



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό
φαρμακούχων ενώσεων σε ιχθυοτροφές, με χρήση τεχνικών
υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτές ορατού υπεριώδους
(UV-VIS), φωτοδιόδων (DAD) και διαδοχικής φασματομετρίας
μαζών (MS/MS)**

**ΙΩΑΝΝΗΣ Δ. ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό φαρμακικών ενώσεων σε ιχθυοτροφές, με χρήση τεχνικών υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτές ορατού υπεριώδους (UV-VIS), φωτοδιόδων (DAD) και διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (MS/MS)

ΙΩΑΝΝΗΣ Δ. ΑΝΑΣΤΑΣΟΠΟΥΛΟΣ

A.M.: 11601

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμαΐδης Νικόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Γκίκας Ευάγγελος, Επίκουρος Καθηγητής ΕΚΠΑ
2. Θωμαΐδης Νικόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ
3. Οικονόμου Αναστάσιος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 24/06/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία έχει ως σκοπό την ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων, για τον προσδιορισμό φαρμακούχων ενώσεων σε ιχθυοτροφές. Συγκεκριμένα αναφέρεται στον προσδιορισμό των ενώσεων : Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη, Σουλφαδιαζίνη και Τριμεθοπρίμη. Στόχος είναι ο προσδιορισμός περιεκτικότητας των πρώτων υλών που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή των ιχθυοτροφών, του τελικού προϊόντος καθώς και της γραμμής καθαρισμού. Για την ανάπτυξη των παραπάνω μεθόδων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική υδροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με ανιχνευτή ορατού / υπεριώδους (HPLC UV/VIS), και ανιχνευτή φωτοδιόδων (DAD). Για τον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης στις γραμμές καθαρισμού, λόγω των πολύ χαμηλών συγκεντρώσεων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική υδροχρωματογραφίας συζευγμένης με φασματομετρία μαζών σε σειρά (LC MS/MS). Το πειραματικό μέρος χωρίζεται σε δύο άξονες. Αρχικά στην ανάπτυξη και βελτιστοποίηση των παραπάνω μεθόδων και έπειτα στην επικύρωσή τους. Συμπερασματικά, για την υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη επικυρώθηκε μια μέθοδος που επιτρέπει τον προσδιορισμό της στην πρώτη ύλη, το τελικό προϊόν καθώς και στην γραμμή καθαρισμού.

Αντίστοιχα και για τις άλλες δύο ενώσεις επικυρώθηκε μια κοινή μέθοδος προσδιορισμού της πρώτης ύλης και του τελικού προϊόντος. Όσο αφορά την γραμμή καθαρισμού για την σουλφαδιαζίνη χρησιμοποιήθηκε η παραπάνω μέθοδος, ενώ για την τριμεθοπρίμη επικυρώθηκε άλλη μέθοδος στο (LC MS/MS).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική Ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη, Σουλφαδιαζίνη, Τριμεθοπρίμη,
HPLC UV/VIS – DAD, LC MS/MS

ABSTRACT

In this thesis, we study the development and validation of analytical methods, for the determination of medicated compounds in fish feeds. Specifically, it relates to the determination of the compounds: Oxytetracycline Hydrochloride, Sulphadiazine and Trimethoprim. The aim is to determine the content of raw materials used for the production of fish feed, the final product and the cleaning line. For the development of the above methods, the high-performance liquid chromatography technique was used with a visible / ultraviolet detector (HPLC UV / VIS) and diode array detector (DAD). To determine the trimethoprim in the purification lines, the liquid chromatography coupled with mass spectrometry (LC MS / MS) was used, because of the very low concentrations. The experimental part is divided into two axes. Initially develop and optimize the above methods and then validate them.

As a result, for oxytetracycline hydrochloride, a method that allows its determination in the raw material, the final product as well as the purification line has been validated.

Similarly, for the other two compounds, a common method for determining the raw material and the final product was validated. As regards the purification line for sulfadiazine, the above method was used, while for the trimethoprim another method was validated in LC MS / MS.

SUBJECT AREA: Pharmaceutical analysis

KEYWORDS: Oxytetracycline hydrochloride, Sulphadiazine, Trimethoprim,
HPLC UV/VIS – DAD, LC MS/MS

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	14
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	15
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	15
1.1 Γενικά για την χορήγηση φαρμάκων στις υδατοκαλλιέργειες	15
1.2 Αντιβιοτικά	16
1.2.1 Κατηγορίες Αντιβιοτικών	17
1.2.2 Τρόποι χορηγήσεις αντιβιοτικών ουσιών	24
1.3 Ενώσεις διπλωματικής εργασίας	26
1.3.1 Σουλφαδιαζίνη.....	27
1.3.2 Τριμεθοπρίμη	29
1.3.3 Οξυτετρακυκλίνη	31
1.3.4 Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες κτηνιατρικών φαρμάκων σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας	33
1.3.5 Συνδυαστική δράση κατά το συνδυασμό χορήγησης σουλφοναμίδων με τριμεθοπρίμη	34
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	35
2.1 Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)	35
2.1.1 Ιστορική Αναδρομή	35
2.1.2 Πεδίο εφαρμογών.....	36
2.1.3 Οργανολογία HPLC.....	36
2.2 Φασματομετρία Μάζας (MS)	40
2.2.1 Ιστορική Αναδρομή	40
2.2.2 Πεδίο Εφαρμογής.....	41
2.2.3 Οργανολογία Φασματόμετρου μαζών	41
2.2.4 Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μαζών	50
2.2.5 Εφαρμογές της σύζευξης των τεχνικών υγροχρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας	54
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	57
3.1 Σκοπός της εργασίας	57
3.2 Υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη	57
3.2.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης για τον προσδιορισμό οξυτετρακυκλίνης σε δείγματα ιχθυοτροφών	63
3.3 Σουλφαδιαζίνη – Τριμεθοπρίμη	65
3.3.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης για τον προσδιορισμό σουλφαδιαζίνη και τριμεθοπρίμης σε δείγματα ιχθυοτροφών	67
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ – ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ	69
4.1 Αντιδραστήρια - Οργανολογία	69
4.1.1 Αντιδραστήρια	69
4.1.2 Πρότυπες Ουσίες	69
4.1.3 Εργαστηριακός Εξοπλισμός.....	70
4.2 Βελτιστοποίηση Μεθόδου	71
4.2.1 Βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο εκχύλισης	71
4.2.2 Βελτιστοποίηση ως προς την ζύγιση του δείγματος	72
4.2.3 Βελτιστοποίηση ως προς το διαλύτη εκχύλισης	73
4.2.4 Βελτιστοποίηση ως προς το μέσο εκχύλισης και την τελική αραίωση.....	74
4.2.5 Βελτιστοποίηση ως προς την αναλογία των διαλυτών εκχύλισης	75
4.2.6 Προτεινόμενη μέθοδος για επικύρωση.....	77

4.3	Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης και	
	τριμεθοπρίνης	81
4.3.1	Εισαγωγή	81
4.3.2	Ειδικότητα (Specificity)	82
4.3.3	Γραμμικότητα (Linearity)	83
4.3.4	Ακρίβεια (Accuracy)	86
4.3.5	Πιστότητα (Precision)	87
4.3.6	Όριο Ανίχνευσης LOD και όριο ποσοτικοποίησης LOQ	90
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΗ ΟΞΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ	95
5.1	Αντιδραστήρια – Οργανολογία.....	95
5.1.1	Αντιδραστήρια	95
5.1.2	Πρότυπες ουσίες	96
5.1.3	Εργαστηριακός εξοπλισμός	96
5.2	Βελτιστοποίηση μεθόδου	97
5.2.1	Βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο και ως προς το μέσο εκχύλισης – στάδιο 1 ^ο	97
5.2.2	Βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο και ως προς το μέσο εκχύλισης – στάδιο 2 ^ο	98
5.2.3	Βελτιστοποίηση ως προς την ζύγιση του δείγματος.....	99
5.2.4	Προτεινόμενη μέθοδος για επικύρωση.....	99
5.3	Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της Οξυτετρακυκλίνης	102
5.3.1	Ειδικότητα (Specificity)	102
5.3.2	Γραμμικότητα (Linearity)	102
5.3.3	Ακρίβεια (Accuracy)	104
5.3.4	Πιστότητα (Precision)	105
5.3.5	Όριο Ανίχνευσης LOD και όριο ποσοτικοποίησης LOQ	108
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	109
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	111
	Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια.....	113
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ.....	115

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Χημική Δομή Αμοξυκιλλίνης (5).....	18
Σχήμα 2: Χημική δομή Χλωροφαινικόλης (9).....	19
Σχήμα 3: Χημική δομή Οξολινικού Οξέος (12).....	20
Σχήμα 4: Χημική δομή Φλουμεκίνης (12)	21
Σχήμα 5: Χημική δομή Ναλιδιξικού Οξέος (12).....	21
Σχήμα 6: Χημική δομή Πυραμιδικού Οξέος (12).....	21
Σχήμα 7: Χημική δομή Σουλφαδιαζίνης (19).....	27
Σχήμα 8: Οδοί μεταβολισμού για την Σουλφαδιαζίνη (20)	29
Σχήμα 9: Χημική δομή Τριμεθοπρίμης (19).....	30
Σχήμα 10: Χημική δομή της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης.....	31
Σχήμα 11: Σχηματική παράσταση μιας διάταξης HPLC (26).....	37
Σχήμα 12: Γενική περιγραφή της πορείας ενός μορίου αναλύτη κατά την διαδικασία MS (29)...	42
Σχήμα 13: Σχηματικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου μάζας (30)	42
Σχήμα 14: Σχηματικό διάγραμμα τεχνικής ιονισμού ESI (31).....	47
Σχήμα 15: Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή μαζών (32).....	48
Σχήμα 16: Σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετράπολου (QQQ) (33).....	51
Σχήμα 17: Σχηματικό διάγραμμα των τεσσάρων τεχνικών σάρωσης (33)	53
Σχήμα 18: Καμπύλες αναφοράς για βελτιστοποίηση ως προς τον διαλύτη εκχύλισης	74
Σχήμα 19: Ανακτήσεις με αλλαγή στους διαλύτες αραίωσης	75
Σχήμα 20: Ανακτήσεις με βάση τον διαλύτη εκχύλισης	76
Σχήμα 21: Συγκεντρώσεις με βάση τον διαλύτη εκχύλισης.....	76
Σχήμα 22: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος τριμεθοπρίμης.....	80
Σχήμα 23: Χρωματογράφημα διαλύτη	82
Σχήμα 24: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης – τριμεθοπρίμης	82
Σχήμα 25: Διάγραμμα Γραμμικότητας για την σουλφαδιαζίνη	85
Σχήμα 26: Διάγραμμα υπολοίπων για την σουλφαδιαζίνη	85
Σχήμα 27: Διάγραμμα γραμμικότητας για την τριμεθοπρίμη.....	85
Σχήμα 28: Διάγραμμα υπολοίπων για την τριμεθοπρίμη	85
Σχήμα 29: Βελτιστοποίηση ως προς χρόνο και μέσο εκχύλισης.....	98
Σχήμα 30: Βελτιστοποίηση ως προς χρόνο και μέσο εκχύλισης.....	99
Σχήμα 31: Χρωματογράφημα διαλύτη οξυτετρακυκλίνης.....	102
Σχήμα 32: Χρωματογράφημα δείγματος οξυτετρακυκλίνης	102
Σχήμα 33: Διάγραμμα γραμμικότητας οξυτετρακυκλίνης	104
Σχήμα 34: Διάγραμμα υπολοίπων οξυτετρακυκλίνης.....	104

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες Σουλφαδιαζίνης.....	27
Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες Τριμεθοπρίμης	30
Πίνακας 3: Φυσικοχημικές ιδιότητες Οξυτετρακυκλίνης	32
Πίνακας 4: Τεχνικές ιονισμού στη φασματομετρία μάζας (26)	45
Πίνακας 5: Συνδυασμοί αναλυτικών παραγόντων χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό της οξυτετρακυκλίνης (41)	59
Πίνακας 6: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για την οξυτετρακυκλίνη	64
Πίνακας 7: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για το προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης - τριμεθοπρίμης	68
Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάκτησης στην βελτιστοποίηση του χρόνου	72
Πίνακας 9: Βελτιστοποίηση ως προς το μέσο εκχύλισης	74
Πίνακας 10: Βελτιστοποίηση ως προς την αναλογία του μέσου εκχύλισης	75
Πίνακας 11: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.....	78
Πίνακας 12: Πρόγραμμα βαθμιδωτής εκλούσης LC MS-MS.....	79
Πίνακας 13: Πίνακας θραυσμάτων.....	79
Πίνακας 14: Αραιώσεις διαλυμάτων για τον έλεγχο γραμμικότητας	84
Πίνακας 15: Αποτελέσματα γραμμικότητας	84
Πίνακας 16: Πίνακας αποτελεσμάτων ακρίβειας	87
Πίνακας 17: Πίνακας αποτελεσμάτων πιστότητας A ύλης	88
Πίνακας 18: Πίνακας αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας	89
Πίνακας 19: Πίνακας αποτελεσμάτων ενδιάμεσης πιστότητας	90
Πίνακας 20: Σουλφαδιαζίνη – Τριμεθοπρίμη Όριο Ανίχνευσης – Ποσοτικοποίησης	93
Πίνακας 21: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης οξυτετρακυκλίνης	101
Πίνακας 22: Αραιώσεις διαλυμάτων για τον έλεγχο γραμμικότητας οξυτετρακυκλίνης	103
Πίνακας 23: Αποτελέσματα γραμμικότητας οξυτετρακυκλίνης.....	103
Πίνακας 24: Πίνακας αποτελεσμάτων ακρίβειας οξυτετρακυκλίνης.....	105
Πίνακας 25: Πίνακας αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας οξυτετρακυκλίνης	106
Πίνακας 26: Πίνακας αποτελεσμάτων ενδιάμεσης πιστότητας οξυτετρακυκλίνης	107
Πίνακας 27: Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη Όριο Ανίχνευσης – Ποσοτικοποίησης	108

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία « Ανάπτυξη και επικύρωση αναλυτικών μεθόδων για τον προσδιορισμό φαρμακικών ενώσεων σε ιχθυοτροφές, με τη χρήση των τεχνικών υγροχρωματογραφίας με ανιχνευτές ορατού υπεριώδους, φωτοδιόδων (HPLC UV-VIS, DAD) και διαδοχικής φασματομετρίας μαζών (LC-MS/MS)» διεκπεραιώθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας υπό την επίβλεψη του καθηγητή του τμήματος κ. Νικόλαου Σ. Θωμαΐδη.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου για την αμέριστη συμπαράσταση του, τις πολύτιμες συμβουλές του, την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής της διπλωματικής εργασίας, καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας. Επίσης, ευχαριστώ θερμά τα μέλη της τριμελούς, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή της παρούσας εργασίας και για το χρόνο που διέθεσαν για την διόρθωσή της. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω από καρδιάς όλα τα παιδιά από την ερευνητική ομάδα του κύριου Θωμαΐδη, τόσο για την συνεργασία μας σε επιστημονικό επίπεδο, όσο και για τη σχέση που δημιουργήσαμε σε προσωπικό επίπεδο εντός και εκτός εργαστηρίου.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ θα ήθελα να εκφράσω στον άνθρωπο που ήταν δίπλα μου, καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, τον διδάκτορα του τμήματος χημείας, Μάριο Κωστάκη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω πάνω και πέρα από όλους την οικογένεια μου και όλους τους δικούς μου ανθρώπους για την αμέριστη βοήθεια και κατανόησή τους καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών αλλά και της ζωής μου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Γενικά για την χορήγηση φαρμάκων στις υδατοκαλλιέργειες

Η υδατοκαλλιέργεια είναι μια αναπτυσσόμενη αγροτική βιομηχανία. Έχει αυξηθεί ταχύτερα από την αλιεία ή τη χερσαία παραγωγή ζωοτροφών. Η υδατοκαλλιέργεια αποτελεί σημαντικό συστατικό του παγκόσμιου εφοδιασμού σε τρόφιμα τόσο στις ανεπτυγμένες όσο και στις αναπτυσσόμενες χώρες. Τα τελευταία χρόνια, τα ψάρια έχουν αναγνωρισθεί ευρέως ως μια εξαιρετικά θρεπτική πηγή πρωτεΐνης, περιέχουν τα απαραίτητα λιπαρά οξέα καθώς και μικροθρεπτικά συστατικά και μέταλλα. Τα ψάρια μπορούν να έχουν σημαντικό θετικό αντίκτυπο στη βελτίωση της ποιότητας της πρωτεΐνης, συμπληρώνοντας τα απαραίτητα αμινοξέα που συχνά υπάρχουν σε μικρές ποσότητες σε δίαιτες με φυτικές ίνες.

Είναι γνωστό ότι η χρήση αντιβιοτικών σε ζώα τροφίμων είναι παγκόσμιας σημασίας και το πρόβλημα έχει πρόσφατα επανεμφανιστεί στην υδατοκαλλιέργεια. Ωστόσο, παρά τους ελέγχους και τους κανονισμούς που θεσπίστηκαν από τις κυβερνήσεις για την πρόληψη των περιβαλλοντικών κινδύνων σε πολλές χώρες, η αντιμικροβιακή αντοχή και η τοξικότητα αυξάνονται.

Η υδατοκαλλιέργεια ορίζεται ως η παραγωγή ορισμένων ειδών, υδρόβιων ζώων και φυτών εντός περιορισμένων συστημάτων σε υδάτινα περιβάλλοντα. Η καλλιέργεια ζώων και φυτών σε υδάτινα περιβάλλοντα διαφέρει σημαντικά από την καλλιέργεια των ζώων σε επίγεια περιβάλλοντα. Η χορήγηση φαρμάκων και χημικών ουσιών έμμεσα στο νερό της καλλιέργειας επηρεάζει την ταχύτητα και την έκταση της έκθεσης οργανισμών που δεν αποτελούν στόχο όπως τα άλλα σπονδυλωτά, τα φύκια, τα ασπόνδυλα και τα βακτήρια, σε αντίθεση με την άμεση χορήγηση φαρμάκων και χημικών ουσιών σε σχέση με τη χερσαία καλλιέργεια (1).

1.2 Αντιβιοτικά

Η λέξη αντιβιοτικό σημαίνει κυριολεκτικά ουσία «κατά της ζωής» (των βακτηρίων). Τα αντιβιοτικά ανήκουν σε μια μεγαλύτερη κατηγορία ενώσεων, οι οποίες καλούνται «αντιμικροβιακά» και περιλαμβάνουν φάρμακα, όπως η πενικιλίνη, η τετρακυκλίνη και η αμοξικιλίνη. Αυτά τα φάρμακα χρησιμοποιούνται για να σκοτώνουν βακτήρια χωρίς να προκαλούν βλάβη στον ξενιστή και δύνανται να είναι φυσικής, ημισυνθετικής ή συνθετικής προέλευσης.

Τα αντιβιοτικά ανακαλύφθηκαν στην αρχή του προηγούμενου αιώνα. Παραδοσιακά τα αντιβιοτικά λαμβάνονται από φυσικές πηγές. Οι άνθρωποι γνώριζαν ανέκαθεν ότι κάποιες ουσίες, όπως για παράδειγμα το ελαιόλαδο, το ξύδι και το αλάτι, συντελούν στην επούλωση των πληγών. Η σύγχρονη επιστήμη γνωρίζει πως οι ουσίες αυτές, για διαφορετικούς λόγους η κάθε μια, εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση. Η συστηματική γνώση των αντιβιοτικών είναι μια σύγχρονη κατάκτηση, που ξεκίνησε από ένα τυχαίο συμβάν. Ο Βρετανός επιστήμονας Flemming παρατήρησε εντελώς τυχαία, πως κάποιες καλλιέργειες μικροβίων καταστρέφονταν όταν έρχονταν σε επαφή με μύκητες του γένους *Penicillium*. Την παρατήρηση αυτή ο Flemming μετέτρεψε σε επιστημονική επανάσταση. Απέδωσε την καταστροφή των μικροβιακών καλλιεργειών σε ουσίες που παράγουν οι μύκητες αυτοί. Σε λίγο καιρό, η πενικιλίνη, το πρώτο αντιβιοτικό, αναδύθηκε.

Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης άνοιξε ο δρόμος και για άλλα αντιβιοτικά. Το 1944 ανακαλύφθηκε το αντιβιοτικό στρεπτομυκίνη. Μελέτες που ακολούθησαν οδήγησαν στην ανακάλυψη πλήθους αντιβιοτικών, όπως η ακτινομυκίνη, η στρεπτοθρικίνη και η νεομυκίνη, όλα παράγωγα του γένους των βακτηρίων *Streptomyces*. Άλλα αντιβιοτικά που ανακαλύφθηκαν από τότε είναι η βακιτρακίνη, η χλωραμοφενικόλη και οι τετρακυκλίνες. Από το 1970, τα περισσότερα νέα αντιβιοτικά είναι συνθετικά προερχόμενα από χημικές μετατροπές φυσικών αντιβιοτικών. Σήμερα υπάρχουν αντιβιοτικά, όπως οι φθοροκινολόνες, που είναι εξ ολοκλήρου συνθετικά. Έχουν περάσει χρόνια από την έναρξη της εφαρμογής τους και τα αντιβιοτικά έχουν αυξηθεί σε ποικιλία και σε αριθμό (2).

1.2.1 Κατηγορίες Αντιβιοτικών

1.2.1.1 Μακρολίδια

Τα μακρολίδια είναι αντιβιοτικά που δρουν κυρίως κατά Gram-θετικών βακτηριδίων. Το αντιμικροβιακό φάσμα των μακρολιδίων είναι ελαφρώς πλατύτερο από αυτό της πενικιλίνης. Επομένως, είναι κοινά υποκατάστατα της πενικιλίνης. Σε αντίθεση με την πενικιλίνη, τα μακρολίδια έχουν αποδειχθεί ότι είναι αποτελεσματικά κατά του μυκοπλάσματος, των μυκοβακτηρίων, των χλαμύδιων και των ρικετσιών. Ο μηχανισμός δράσης των μακρολιδίων είναι η αναστολή της βιοσύνθεσης των βακτηριδιακών πρωτεϊνών, πιστεύεται ότι εμποδίζουν την πεπτιδυλο-τρανσφεράση από την προσθήκη του πεπτιδυλίου που συνδέεται με το tRNA στο επόμενο αμινοξύ (με παρόμοιο τρόπο με τη χλωραμφενικόλη), καθώς επίσης και την αναστολή της ριβοσωματικής μετατόπισης. Ένας άλλος πιθανός μηχανισμός είναι η πρόωρη διάσπαση του πεπτιδυλ-tRNA από το ριβόσωμα. Δεδομένου ότι η πλειοψηφία των βακτηριακών παθογόνων μικροοργανισμών των ψαριών είναι κατά Gram-αρνητικά, η χρήση μακρολιδίων είναι περιορισμένη και συγκεκριμένη. Μόνο τρία χρησιμοποιούνται σε οποιαδήποτε έκταση στην υδατοκαλλιέργεια: ερυθρομυκίνη, σπιραμυκίνη και ζοσαμυκίνη (3).

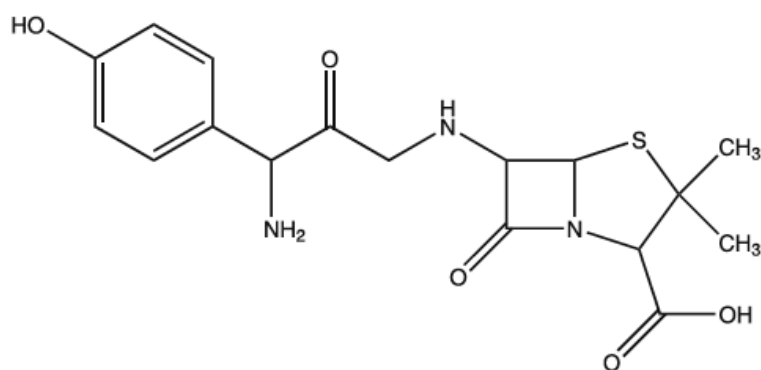
1.2.1.2 Τετρακυκλίνες

Οι τετρακυκλίνες είναι αντιμικροβιακά ευρέος φάσματος εναντίον κατά Gram-θετικών και Gram-αρνητικών μικροοργανισμών. Η τετρακυκλίνη, η χλωροτετρακυκλίνη και η οξυτετρακυκλίνη (OTC) είναι προϊόντα που απαντώνται στη φύση και υπάρχουν αρκετά ημισυνθετικά παράγωγά τους. Τα αντιμικροβιακά της τετρακυκλίνης είναι αναστολείς της πρωτεϊνικής σύνθεσης, οι οποίοι αναστέλλουν τη δέσμευση του αμινοακυλο-tRNA στο σύμπλοκο mRNA-ριβοσώματος. Δύο από τις φυσικές τετρακυκλίνες, OTC και χλωροτετρακυκλίνη, έχουν χρησιμοποιηθεί στην υδατοκαλλιέργεια: η OTC, η οποία έχει χρησιμοποιηθεί ως φάρμακο πρώτης επιλογής για σχεδόν όλες τις βακτηριακές ασθένειες των ψαριών, δεν είναι μόνο ευρέως διαθέσιμη αλλά και φθηνότερη από άλλα αντιβακτηριακά φάρμακα ευρέος φάσματος. Αυτή η ευρεία χρήση στη βιομηχανία της υδατοκαλλιέργειας, έχει οδηγήσει σε βακτηριακή αντοχή.

Το μειονέκτημα της ΟΤC είναι η χαμηλή βιοδιαθεσιμότητά του σε όλα τα ψάρια. Ο βαθμός στον οποίο έχει χρησιμοποιηθεί η ΟΤC είναι αξιοσημείωτο δεδομένου ότι ο σχηματισμός συμπλόκου με ιόντα Ca^{2+} και Mg^{2+} το καθιστά γενικά ακατάλληλο αντιμικροβιακό για τα ψάρια. Στα θαλάσσια ψάρια, τα κατιόντα είναι μια απαίτηση για οσμωγραιμία. Τα ψάρια κατά συνέπεια πίνουν συνεχώς, και ως εκ τούτου το περιεχόμενο των τροφικών τους οδών τροποποιείται από το θαλάσσιο νερό. Σε αυτό το μέσο, η τάση της ΟΤC να σχηματίζει σύμπλοκα δημιουργεί μια απαίτηση για υψηλές δόσεις και επιδεινώνει τη χαμηλή βιοδιαθεσιμότητα. Δεδομένου ότι το φάρμακο δεν μεταβολίζεται σχεδόν καθόλου από τα ψάρια, ουσιαστικά ολόκληρη η δόση αποβάλλεται στο περιβάλλον. Η επίδραση είναι ασθενέστερη στα γλυκά νερά παρά στο θαλασσινό νερό όχι μόνο λόγω των χαμηλότερων συγκεντρώσεων των κατιόντων που υπάρχουν, αλλά και επειδή τα ψάρια του γλυκού νερού δεν πίνουν (4).

1.2.1.3 β-Λακτάμες

Τα αντιβιοτικά β-λακτάμης, όπως η Αμοξικιλίνη (Σχήμα 1) παρεμβαίνουν στην σύνδεση ενζύμων (τρανσπεπτιδάσες και καρβοξυτεπτιδάσες) του κυτταρικού τοιχώματος στα ενεργά αναπτυσσόμενα βακτήρια. Η δραστηριότητα των β-λακταμών εξαρτάται από τη συγγένειά τους με τους στόχους και τη σταθερότητα τους (5,6).



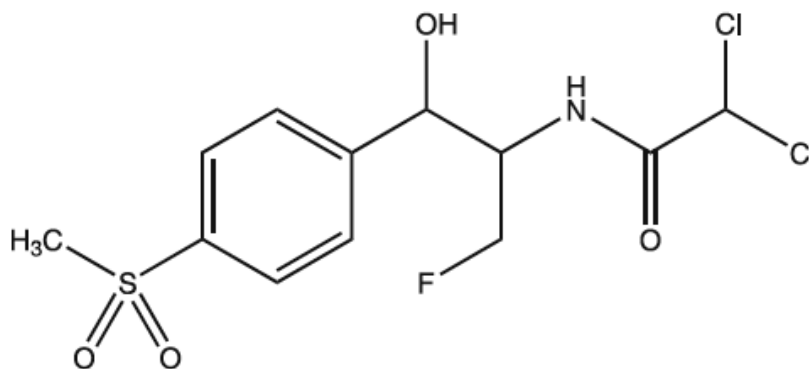
Σχήμα 1: Χημική Δομή Αμοξικιλίνης (5)

Η αμοξικιλίνη χρησιμοποιείται συνήθως για τον έλεγχο της φουρουκώσεως των σαλμονιδών που προκαλείται από το βακτήριο *Aeromonas sp.* Χορηγείται από το στόμα σε δόση $80-160 \text{ mg kg bw}^{-1} \text{ d}^{-1}$, για μια τυπική περίοδο 10 ημερών (7). Οι περιβαλλοντικές ανησυχίες όσον αφορά την ανθεκτικότητα της ομάδας

της β-λακτάμης των αντιβιοτικών είναι ελάχιστες. Οι β-λακτάμες είναι ευαίσθητες ως προς τη βιολογική και φυσικοχημική οξειδωση στο περιβάλλον δεδομένου ότι είναι μεταβολίτες φυσικής προέλευσης με συνθετική βάση αμινοξέων.

1.2.1.4 Φαινόλες

Η χλωροφαινικόλη δρα ως αντιβιοτικό ευρέος φάσματος κατά των Gram-θετικών και Gram-αρνητικών βακτηρίων, με δέσμευση τους στην ριβοσωματική υπομονάδα 50S για πρόληψη της πρωτεϊνικής σύνθεσης (8). Η φθοροφαινικόλη έχει ένα άτομο φθορίου αντί της υδροξυλικής ομάδας που βρίσκεται στον τρίτο άνθρακα που παρατηρείται στη δομή της χλωροφαινικόλης (Σχήμα 2) και της θειαμφενικόλης (9).



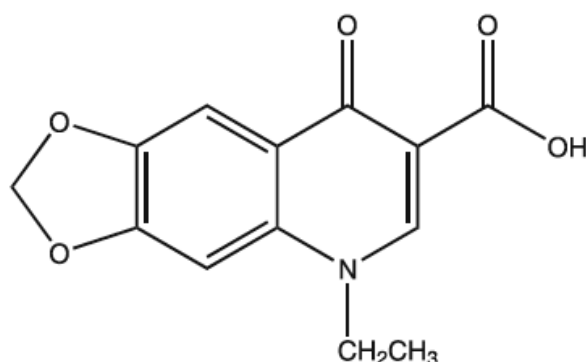
Σχήμα 2: Χημική δομή Χλωροφαινικόλης (9)

Αυτή η δομική αλλαγή καθιστά την φθοροφαινικόλη λιγότερο ευαίσθητη στην απενεργοποίηση της από βακτηρίδια με ακετυλίωση του τρίτου άνθρακα του πλάσματος και εμποδίζει την αλληλεπίδραση με βακτηριακά ριβοσώματα. Η χλωροφαινικόλη χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της φουρουλκώσεως στον σολομό που προκαλείται από το βακτήριο *Aeromonas salmonicida*. Οι περίοδοι έκθεσης είναι συνήθως 10 ημέρες σε συγκεντρώσεις των 10 mg kg bw⁻¹ d⁻¹, χωρίς εμφανείς ανεπιθύμητες ενέργειες σε ποσότητα 10 φορές μεγαλύτερη από την κανονική δόση για περίοδο θεραπείας 10 ημερών. Η περίοδος παρακράτησής της είναι 12 ημέρες, 150 ημέρες, ή 30 ημέρες για τον Καναδά, το Ηνωμένο Βασίλειο, και τη Νορβηγία, αντίστοιχα. Ο χρόνος που χρειάζεται ο σολομός στον Καναδά για να αποβάλλει αυτό το αντιβιοτικό είναι 12 ημέρες, ωστόσο η θερμοκρασία του νερού πρέπει να είναι πάνω από 5 °C. Η

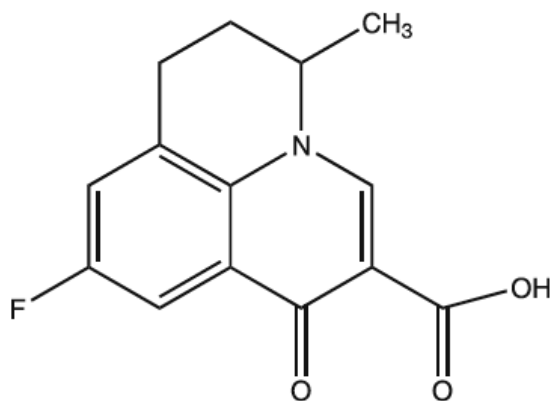
προσρόφηση της φθοροφαινικόλης στο σολομό είναι 96,5% με δόση 10 mg kg⁻¹ σε θερμοκρασίες νερού 10,8 ± 1,5 °C. Η φθοροφαινικόλη διανέμεται σε όλους τους ιστούς και τα όργανα του σολομού σε δόση 10 mg kg bw⁻¹ d⁻¹ όταν η θερμοκρασία του νερού είναι 8,5-11,5 °C. Οι συγκεντρώσεις χλωροφαινικόλης στους μυς είναι παρόμοιες με αυτές στο αίμα και τον ορό, ενώ οι κεντρικοί νευρικοί και λιπώδεις ιστοί έχουν χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Μόνο το 25% της συγκέντρωσης του ορού βρίσκεται στον εγκέφαλο. Ο χρόνος ημιζωής της φθοροφαινικόλης όταν χορηγήθηκε ενδοφλεβίως ήταν 12,2 ώρες σε νερό θερμοκρασίας 10,8 ± 1,5 °C. Η χλωροφαινικόλη καταβυθίζεται σε ίζημα με χρόνο ημιζωής 4,5 ημέρες και εμφανίζει χαμηλή τοξικότητα στους υδρόβιους οργανισμούς. Υπάρχει χαμηλή βακτηριακή αντοχή στην φθοροφαινικόλη και συνεπώς δεν παρουσιάζεται σοβαρή περιβαλλοντική ανησυχία όσον αφορά την παραμονή της στο περιβάλλον (8,10,11).

1.2.1.5 4-Κινολόνες

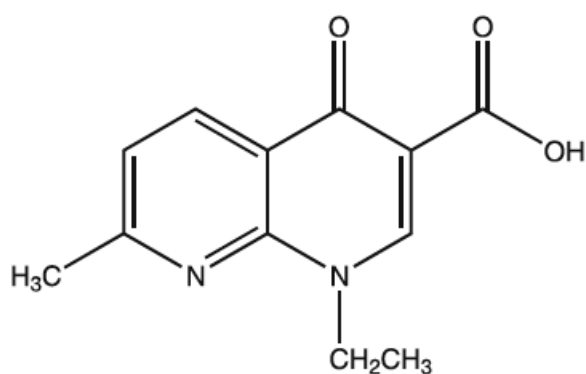
Οι 4-κινολόνες είναι μια σχετικά νέα ομάδα αντιβιοτικών που είναι κατά κύριο λόγο δραστικά κατά των Gram-αρνητικών βακτηριδίων. Ωστόσο, μελλοντικά μπορεί να αναπτυχθούν κινολόνες οι οποίες να είναι αποτελεσματικές και κατά των Gram-θετικών βακτηρίων, των αναερόβιων βακτηρίων και μερικών πρωτοζώων. Τέσσερις κινολόνες είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας Οξολινικό οξύ (Σχήμα 3), Φλουμεκίνη (Σχήμα 4), Ναλιδιξικό οξύ (Σχήμα 5) και Πυραμιδικό οξύ (Σχήμα 6).



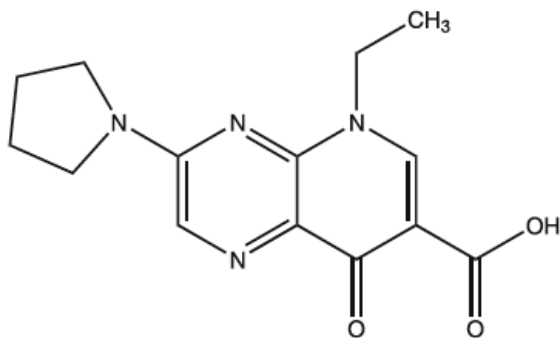
Σχήμα 3: Χημική δομή Οξολινικού Οξέος (12)



Σχήμα 4: Χημική δομή Φλουμεκίνης (12)



Σχήμα 5: Χημική δομή Ναλιδιξικού Οξέος (12)



Σχήμα 6: Χημική δομή Πυραμιδικού Οξέος (12)

Οι 4-κινολόνες είναι δραστικές έναντι της βακτηριακής DNA γυράσης που δρα με την αναστολή της υπερέκλυσης του βακτηριακού DNA. Η περίοδος παρακράτησης για αυτήν την ομάδα αντιβιοτικών, κυρίως για το οξολινικό οξύ, είναι 500 ημέρες στο Ηνωμένο Βασίλειο και άνω των 80 ημερών σε λιγότερο από 8 °C, 40-60 ημέρες σε 8-12 °C και 40 ημέρες σε περισσότερο από 12 °C στη Νορβηγία. Οι 4-κινολόνες είναι νέα αντιβιοτικά που έχουν υψηλή

αποτελεσματικότητα και σχετικά χαμηλή τοξικότητα. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις δεν είναι ευαίσθητες σε ενζυματική αποικοδόμηση ή μετασχηματισμό. Επομένως, αυτά τα αντιβιοτικά έχουν τη δυνατότητα να συσσωρεύονται σε υδάτινα περιβάλλοντα. Οι 4-κινολόνες είναι ευαίσθητες σε φωτόλυση, ωστόσο, αυτό θα μειωνόταν σε ένα κλουβί ψαριών παρουσία των υψηλών αιωρούμενων σωματιδιακών φορτίων ή των διαλυμένων οργανικών ουσιών (13). Επιπλέον, δεδομένου της ικανότητας αυτών των μορίων να συνδέονται εύκολα με σωματίδια και να καθιζάνουν, συσσωρεύεται σε ιζήματα, με αποτέλεσμα η πιθανότητα της φωτολύσεως να είναι μικρή (14).

1.2.1.6 Σουλφοναμίδες

Τα σουλφοναμίδια είναι μια μεγάλη κατηγορία αντιβιοτικών τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες για τον έλεγχο της δοθιήνωσης (*Aeromonas salmonicida*), της ασθένειας Red mouth (*Yersinia ruckeri*) και της ίνωσης (*Vibrio spp.*, *Cytophaga spp.*, *Flexibacterspp.*) (15). Το πιο διαδεδομένο ενισχυμένο σουλφοναμίδιο είναι το Tribissen (σουλφαδιαζίνη: τριμεθοπρίμη σε αναλογία 5:1). Το Tribissen αναστέλλει τη διϋδροφολική αναγωγή ενώ άλλα σουλφοναμίδια, όπως η σουλφαδιαζίνη, αναστέλλουν τη συνθετάση των διυδροπτεροτικών. Και τα δύο ένζυμα εμπλέκονται στη διαδικασία σύνθεσης του φολικού οξέος. Αυτά τα αντιβιοτικά χορηγούνται στα ψάρια και τα μαλάκια στα εκκολαπτήρια ως θεραπείες λουτρού. Η συνήθης δόση για το Tribissen είναι 30-75 mg kg bw⁻¹ d⁻¹ για 5-10 ημέρες. Η κατακράτηση για αυτούς τους τύπους αντιβιοτικών είναι 350-500 ημέρες στο Ηνωμένο Βασίλειο και 40-90 ημέρες στη Νορβηγία και εξαρτάται από τη θερμοκρασία. Οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις της απελευθέρωσης αυτού του τύπου αντιβιοτικού στο περιβάλλον είναι άγνωστες.

1.2.1.7 Πενικιλίνες

Οι πενικιλίνες είναι μια ομάδα αντιμικροβιακών που προέρχονται από την ομάδα μυκήτων *Penicillium* και είναι μέλη της οικογένειας των αντιβιοτικών της β-λακτάμης. Τα αντιβιοτικά της β-λακτάμης, όπως προαναφέρθηκε, δρουν παρεμποδίζοντας την εγκάρσια σύνδεση της πεπτιδογλυκάνης στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα. Οι κεφαλοσπορίνες, οι οποίες ανήκουν επίσης στην οικογένεια της β-λακτάμης, δεν χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια. Η

πενικιλίνη είναι αποτελεσματική σε συνδυασμό με αμινογλυκοσίδες επειδή η αναστολή της σύνθεσης της πεπτιδογλυκάνης επιτρέπει στους αμινογλυκοζίτες να διεισδύσουν ευκολότερα στο βακτηριακό κυτταρικό τοίχωμα και με αυτό τον τρόπο να προκληθεί η διάσπαση της βακτηριακής πρωτεϊνικής σύνθεσης εντός του κυττάρου. Αυτό οδηγεί σε χαμηλότερα ποσοστά συγκέντρωσης βακτηριακού πληθυσμού στους πιο ευαίσθητους οργανισμούς. Οι πενικιλίνες είναι ευαίσθητες στην υδρόλυση από βακτηριακά ένζυμα βητα-λακταμάσης, αλλά μπορεί να επιτευχθεί ενίσχυση με προσθήκη αναστολέων βητα-λακταμάσης, κυρίως κλαβουλανικού οξέος.

Η βενζυλοπενικιλίνη (πενικιλίνη G) είναι ένα φυσικό αντιμικροβιακό που παράγεται από το μύκητα *Penicillium notatum*. Έχει ένα στενό φάσμα δράσης, κυρίως κατά των Gram-θετικών βακτηριδίων, και ως εκ τούτου δεν έχει μεγάλη χρησιμότητα στην υδατοκαλλιέργεια. Άλλα ημισυνθετικά ήδη πενικιλίνων, η αμπικιλίνη και η αμοξικιλίνη, έχουν παρόμοια φάσματα δραστηριότητας που είναι ευρύτερη από εκείνη της βενζυλοπενικιλίνης και χρησιμοποιούνται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια. Δεν σχηματίζονται σύμπλοκα με δισθενή κατιόντα και συνεπώς ο λόγος κόστους / οφέλους τους, σε σύγκριση με τα OTC, είναι καλύτερος στο θαλάσσιο νερό παρά σε γλυκά νερά. Αυτά τα ημισυνθετικά ήδη πενικιλίνων χρησιμοποιούνται στα περισσότερα είδη εκτρεφόμενων ψαριών (12).

1.2.1.8 Νιτροφουράνια

Τα νιτροφουράνια είναι συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες με ένα ευρύ φάσμα που καλύπτει όχι μόνο τα Gram-θετικά και Gram-αρνητικά βακτήρια, αλλά και αρκετούς τύπους παρασιτικών πρωτοζώων. Είναι συνήθως βακτηριοστατικά αλλά μπορεί και να δράσουν ως βακτηριοκτόνα σε υψηλές δόσεις. Αν και οι ανεπιθύμητες ενέργειες είναι σπάνιες, μπορεί να προκληθεί σε υψηλές δόσεις πνευμονική τοξικότητα. Επιπλέον, παρατεταμένη έκθεση σε νιτροφουράνια σε συνδυασμό με παρουσία πράσινου μαλαχίτη και μοβ γεντιανής μπορεί να παρουσιάσει καρκινογόνο δράση στα πειραματόζωα. Τα δύο συχνότερα χρησιμοποιούμενα νιτροφουράνια σε υδρόβια φάρμακα είναι η φουραζολιδόνη και η νιφουρσιρινόλη. Η φουραζολιδόνη απορροφάται καλά από τα ψάρια και χορηγείται κανονικά στην τροφή, σε αντίθεση με τα περισσότερα νιτροφουράνια, τα οποία απορροφώντας ελάχιστα από το

γαστρεντερικό σωλήνα. Επιπλέον, η νιτροφουραντοΐνη, που απορροφάται αλλά αποβάλλεται αμέσως, είναι χρήσιμη για τη θεραπεία των λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και έχει μελετηθεί για τη χρήση αυτή (16-18).

1.2.2 Τρόποι χορηγήσεις αντιβιοτικών ουσιών

Οι δύο συνηθέστεροι οδοί για τη χορήγηση αντιμικροβιακών ουσιών στην υδατοκαλλιέργεια είναι η φαρμακευτική αγωγή στο νερό και η φαρμακευτική τροφή, ενώ υπάρχουν ακόμα τρεις τρόποι χορήγησης, οι οποίοι αναφέρονται παρακάτω αναλυτικά.

1.2.2.1 Χορήγηση στο νερό

Η διατροφή των ψαριών μέσω του νερού που ζουν είναι η πιο κοινή και παραδοσιακή μέθοδος διαχείρισης. Η θεραπεία εμβάπτισης χρησιμοποιείται συνήθως για προβλήματα που αφορούν τα εκτοπαράσιτα και χρησιμοποιείται περιστασιακά για τη θεραπεία βακτηριακών ασθενειών όταν τα ψάρια βρίσκονται σε νεανικά στάδια. Ωστόσο, τα εκκολαπτήρια της γης και τα συστήματα δεξαμενών, ειδικά τα εκκολαπτήρια για θαλάσσια ψάρια και καρκινοειδή, χρησιμοποιούν επίσης αντιμικροβιακά λουτρά. Το φάρμακο για το νερό είναι μια απλή μέθοδος, στην οποία πρέπει να είναι γνωστός μόνο ο όγκος του νερού για τον υπολογισμό της τελικής συγκέντρωσης του φαρμάκου. Συνήθως συνιστάται για φάρμακα χαμηλού μοριακού βάρους που μπορούν να διανεμηθούν σε όλο το νερό. Τα κατανεμημένα φάρμακα απορροφώνται από τα ψάρια μέσω των επιθήλιων των βρόγχων, του δέρματος και του βλεννογόνου, και σκοτώνουν επίσης παθογόνους παράγοντες που ζουν ελεύθερα στο νερό. Εκτός από την απλότητα του, το άλλο πλεονέκτημα της φαρμακευτικής αγωγής μέσω του νερού είναι ότι ένας μεγάλος αριθμός ψαριών μπορεί να ιαθεί ταυτόχρονα.

Ο ρυθμός απορρόφησης, ωστόσο, ποικίλλει από φάρμακο σε φάρμακο. Γενικά, οι λιπόφιλες ενώσεις διαχέονται στις μεμβράνες των ψαριών, αλλά οι ιονικές ενώσεις με μεγάλα μοριακά βάρη δεν διαχέονται. Ο ρυθμός απορρόφησης ποικίλει επίσης μεταξύ των ειδών ψαριών. Αυτά τα μειονεκτήματα σημαίνουν ότι η μέθοδος είναι δαπανηρή. Επιπλέον, η φαρμακευτική αγωγή με χορήγηση στο νερό έχει ως αποτέλεσμα ανεπιθύμητη έκθεση του περιβάλλοντος στα φάρμακα. Σε μια προσπάθεια να ξεπεραστούν αυτά τα μειονεκτήματα,

μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικές μέθοδοι χορήγησης στο νερ'πι, περιλαμβανομένης της εμβάπτισης, έκπλυσης και επεξεργασίας λουτρού (12).

1.2.2.2 Χορήγηση μέσω ιχθυοτροφών

Οι φαρμακευτικές τροφές παρασκευάζονται με την προσθήκη μίας μικρής ποσότητας του αντιμικροβιακού φαρμάκου σε μία ομοιογεντοποιημένη και εξωθημένη δίαιτα ή το φάρμακο μπορεί να ψεκάζεται ή επικαλύπτεται πάνω στην τροφή. Η αξία της φαρμακευτικής αγωγής σε ζωοτροφές είναι η μειωμένη σπατάλη σε σύγκριση με το φάρμακο για το νερό. Μειώνει επίσης την ανεπιθύμητη έκθεση του στο περιβάλλον και στα άλλα ψάρια. Το φάρμακο σε ζωοτροφές είναι συνήθως πρακτική για μεγάλο αριθμό ασθενειών και ειδών ψαριών. Ο σημαντικός περιορισμός αυτής της μεθόδου είναι ότι τα προς επεξεργασία ψάρια πρέπει να τροφοδοτούνται ενεργά. Η επιτυχής χορήγηση φαρμακευτικής τροφής εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το επίπεδο διατροφής του μολυσμένου πληθυσμού. Ωστόσο, σχεδόν όλα τα ψάρια που πάσχουν από ασθένεια παύουν να τρώνε, και τα μεγαλύτερα και υγιέστερα ψάρια τρώνε περισσότερο. Επομένως, το φάρμακο είναι συνήθως προληπτικό, όχι θεραπευτικό.

Ένα δεύτερο πρόβλημα είναι η έλλειψη ομοιογένειας. Ο ιδανικός τρόπος για την παραγωγή φαρμακευτικής τροφής είναι η προσθήκη του φαρμάκου στη ζωοτροφή πριν από την ανάμειξη. Ωστόσο, εάν το φάρμακο είναι ασταθές στη θερμότητα ή χρειάζονται μόνο μικρές παρτίδες τροφής για φαρμακευτική αγωγή, η διαδικασία επιφανειακής επικάλυψης είναι μια κατάλληλη μέθοδος χορήγησης τροφής. Μεταξύ των πολλών προβλημάτων που σχετίζονται με τη μέθοδο επιφανειακής επικάλυψης είναι η δυσκολία επίτευξης ομοιογένειας. Ακόμα κι αν όλα τα ψάρια σε ένα κλωβό τρώνε την ίδια ποσότητα τροφής, δεν θα λάβουν την ίδια δόση του φαρμάκου. Αυτό προκαλεί υπερβολική χρήση ή χαμηλότερο όριο χρήσης φαρμάκων, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε καταστάσεις που οδηγούν σε αντοχή στα φάρμακα. Επιπλέον, υπάρχει περιβαλλοντική επίδραση, ανεξάρτητα από το εάν τα ψάρια έχουν υποβληθεί σε φαρμακευτική αγωγή με επιτυχία ή όχι. Ανεπιθύμητα τρόφιμα συσσωρεύονται στο βυθό μαζί με φαρμακευτικά περιττώματα που περιέχουν μη μεταβολισμένα φάρμακα όπως η οξυτετρακυκλίνη. Διάφορες τεχνικές έχουν

αναπτυχθεί για την ανάκτηση ανεπιθύμητων τροφών ή φαρμακευτικών περιπτώσεων (12).

1.2.2.3 Χορήγηση μέσω καθετηριασμού

Ο καθετηριασμός είναι μια μορφή στοματικής χορήγησης που χρησιμοποιείται εκτενώς σε πειραματικό στάδιο, και είναι γνωστή η ακριβής δόση. Η τεχνική χρησιμοποιεί έναν σωλήνα στομάχου, ο οποίος συνδέεται με μια σύριγγα που περιέχει ένα φάρμακο και το φάρμακο αντλείται στο στομάχι του ψαριού. Πριν από τη χορήγηση του φαρμάκου, τα ψάρια πρέπει να αναισθητοποιούνται ή να καταστέλλονται. Αυτή η μέθοδος σπάνια χρησιμοποιείται στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας επειδή είναι έντονη και αγχωτική για τα ψάρια (12).

1.2.2.4 Χορήγηση μέσω ένεσης

Οι συνήθεις μέθοδοι ένεσης για τα ψάρια είναι ενδομυϊκές, ενδοπεριτοναϊκές και φλεβοκομβικές ενέσεις. Ενεργοποίηση του εντέρου και καρδιακή διάτρηση είναι επίσης δυνατές, αλλά δεν συνιστώνται για ενέσεις ρουτίνας, καθώς είναι πάντα αγχωτικές για τα ψάρια. Οι μέθοδοι έγχυσης ενδείκνυνται για τον εμβολιασμό, τη θεραπεία περιορισμένου αριθμού ψαριών ή πολύτιμων ψαριών και για ορισμένες διαγνωστικές διαδικασίες δοκιμών (12).

1.2.2.5 Τοπική εφαρμογή

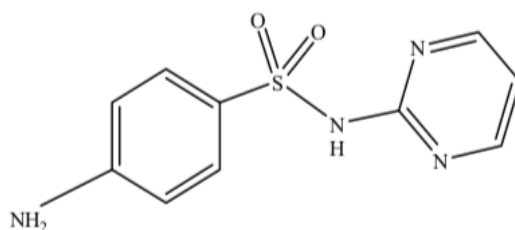
Η τοπική εφαρμογή είναι σπάνια στη βιομηχανία υδατοκαλλιέργειας. Χρησιμοποιείται για τη θεραπεία δερματικών ελκών σε πολύτιμα ψάρια. Η αναισθησία είναι απαραίτητη και τα φάρμακα είναι συνήθως σε ελαιώδη μορφή (12).

1.3 Ενώσεις διπλωματικής εργασίας

Η παρούσα διπλωματική εργασία έχει ως αντικείμενο μελέτης τις ενώσεις σουλφαδιαζίνη, τριμεθοπρίμη και υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη, οι οποίες ανήκουν στην οικογένεια των αντιβιοτικών και προστίθενται σε τροφές ψαριών σε ιχθυοκαλλιέργειες.

1.3.1 Σουλφαδιαζίνη

Μία από τις ενώσεις που ανήκουν στην οικογένεια των σουλφοναμιδών με αντιβιοτική δράση είναι η σουλφαδιαζίνη (SDZ), όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Ο συντακτικός τύπος απεικονίζεται στο Σχήμα 7 ενώ οι φυσικοχημικές της ιδιότητες αναγράφονται στον Πίνακα 1.



Σχήμα 7: Χημική δομή Σουλφαδιαζίνης (19)

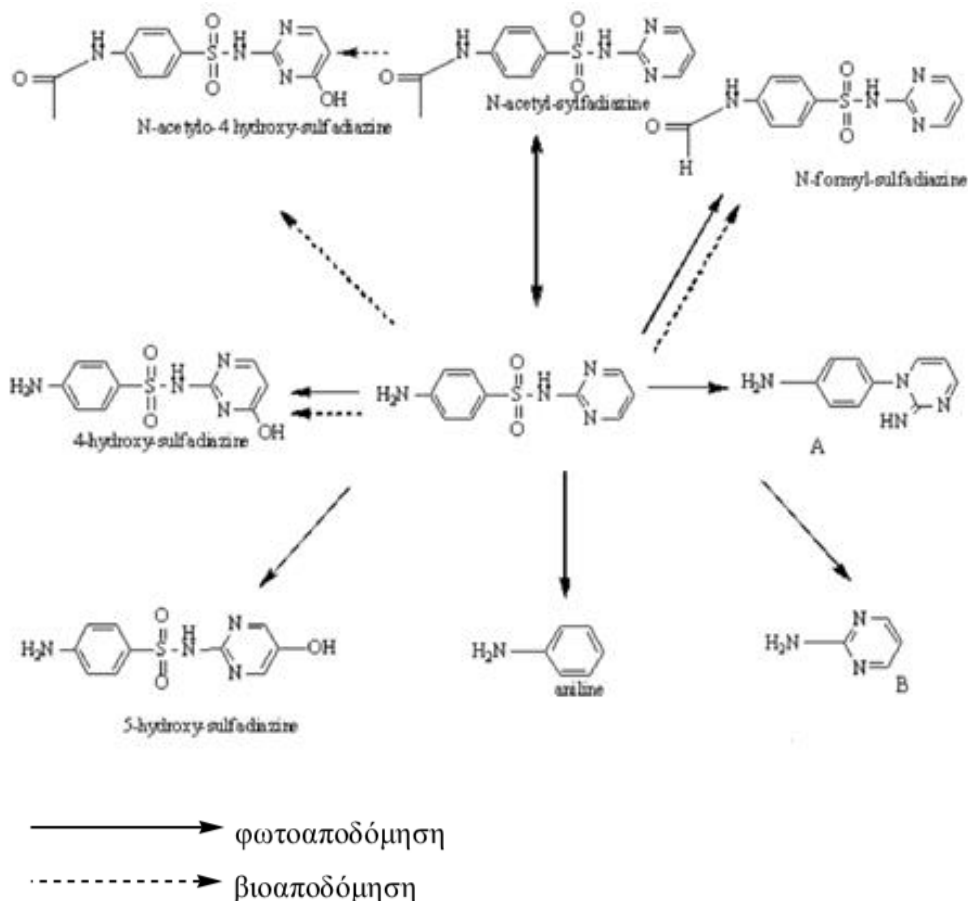
Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες Σουλφαδιαζίνης

Όνομασία	Σουλφαδιαζίνη
CAS - number	68-35-9
Χημική ονομασία	4-amino-N-(2-pyrimidinyl) benzenesulfonamide
Άλλες ονομασίες	Sanodiazine, Sulfadiazine, Sulfapyrimidine, Sulfazin
Μοριακός τύπος	C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S
Μοριακό βάρος, g/mol	250,28
Σημείο τήξεως, °C	255-256
Σημείο βρασμού, °C	512,6 (760 Torr)
Σημείο ανάφλεξης, °C	263,8 ± 55,2
Τάση ατμών, Torr	1,28 x10 ⁻¹⁰ στους 25 °C
Ενθαλπία ατμών, KJ/mole	78,4 ± 3.0
Παράγοντας βιοσυγκέντρωσης	1 σε pH 1, 4, 7, 8, 10
Διαλυτότητα	Ευδιάλυτο σε Η 1 και 7, ελαφρά διαλυτό σε pH 4, πολύ διαλυτό σε pH 8 και 10
K _{oc}	2.48 (pH 1), 20 (pH 4), 4.95 (pH 7), 1 (pH 8 και 10)

logK _{ow}	-0,09
Διαλυτότητα στο H ₂ O, g/L	0,077
pK _a	2,1 και 6,4

Η σουλφαδιαζίνη ή 4-αμινο-2-N-πυριμιδίνυλβενζενο-σουλφοναμίδη ή σουλφαναμιδοπυριμιδίνη, πρόκειται για σκόνη λευκή ή ελαφρά κιτρινωπή με σημείο ζέσεως τους 252 – 256 °C. Είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό στους 37 βαθμούς κελσίου όπως επίσης στην αλκοόλη και την κετόνη. Αντίθετα, είναι πολύ διαλυτή σε διαλύματα υδροξειδίων νατρίου και καλίου. Χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη Τριμεθοπρίμη (TMP) συνήθως σε αναλογία 5:1 (19). Η σουλφαδιαζίνη αναστέλλει τον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων, λειτουργώντας ως ανταγωνιστικός αναστολέας του p-αμινοβενζοϊκού οξέος στον κύκλο μεταβολισμού του φολικού οξέος.

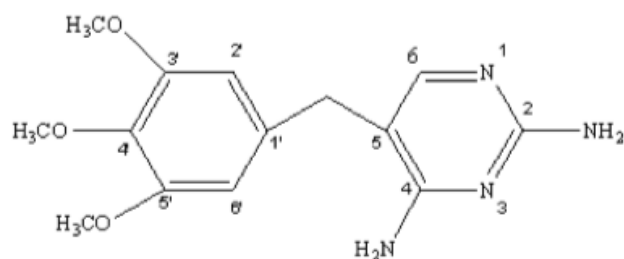
Στο Σχήμα 8 φαίνεται συνολικά ο μεταβολισμός της σουλφαδιαζίνης κάτω από βιοτικές ή αβιοτικές συνθήκες. Οι σουλφοναμίδες παίζουν ένα σπουδαίο ρόλο στην κτηνιατρική ως αποτελεσματικά αντιμικροβιακά φάρμακα εναντίον μικροβιακών και πρωτοζωικών νοσημάτων. Με ανταγωνιστική αναστολή εμποδίζουν τον σχηματισμό του διυδροφολικού οξέος που είναι μια ενδιάμεση πρόδρομη ουσία του μεταβολικού δρόμου του φολικού οξέος (20).



Σχήμα 8: Οδοί μεταβολισμού για την Σουλφαδιαζίνη (20)

1.3.2 Τριμεθοπρίμη

Η τριμεθοπρίμη ή 5-[(3,4,5 τριμεθόξυβενζυλ) μέθυλ]-2,4-πυριμιδινεδιαμίνη, είναι σκόνη λευκή, πικρή και κρυσταλλική, με σημείο ζέσεως 199-203 °C (19). Η τριμεθοπρίμη (TMP) που ανήκει στην ομάδα των διαμινοπυριμιδινών είναι ένα συνθετικό αντιβιοτικό με αντιβακτηριακή και ανθελονοσιακή δράση, που συντέθηκε για πρώτη φορά το 1956, ως αποτέλεσμα συστηματικής έρευνας. Παρακωλύει το μεταβολισμό του φολικού οξέος αναστέλλοντας την αναγωγή του διυδροφυλλικού οξέος και καταλύει τη μετατροπή του διυδροφυλλικού σε τετραυδροφυλλικό οξύ. Χορηγείται συνήθως σε συνδυασμό με σουλφοναμίδες, ώστε να δρουν συνεργατικά στην αναστολή της σύνθεσης του φολικού οξέος. Όσον αφορά στη χημική της δομή (Σχήμα 9) πρόκειται για μια διαμινοτριμεθυλοβενζυλοπυριμιδίνη που ανήκει στην οικογένεια των 2,4-διαμινοπυριμιδινών. Στον Πίνακα 2 αναγράφονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες της τριμεθοπρίμης (20).



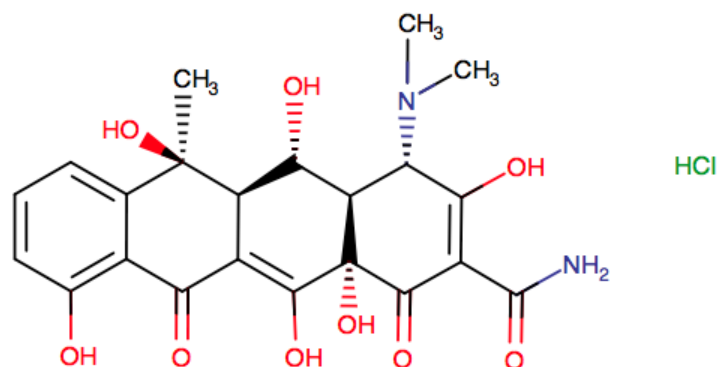
Σχήμα 9: Χημική δομή Τριμεθοπρίμης (19)

Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες Τριμεθοπρίμης

Όνομασία	Τριμεθοπρίμη
CAS-number	738-70-5
Χημική ονομασία κατά IUPAC	2,4-Diamino-5-(3,4,5-trimethoxybenzyl)pyrimidine 5-[(3,4,5-Trimethoxyphenyl)methyl]-2,4-pyrimidinediamine
Άλλες Ονομασίες	Methoprim, Monotrim, Primosept, Primsol, Proloprim, Trimexazole, Trimogal, Trimopan, Trimplex, Unitrim, Uretrim, Wellcoprim
Μοριακός τύπος	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃ S
Μοριακό βάρος, g/mol	290,32
Χημική κατηγορία	Βενζυλοπυριμιδίνες
Σημείο τήξεως, ° C	199-203
Τάση ατμών, mm Hg	9,88 x 10 ⁻¹⁴ (25 °C)
Διαλυτότητα στο ύδωρ, g/l	0,4
logK _{ow}	0,91
Φυσική κατάσταση	Λευκή κρυσταλλική σκόνη
pK _a	1,32 και 7,12
Τρόπος δράσης	Βακτηριοστατικό

1.3.3 Οξυτετρακυκλίνη

Η οξυτετρακυκλίνη (Σχήμα 10) είναι ευρέως φάσματος φυσικός βακτηριοστατικός παράγοντας. Δρα μέσα στο κυτταρόπλασμα του βακτηριακού κυττάρου και διαταράσσει τη λειτουργία των ριβοσωμάτων αναστέλλοντας την πρωτεϊνική σύνθεση. Η οξυτετρακυκλίνη είναι πιο δραστική έναντι των λοιμώξεων που οφείλονται σε αρνητικά και θετικά κατά Gram βακτήρια, χλαμύδια και ρικέτσια.



Σχήμα 10: Χημική δομή της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης

Σύμφωνα με την ευρωπαϊκή φαρμακοποιία, η οξυτετρακυκλίνη και η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη μπορεί να περιέχουν προσμίξεις, όπως την EOTC, την τετρακυκλίνη και την ADOTC (21). Η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη επίσης είναι δυνατόν να περιέχει ανυδροοξυτετρακυκλίνη, α-AOTC και β-AOTC. Διατυπώνεται ο ισχυρισμός ότι οι προσμίξεις στην οξυτετρακυκλίνη είναι οι ακόλουθες: 2% w/w ADOTC, 2% w/w TC, 0.5% w/w EOTC και συνολικά 2% w/w AOTC, α-AOTC και β-AOTC, σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή φαρμακοποιία. Η οξυτετρακυκλίνη παράγεται από τη ζύμωση κάποιων στελεχών *Streptomyces Rimosus*. Η τετρακυκλίνη και η ADOTC σχηματίζονται ως παραπροϊόντα κατά τη διάρκεια της ζύμωσης και επομένως κρίνεται απαραίτητο ένα στάδιο καθαρισμού της οξυτετρακυκλίνης, ενώ η EOTC, η α-AOTC και η β-AOTC είναι προϊόντα αποδόμησης κατά τη διάρκεια του καθαρισμού. Σε όξινες συνθήκες, η οξυτετρακυκλίνη αφυδατώνεται και σχηματίζεται η AOTC, η οποία είναι ιδιαίτερα ασταθής λόγω της παρουσίας υδροξυλίου στον C5 με αποτέλεσμα το άνοιγμα του δακτυλίου B και το σχηματισμό δύο αρωματικών ισομερών της α-AOTC και της β-AOTC (22). Σε υδατικά διαλύματα οξυτετρακυκλίνης σχηματίζονται επίσης ίχνη 4-

επιτετρακυκλίνης καθώς η τετρακυκλίνη, που συνυπάρχει ως παραπροϊόν της ζύμωσης, επιμερίζεται πιο εύκολα από την OTC λόγω της έλλειψης OH στη θέση 5, ενώ η ADOTC από την άλλη δεν επιμερίζεται.

Ακολουθεί ο Πίνακας 3 με τις φυσικοχημικές ιδιότητες της οξυτετρακυκλίνης.

Πίνακας 3: Φυσικοχημικές ιδιότητες Οξυτετρακυκλίνης

Όνομασία	Οξυτετρακυκλίνη
CAS-number	79-57-2
Χημική ονομασία	Oxytetracycline, 4-(dimethylamino)-1,4,4a,5,5a,6,11,12a-octahydro-3,5,6,10,12,12ahexahydroxy-6-methyl-1,11-dioxo-2-naphthacenecarboxamide
Άλλες ονομασίες	Terramycin, 5-hydroxytetracycline
Μοριακός τύπος	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉
Μοριακό βάρος, g/mol	460,34
Χημική κατηγορία	Τετρακυκλίνες
Φυσική κατάσταση	Η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη είναι κίτρινη κρυσταλλική σκόνη, Η οξυτετρακυκλίνη είναι κίτρινη της ώχρας έως κίτρινη-καφέ κρυσταλλική σκόνη
Σημείο τήξεως, °C	184,5
K _{oc} , (pH 5,6)	0,075
LogP (enol form)	-3,03
LogP (zwitterion form)	-3,18
Άλλες διαθέσιμες μορφές	Ένυδρη (OTC·2H ₂ O, CAS number 6153-64-6), υδροχλωρική (OTC·HCl, CAS number 2058-46-0), άλας Ca (CAS number 15251-48-6)

Διαλυτότητα:

Γενικά, η οξυτετρακυκλίνη, τόσο η ένυδρη μορφή όσο και η υδροχλωρική, είναι αρκετά ευδιάλυτες στο ύδωρ και στις κατώτερες πρωτοταγείς αλκοόλες και δυσδιάλυτες σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Η κρυσταλλική μορφή της ελεύθερης βάσης είναι εξαιρετικά δυσδιάλυτη σε απεσταγμένο ύδωρ. Η υδροχλωρική καθώς και τα μετά νατρίου άλατα της οξυτετρακυκλίνης είναι ευδιάλυτα σε μια ευρεία περιοχή τιμών pH (20).

1.3.4 Φαρμακοδυναμικές ιδιότητες κτηνιατρικών φαρμάκων σε ψάρια ιχθυοκαλλιέργειας

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα τελευταία χρόνια με την έντονη ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας παγκοσμίως, όλο και περισσότερες μελέτες φαρμακοκινητικής που αφορούν τα εκτρεφόμενα εμφανίζονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Η αύξηση του αριθμού των μελετών αυτών οφείλεται στο γεγονός ότι η φαρμακοκινητική διαφέρει μεταξύ των ζωικών ειδών και ειδικότερα στα ψάρια που είναι ποικιλόθερμοι υδρόβιοι οργανισμοί. Οι οδοί χορήγησης των φαρμακευτικών ουσιών στα ψάρια, είναι κυρίως η πεπτική οδός (τροφή, εμβάπτιση) και λιγότερο η ενδομυϊκή, ενδοπεριτονιακή ή ενδοφλέβια (23).

Η τύχη ενός φαρμάκου μέσα στον οργανισμό των ψαριών εξαρτάται από την απορρόφηση, την κατανομή, το μεταβολισμό και τέλος την αποβολή του.

Η απορρόφηση των φαρμάκων στα ψάρια γίνεται όταν αυτά χορηγούνται από την πεπτική οδό με την τροφή. Η απορρόφηση εξαρτάται από τους παράγοντες που σχετίζονται με τον ίδιο τον οργανισμό, το περιβάλλον και το φάρμακο. Το σπουδαιότερο ρόλο παίζει η διαλυτότητα του φαρμάκου στο νερό (υδατικό διάλυμα ή εναιώρημα ή σε στερεά μορφή). Επιπλέον η απορρόφηση του φαρμάκου επηρεάζεται από το εάν η τροφή περιέχει συστατικά τα οποία δεσμεύουν το φάρμακο (24).

Η απομάκρυνση ενός φαρμάκου από τον οργανισμό ενός ψαριού γίνεται με τον μεταβολισμό του και την αποβολή του. Η αποβολή γίνεται τόσο άμεσα όσο και έμμεσα και εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου (24).

Μελέτες σχετικές με τη φαρμακοκινητική και την παρουσία καταλοίπων διαφόρων φαρμάκων, έδειξαν ότι από τους πολλούς παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν το μεταβολισμό από την αποβολή των φαρμάκων, ο πλέον

σημαντικός είναι το είδος του ψαριού. Το πόρισμα των παραπάνω μελετών καταδεικνύουν την ανάγκη για πραγματοποίηση μελετών στα διάφορα είδη ψαριών ξεχωριστά (24) .

1.3.5 Συνδυαστική δράση κατά το συνδυασμό χορήγησης σουλφοναμίδων με τριμεθοπρίμη

Οι σουλφοναμίδες έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς ενάντια σε βακτηριακά νοσήματα στις ιχθυοκαλλιέργειες για δεκαετίες. Οι σουλφοναμίδες που έχουν χρησιμοποιηθεί σε ιχθυοκαλλιέργειες περιλαμβάνουν τη σουλφαμεθαζίνη, τη σουλφανιλαμίδα, τη σουλφαμεραζίνη, τη σουλφαδιαζίνη, τη σουλφαθειαζόλη και τη σουλφισοξαζόλη.

Κατά τη μελέτη που πραγματοποιήθηκε από τον McCathry το 1974 σχετικά με τη δραστικότητα επτά σουλφαδιαμιδών αλλά και συνδυασμούς τους με τριμεθοπρίμη, το συμπέρασμα στο οποίο κατέληξαν είναι ότι ο συνδυασμός μιας σουλφοναμίδης με τριμεθοπρίμη είναι ένας αποτελεσματικός αντιμικροβιακός παράγοντας. Σε συμφωνία με τα παραπάνω, οι σουλφοναμίδες σήμερα χρησιμοποιούνται κυρίως σε συνδυασμό με διαμινοπυριμιδίνες, όπως η τριμεθοπρίμη. Οι διαμινοπυριμιδίνες ενισχύουν την *in vitro* ανασταλτική επίδραση των σουλφοναμιδών εναντίον ευαίσθητων βακτηρίων που είναι παθογόνα για τα ψάρια (25).

Μολονότι τα τελευταία χρόνια οι σουλφοναμίδες έχουν σε μεγάλο βαθμό αντικατασταθεί από άλλα αντιμικροβιακά φάρμακα, το ενδιαφέρον προς αυτές παραμένει λόγω της ευρύτατα διαδεδομένης μορφής τους σε συνδυασμό με την τριμεθοπρίμη.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

2.1 Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (HPLC)

2.1.1 Ιστορική Αναδρομή

Αρχικά η υγροχρωματογραφία, συμπεριλαμβανομένης της πρωτοποριακής εργασίας του Tswett, πραγματοποιείτο με υάλινες στήλες διαμέτρου 1 έως 5 εκατοστά και μήκους 50 έως 500 εκατοστά. Για την επίτευξη ρεαλιστικής ταχύτητας ροής, η διάμετρος των σωματιδίων της στερεάς φάσης ήταν συνήθως 150 έως 250 μικρόμετρα. Ακόμη και έτσι οι ταχύτητες ροής ήταν μικρές, της τάξης των μερικών δεκάτων του χιλιοστόλιτρου ανά λεπτό. Συνεπώς, οι χρόνοι διαχωρισμού ήταν μεγάλοι και συχνά έφταναν τις μερικές ώρες. Απόπειρες επιτάχυνσης με εφαρμογή κενού ή με άντληση, δεν ήταν αποτελεσματικές, επειδή αυξήσεις στην ταχύτητα ροής προκαλούσαν αύξηση των υψών των θεωρητικών πλακών μακριά από το ελάχιστο, που εμφανίζεται στην τυπική καμπύλη ύψους πλάκας – ταχύτητας ροής. Το αποτέλεσμα αυτών ήταν οι ελαττωμένες αποδόσεις.

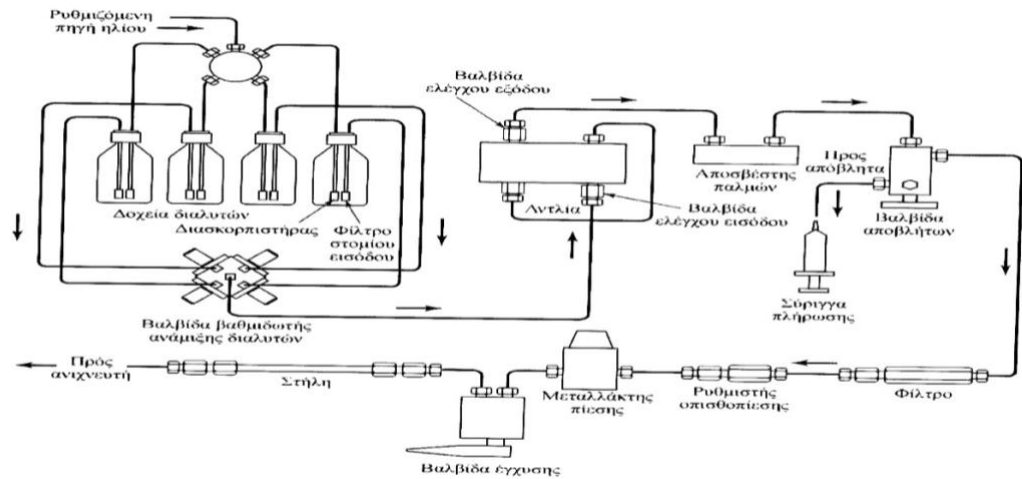
Γρήγορα, κατά την διάρκεια της εξέλιξης της υγροχρωματογραφίας, οι επιστήμονες κατάλαβαν ότι σημαντική βελτίωση στην απόδοση της στήλης θα μπορούσε να επιτευχθεί με ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων του υλικού πλήρωσης της στήλης. Στο τέλος της δεκαετίας του 1960 αναπτύχθηκε η τεχνολογία παραγωγής και χρήσης πληρωτικών υλικών με σωματίδια διαμέτρου 3 έως 10 μικρόμετρα. Η τεχνολογία αυτή απαιτούσε εξελιγμένα όργανα, με δυνατότητες λειτουργίας σε υψηλές πιέσεις, κάτι που ήταν αδύνατο να επιτευχθεί με τις απλές υάλινες στήλες της κλασικής υγροχρωματογραφίας με βαρυτική ροή. Η ονομασία υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High performance liquid chromatography, HPLC) χρησιμοποιείται για να διακρίνει αυτές τις νεότερες τεχνικές από τις παλαιότερες, που ακόμη χρησιμοποιούνται για παρασκευαστικούς σκοπούς (26).

2.1.2 Πεδίο εφαρμογών

Η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης είναι η πιο διαδεδομένη απ' όλες τις αναλυτικές τεχνικές διαχωρισμού, με ετήσιες πωλήσεις σε όργανα HPLC που φθάνουν τα δισεκατομμύρια δολάρια. Οι λόγοι αυτής της αποδοχής της τεχνικής είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ακριβείς ποσοτικούς προσδιορισμούς, η καταλληλότητά της για διαχωρισμούς μη πτητικών ή θερμικά ευαίσθητων συστατικών και κυρίως, η εφαρμοσιμότητά της σε προσδιορισμούς ουσιών πρωτίστου ενδιαφέροντος για τη βιομηχανία, το δημόσιο και πολλά επιστημονικά πεδία. Παραδείγματα αποτελούν τα αμινοξέα, οι πρωτεΐνες, τα νουκλεϊκά οξέα, οι υδρογονάνθρακες, οι υδατάνθρακες, τα φαρμακευτικά, τα τερπενοειδή, τα φυτοφάρμακα, τα αντιβιοτικά, τα στεροειδή, οι οργανομεταλλικές ενώσεις και μια ποικιλία ανόργανων ουσιών. Οι διάφορες τεχνικές υγροχρωματογραφίας τείνουν να αλληλοσυμπληρώνονται, σε ότι αφορά τα πεδία εφαρμογών. Συνεπώς, για ουσίες με μοριακά βάρη μεγαλύτερα από 10.000, χρησιμοποιείται συχνά η υγροχρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού αν και σήμερα είναι δυνατόν τέτοιες ενώσεις να προσδιορίζονται με χρωματογραφία κατανομής αντίστροφης φάσης. Για ιοντικές ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους χρησιμοποιείται ευρέως η χρωματογραφία ιονανταλλαγής. Επιπλέον, η παραλλαγή αυτής της υγροχρωματογραφίας χρησιμοποιείται συχνά για διαχωρισμούς ενώσεων, που ανήκουν στην ίδια ομόλογη σειρά. Η χρωματογραφία προσρόφησης συχνά επιλέγεται για διαχωρισμό μη πολικών ενώσεων, ισομερών και κατηγορίες ενώσεων, όπως είναι οι αλειφατικοί υδρογονάνθρακες από αλειφατικές αλκοόλες (26) .

2.1.3 Οργανολογία HPLC

Ένα τυπικό σύστημα HPLC αποτελείται από τα εξής μέρη, Σχήμα 11, α) Τα δοχεία κινητής φάσης και τα συστήματα επεξεργασίας διαλυτών, β) την αντλία υψηλής πίεσης, γ) το σύστημα έγχυσης δείγματος, δ) την στήλη χρωματογραφίας, ε) τον ανιχνευτή και στ) τη μονάδα επεξεργασίας και καταγραφής δεδομένων.



Σχήμα 11: Σχηματική παράσταση μιας διάταξης HPLC (26)

2.1.3.1 Δοχεία κινητής φάσης

Ένα σύγχρονο σύστημα HPLC είναι εφοδιασμένο με τέσσερα δοχεία που περιέχουν μέσα τους διαλύτες. Συχνά περιλαμβάνονται φίλτρα απομάκρυνσης σκόνης και αιωρούμενων σωματιδίων από τους διαλύτες, για να προληφθούν πιθανές βλάβες στις αντλίες ή στα συστήματα έγχυσης. Ο διαχωρισμός στον οποίο χρησιμοποιείται ένας διαλύτης σταθερής σύστασης καλείται ισοκρατική έκλουση. Συχνά η απόδοση διαχωρισμού ενισχύεται σημαντικά με την βαθμιδωτή έκλουση. Εδώ χρησιμοποιούνται δύο ή τρία συστήματα διαλυτών, που διαφέρουν σημαντικά ως προς την πολικότητα. Αφού αρχίσει η έκλουση, ο λόγος των διαλυτών μεταβάλλεται με τρόπο προγραμματισμένο άλλες φορές συνεχώς και άλλες με μια σειρά βημάτων. Τα συστήματα HPLC είναι εφοδιασμένα με διατάξεις, οι οποίες εισάγουν διαλύτες από δύο ή περισσότερα δοχεία σε θάλαμο ανάμιξης με ρυθμούς που μεταβάλλονται συνεχώς. Ο λόγος των όγκων των διαλυτών μπορεί να μεταβάλλεται ως προς τον χρόνο γραμμικά ή λογαριθμικά (26).

2.1.3.2 Αντλία υψηλής πίεσης

Οι παλινδρομικές αντλίες αποτελούνται από ένα μικρό θάλαμο, στον οποίο ο διαλύτης αντλείται παλινδρομικά με ένα μηχανικά κινούμενο έμβολο. Δύο σφαιρικές βαλβίδες ανοίγουν και κλείνουν εκ περιτροπής και ελέγχουν τη ροή του διαλύτη μέσα και έξω από ένα κύλινδρο. Ο διαλύτης βρίσκεται σε άμεση επαφή με το έμβολο. Εναλλακτικά μπορεί να μεταδίδεται πίεση στον διαλύτη

μέσω ενός ευκάμπτου διαφράγματος, το οποίο με τη σειρά του αντλείται πνευματικά από ένα παλινδρομικό έμβολο (26).

2.1.3.3 Στήλες Χρωματογραφίας

Οι στήλες χρωματογραφίας τοποθετούνται σε ειδικό θερμοστατούμενο φούρνο, ο οποίος επιτρέπει την ρύθμιση της θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της ανάλυσης. Η πλειονότητα των στηλών υγροχρωματογραφίας έχουν μήκος από 10 έως 30 cm. Η εσωτερική διάμετρος των στηλών είναι συνήθως 4 έως 10 mm και το μέγεθος σωματιδίων του υλικού πλήρωσης είναι 5 ή 10 μm . Φυσικά είναι διαθέσιμες και στήλες με μικρότερες διαστάσεις από αυτές που περιγράφονται με εσωτερική διάμετρο από 1 έως 4.6 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3 έως 5 μm .

Συχνά, πριν από την αναλυτική στήλη παρεμβάλλεται μια μικρή προστατευτική στήλη (προ-στήλη), για να αυξήσει τον χρόνο ζωής της, απομακρύνοντας όχι μόνο τα αιωρούμενα σωματίδια και τις προσμίξεις από τον διαλύτη αλλά και συστατικά του δείγματος που συνδέονται με τη στατική φάση, μη αντιστρεπτά. Επιπλέον, στη χρωματογραφία υγρού – υγρού, προ-στήλη προκαλεί κορεσμό της κινητής φάσης με τη στατική έτσι, ώστε να ελαχιστοποιούνται οι απώλειες του διαλύτη της αναλυτικής στήλης. Η σύσταση του υλικού της προ-στήλης πρέπει να είναι παρόμοια με αυτό της αναλυτικής στήλης. Ωστόσο το μέγεθος των σωματιδίων είναι συνήθως μεγαλύτερο για να ελαχιστοποιείται η πτώση πίεσης.

Στην υγροχρωματογραφία χρησιμοποιούνται δύο βασικοί τύποι πληρωτικών υλικών, ο πρώτος τύπος αποτελείται από σωματίδια σφαιροειδή και ο δεύτερος από πορώδη. Συνήθως συναντάται ο δεύτερος τύπος. Το υλικό πλήρωσης με βάση τα πορώδη σωματίδια αποτελείται από μικροσωματίδια διαμέτρου 3 έως 10 μm . Καταβάλλεται κάθε προσπάθεια για την ελαχιστοποίηση του εύρους περιοχής μεγεθών τους. Τα σωματίδια αποτελούνται από SiO_2 , αλουμίνα, συνθετικές ρητίνες πολυστυρενίου – διβινυλοβενζολίου ή ιονανταλλακτική ρητίνη. Το SiO_2 είναι το συνηθέστερο υλικό πλήρωσης στην υγροχρωματογραφία. Τα σωματίδια SiO_2 παρασκευάζονται με συσσωμάτωση σωματιδίων SiO_2 μεγέθους μικρότερου από ένα μm σε συνθήκες που οδηγούν στο σχηματισμό μεγαλύτερων σωματιδίων πολύ στενής περιοχής τιμών

διαμέτρου. Τα σχηματιζόμενα σωματίδια συχνά καλύπτονται με λεπτά οργανικά στρώματα, που συνδέονται με την επιφάνεια με χημικό ή φυσικό τρόπο (26).

2.1.3.4 Ανιχνευτές

Ο ιδανικός ανιχνευτής θα πρέπει να έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά :

1. Ικανοποιητική ευαισθησία.
2. Σταθερότητα και αναπαραγωγιμότητα.
3. Γραμμική απόκριση επεκτεινόμενη σε περιοχή αρκετών τάξεων μεγέθους.
4. Ευρεία περιοχή θερμοκρασιών λειτουργίας.
5. Σύντομους χρόνους απόκρισης ανεξάρτητους από την ταχύτητα ροής.
6. Εξαιρετική αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
7. Εξαιρετικά προβλέψιμη και εκλεκτική απόκριση για μία ή περισσότερες ομάδες ενώσεων.
8. Να μην καταστρέφει το δείγμα.

Υπάρχουν δύο βασικοί τύποι ανιχνευτών υδροχρωματογραφίας. Αυτοί που ανταποκρίνονται σε μία βασική ιδιότητα της κινητής φάσης, όπως ο δείκτης διάθλασης ή η διηλεκτρική σταθερά ή η πυκνότητα, οι τιμές των οποίων επηρεάζονται από την παρουσία των εκλουόμενων συστατικών. Αντίθετα υπάρχουν ανιχνευτές που αποκρίνονται σε ιδιότητα του εκλουόμενου συστατικού, όπως είναι η απορρόφηση στο υπεριώδες, ο φθορισμός ή το ρεύμα διάχυσης. Την ιδιότητα αυτή δεν πρέπει να έχει η κινητή φάση.

Επιγραμματικά οι κυριότεροι τύποι ανιχνευτών είναι:

1. Διαφορικός ανιχνευτής δείκτη διάθλασης
2. Ανιχνευτής υπεριώδους ορατού
3. Ανιχνευτής φθορισμού
4. Ανιχνευτής Υπερύθρου
5. Ηλεκτροχημικός (Αμπερομετρικός Ανιχνευτής)
6. Φασματοόμετρο μαζών
7. Εξαμιστικός ανιχνευτής σκέδασης ακτινοβολίας

Ανιχνευτής Υπεριώδους – Ορατού : Υπάρχουν τέσσερις τύποι του συγκεκριμένου ανιχνευτή. Σταθερού μήκους κύματος, Πολλαπλών σταθερών μηκών κύματος, Μεταβαλλόμενου μήκους κύματος, Σειράς φωτοδιόδων (26).

2.2 Φασματομετρία Μάζας (MS)

2.2.1 Ιστορική Αναδρομή

Η ιστορία της επιστήμης μας δείχνει ότι η Φασματομετρία Μάζας έχει τις ρίζες της στη Φυσική, όμως διακλαδίστηκε και στη Χημεία και τις τελευταίες δεκαετίες έχει εξαπλωθεί και στη Βιολογία. Το πρώτο φασματόμετρο μάζας κατασκευάζεται από τον J.J. Thomson το 1912 με το οποίο κατάφερε να διαχωρίσει διάφορα ιόντα αναγκάζοντας τα να κινηθούν μέσα σε μαγνητικό πεδίο. Τα ιόντα κινήθηκαν σε διαφορετικές παραβολικές τροχιές και ο διαχωρισμός τους έγινε εμφανής από το ίχνος που άφησαν πάνω σε μια φθορίζουσα οθόνη ή φωτογραφική πλάκα (27). Κατάφερε με αυτόν τον τρόπο να πάρει τα φάσματα των O₂, N₂, CO, CO₂ και COCl₂. Το πρώτο φασματόμετρο μαζών διατέθηκε στο εμπόριο το 1948. Χρησιμοποιούσε ως τρόπο ιοντισμού την τεχνική Electron Impact ionization (EI), αλλά μπορούσε να ανιχνεύσει ιόντα μάζας έως 300 Da και παρουσίαζε μικρή διακριτική ικανότητα. Η τεχνική TOF για τον αναλυτή μάζας προτάθηκε το 1946 από το William E. Stephens, που εργαζόταν στο Πανεπιστήμιο της Pennsylvania. Η ιδέα του τετραπολικού αναλυτή το 1953 ανήκει στον Wolfgang Paul του Πανεπιστημίου της Bonn και όπως αποδείχθηκε ήταν ο ιδανικός για τη σύζευξη με την αέρια χρωματογραφία (GCMS) το 1956 και με την υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (LC-MS) το 1974. Η τεχνική του χημικού ιονισμού (C.I.) αναπτύχθηκε από τους M.S.B. Munson και F.H. Field το 1966. Ενώ η τεχνική εκρόφησης πεδίου (F.D) για οργανικά μόρια ανακαλύφθηκε το 1969 από τον H.D.Beckey. Το 1974, ο Melvin B. Comisarow και ο Alan G. Marshall του Πανεπιστημίου της British Columbia έφεραν μια επανάσταση στην τεχνική ICR αναπτύσσοντας την FT-ICR MS Το κύριο πλεονέκτημα του FT-ICR MS ήταν ότι μας δίνει τη δυνατότητα να μετρηθούν με τη μία πολλά διαφορετικά ιόντα με ακρίβεια μικρότερη από ένα στο εκατομμύριο. Το 1978 έχουμε τον πρώτο φασματογράφο μάζας με αναλυτή το τριπλό τετράπολο και το 1981 ο M. Barber εισάγει την τεχνική ιονισμού FAB. Η ομάδα του J. Fenn (Nobel Χημείας 2002) το 1984 ανακάλυψε την τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο (ESI) σε συνδυασμό με την MS και το 1988 προτάθηκε ως κατάλληλη μέθοδος για τον ιονισμό μεγάλων βιομορίων (27).

2.2.2 Πεδίο Εφαρμογής

Η τεχνική χρησιμοποιείται προκειμένου να διαχωρίσει τα οργανικά ή ανόργανα συστατικά ενός δείγματος με βάση το λόγο της μάζας τους προς το φορτίο τους m/z , αφού προηγουμένως με κατάλληλες μεθόδους έχουν μετατραπεί σε ιόντα που κινούνται πάρα πολύ γρήγορα. Οι ολοένα και μεγαλύτερες απαιτήσεις στη χημική ανάλυση έχουν καταστήσει την MS ένα πολυδύναμο εργαλείο για ένα πολύ μεγάλο πλήθος επιστημονικών ερευνητικών δραστηριοτήτων. Αυτό οφείλεται στο ότι η συγκεκριμένη τεχνική είναι σε θέση να μας δώσει πληροφορίες για :

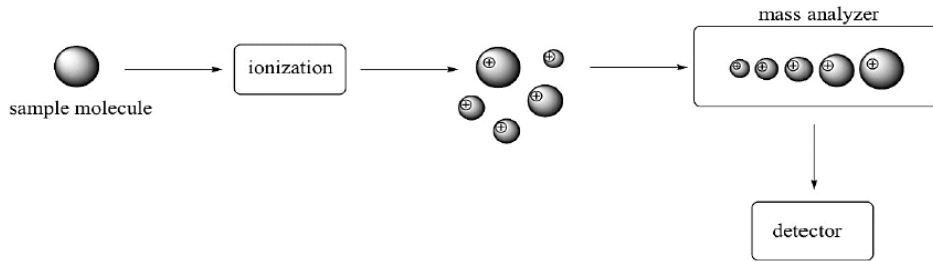
- την ποιοτική και ποσοτική σύσταση σύνθετων μειγμάτων αγνώστου περιεχομένου.
- τη δομή ανόργανων, οργανικών και βιολογικών μορίων
- τη δομή και τη σύσταση στερεών επιφανειών με μορφή απεικόνισης
- την παρουσία αλλά και την αναλογία ισοτόπων ατόμων σε διάφορα δείγματα

Η MS είναι τόσο βασική για την χημική ανάλυση, γιατί παρουσιάζει κάποιες πολύ σημαντικές ιδιότητες, όπως:

- πολύ μεγάλη ευαισθησία
- είναι σε θέση να μετρά με πολύ μεγάλη ακρίβεια τις σχετικές μοριακές μάζες με αποτέλεσμα την απόλυτη ταυτοποίηση ενώσεων ακόμη και πολύ μικρών συγκεντρώσεων
- είναι σε θέση θεωρητικά τουλάχιστον να έχει δυνατότητες ολικού ανιχνευτή και άρα να μπορεί να αναλύει οποιοδήποτε σώμα ανεξάρτητα από τη φύση του (28) .

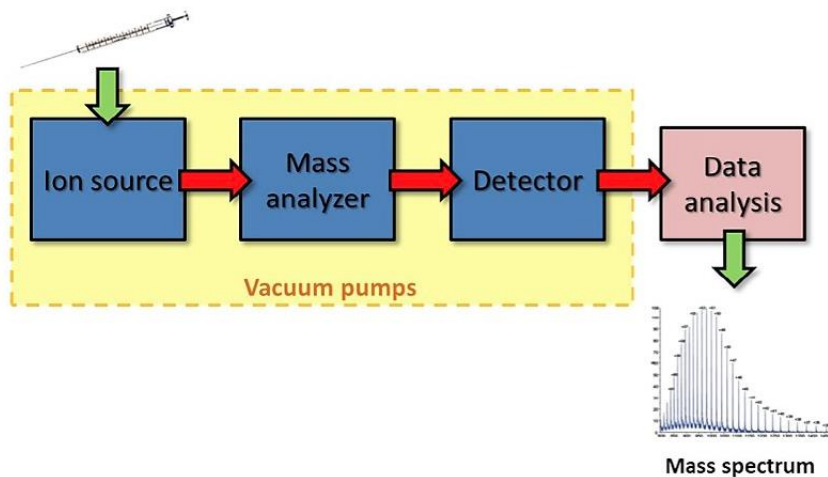
2.2.3 Οργανολογία Φασματομέτρου μαζών

Υπάρχουν πολλά διαφορετικού τύπου φασματομέτρα μαζών, αλλά όλα έχουν τρία βασικά τμήματα. Αρχικά είναι η πηγή ιόντων, όπου το μόριο του αναλύτη μετατρέπεται με κάποια διαδικασία σε θετικό ιόν (συνήθως). Αυτή η διαδικασία μπορεί να το διατηρήσει ως έχει ή να το σπάσει σε θραύσματα, μικρότερης σχετικής μοριακής μάζας, όπως φαίνεται στο Σχήμα 12.



Σχήμα 12: Γενική περιγραφή της πορείας ενός μορίου αναλύτη κατά την διαδικασία MS (29)

Στη συνέχεια είναι ο αναλυτής μάζας, όπου γίνεται ο διαχωρισμός των κατιόντων με βάση το λόγο μάζας/φορτίου και τέλος είναι το τμήμα του ανιχνευτή, που ανιχνεύει και ποσοτικοποιεί τα ιόντα που διαχωρίστηκαν. Στο Σχήμα 13 φαίνεται μια πιο αναλυτική περιγραφή των τμημάτων ενός φασματομέτρου μάζας. Τα τμήματα αυτά είναι:



Σχήμα 13: Σχηματικό διάγραμμα ενός φασματομέτρου μάζας (30)

- Το σύστημα εισαγωγής του δείγματος. Τις περισσότερες φορές το δείγμα σε αέρια ή υγρή μορφή.
- Την πηγή των ιόντων. Σε αυτό το τμήμα τα μόρια των αναλυόμενων υλικών μετατρέπονται σε ιόντα με διάφορες τεχνικές, όπως βομβαρδισμός με ηλεκτρόνια, άλλα ιόντα ή μόρια, φωτόνια. Για την μετατροπή σε ιόντα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ηλεκτρικό πεδίο ή υψηλή θερμοκρασία. Σε αρκετά φασματομέτρα μάζας το σύστημα εισαγωγής και η πηγή ιόντων είναι ένα ενιαίο τμήμα που παράγει ένα ρεύμα ιόντων, που κατόπιν επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μάζας.

- Τον αναλυτή μαζών. Είναι το κέντρο του συστήματος. Εδώ πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των ιόντων με βάση τις τιμές του λόγου m/z . Χρησιμοποιούνται αρκετοί αναλυτές μάζας με λειτουργία που στηρίζεται σε διαφορετικές αρχές.
- Τον ανιχνευτή. Η διάταξη αυτή μετατρέπει σε ηλεκτρικό σήμα τα ιόντα που διαχωρίστηκαν από τον αναλυτή μάζας.
- Το σύστημα κενού. Εσωτερικές και εξωτερικές αντλίες δημιουργούν συνθήκες κενού, πιέσεις της τάξης των $10^{-5} - 10^{-8}$ Torr σε όλο το φασματογράφο εκτός από το σύστημα επεξεργασίας, ανάγνωσης και καταγραφής δεδομένων (28).

2.2.3.1 Σύστημα εισαγωγής του δείγματος

Αυτή η διάταξη χρησιμεύει στο να εισάγει την απαιτούμενη ποσότητα δείγματος στην πηγή ιόντων, χωρίς να διαταραχθούν οι συνθήκες κενού, που είναι απαραίτητες για τη σωστή λειτουργία του φασματογράφου μάζας. Τα απλούστερα και βέβαια φθηνότερα μοντέλα χρησιμοποιούν ένα μόνο σύστημα εισαγωγής, οπότε η χρήση τους είναι περιορισμένη. Έτσι λοιπόν έχουμε σύστημα εισαγωγής δέσμης ή μεμονωμένης εισαγωγής (batch inlet system), σύστημα άμεσης εισαγωγής με ακροφύσιο (direct probe, DIP). Επιπλέον έχουμε και συστήματα απευθείας εισαγωγής (σύζευξη) των προϊόντων της έκλουσης από στήλες της χρωματογραφίας ή της τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (26).

Η παρούσα εργασία χρησιμοποίησε τον τελευταίο τρόπο εισαγωγής. Πιο αναλυτικά, όταν πρόκειται να αναλυθεί ένα πολύπλοκο μείγμα τότε τα φασματόμετρα συνδυάζονται με συστήματα αέριας χρωματογραφίας (GC), υγροχρωματογραφίας (LC ή TLC ή HPLC) ή τριχοειδούς ηλεκτροφόρησης (Capillary Electrophoresis, CE). Η σύζευξη της GC με την MS πρακτικά γίνεται άμεσα μέσω ενός θερμαινόμενου σωλήνα, όμως η HPLC, η TLC, η CE και άλλες τεχνικές διαχωρισμού που δρουν σε υγρό περιβάλλον απαιτούν ειδικά συστήματα εισαγωγής (28).

2.2.3.2 Πηγή Ιόντων

Η διαδικασία λήψης του φάσματος μαζών για έναν αναλύτη, που βρίσκεται πλέον σε αέρια κατάσταση, ξεκινά με την μετατροπή των μορίων του σε ιόντα. Αυτή η διαδικασία είναι πολύ σημαντική για την ανάλυση που ακολουθεί. Για την ίδια ένωση η μορφή του φάσματος της εξαρτάται πολύ από την τεχνική με την οποία λήφθηκαν τα ιόντα της. Οι τεχνικές αυτές χωρίζονται σε δυο κατηγορίες, σε μαλακές και σε σκληρές. Στις σκληρές τεχνικές μεταδίδεται μεγάλη ποσότητα ενέργειας στα μόρια του αναλύτη και έτσι ανεβαίνουν σε υψηλότερη διεγερμένη κατάσταση. Η αποδιέγερση που ακολουθεί οδηγεί σε σπάσιμο δεσμών και παραγωγή θυγατρικών ιόντων (θραύσματα) με λόγους m/z μικρότερους από το μητρικό ιόν. Στις μαλακές τεχνικές ο ιοντισμός επιτυγχάνεται με ηπιότερες συνθήκες από αυτές των σκληρών, με αποτέλεσμα να έχουμε περιορισμένη θραύση των μορίων του αναλύτη και στο λαμβανόμενο φάσμα να υπάρχει μια κύρια κορυφή, του μοριακού ιόντος, και ένα μικρό πλήθος επιπλέον κορυφών που αντιστοιχούν στα προϊόντα θραύσης. Οι πληροφορίες που αντλούνται από τα φάσματα που προκύπτουν είτε από τις σκληρές είτε από τις μαλακές τεχνικές είναι πολύ χρήσιμες. Οι πολλές κορυφές στην πρώτη περίπτωση λόγω θραύσης του μητρικού ιόντος μας πληροφορούν για το ποιες χαρακτηριστικές ομάδες υπήρχαν στο αρχικό μόριο και άρα αποκτούμε μια σαφή εικόνα της δομής του. Στη δεύτερη περίπτωση τα φάσματα μας δίνουν την δυνατότητα να υπολογίσουμε με μεγάλη ακρίβεια τη σχετική μοριακή μάζα των μορίων του αναλύτη. Επίσης οι τεχνικές χωρίζονται σε δυο ομάδες, στην πρώτη αρχικά το αναλυόμενο δείγμα μετατρέπεται σε αέριο και μετά ιοντίζεται (αέριας φάσης ιοντισμός, *gas-phase courses*) και στη δεύτερη το στερεό ή υγρό δείγμα απορροφά ενέργεια από κάποια πηγή και τα μόρια του εκροφόνται και μετατρέπονται κατευθείαν σε ιόντα που βρίσκονται στην αέρια φάση (εκρόφηση- *desorption sources*) (26).

Ακολουθεί ο Πίνακας 4 όπου βρίσκονται όλες οι κύριες τεχνικές δημιουργίας ιόντων χωρισμένες σε αέριας φάσης και εκρόφησης.

Πίνακας 4: Τεχνικές ιονισμού στη φασματομετρία μάζας (26)

Ομάδα	Όνομα και συντομογραφία	Τρόπος Ιονισμού
Αέριας Φάσης	Πρόσκρουσης ηλεκτρονίων (electron impact-EI)	Ηλεκτρόνια μεγάλης ενέργειας
Αέριας Φάσης	Χημικός ιονισμός (chemical ionization- CI)	Αντιδραστήρια – Ιόντα σε αέρια φάση
Αέριας Φάσης	Εκρόφησης πεδίου (field desorption- FD)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Εκρόφησης	Εκρόφησης πεδίου (field desorption- FD)	Ηλεκτρόδιο υψηλού δυναμικού
Εκρόφησης	Ψεκασμός σε ηλεκτρικό πεδίο (electrospray ionization–ESI)	Ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο
Εκρόφησης	Εκρόφησης πλάσματος (plasma desorption-PD)	Θραύσματα σχάσης ²⁵² Cf
Εκρόφησης	Ιοντισμός με θερμοψεκασμό (thermospray ionization-TS)	Υψηλή θερμοκρασία
Εκρόφησης	Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας (fast atom bombardment-FAB)	Δέσμη ατόμων μεγάλης ενέργειας
Εκρόφησης	Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού υποστρώματος (matrix assisted laser desorption ionization-MALDI)	Ακτίνα λέιζερ
Εκρόφησης	Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος (secondary ion Mass Spectrometry-SIMS)	Δέσμη ιόντων μεγάλης ενέργειας

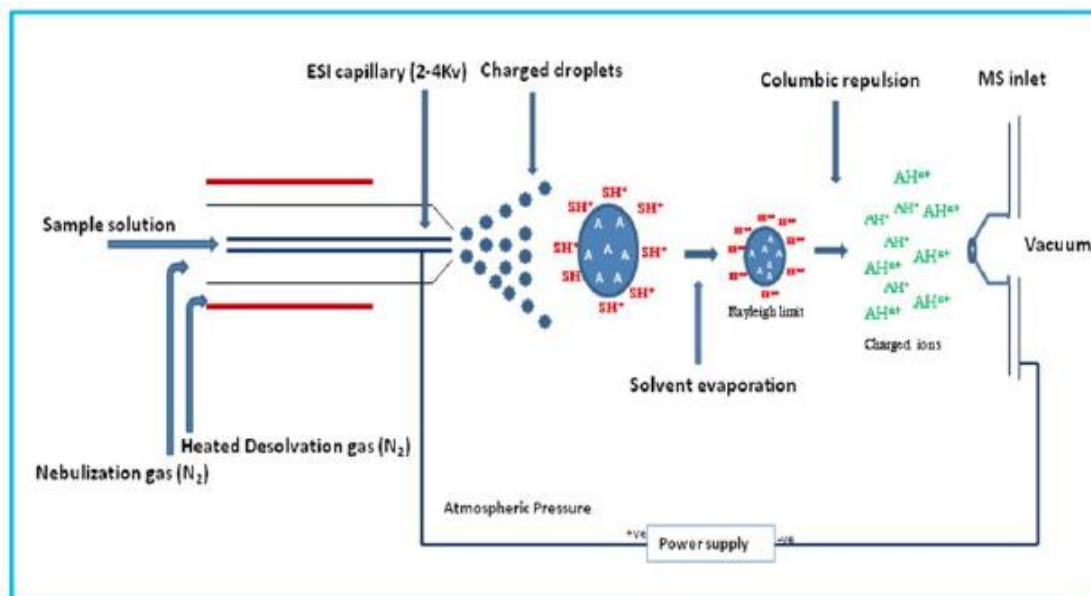
Οι τρόποι ιονισμού των ενώσεων είναι:

- Ιοντισμός με πρόσκρουση ηλεκτρονίων (Electron Impact,EI)
- Χημικός Ιοντισμός (Chemical Ionization, CI)

- Ιοντισμός εκρόφησης υποβοηθούμενος από υλικό υποστρώματος και laser (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI)
- Ιοντισμός με ταχέως κινούμενα άτομα (Fast Atom Bombardment, FAB)
- Χημικός Ιοντισμός σε Ατμοσφαιρική Πίεση (Atmospheric pressure chemical ionization, APCI)
- Ψεκασμός σε ηλεκτρικό πεδίο (Electrospray Ionization, ESI)

Η τεχνική ESI είναι μια ήπια/μαλακή τεχνική ιονισμού. Επιπλέον έχουμε περιορισμένη θραύση των μορίων του αναλύτη και τα αντίστοιχα φάσματα είναι καθαρά, απλά και εύκολα στην μελέτη τους. Η συγκεκριμένη τεχνική παράγει ιόντα με πολλαπλό φορτίο, οπότε ο λόγος m/z μειώνεται αισθητά και έτσι η χρήση π.χ. ενός τετραπολικού ανιχνευτή με εύρος ανίχνευσης σχετικών μοριακών μαζών μικρότερο του 1500, είναι δυνατή (28). Από την κατανομή των κορυφών του φάσματος μπορεί να βρεθεί το φορτίο της κάθε κορυφής και στη συνέχεια να προσδιορισθεί το μοριακό βάρος της πρωτεΐνης. Το μέσο φορτίο αυξάνεται περίπου γραμμικά με το μοριακό βάρος στα φάσματα των πρωτεϊνών (26). Η διαδικασία της ESI απεικονίζεται απλά στο Σχήμα 14, και πραγματοποιείται σε συνθήκες ατμοσφαιρικής πίεσης. Μέσω ενός ανοξειδωτού τριχοειδούς σωλήνα, το διάλυμα του αναλύτη αντλείται και ρέει με ταχύτητα μερικών $\mu\text{L}/\text{min}$. Ο τριχοειδής σωλήνας είναι γειωμένος, αλλά το απέναντι αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο βρίσκεται σε δυναμικό της τάξης των μερικών kV. Μεταξύ του τριχοειδούς και του ηλεκτροδίου δημιουργείται ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο. Για να δημιουργηθεί εκνέφωμα στην άκρη του τριχοειδούς διαβιβάζεται μέσω ενός εξωτερικού σωλήνα αέριο ξήρανσης, που συνήθως είναι θερμό άζωτο. Το διάλυμα του αναλύτη ψεκάζεται στο χώρο του ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός νέφους επιφανειακά, φορτισμένων σταγονιδίων. Ο διαλύτης όμως εξατμίζεται πάρα πολύ γρήγορα. Το φορτίο των σταγονιδίων ενισχύεται όσο εξατμίζεται ο διαλύτης. Η ενίσχυση του φορτίου των σταγονιδίων συνεχίζεται μέχρι ενός σημείου -όριο σταθερότητας Rayleigh- κατά το οποίο τα σταγονίδια διασπώνται σε μικρότερα σταγονίδια αφού η ηλεκτροστατική άπωση (δυνάμεις Coulomb) είναι μεγαλύτερη της επιφανειακής τους τάσης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές μέχρι να σχηματιστούν μικροσκοπικά σταγονίδια. Τα ιόντα που

προκύπτουν απωθούνται (‘‘εξατμίζονται’’) από τα σταγονίδια λόγω των ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Τα ιόντα, σε αέρια φάση, εισέρχονται στον αναλυτή μαζών. Η ESI τεχνική είναι η πιο διαδεδομένη στην περίπτωση που έχουμε σύζευξη υγροχρωματογραφίας και φασματογραφίας μαζών (28).



Σχήμα 14: Σχηματικό διάγραμμα τεχνικής ιονισμού ESI (31)

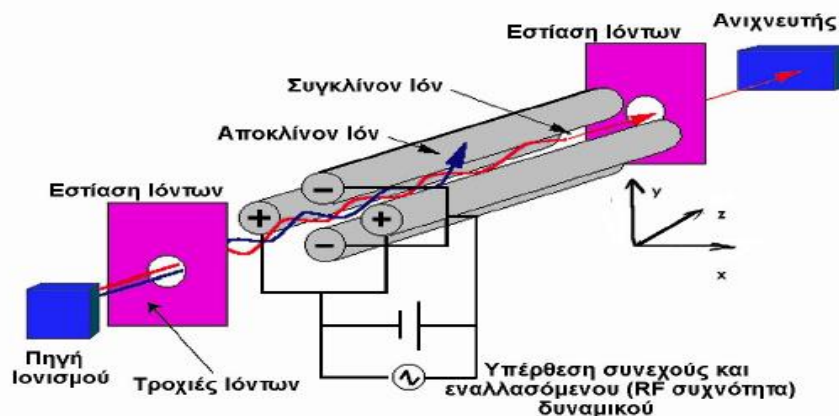
2.2.3.3 Αναλυτές μαζών

Ο αναλυτής είναι μια διάταξη, που διαχωρίζει τα ιόντα που έρχονται από την πηγή ιόντων ανάλογα με το λόγο m/z . Άρα λοιπόν ένας ιδανικός αναλυτής θα ήταν σε θέση να διαχωρίσει ιόντα που διαφέρουν ελάχιστα στο λόγο m/z . Επίσης, θα έπρεπε να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές ιονισμού, με όλες τις διαφορετικές διαδικασίες εισαγωγής του προς ανάλυση δείγματος και επιπλέον να μπορεί να διαχωρίσει ένα μεγάλο πλήθος εισερχόμενων ιόντων. Ένας αναλυτής μαζών διαχωρίζει ιόντα, άρα η διαχωριστική ή διακριτική του ικανότητα R (Resolution, R) (28).

Τα ήδη αναλυτών μαζών που χρησιμοποιούνται είναι τα εξής

- Αναλυτής Μαγνητικού τομέα απλής εστίασης (Magnetic Sector Analyzer, B)
- Αναλυτής Μαγνητικού τομέα διπλής εστίασης
- Αναλυτής παγίδα ιόντων (Ion trap, IT)
- Αναλυτής χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF)
- Τετραπολικός αναλυτής μαζών (Quatrupole Mass Analyser, Q)

Ο τετραπολικός αναλυτής μαζών είναι μια διάταξη με αρκετά πλεονεκτήματα, που τον καθιστούν τον πιο συνηθισμένο τύπο αναλυτή στη φασματομετρία μάζων. Πρώτα από όλα έχει χαμηλό κόστος, μικρές διαστάσεις και παρουσιάζει τις μεγαλύτερες μηχανικές αντοχές από τους υπόλοιπους ανιχνευτές. Επιπλέον παρουσιάζει μεγάλες τιμές ταχυτήτων σάρωσης, με αποτέλεσμα να μας παρέχει ολόκληρο το φάσμα του αναλύτη σε χρονικό διάστημα μικρότερο από 100 ms και επίσης παρουσιάζει δυνατότητα σύζευξης με χρωματογραφικές τεχνικές. Αποτελείται από τέσσερις, παράλληλες μεταξύ τους, κυλινδρικές, μεταλλικές ράβδους που λειτουργούν σαν ηλεκτρόδια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 15.



Σχήμα 15: Σχηματικό διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή μαζών (32)

Είναι τοποθετημένες με τέτοιο τρόπο ώστε ανά δύο, σε διαγώνια διάταξη να σχηματίζουν ζευγάρι και να συνδέονται το ένα ζεύγος με τον θετικό πόλο μια πηγής συνεχούς ρεύματος και το δεύτερο ζεύγος με τον αρνητικό πόλο. Επιπλέον σε κάθε ζευγάρι ράβδων εφαρμόζονται εναλλασσόμενες τάσεις που διαφέρουν μεταξύ τους κατά 180° . Η πηγή του εναλλασσόμενου ρεύματος λειτουργεί με υψηλή συχνότητα της τάξης των ραδιοκυμάτων. Όμως πρέπει να επιταχυνθούν τα ιόντα, για να πάρουμε το φάσμα τους, και έτσι χρησιμοποιείται και μια ακόμη πηγή συνεχούς ηλεκτρικού ρεύματος με τάση πόλων από 5 έως 10 Volt. Η εναλλασσόμενη και η συνεχής τάση που έχουν εφαρμοσθεί στα ζεύγη των ράβδων έχουν σταθερό λόγο παρόλο που αυξάνονται ταυτόχρονα ξεκινώντας από το μηδέν και καταλήγοντας σε μια μέγιστη τιμή. Η διακριτική τιμή του τετράπολου μεγιστοποιείται, όταν αυτός λόγος είναι λίγο μικρότερος από 6. Το σύνολο των εφαρμοζόμενων διαφορών δυναμικού επιδρά με διαφορετικό τρόπο στην τροχιά των ιόντων που διέρχονται από τον χώρο

μεταξύ των ηλεκτροδίων ανάλογα με το λόγο m/z . Τα ιόντα εκείνα που αντιστοιχούν στο δυναμικό που εφαρμόζεται θα διαπεράσουν και θα εξέλθουν από το τετράπολο προς τον ανιχνευτή. Τα υπόλοιπα ιόντα φθάνουν στα τοιχώματα του τετράπολου, μεταβάλλονται σε ουδέτερα μόρια και απομακρύνονται. Λόγω του γεγονότος αυτού, κάποιες φορές αναφέρεται και ως «φίλτρο μαζών», αφού μόνο τα ιόντα των οποίων ο λόγος m/z αντιστοιχεί σε μία στενή περιοχή τιμών διαπερνούν το συγκεκριμένο σύστημα διαγράφοντας ελικοειδείς τροχιές. Το τετράπολο διαθέτει ένα επιπλέον πλεονέκτημα σε σχέση με τον αναλυτή μαγνητικού τομέα, τα ιόντα στο πρώτο εισάγονται στην περιοχή ανάλυσης μέσω κυκλικού διαφράγματος, ενώ στον δεύτερο μέσω σχισμής. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα να εισάγεται μεγαλύτερη ποσότητα δείγματος, κάτι που δεν μπορεί να συμβεί στον αναλυτή τομέα, όπου το πλάτος της σχισμής και η διακριτική του ικανότητα είναι μεγέθη αντιστρόφως ανάλογα. Αυτή τη στιγμή στην αγορά υπάρχουν διαθέσιμα πολλά φασματόμετρα μαζών με τετραπολικό αναλυτή, που μπορούν να διακρίνουν περιοχές ιόντων με λόγο m/z μέχρι 3000 ή και 4000 (26).

2.2.3.4 Σύστημα κενού και επεξεργασία δεδομένων

Προκειμένου να λειτουργήσει σωστά ένα φασματόμετρο μάζας πρέπει τα ιόντα των αναλυτών που επεξεργάζεται, αλλά και τα ηλεκτρόνια που κινούνται στο εσωτερικό του, να μη συγκρούονται με τα μόρια των αερίων της ατμόσφαιρας. Κάτι τέτοιο θα σήμαινε αλλαγή της δομής των φορτισμένων σωματιδίων και αλλοίωση της ανάλυσης τους γιατί θα εμφανιζόταν σήματα από τον ιονισμό των μορίων του αέρα. Οπότε όλα τα τμήματα του φασματόμετρου μάζας, εκτός από τον επεξεργαστή του ηλεκτρικού σήματος και του συστήματος ανάγνωσης και καταγραφής δεδομένων, πρέπει να βρίσκονται σε συνθήκες ιδιαίτερα χαμηλής πίεσης των 10^{-4} με 10^{-8} Torr. Το τελευταίο το φροντίζει ένα πολύπλοκο σύστημα κενού. Η ποσότητα των πληροφοριών που παρέχεται από ένα φασματόμετρο μάζας είναι πολύ μεγάλη και είναι απαραίτητη η γρήγορη συλλογή και επεξεργασία τους. Επιπλέον η παραπάνω διαδικασία δεν είναι μονοδιάστατη, αλλά πρέπει ταυτόχρονα να γίνεται έλεγχος ή παρακολούθηση πολλών παραμέτρων που σχετίζονται με τον τρόπο λειτουργίας του συστήματος, όπως η θερμοκρασία της πηγής, η ταχύτητα σάρωσης, η ένταση του μαγνητικού πεδίου κλπ. Κάτι τέτοιο είναι πολύ δύσκολο να γίνει με ανθρώπινο χειρισμό,

οπότε η χρήση ενός υπολογιστή είναι άκρως απαραίτητη. Ο υπολογιστής επεξεργάζεται το ψηφιοποιημένο ιοντικό ρεύμα κατάλληλα και το μετατρέπει σε τιμές m/z και εντάσεις κορυφών ώστε να μπορεί να γίνει ερμηνεία των φασμάτων από τον ερευνητή. Επιπλέον είναι σε θέση τα σύγχρονα υπολογιστικά συστήματα που είναι συνδεδεμένα με φασματομέτρα μάζας, να αναζητούν αρχεία φασμάτων σε μεγάλες «ηλεκτρονικές βιβλιοθήκες», που ταιριάζουν με το φάσμα της εξεταζόμενης ουσίας και συνεπώς να επιτυγχάνεται η γρήγορη ταυτοποίηση της (26).

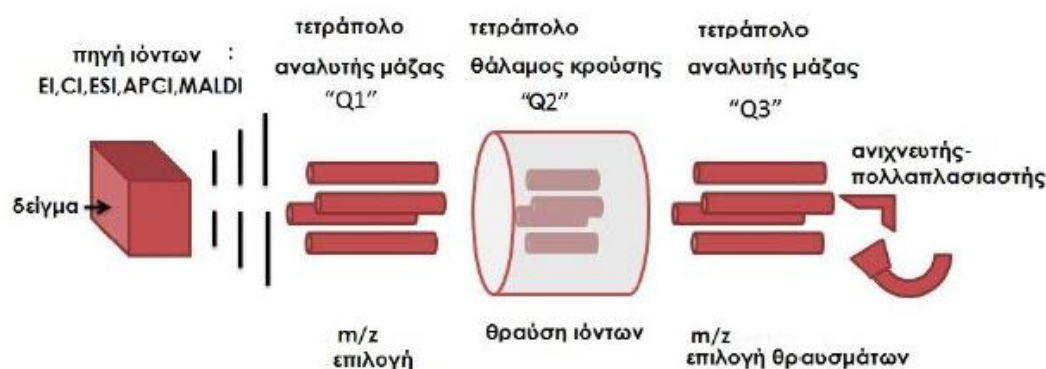
2.2.4 Τεχνικές ανάλυσης στη φασματομετρία μαζών

Οι τεχνικές ανάλυσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ανεξάρτητα από τη μέθοδο ιοντισμού και την τεχνική διαχωρισμού που ακολουθείται, στη φασματομετρία μαζών είναι :

- Η τεχνική πλήρους σάρωσης (full scan)
- Η τεχνική της επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων (single ion monitoring, SIM)
- Η συζευγμένη φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry, MS/MS), που περιλαμβάνει μερικές υποπεριπτώσεις τεχνικών σάρωσης.

Όπως δηλώνει και η ονομασία της αυτή η τεχνική περιλαμβάνει τουλάχιστον δυο διαδικασίες φασματομετρικής ανάλυσης. Τα συζευγμένα φασματομέτρα μπορούν να περιλαμβάνουν διάφορους συνδυασμούς ηλεκτρικών τομέων, μαγνητικών τομέων, τετραπόλων κ.α. Το αποτέλεσμα είναι η δημιουργία συστημάτων τριπλών τετραπόλων (QQQ) ή υβριδικών όπως τα Q-IT (Quadrupole - Ion Trap), Q-TOF (Quadrupole - TOF), IT-TOF (Ion Trap - TOF), LIT-Orbitrap (Linear Ion Trap – Orbitrap) που είναι σε θέση να επιλέξουν ένα μόνο ιόν και να το αφήσουν να περάσει ή να επιτρέψουν την δίοδο όλων των ιόντων. Τα ιόντα μπορούν να υποβληθούν σε διάφορες διαδικασίες στους αναλυτές, οι οποίοι επίσης μπορούν να λειτουργήσουν είτε σε σάρωση είτε όχι. Αυτές οι επιλογές μας δίνουν την δυνατότητα να πραγματοποιήσουμε πληθώρα αναλυτικών πειραμάτων, που μας παρέχουν πληροφορίες για τη δομή και τη σύνθεση πολύπλοκων ενώσεων όπως πολυσακχαριτών, λιπιδίων, πρωτεϊνών κ.α. και ταυτόχρονα να πετύχουμε περαιτέρω ευαισθησία και εξειδίκευση στις μετρήσεις. Συγκριτικά με τις υπόλοιπες τεχνικές που χρησιμοποιούν

φασματόμετρα μάζων, η τεχνική της συζευγμένης φασματομετρίας μαζών παρουσιάζει τη μεγαλύτερη συχνότητα χρήσης και μπορεί η ανάλυση να πραγματοποιηθεί στο χώρο ή στο χρόνο. Για την πρώτη περίπτωση ανάλυσης (Tandem Mass Spectrometry in Space) απαιτούνται τουλάχιστον δύο αναλυτές μαζών. Σήμερα η πιο συνηθισμένη και χρησιμοποιούμενη διάταξη περιλαμβάνει τρία τετράπολα (Triple Quadrupole, QQQ). Το πρώτο τετράπολο (Q1) και το τρίτο τετράπολο (Q3) λειτουργούν ως αναλυτές- διαχωριστές της διαδικασίας MS και το δεύτερο τετράπολο (Q2), είναι ένας θάλαμος κρούσεων- θραύσης των ιόντων που προέρχονται από το Q1. Στο θάλαμο του τετράπολου Q2 εισάγεται συνήθως ένα αδρανές αέριο όπως το ήλιο ή το αργό σε πίεση 10^{-3} με 10^{-4} Torr. Μια αναπαράσταση του τριπλού τετραπόλου φαίνεται στο Σχήμα 16.



Σχήμα 16: Σχηματικό διάγραμμα τριπλού τετράπολου (QQQ) (33)

Επίσης διαφέρουν και τα φάσματα που λαμβάνονται με MS/MS στο χρόνο από τα φάσματα με MS/MS στο χώρο. Μια ποικιλία από τεχνικές σάρωσης MS/MS περιγράφονται στη βιβλιογραφία, αλλά οι τέσσερις πιο συχνές είναι η σάρωση πρόδρομου ιόντος (precursor ion), η σάρωση παραγόμενων ιόντων (product ion), που αναφέρεται επίσης και ως multiple-reaction monitoring (MRM), η ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (constant neutral loss), και η σάρωση επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων. Οι προαναφερθείσες τεχνικές φαίνονται στο Σχήμα 17 (33).

➤ Σάρωση πρόδρομου ιόντος (Precursor ion scan)

Το τετράπολο Q1 λειτουργεί σε συνθήκες πλήρους σάρωσης και τα ιόντα εισέρχονται σε αυτό. Μετά την είσοδο τους στο Q2 υφίστανται θραύση και δημιουργούνται τα θυγατρικά ιόντα. Ακολουθεί η δεύτερη ανάλυση στην οποία

το Q3, από όπου εξέρχονται ιόντα προς τον αναλυτή που έχουν συγκεκριμένες τιμές του λόγου m/z . Τα μητρικά ιόντα, που έδωσαν τα συγκεκριμένα θυγατρικά ιόντα, είναι αυτά που φαίνονται στο φάσμα που παραλαμβάνεται

➤ Σάρωση παραγόμενων ιόντων (Product ion scan)

Η συγκεκριμένη τεχνική σάρωσης χρησιμοποιείται ταχτικά στην MS/MS. Σε αυτή την τεχνική ο πρώτος αναλυτής Q1 επιλέγει ένα ιόν, που λέγεται πρόδρομο ιόν. Το επιλεγμένο ιόν μεταβαίνει στο Q2, όπου θραύσματοποιείται σε ιόντα και σε ένα ή περισσότερα ουδέτερα μόρια. Η αιτία της θραύσης είναι η σύγκρουση των ταχέως κινούμενων προδρόμων ιόντων με τα μόρια αργού ή αζώτου που βρίσκονται εκεί. Τα φορτισμένα θραύσματα εισέρχονται στον Q3 που λειτουργεί σε συνθήκες πλήρους σάρωσης και κατόπιν στον ανιχνευτή. Ο συγκεκριμένος τρόπος όμως σάρωσης είναι αργός, οπότε δεν είναι κατάλληλος για ποσοτικές αναλύσεις. Είναι όμως κατάλληλος για την εξέταση πολύπλοκων μιγμάτων, επειδή έχει τη δυνατότητα να παρέχει πληροφορίες ξεχωριστά για τη δομή μιας ένωσης.

➤ Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου (Constant neutral loss scan, CNL)

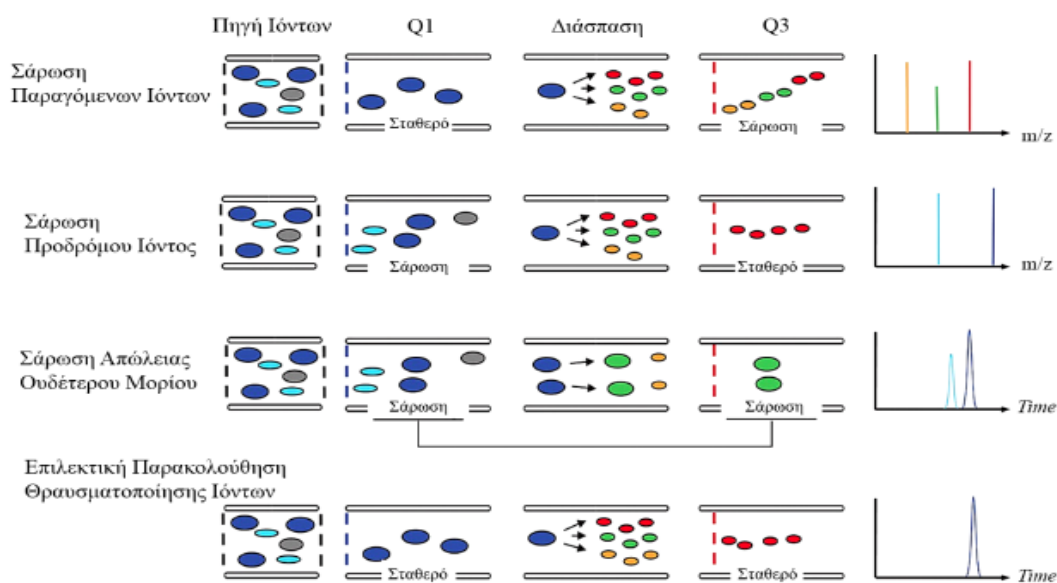
Σε αυτή την τεχνική τα δύο τετράπολα Q1 και Q3 σαρώνουν ιόντα των οποίων οι λόγοι m/z έχουν μια καθορισμένη διαφορά. Οπότε ανιχνεύονται ιόντα που υφίστανται αυτή την απώλεια μάζας μέσα στο θάλαμο θραύσης Q2. Με αυτό τον τρόπο ανιχνεύονται ιόντα που προέρχονται από τη θραύση μορίων χημικών (33).

➤ Σάρωση επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων (Single/Selected Reaction Monitoring, SRM).

Με αυτή την τεχνική επιλέγεται η παρακολούθηση μιας συγκεκριμένης αντίδρασης θραύσης ιόντος ή μιας ομάδας αντιδράσεων θραύσης. Όταν επιλέγεται μια μόνο αντίδραση θραύσης, δηλαδή όταν ένα πρόδρομο ιόν δίνει ένα θυγατρικό ιόν, τότε η τεχνική αυτή ονομάζεται «επιλεκτική παρακολούθηση αντίδρασης θραυσματοποίησης ιόντων» (Single/Selected Reaction Monitoring, SRM). Χαρακτηρίζεται από υψηλή ευαισθησία, αναπαραγωγιμότητα και εκλεκτικότητα. Όταν επιλέγονται δυο ή περισσότερα ιόντα θραύσης, τότε η μέθοδος ονομάζεται «παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων θραυσματοποίησης ιόντων» (Multiple Reaction Monitoring, MRM). Και με αυτή τη μέθοδο πετυχαίνουμε υψηλή ευαισθησία και γρήγορη σάρωση. Όπως και

στην SRM έτσι και εδώ το υπόβαθρο χημικού θορύβου είναι χαμηλό. Για να δημιουργήσει μια χημική ένωση πρόβλημα στη συγκεκριμένη διαδικασία θα πρέπει ταυτόχρονα να δίνει μητρικό ιόν ίδιου λόγου m/z με την ένωση, που αναλύεται, και βέβαια η θραύση της να δίνει τα ίδια θυγατρικά ιόντα (33).

Η φασματομετρία μάζας είναι μια τεχνική που στηρίζεται στην παραγωγή θραυσμάτων του μορίου μιας ένωσης, με διάφορους λόγους m/z , και στην ανάλυση αυτών. Το πρόβλημα ξεκινά όμως όταν πρέπει να αναλυθούν περίπλοκα μείγματα, γιατί τώρα παράγεται πληθώρα θυγατρικών ιόντων και το αντίστοιχο φάσμα μαζών είναι σχεδόν αδύνατο να οδηγήσει σε ασφαλή συμπεράσματα. Για αυτό το λόγο ένας φασματογράφος μάζας συνδυάζεται με ένα, τουλάχιστον, επιπλέον όργανο διαχωρισμού. Σε τέτοιες περιπτώσεις προκύπτει ένα νέο όργανο, αποτελεσματικότερο των όσων συνδυάστηκαν, με νέα πρωτόκολλα λειτουργίας. Η καινούρια τεχνική λέγεται συζευγμένη τεχνική (hyphenated technique) και μια τέτοια προκύπτει από τη σύζευξη της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας (LC) και του φασματογράφου μάζας (MS) (26).



Σχήμα 17: Σχηματικό διάγραμμα των τεσσάρων τεχνικών σάρωσης (33)

2.2.5 Εφαρμογές της σύζευξης των τεχνικών υγροχρωματογραφίας και φασματομετρίας μάζας

Ο συνδυασμός της ευαισθησίας της MS με την επιλεκτικότητα της LC, είχε σαν αποτέλεσμα την υπέρβαση ορισμένων από τις προκλήσεις που παρουσιάζονται στην περιβαλλοντική ανάλυση. Η MS είναι πιο αξιόπιστος ανιχνευτής μικρο-ρύπων σε σχέση με άλλους που χρησιμοποιούνται συνήθως με την LC. Με τη σωστή ρύθμιση, η σύζευξη LC-MS μπορεί να αναλύσει άγνωστες ενώσεις ή ενώσεις που βρίσκονται σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις όπως μέρη ανά τρισεκατομμύριο. Το LC-MS είναι η πιο δημοφιλής τεχνική για την ανίχνευση και την ανάλυση ενός μεγάλου φάσματος ενώσεων, που ανήκουν στα φυτοφάρμακα. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση ενδοκρινικών διαταράχτων (EDCs) που μπορεί να είναι ένα πρόβλημα στα λύματα και μπορεί να διαταράξει το ενδοκρινικό σύστημα (34). Το LC-MS με αναλυτή μάζας Orbitrap προσφέρεται και για περιβαλλοντική ανάλυση. Ο αναλυτής Orbitrap παρουσιάζει πολύ υψηλή διακριτική ικανότητα, μεγάλη ακρίβεια μάζας καθώς επίσης έχει τη δυνατότητα ανίχνευσης μεγάλου εύρους μαζών. Ωστόσο, η αργή ταχύτητα σάρωσης σε αναλύσεις άνω των 100.000 Da καθιστά δύσκολη τη σύνδεση με την UPLC, η οποία έχει αιχμή πλάτους διάρκειας μερικών δευτερόλεπτων. Έχει χρησιμοποιηθεί για περιβαλλοντικές εφαρμογές όπως η ανάλυση νιτροζαμινών στα λύματα, καθώς και για ποσοτικό προσδιορισμό ενώσεων-στόχων και εντοπισμό άγνωστων. Το LC-MS με αναλυτή qTOF έχει χρησιμοποιηθεί για τη διαχωρισμό ενώσεων από αντιβιοτικά έως εντομοκτόνα. Η σύζευξη LC-MS/MS, χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση υπερφθοριωμένων οργανικών ενώσεων (PFOS) σε χαμηλή συγκέντρωση. Τα PFOS βρίσκονται σε προϊόντα καθαρισμού, υφάσματα και φωτογραφικά υλικά. Ο συνδυασμός LC με φασματομετρία μάζας υψηλής ανάλυσης (HRMS) είναι εξαιρετικός για την ευρεία εξέταση διαφόρων οργανικών ρύπων στο περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων των προϊόντων αποικοδόμησης. Το σύστημα HRMS προσφέρει ευαισθησία, υψηλή ακρίβεια ανάλυσης μάζας και είναι κατάλληλο για στοχευμένες και μη ενώσεις (34). Για να είναι μια ανάλυση επιτυχημένη θα πρέπει η προετοιμασία του υποστρώματος του δείγματος, αλλά και του ίδιου του δείγματος να προηγούνται της LC-MS διαδικασίας. Στην περιβαλλοντική ανάλυση που αφορά αναλύσεις

σχετικά καθαρών δειγμάτων όπως νερό βρύσης, υπόγεια ύδατα, επιφανειακά ύδατα κ.α. Οι τεχνικές LC-MS και LC-MSⁿ δίνουν και οι δύο καλές πληροφορίες. Για δείγματα όμως όπως λύματα, χώμα, ιζήματα κ.α. η τεχνική LCMSⁿ δίνει καλύτερα αποτελέσματα ειδικά αν η προετοιμασία του δείγματος είναι γενική και όχι εξειδικευμένη. Οι προσδιορισμοί οργανικών μικρορυπαντών σε στερεά δείγματα, όπως έδαφος και ιζήματα μπορούν επίσης να εκτελεστούν από την LC-MS με τις διαδικασίες που περιγράφονται για τα δείγματα νερού. Προηγείται όμως η διαδικασία της εκχύλισης από το έδαφος ανάλογα με την περίπτωση. Οι απαιτήσεις επίσης για την ανίχνευση εκρηκτικών ουσιών σε δείγματα εδάφους, έχουν αυξηθεί και η χρήση της LC-MS είναι υποχρεωτική για την ανάλυση ορισμένων από αυτές (34).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

3.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη και επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των αντιβιοτικών σουλφαδιαζίνη και τριμεθοπρίμη, καθώς και άλλης μίας μεθόδου για τον προσδιορισμό του αντιβιοτικού υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη σε τροφές ψαριών. Η επιλογή των ενώσεων βασίστηκε στην αποτελεσματική τους δράση ως αντιμικροβιακοί παράγοντες στις υδατοκαλλιέργειες.

Τα επιλεγμένα αντιβιοτικά είναι αντιπροσωπευτικά μέλη ξεχωριστών χημικών οικογενειών με διαφορές στη δομή τους και στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες, γεγονός που καθιστά τον ταυτόχρονο προσδιορισμό να παρουσιάζει αναλυτικό ενδιαφέρον. Συγκεκριμένα, τα επιλεγμένα αντιβιοτικά ανήκουν στις σουλφοναμίδες (σουλφαδιαζίνη), βενζυλοπυριμιδίνες (τριμεθοπρίμη) και τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη). Τόσο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των δύο πρώτων αντιβιοτικών όσο και για τον προσδιορισμό της υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης αναπτύχθηκαν αποτελεσματικές μέθοδοι με χρήση της τεχνικής της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC). Μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων παραγόντων (μέσο εκχύλισης, χρόνος προκατεργασίας κ.α.) κατά την πειραματική διαδικασία και ορίστηκαν οι βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης για τον προσδιορισμό των δραστικών. Ακολούθησε επικύρωση των μεθόδων με χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), ενώ για τον προσδιορισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της τριμεθοπρίμης έγινε χρήση της τεχνικής σύζευξης υγροχρωματογραφίας και φασματομετρίας μαζών, λόγω των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων των δειγμάτων της γραμμής καθαρισμού.

3.2 Υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη

Η παρουσία της οξυτετρακυκλίνης ως αντιβιοτικό σε τροφές ψαριών, έχει επίσης αναπτύξει ενδιαφέρον για ανάπτυξη μεθόδων ώστε να μπορεί να πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της και η ποσοτικοποίησή της.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετές αναλυτικές μέθοδοι που είναι κατάλληλες ώστε να προσδιορίσουν οξυτετρακυκλίνη σε δείγματα.

Ξεκινώντας τις αναφορές σε ηλεκτροχημικές μεθόδους, οι Kurzawa και Kowalczyk-Marzec (35) περιγράφουν μεθόδους ηλεκτροχημικής τιτλοδότησης για τον προσδιορισμό των OTC σε εμπορικά παρασκευάσματα τα οποία χρησιμοποιούνται συνήθως στον κλάδο της κτηνιατρικής. Οι σχετικές τυπικές αποκλίσεις (RSD) που παρατηρήθηκαν με τη χρήση $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, NaOH, AgNO_3 και FeCl_3 ως τιτλοδοτητές των μεθόδων αγωγιμετρικής, ποτενσιομετρικής και κυκλικής βολταμετρικής τιτλοδότησης βρέθηκαν κάτω από 1,0 %.

Επιπλέον, για τον προσδιορισμό OTC.HCl σε καθαρά διαλύματα και σε φαρμακευτικά παρασκευάσματα δύο ακόμα μέθοδοι που έχουν προταθεί, είναι η μέθοδος προσθήκης εσωτερικού προτύπου και η μέθοδος ποτενσιομετρικής τιτλοδότησης χρησιμοποιώντας ηλεκτρόδια επιλεκτικά σε υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη. Το χρησιμοποιούμενο εκλεκτικό ηλεκτρόδιο ιόντος είχε απόκριση της τάξεως $1,02 \times 10^{-6}$ έως $1,02 \times 10^{-2}$ mol/L οξυτετρακυκλίνης. Σημειώνεται πως η απόκριση αυτή δεν επηρεάζεται από την αλλαγή του pH εντός της περιοχής 4 έως 11.

Οι Couto et al. (36), ανέπτυξε ένα σύστημα έγχυσης ροής με ποτενσιομετρική ανίχνευση για τον προσδιορισμό της OTC σε φαρμακευτικά προϊόντα. Χρησιμοποιήθηκε ένα ομογενές κρυσταλλικό σωληνοειδές ηλεκτρόδιο διπλής μεμβράνης $\text{CuS} / \text{Ag}_2\text{S}$ για την παρακολούθηση της μείωσης του δισθενή χαλκού λόγω της συμπλοκοποίησης του με OTC. Μέθοδο έγχυσης ροής για την ανίχνευση OTC σε φαρμακευτικά σκευάσματα αναπτύχθηκε επίσης από τους Wangfuengkanagul et al. (37), μέσω ηλεκτροχημικής ανίχνευσης σε αναδιόμοιο ηλεκτρόδιο λεπτής μεμβράνης διαμαντιού ενισχυμένο με βόριο. Το όριο ανίχνευσης βρέθηκε να είναι 10 nm (λόγος σήματος προς θόρυβο = 3). Στη συνέχεια, δύο ακόμα κατηγορίες μεθόδων όπου χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό οξυτετρακυκλίνης είναι οι φασματικές μέθοδοι και οι μέθοδοι χημειοφωταύγειας.

Οι Samola και Urleb (38), ανέφεραν ποιοτική και ποσοτική ανάλυση της OTC χρησιμοποιώντας φασματοσκοπία εγγύς υπέρυθρης ακτινοβολίας (NIR). Διεξήχθη πολυμεταβλητή βαθμονόμηση NIR χρησιμοποιώντας ανάλυση κύριων συνιστωσών (PCA), PLS.

Επίσης, ο Fernandez-Gonzales (39), περιέγραψε μια μέθοδο για τον προσδιορισμό της OTC σε φαρμακευτικά μείγματα και τροφές με σύγχρονη

φασματοφθορομετρία δευτερογενών παραγώγων. Η δοκιμασία αυτή βασίζεται στην αντίδραση της οξυτετρακυκλίνης με ιόν δισθενούς μετάλλου (Ca^{2+}) σε pH 6-10 για να σχηματίσει ένα κίτρινο σύμπλοκο το οποίο μπορεί να αναλυθεί με σύγχρονη φασματοφθορομετρία ($\text{DI}^{1/4} = 115 \text{ nm}$).

Ο Zheng (40), ανέπτυξε μια απλή μέθοδο ηλεκτροπαραγωγής με χημειοφωταύγεια για τον προσδιορισμό της οξυτετρακυκλίνης σε φαρμακευτικές συνθέσεις. Η μέθοδος βασίστηκε στην αντίδραση χημειοφωταύγειας του ηλεκτροπαραγωγού βρωμίου κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου λευκόχρυσου με H_2O_2 και της οξυτετρακυκλίνης. Το όριο ανίχνευσης (λόγος σήματος προς θόρυβο 1:3) της μεθόδου ήταν $7,0 \times 10^{-8} \text{ g / mL}$ οξυτετρακυκλίνης.

Η κυριότερη μέθοδος ανάλυσης όμως είναι από την κατηγορία των χρωματογραφικών μεθόδων και πρόκειται για την υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης.

Ακολουθεί ο Πίνακας 5 που παρουσιάζει διάφορους συνδυασμούς αναλυτικών παραγόντων χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό της οξυτετρακυκλίνης.

Πίνακας 5: Συνδυασμοί αναλυτικών παραγόντων χρωματογραφίας για τον προσδιορισμό της οξυτετρακυκλίνης (41)

Column	Mobile Phase	Detection	Analyte(s) and sample	Extraction and clean up	Detection Limit (DL), Quantitation Limit (QL) and recovery (Rec)
RP C18	0.05 M KH_2PO_4 Buffer pH 2.5 : ACN (84:16 v/v)	Amperometric detection at 1.2 V	OTC, TC, CTC, DMC, DC, MC, MNC in bulk powders and pharmaceutical preparations	Dilution with mobile phase	DL= 0.1-1.0 ng/ μL Rec: 99.1-100.4 %
Xterra MS C18	Gradient A: MeOH : Water (5:95 v/v) added with formic acid (0.08M) B: MeOH, Water (95:5, v/v) added with formic acid (0.08M)	ESI MS/MS	OTC, BOTC, TC, ETC, ADOTC, a-AOTC, β -AOTC in ointments	Extraction with hexane-0.08M formic acid (1:1, v/v)	DL = 0.78 mg/L (OTC); QL=2.60 mg/L (OTC); Rec: 90-112 %
MacMod Hydrobond PS C8	0.01 M Formic Acid-ACN – MeOH (75:18:7)	UV 370 nm; ESI-MS/MS	OTC, TC, CTC in shrimps and whole milk	Extraction with succinic acid, clean-up with OASIS HLB SPE Column	DL= 25-400 ng/g (shrimps); 50-300 ng/g (milk)

Polymer Labs. PLRP-S	Mixture of 0.1 M KH_2PO_4 , 0.01 M citric acid and 0.01M EDTA	UV 350 nm	OTC, TC, CTC, and DMC in sheep liver and cattle kidney	Extraction with succinate buffer, dilution with EDTA-pentanesulphonic	DL= 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (OTC)
Spherisorb ODS 1	0.025 M oxalic acid solution – ACN-THF	UV 355 nm	OTC in bryophyte	Extraction with acetone and Mclvaine Buffer (50/50, v/v) saturated with EDTA	DL= 30 ng/g QL= 100 ng/g Rec: 48 %
RP LUNA C18	ACN-0.01M oxalic acid (85:15, v/v)	UV 355 nm	OTC and its 4 th Epimer in edible tissues from turkeys	Extracted with Mclvaine buffer (pH 4.0) and clean-up by MCAC	DL of OTC = 4.7 g/kg (muscle); 11.0 g/kg (liver), 9.3 g/kg (kidney)
LichroSpher 100 RP 18E	ACN-0.02M orthophosphoric acid (24:76, v/v), pH 2.3	UV 355 nm	OTC and OA in blue mussel (<i>Mytilus edulis</i>)	Extraction with methanolic oxalic acid sol (pH 1.4)	0.012 $\mu\text{g}/\text{g}$ (OTC), Rec = 65.4% (OTC)
Silasorb C8	MeOH-0.01 M oxalic acid, pH 3.0 (30:70, V/V)	UV 250 nm	OTC in pharmaceutical formulation	Dilution with MeOH	DL: 2 ng; QL = 10 ng (injected onto the column)
Hypercarb porous graphitic carbon	0.05M potassium phosphate buffer (pH 2.0)- CAN (40-60)	UV 268 nm	OTC, DC, CTC, MC in pharmaceutical products	Tablets: dissolution in mobile phase; ointments: addition of cyclohexane and extracted with buffer solution	Rec= 98.8 % (OTC, ointment); 99.8-101%, tablet)
Inertsil C8	0.1M ammonium acetate (pH 3.0)- ACN (75:25, v/v)	UV 350 nm	OTC in bovine kidney and medicated milk replacer	Extraction: Mclvaine buffer-EDTA solution, clean-up with SPE column	Rec= 84-98 %
LiChrosorb RP 18	MeOH-ACN 0.01M oxalic acid (17.5:17.5:65, %)	UV-DAD	OTC, TC, CTC in meat, milk, and cheese	Extraction with buffer solution, clean-up with SPE or MSPD	Rec=48-86 % (SPE) Rec= 89-93& (MSPD); DL=15-2 ng/g (SPE); 30 ng/g (MSPD)
RP ODS hypersil column	ACN-0.05M sodium phosphate monobasic dihydrate pH 2.2 (22:78, v/v)	Electrochemical detection, 400 mV	OTC, TC, CTC, MC, DC in ovine milk	Extraction with ACN and hexane	12.5 ng/ml (OTC) Rec= 88 % (OTC)
Chromsper C8	ACN- oxalic acid 0.01M (aq. pH 2.0; 20:80)	Fluorescence 385nm/500nm	OTC and TC in salmon muscle	Extraction with EDTA-Mclvaine buffer pH 4.0, clean up with polymeric SPE	QL: 50microg/kg Rec: 83.9-93%
Polymer Labs PLRP-S	Gradient:	Positive ESI-MS/MS	OTC, CTC, TC, DC and its 4-epimer in pig tissues	Extraction with Sodium succinate solution, protein	DL: 0.5 - 4.2 ng/g

	A:0.001M oxalic acid, 0.5% formic acid and 3% THF in water, B: THF			removal with TCA, SPE clean up on polymeric RP column	
Polymer Labs PLRP-S	A:0.1% TFA in water B: ACN	UV 350 nm	OTC in water biofilter sand, sediment, trout tissues	Dilution with acidic buffer containing EDTA, clean up with Polymeric SPE cartridge	DL: 0.04ppm (trout), 0.03ppm (biofilter sand), 1ppm (sediment), 0.003ppm (water) Rec: 82 – 108%
RP C-18	Water, 5% formic acid , ACN, MeOH (23:40:25:12)	ESI-MS/MS	OTC, TC, CTC in lagoon water	Polymeric SPE and C-8 cartridge	DL: 3.6 microg/L Rec: 86 – 110%
Polymer Labs PLRP-S	0.01M oxalic acid-ACN UV (75:5v/v)	360nm	Animal tissues	Extraction with oxalic buffer followed by chelation and deproteinaiion , clean up with styrene-divinylbenzene cartridge	Rec: 76 – 87%
Supelco sil LC-18-DB column	pH 2.3 H ₃ PO ₄ -ACN (76:24 w/v)	355nm	Ovine milk	Extraction with ACN and clean up with CH ₂ Cl ₂ and hexane	DL: 5.2 ng/ml QL: 1705 ng/ml Rec: 85.8 – 98.9%
Polymer Labs PLRP-S	Gradient: Sol A: 0.1M KH ₂ PO ₄ , 0.01M citric acid , 0.01M EDTA, B: ACN:MeOH:buffer (25:10:65 v/v)	UV 350nm	Egg, anomal tissues	Extraction with EA, evaporated reconstituted in MeOH on-line MCAC clean up	DL: 3µg/kg 91 – 94% (egg) 101 – 104% (animal tissues)
Polymer Labs PLRP-S	Gradient: A: 0.02M H ₃ PO ₄ and 0.01M sodium 1-decansulfonate , B: ACN	UV-DAD 355nm	OTC, T, CTC, DCin eggs and boiler ment	Extraction with CH ₂ Cl ₂ and petroleum ether	DL: 2.2 ng/g (OTC, eggs) QL: 13.0ng/g (OTC, eggs) Rec= 76%
High purity C-18 silica column Inertsil ODS 2	Gradient: A: ACN:H ₂ O (10:90) containing 0.04% (v/v) heptafluorobutyric acid, 10mM oxalic	APCI-MS	OTC, TC, CTC and its isomers in muscle and kidney	Extraction with glycine- HCl buffer , clean up with isolate cyclohexyl cartridge	DL: 10ng/g (muscle) 20ng/g (kidney) Rec: 56 – 74%

	acid and 10 μ M EDTA ammonium salt, B: ACN:H ₂ O (90:10) containing 0.04% (v/v) heptafluorobutyric acid, and 10 μ M EDTA ammonium salt				
Zorbax SB C-18	Mixture of 0.001M ETA, 0.05M citric acid, 0.013M trisodium citrate and 0.1M KNO ₃ -DMF-ACN (65:25:10)	UV 353nm	Fish muscles	Extraction with McIlvaine buffer Ph 4.0 containing EDTA, addition of TCA	QL: 0.04 μ g/g Rec: 33 – 35%

Ο προσδιορισμός στις περισσότερες περιπτώσεις έχει πραγματοποιηθεί με στήλες αντίστροφης φάσης (Reversed Phase) και δεκαοκτυλοπυριτία (ODS). Κατά την αλληλεπίδραση της οξυτετρακυκλίνης με τα μεταλλικά ιόντα στο πληρωτικό υλικό αντίστροφης φάσης οδηγεί σε σχηματισμό χειλικών συμπλοκών με αποτέλεσμα την μη σωστή ανίχνευση κορυφών. Για να αποφευχθεί το πρόβλημα αυτό γίνεται προσθήκη EDTA που είναι παράγοντας συμπλοκοποίησης στην κινητή φάση.

Βασιζόμενοι στα στοιχεία της βιβλιογραφίας αναπτύχθηκε από κοινού με το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ, ένα προτεινόμενο πρωτόκολλο μεθόδου ανάλυσης για δείγματα πρώτης ύλης, φαρμακώχων ιχθυοτροφών (Medicated) και δείγματα από την γραμμή καθαρισμού.

3.2.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης για τον προσδιορισμό οξυτετρακυκλίνης σε δείγματα ιχθυοτροφών

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης φαρμακούχας ιχθυοτροφής (Medicated) :
 - ✓ Ζύγιση 0,5 g ιχθυοτροφής σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL.
 - ✓ Προσθήκη 10 mL HCl 0,1M και χειρωνακτική ανακίνηση για 2 λεπτά.
 - ✓ Υπέρηχοι για 20 λεπτά στους 45 °C.
 - ✓ Προσθήκη 10 mL MeOH και χειρωνακτική ανακίνηση για 2 λεπτά.
 - ✓ Υπέρηχοι για 20 λεπτά στους 45 °C.
 - ✓ Πλήρωση με διάλυμα [(McInaine buffer/EDTA 0,1M) : MeOH] (90:10 v/v) έως χαραγή.
 - ✓ Φιλτράρισμα ποσότητας με φίλτρο τύπου RC.
 - ✓ Λήψη 100 μL του φιλτραρισμένου δείγματος σε περιέκτη και προσθήκη σε αυτόν 900 μL διαλύματος [(McInaine buffer/EDTA 0,1M) : MeOH] (90:10 v/v).
 - ✓ Ανάδευση για ομοιογενοποίηση δείγματος.

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης μη φαρμακούχας ιχθυοτροφής με σκοπό τον έλεγχο της γραμμής καθαρισμού :
 - ✓ Ζύγιση 1 g ιχθυοτροφής σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL.
 - ✓ Προσθήκη 5 mL HCl 0,1M και χειρωνακτική ανακίνηση για 2 λεπτά.
 - ✓ Υπέρηχοι για 20 λεπτά στους 45 °C.
 - ✓ Προσθήκη 5 mL MeOH και χειρωνακτική ανακίνηση για 2 λεπτά.
 - ✓ Υπέρηχοι για 20 λεπτά στους 45 °C.
 - ✓ Πλήρωση με διάλυμα [(McInaine buffer/EDTA 0.1M) : MeOH] (90:10 v/v) έως χαραγή.
 - ✓ Φιλτράρισμα ποσότητας με φίλτρο τύπου RC.

- Για την παρασκευή δειγμάτων πρώτης ύλης, καθαρότητας 50% :
 - ✓ Ζύγιση 0,1 g πρώτης ύλης σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL.
 - ✓ Προσθήκη 200 mL διαλύματος [(Mclvaine buffer/EDTA 0.1M) : MeOH] (90:10 v/v).
 - ✓ Υπέρηχοι για 30 λεπτά στους 45 °C.
 - ✓ Πλήρωση με διάλυμα [(Mclvaine buffer/EDTA 0,1M) : MeOH] (90:10 v/v) έως χαραγή.
 - ✓ Λήψη 125 μ L και αραιώση έως τα 5 mL με διάλυμα [(Mclvaine buffer/EDTA 0.1M) : MeOH] (90:10 v/v).

- Για την παρασκευή δειγμάτων πρώτης ύλης, καθαρότητας 100% :
 - ✓ Ζύγιση 0,1 g πρώτης ύλης σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL.
 - ✓ Προσθήκη 200 mL διαλύματος [(Mclvaine buffer/EDTA 0,1M) : MeOH] (90:10 v/v).
 - ✓ Υπέρηχοι για 30 λεπτά στους 45°C.
 - ✓ Πλήρωση με διάλυμα [(Mclvaine buffer/EDTA 0,1M) : MeOH] (90:10 v/v) έως χαραγή.
 - ✓ Λήψη 125 μ L και αραιώση έως τα 10 mL με διάλυμα [(Mclvaine buffer/EDTA 0,1M) : MeOH] (90:10 v/v).

- Συνθήκες χρωματογραφίας
 - ✓ Κινητή φάση A: Μυρμηγκικό οξύ 1%
 - ✓ Κινητή φάση B: Ακετονιτρίλιο : Μεθανόλη (60:40 v/v)

σε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που ακολουθεί:

Πίνακας 6: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για την οξυτετρακυκλίνη

Χρόνος (min)	A%	B%	Ροή (mL/min)
0	90	10	1,0
8	50	50	1,0

- ✓ Θερμοκρασία στήλης: 30 °C \pm 1 °C
- ✓ Post run: 4 min
- ✓ Χρόνος έκλουσης οξυτετρακυκλίνης: 5,6 min
- ✓ Μήκος κύματος: 360 nm

3.3 Σουλφαδιαζίνη – Τριμεθοπρίμη

Όπως έχει προαναφερθεί, μείγμα σουλφοναμιφίων εφαρμόζεται συνεχώς ως θεραπεία στον κτηνιατρικό κλάδο για διάφορες παθολογίες. Ως εκ τούτου μέθοδοι ρουτίνας που δεν είναι χρονοβόρες είναι απαραίτητες στον κλάδο της φαρμακοβιομηχανίας για τον προσδιορισμό των ενώσεων αυτών σε δείγματα Πρόσφατα, τόσο φασματοφωτομετρικές όσο και φασματοφθορισμομετρικές τεχνικές έχουν εφαρμοστεί για τη διαλυτοποίηση μειγμάτων σε φάρμακα με στόχο τη μείωση του συνολικού χρόνου που καταναλώνεται ανά δείγμα στην ανάλυση, ώστε να εξαλείψει τα σήματα υποβάθρου και να απλοποιήσει τα πειραματικά βήματα πριν από τις μετρήσεις. Έχουν γίνει προτάσεις τόσο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαθειαζόλης και σουλφαδιαζίνης σε φαρμακευτικά προϊόντα όσο και σουλφαθειαζόλης και οξυτετρακυκλίνης σε μέλι χρησιμοποιώντας φασματοφωτομετρία παραγωγοποίησης. Οι τεχνικές παραγωγοποίησης είναι καλά εργαλεία για την ταυτόχρονη ανάλυση οργανικών ενώσεων με φασματοσκοπικές ιδιότητες αλλά συνήθως μόνο δύο ενώσεις μπορούν να προσδιοριστούν λόγω σημαντικών φασματικών αλληλοεπικαλύψεων μεταξύ αυτών. Στην πραγματικότητα, ένας πιο ισχυρός τρόπος αντιμετώπισης των δειγμάτων με τρεις ενώσεις ή ακόμη και πιο πολύπλοκα μίγματα οργανικών ενώσεων, που παρουσιάζουν παρόμοια φασματικά χαρακτηριστικά, είναι η εφαρμογή πολυμεταβλητών μεθόδων ανάλυσης. Με τη βοήθεια ενός κατάλληλου λογισμικού πακέτου είναι δυνατόν να εφαρμοστούν περίπλοκοι μαθηματικοί αλγόριθμοι και να αναπτυχθούν ταχύτερες και πιο συγκεκριμένες μέθοδοι ανάλυσης.

Η ανάλυση μερικών ελαχίστων τετραγώνων (Partial Least Square, PLS) είναι μία μέθοδος βασισμένη στην ανάλυση πολλαπλών παραγόντων και αρχικά αναπτύχθηκε από τον Wold και εφαρμόστηκε στον κλάδο της χημείας από τους Wold et al. Έχουν περιγραφεί μέθοδοι PLS τύπου 1 και τύπου 2. Η διαφορά μεταξύ των δύο τύπων είναι ότι ο τύπος PLS-1 πραγματοποιεί τη βελτιστοποίηση του αριθμού των παραγόντων για ένα μόνο στοιχείο τη φορά. Μόνο δύο παραδείγματα εφαρμογής PLS έχουν περιγραφεί ως μέθοδοι για την ανάλυση σουλφοναμίδης στη βιβλιογραφία. Το πρώτο αναφέρεται στον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαμεθοξαζολίου, σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης με τη χρήση της μεθόδου PLS σε δισκία. Βιβλιογραφικά

αναφέρεται πως η μέθοδος αυτή είναι ταχύτερη από τη συμβατική μέθοδο υγροχρωματογραφίας. Πρόσφατα, ο Sanchez Peña (42), πρότεινε τον προσδιορισμό μειγμάτων δύο σουλφοναμιδίων με φωτοχημική επαγωγή φθορισμού σε συνδυασμό με τη μέθοδο PLS.

Εξετάζοντας τις βιβλιογραφικές αναφορές ως προς τον προσδιορισμό Σουλφαδιαζίνης και Τριμεθοπρίμης, οι περισσότερες μέθοδοι που βρέθηκαν στη βασίζονται στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC).

Πιο συγκεκριμένα, οι Mashhour M. Ghanem και Saleh A. Abu-Lafi ανέπτυξαν μία μέθοδο, άμεση, ακριβείς και σταθερής ένδειξης με σκοπό τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης (SDZ) και Τριμεθοπρίμης (TMP) σε ενέσιμο διάλυμα, με τη χρήση της υγροχρωματογραφίας αντίστροφης φάσης (RP-HPLC) σε συνδυασμό με ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιόδων (PDA).

Οι παράμετροι που ελέγχθηκαν με στόχο τη βέλτιστη επιλογή των χρωματογραφικών παραγόντων ώστε να υπάρξει μια άρτια μέθοδος ταυτόχρονου προσδιορισμού σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης ήταν η τιμή pH (3,5 έως 6,5), η τιμή θερμοκρασίας στήλης (15 °C έως 35 °C), η αναλογία οργανικού και υδατικού διαλύτη στην παρασκευή κινητής φάσεως αλλά και ο έλεγχος και των δύο ουσιών σε διάφορα μήκη κύματος με ανιχνευτή UV-Vis ώστε να προσδιοριστεί το βέλτιστο.

Ο διαχωρισμός των δύο ουσιών επετεύχθη με τη χρήση στήλης C18 (250 x 4,6 mm, 5 μm) σε θερμοκρασία δωματίου και μία ισοκρατική κινητή φάση που αποτελείται από ένα μίγμα διαλυτών νερού-ακετονιτριλίου-τριαιθυλαμίνης (838: 160: 2, v/v) σε pH 5,5 ± 0,05. Η ροή ήταν 1,4 mL / min και οι αναλύτες ανιχνεύθηκαν στα 254 nm. Οι επιδράσεις των λειτουργικών χρωματογραφικών συνθηκών ως προς στον συντελεστή ασυμμετρίας της κορυφής (tailing factor) κατά USP, η απόδοση της στήλης (column efficiency) και ο διαχωρισμός μεταξύ των δύο ενώσεων, ρυθμίστηκαν συστηματικά. Πειράματα αναγκαστικής αποικοδόμησης διεξήχθησαν με έκθεση των προτύπων SDZS και TMP και της μείξης τους σε συνθήκες θερμικής, φωτολυτικής, οξειδωτικής και όξινης βάσης υδρολυτικού στρες. Η μέθοδος επικυρώθηκε με επιτυχία σύμφωνα με τις κατευθυντήριες γραμμές της Διεθνούς Διάσκεψης για την Εναρμόνιση (ICH) και της Φαρμακοποιίας των Ηνωμένων Πολιτειών (USP 34 / NF 29) και βρέθηκε ότι είναι κατάλληλη για τον ποσοτικό προσδιορισμό και τη σταθερότητα SDZS και TMP σε ενέσιμο διάλυμα (43).

Βασιζόμενοι στα στοιχεία της βιβλιογραφίας αναπτύχθηκε από κοινού με το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του ΕΚΠΑ, ένα προτεινόμενο πρωτόκολλο μεθόδου ανάλυσης των ενώσεων Σουλφαδιαζίνη – Τριμεθοπρίμη, για δείγματα πρώτης ύλης, φαρμακούχων ιχθυοτροφών (Medicated) και δείγματα από την γραμμή καθαρισμού.

3.3.1 Πρωτόκολλο ανάλυσης για τον προσδιορισμό σουλφαδιαζίνη και τριμεθοπρίμης σε δείγματα ιχθυοτροφών

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης φαρμακούχας ιχθυοτροφής (medicated) :
 - ✓ Ζύγιση 0,5 g ιχθυοτροφής σε φυγοκεντρικό σωλήνα.
 - ✓ Προσθήκη 25 mL διαλύτη ACN : MeOH σε αναλογία 1:1.
 - ✓ Vortex για 30 δευτερόλεπτα.
 - ✓ Μηχανική ανάδευση για 30 λεπτά.
 - ✓ Υπέρηχοι για 30 λεπτά στους 35 °C.
 - ✓ Φυγοκέντρηση για 10 min με στροφές 4000 rpm.
 - ✓ Λήψη υπερκείμενου.
 - ✓ Φιλτράρισμα με φίλτρο τύπου Regenerate Cellulose.
 - ✓ Για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης, λήψη 50 μ L δείγματος και αραιώση σε τελικό όγκο 5 mL με $\text{CH}_3\text{COONH}_4$: ACN σε αναλογία 70 : 30.
 - ✓ Για τον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης, λήψη 100 μ L δείγματος και αραιώση σε τελικό όγκο 1000 μ L με $\text{CH}_3\text{COONH}_4$: ACN σε αναλογία 70:30.

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης μη φαρμακούχας ιχθυοτροφής με σκοπό τον έλεγχο της γραμμής καθαρισμού :
 - ✓ Ζύγιση 2,0 g ιχθυοτροφής σε φυγοκεντρικό σωλήνα.
 - ✓ Προσθήκη 25 mL διαλύτη ACN:MeOH σε αναλογία 1:1.
 - ✓ Vortex για 30 sec.
 - ✓ Μηχανική ανάδευση για 30 λεπτά.
 - ✓ Υπέρηχοι για 30 λεπτά στους 35 °C.
 - ✓ Φυγοκέντρηση για 10 min με στροφές 4000 rpm.
 - ✓ Λήψη υπερκείμενου.

- ✓ Φιλτράρισμα με φίλτρο τύπου Regenerate Cellulose.
 - ✓ Για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης με χρήση HPLC, λήψη 125 μL υπερκείμενου και προσθήκης 875 μL $\text{CH}_3\text{COONH}_4:\text{ACN}$ σε αναλογία 70:30.
 - ✓ Για τον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης με την χρήση της μεθόδου φασματοσκοπία μαζών σε σειρά, λήψη 50 μL υπερκείμενου και αραίωση στα 5 mL formic acid:MEOH σε αναλογία 75:25.
- Για την παρασκευή δειγμάτων πρώτης ύλης:
 - ✓ Ζύγιση 0,1 g πρώτης ύλης.
 - ✓ Προσθήκη 50 mL διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4:\text{ACN}$ σε αναλογία 70:30.
 - ✓ Μηχανική ανάδευση.
 - ✓ Υπέρηχοι για 30 λεπτά στους 35°C.
 - ✓ Πλήρωση ως τελικού όγκου 100 mL με διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4:\text{ACN}$ σε αναλογία 70:30.
 - ✓ Για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης, λήψη 100 μL δείγματος και αραίωση στα 20 mL με διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4:\text{ACN}$ σε αναλογία 70:30.
 - ✓ Για τον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης, λήψη 100 μL δείγματος και αραίωση στα 5 mL με διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4:\text{ACN}$ σε αναλογία 70:30.
 - Ός προς τις συνθήκες χρωματογραφίας
 - ✓ Κινητή φάση A: Buffer $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 10mM
 - ✓ Κινητή φάση B: Ακετονιτρίλιο

σε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που ακολουθεί:

Πίνακας 7: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για το προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης - τριμεθοπρίμης

Χρόνος (min)	A%	B%	Ροή (mL/min)
0	88	12	1,0
10	73	27	1,0

- ✓ Θερμοκρασία στήλης: 25 °C
- ✓ Post run: 3 min
- ✓ Χρόνος έκλουσης σουλφαδιαζίνης / τριμεθοπρίμης: 4,6 / 5,7 min
- ✓ Μήκος κύματος: 268 nm

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗ – ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗ

4.1 Αντιδραστήρια - Οργανολογία

4.1.1 Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο (καθαρότητας HPLC), Fischer
- Μεθανόλη (καθαρότητας HPLC), Fischer
- Μεθανόλη (καθαρότητας LC MS-MS), Merck
- Καυστικό Νάτριο, Sigma Aldrich
- Οξικό Αμμώνιο, Merck
- Οξικό Οξύ, Honeywell
- Φορμικό οξύ (καθαρότητας LC MS-MS), Carlo Erba
- Υπερκάθαρο νερό ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, παρεχόμενο από ένα σύστημα Milli-Q καθαρισμού του νερού)

Για την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

- Διάλυμα καυστικού νατρίου συγκέντρωσης 0,025 N : Ζυγίστηκαν σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL 0,50 γραμμάρια καυστικού νατρίου, διαλύθηκαν σε νερό και έγινε αραιώση μέχρι τη χαραγή.
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM, pH 4,3 : Ζυγίστηκαν 0,77 γραμμάρια οξικού αμμωνίου, διαλύθηκαν σε 1000 mL νερού. Ρυθμίστηκε το pH στην τιμή 4,3 με την προσθήκη οξικού οξέος.
- Διάλυμα φορμικού οξέος 0,05 % : Αραιώθηκαν 100 μL πυκνού φορμικού οξέος σε 200 mL με νερό.

4.1.2 Πρότυπες Ουσίες

- Σουλφαδιαζίνη 99 %, Alfa Aesar
- Τριμεθοπρίμη 99,5 %, Fluka Sigma Aldrich
- Πρότυπο διάλυμα σουλφαδιαζίνης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$: Ζυγίστηκαν 10,00 mg πρότυπης ουσίας σουλφαδιαζίνης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, διαλύθηκαν σε διάλυμα καυστικού νατρίου 0,025 N και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής.
- Πρότυπο διάλυμα σουλφαδιαζίνης $10000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$: Ζυγίστηκαν 100,0 mg πρότυπης ουσίας σουλφαδιαζίνης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL,

διαλύθηκαν σε διάλυμα καυστικού νατρίου 0,025 N και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής.

- Πρότυπο διάλυμα Τριμεθοπρίμης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$: Ζυγίστηκαν $10,00 \text{ mg}$ πρότυπης ουσίας τριμεθοπρίμης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL , διαλύθηκαν σε μεθανόλη και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής.

4.1.3 Εργαστηριακός Εξοπλισμός

- Υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης της εταιρίας Agilent 1200 series, εξοπλισμένος με αυτόματο δειγματολήπτη, φούρνο για την ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης, απαερωτή κινητής φάσης, αντλία και ανιχνευτή συστοιχίας φωτοδιοδίων (PDA). Ο έλεγχος του συστήματος και η συλλογή, επεξεργασία δεδομένων πραγματοποιήθηκε από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με εγκατεστημένο το λογισμικό Chem Station.
- Υγροχρωματογράφος υπερυψηλής απόδοσης της εταιρίας Thermo Accela, εξοπλισμένος με αυτόματο δειγματολήπτη, φούρνο για την ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης, απαερωτή κινητής φάσης, αντλία και ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών τριπλού τετραπόλου, Thermo TSQ Quantum Access. Ο έλεγχος του συστήματος και η συλλογή, επεξεργασία δεδομένων πραγματοποιήθηκε από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με εγκατεστημένο το λογισμικό thermo Xcalibur.
- Αναλυτικές στήλες χρωματογραφίας Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 $150 \times 4,6 \text{ mm}$, $5 \mu\text{m}$ και Waters Atlantis T3 $100 \times 2,1 \text{ mm}$, $3 \mu\text{m}$.
- Αναλυτικοί ζυγοί Mettler Toledo AT250 ακρίβειας πέντε δεκαδικών ψηφίων και Sartorius Basic ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
- Λουτρό υπερήχων Selecta Ultrasons H-D
- Συσκευή φυγοκέντρησης Rotofix 32, Hettich.
- Ογκομετρικές φιάλες κλάσης A και σιφώνια πληρώσεως κλάσης AS
- Αυτόματες πιπέτες $10\text{-}100 \mu\text{L}$, $100\text{-}1000 \mu\text{L}$ της εταιρίας Brand.
- Φίλτρα σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης RC, μέγεθος πόρων $0,2 \mu\text{m}$, διαμέτρου 15 mm .
- Πεχάμετρο
- Συσκευή περιδίνησης (Vortex), Stuart

4.2 Βελτιστοποίηση Μεθόδου

4.2.1 Βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο εκχύλισης

Οι αρχικές συνθήκες προκατεργασίας του δείγματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου, που αναφέρθηκε παραπάνω, περιλάμβαναν τρία στάδια προκατεργασίας. Τοποθέτηση του δείγματος σε λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά, ανακίνηση με την βοήθεια κατάλληλης συσκευής για 30 λεπτά και φυγοκέντρηση (4000 rpm), για άλλα δέκα λεπτά. Θεωρήθηκε σκόπιμο οι παραπάνω χρόνοι να βελτιστοποιηθούν για την απλούστευση της μεθόδου.

Παρασκευάστηκαν αρχικά έξι δείγματα, ζυγίζοντας 0,5 g δείγματος medicated σε πλαστικούς σωλήνες για φυγόκεντρο. Έπειτα προστεθήκαν σε κάθε σωλήνα 25 mL ακετονιτριλίου – μεθανόλης, σε αναλογία (1:1). Στο πρώτο δείγμα ακολουθήθηκαν οι αρχικές συνθήκες προκατεργασίας, στο δεύτερο ο χρόνος στο λουτρό υπερήχων και στην συσκευή ανάδευσης μειώθηκε στα 15 λεπτά, ενώ ο χρόνος φυγοκέντρησης παρέμεινε στα 10 λεπτά. Στο τρίτο δείγμα χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων για 15 λεπτά με φυγοκέντρηση 10 λεπτών, ενώ στο τέταρτο δείγμα ο χρόνος του λουτρού υπερήχων ήταν 30 λεπτά, επίσης με φυγοκέντρηση 10 λεπτών. Στο πέμπτο και έκτο δείγμα χρησιμοποιήθηκε μόνο λουτρό υπερήχων για 15 και 30 λεπτά αντίστοιχα.

Και στα έξι δείγματα έγινε λήψη του υπερκείμενου υγρού, το οποίο φιλτραρίστηκε με τη βοήθεια φίλτρων RC. Για τη σουλφαδιαζίνη έγινε αραιώση 50 μ L στα 5 mL με διαλύτη Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM, pH 4,3 – ακετονιτρίλιο σε αναλογία 70:30. Για τη τριμεθοπρίμη έγινε αραιώση 100 μ L στο 1 mL με τον ίδιο διαλύτη.

Τα δείγματα έτρεξαν στον υγρό χρωματογράφο με βάση τη μέθοδο που αναφέρεται στο πρωτόκολλο.

4.2.1.1 Αποτελέσματα

Με βάση τις αναμενόμενες τιμές από τον παραγωγό, για τη σουλφαδιαζίνη τα καλύτερα αποτελέσματα προήλθαν από τα δείγματα 1 και 4. Ενώ για τη τριμεθοπρίμη από τα δείγματα 1, 4 και 6. Από τα αποτελέσματα λοιπόν μπορούμε να βγάλουμε ως ασφαλή συμπέρασμα ότι το λουτρό υπερήχων για 30 λεπτά είναι κρίσιμος παράγοντας. Όσο αφορά την συσκευή ανάδευσης,

προτάθηκε διενέργεια νέων πειραμάτων με την χρήση συσκευής περιδίνησης για ένα λεπτό, μετά το λουτρό υπερήχων.

4.2.1.2 Επιπλέον έλεγχος παραμέτρων ως προς την βελτιστοποίηση του χρόνου εκχύλισης

Παρασκευάστηκαν δείγματα, απουσία του σταδίου των 30 λεπτών στη συσκευή ανάδευσης. Η παράμετρος που εξετάστηκε ήταν ο χρόνος της χρήσης του λουτρού υπερήχων. Παρασκευάστηκαν εις διπλούν δείγματα με χρόνο 15 λεπτά και 30 λεπτά. Για τα 30 λεπτά παρασκευάστηκε και ένα εμβολιασμένο δείγμα με γνωστή συγκέντρωση σουλφαδιαζίνης ($c=0,583 \text{ g}/100\text{g}$) και τριμεθοπρίμης ($c=0,116 \text{ g}/100\text{g}$), καθώς και ένα τυφλό. Σε όλα τα δείγματα η τελική αραιώση ήταν 100 μL στο 1 mL.

4.2.1.3 Αποτελέσματα

Με βάση τα αποτελέσματα, βρέθηκε ότι με χρόνο 30 λεπτά έχουμε καλύτερα αποτελέσματα, καθώς οι φαρμακούχες ενώσεις εκχυλίζονται καλύτερα. Επιπλέον το πείραμα της ανάκτησης έδωσε καλά αποτελέσματα.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα ανάκτησης στην βελτιστοποίηση του χρόνου

Ένωση	Ανάκτηση % Ένεση 1	Ανάκτηση % Ένεση 2	Ανάκτηση % Μέσος όρος
Σουλφαδιαζίνη	100,2	100,1	100,2
Τριμεθοπρίμη	105,1	105,5	105,3

Συμπερασματικά καταλήγουμε ως βέλτιστη προκατεργασία δείγματος, 30 λεπτά στο λουτρό υπερήχων, 1 λεπτό στη συσκευή περιδίνησης και 10 λεπτά φυγοκέντρηση.

4.2.2 Βελτιστοποίηση ως προς την ζύγιση του δείγματος.

Παρασκευάστηκαν 5 δείγματα στα οποία ζυγίστηκαν 0,1 g, 0,25 g, 0,50 g, 0,75 g και 1,00 g ιχθυοτροφής αντίστοιχα. Ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναφέρεται στο πρωτόκολλο, με εξαίρεση την προκατεργασία, όπου έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραγράφου 4.2.1.

4.2.2.1 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των πέντε διαφορετικών δειγμάτων δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές, οπότε το βάρος παρέμεινε στα 500 mg.

4.2.3 Βελτιστοποίηση ως προς το διαλύτη εκχύλισης

Σύμφωνα με την προτεινομένη μέθοδο, τα αρχικά διαλύματα των πρότυπων ουσιών συγκέντρωσης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, διαλύονται σε μεθανόλη. Ως εκχυλιστικό μέσο χρησιμοποιείται μείγμα ακετονιτριλίου – μεθανόλης σε αναλογία 1:1

Σύμφωνα με τις μονογραφίες των ενώσεων στις φαρμακοποιίες μελετήθηκαν τα παρακάτω:

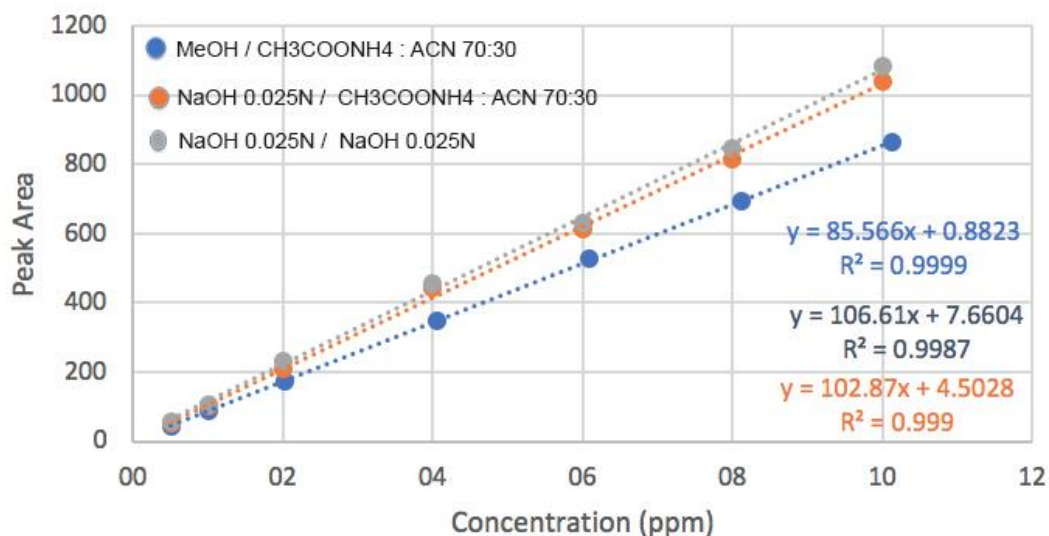
Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα σουλφαδιαζίνης – τριμεθοπρίμης συγκεντρώσεων 0.5-1, 1-2, 2-4, 4-8, 6-10, 8-16, 10- 20 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$. Τα διαλύματα αυτά παρασκευάστηκαν τρεις φορές. Την πρώτη φορά έγιναν αραιώσεις από τα πρότυπα διαλύματα $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ (διαλυμένα σε μεθανόλη), σε διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM, pH 4,3 – ακετονιτρίλιο σε αναλογία 70:30. Την δεύτερη φορά χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα σουλφαδιαζίνης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ σε NaOH 0,025 N και οι επόμενες αραιώσεις έγιναν όπως την πρώτη φορά, ενώ την τρίτη φορά και οι τελικές αραιώσεις έγιναν σε NaOH 0,025 N.

Επίσης παρασκευάστηκαν εις διπλούν δείγμα, τυφλό και εμβολιασμένο δείγμα γνωστής συγκέντρωσης. Η μία τριάδα έγινε σύμφωνα με την μέθοδο και τις βελτιστοποιήσεις 4.2.1 και 4.2.2 και η άλλη με την διαφοροποίηση ότι ως εκχυλιστικό μέσο προστέθηκαν 25 mL NaOH 0,025 N αντί για μείγμα ακετονιτριλίου – μεθανόλης 1:1. Τελική αραιώση δειγμάτων 100 μL στο 1 mL με διαλύτη ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM, pH 4,3 – ακετονιτρίλιο σε αναλογία 70:30.

4.2.3.1 Αποτελέσματα

Οι καμπύλες αναφοράς έδειξαν καλά αποτελέσματα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 18. Όσο αφορά τα δείγματα, δεν μπόρεσε να βγει ασφαλές συμπέρασμα ως προς το μέσο εκχύλισης. Συνεπώς συνεχίστηκαν οι δοκιμές με την δεύτερη καμπύλη αναφοράς.

Βελτιστοποίηση ως προς τον διαλύτη εκχύλισης



Σχήμα 18: Καμπύλες αναφοράς για βελτιστοποίηση ως προς τον διαλύτη εκχύλισης

4.2.4 Βελτιστοποίηση ως προς το μέσο εκχύλισης και την τελική αραιώση

Παρασκευάστηκαν τρία σετ, δείγμα – τυφλό – εμβολιασμένο δείγμα γνωστής συγκέντρωσης, σύμφωνα με τον Πίνακα 9.

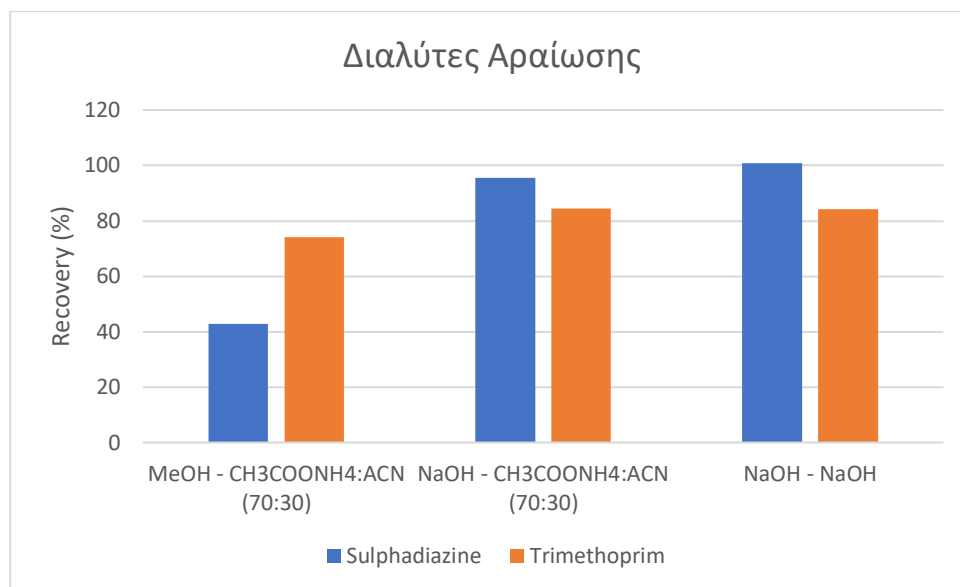
Πίνακας 9: Βελτιστοποίηση ως προς το μέσο εκχύλισης

	Διαλύτης Εκχύλισης	Διαλύτης Τελικής Αραιώσης
Δείγμα, τυφλό, εμβολιασμένο	Ακετονιτρίλιο – Μεθανόλη 1:1	CH ₃ COONH ₄ : ACN 70:30
	NaOH 0,025N	CH ₃ COONH ₄ : ACN 70:30
	NaOH 0,025N	NaOH 0,025N

Επίσης τα ίδια δείγματα μελετήθηκαν και ως προς την τελική αραιώση. Για κάθε δείγμα που αναφέρεται στον παραπάνω Πίνακα, έγιναν τρεις διαφορετικές τελικές αραιώσεις : 100 μL στο 1 mL, 50 μL στο 1 mL, 25 μL στο 1 mL.

4.2.4.1 Αποτελέσματα

Όσο αφορά το διαλύτη εκχύλισης τα καλύτερα αποτελέσματα δόθηκαν με NaOH 0,025 N και CH₃COONH₄ : ACN 70:30 στην τελική αραιώση, ωστόσο κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί εκτενέστερα ο διαλύτης εκχύλισης. Σε ότι αφορά την τελική αραιώση δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές.



Σχήμα 19: Ανακτήσεις με αλλαγή στους διαλύτες αραιώσης

4.2.5 Βελτιστοποίηση ως προς την αναλογία των διαλυτών εκχύλισης

Παρασκευάστηκαν έξι δείγματα σύμφωνα με τα αποτελέσματα των παραπάνω βελτιστοποιήσεων.

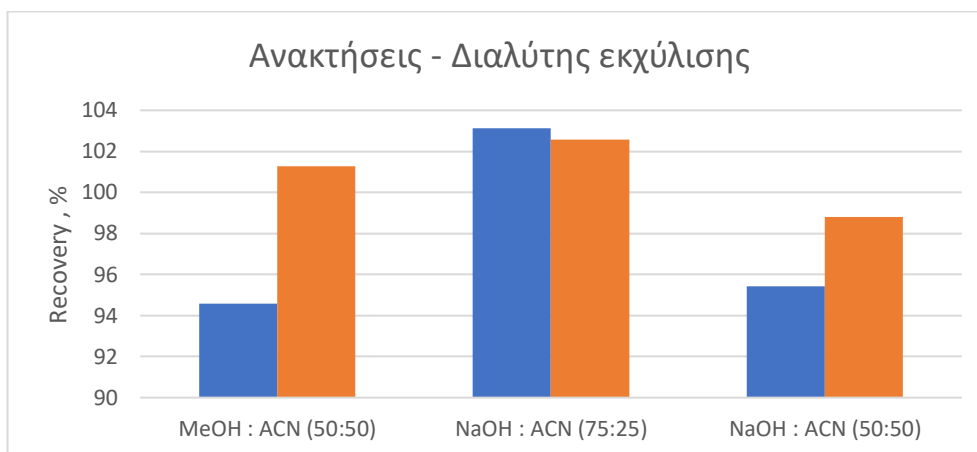
Πίνακας 10: Βελτιστοποίηση ως προς την αναλογία του μέσου εκχύλισης

	Διαλύτης Εκχύλισης	Όγκος Τελικής Αραίωσης
Δείγμα	NaOH 0,025N	50 μL → 1 mL
		100 μL → 1 mL
Εμβολιασμένο Δείγμα	NaOH 0,025N	50 μL → 1 mL
		100 μL → 1 mL
Δείγμα	NaOH 0,025N : ACN 75:25	50 μL → 1 mL
		100 μL → 1 mL
Εμβολιασμένο Δείγμα	NaOH 0,025N : ACN 75:25	50 μL → 1 mL
		100 μL → 1 mL
Δείγμα	NaOH 0,025N : ACN 50:50	50 μL → 1 mL
		100 μL → 1 mL
Εμβολιασμένο Δείγμα	NaOH 0,025N : ACN 50:50	50 μL → 1 mL
		100 μL → 1 mL

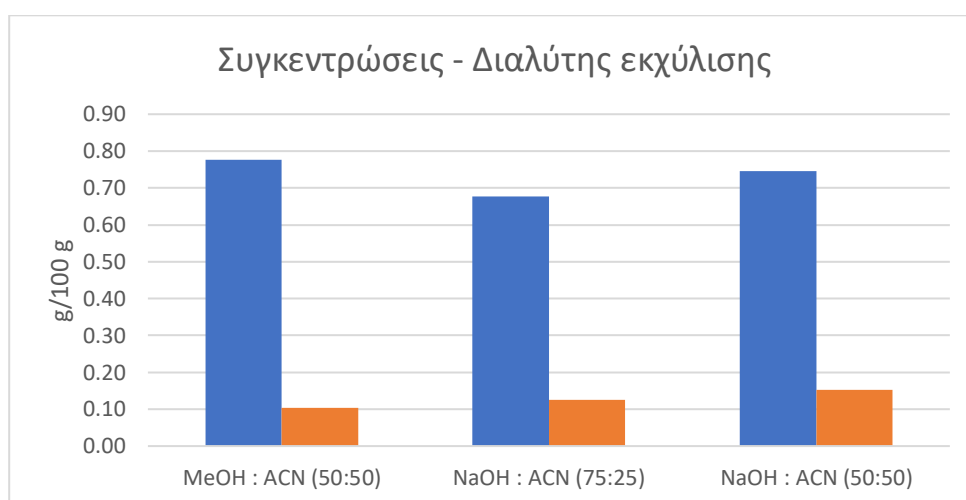
4.2.5.1 Αποτελέσματα

Με βάση τα πειραματικά αποτελέσματα το μείγμα διαλυτών (NaOH 0,025N : ACN 50:50) φαίνεται να λειτουργεί ιδανικά για την ταυτόχρονη εκχύλιση τόσο της σουλφαδιαζίνης όσο και της τριμεθοπρίμης. Οι ανακτήσεις (%) ήταν 95,2 για την σουλφαδιαζίνη και 98,7 για τη τριμεθοπρίμη.

Επιπλέον καθ' όλη την διάρκεια των βελτιστοποιήσεων μελετήθηκαν δύο τρόποι ποσοτικοποίησης. Ο πρώτος είναι με καμπύλη αναφοράς και ο δεύτερος με την μέθοδο ενός εξωτερικού προτύπου. Μετά από σύγκριση των δύο μεθόδων διαπιστώθηκε ότι τα αποτελέσματα ήταν συγκρίσιμα, επομένως αποφασίστηκε να χρησιμοποιηθεί η μέθοδος εξωτερικού προτύπου με στόχο την απλούστευση της μεθόδου.



Σχήμα 20: Ανακτήσεις με βάση τον διαλύτη εκχύλισης



Σχήμα 21: Συγκεντρώσεις με βάση τον διαλύτη εκχύλισης

4.2.6 Προτεινόμενη μέθοδος για επικύρωση

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης φαρμακούχας ιχθυοτροφής (medicated) :
 - Ζύγιση 0,5 g δείγματος
 - Προσθήκη 25,0 mL ACN : NaOH 0,025N (50:50)
 - Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων στους 35 °C για 30 λεπτά
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά
 - Λήψη υπερκείμενου υγρού και φιλτράρισμα με RC 0,20 μm
 - Αραίωση 50 μL στο 1 mL με διαλύτη CH₃COONH₄ : ACN (70:30)
- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης μη φαρμακούχας ιχθυοτροφής με σκοπό τον έλεγχο της γραμμής καθαρισμού :
 - Ζύγιση 2,0 g δείγματος
 - Προσθήκη 25,0 mL ACN: NaOH 0,025N (50:50)
 - Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων στους 35 °C για 30 λεπτά
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Φυγοκέντρηση στις 4000 στροφές/λεπτό για 10 λεπτά
 - Λήψη υπερκείμενου υγρού και φιλτράρισμα με RC 0,20 μm
 - Αραίωση 100 μL στο 1 mL με διαλύτη CH₃COONH₄ : ACN (70:30)

Για τον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης σε δείγματα της γραμμής καθαρισμού, λόγω των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων επικυρώθηκε ξεχωριστή μέθοδος με χρήση UPLC MS-MS.

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης πρώτης ύλης :
 - Ζύγιση 100,0 mg δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
 - Προσθήκη 50 mL CH₃COONH₄: ACN (70:30)
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων στους 35 °C για 30 λεπτά
 - Άφεση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αραίωση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη
 - Αραίωση 100 μL στα 20 mL με διαλύτη CH₃COONH₄ : ACN (70:30) για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης

- Αραίωση 100 μL στα 5 mL με διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4$: ACN (70:30) για τον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος: Μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL 20 μL προτύπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ και 40 μL προτύπου διαλύματος τριμεθοπρίμης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4$: ACN (70:30).

- Χρωματογραφικές Συνθήκες:

- ✓ Κινητή φάση A: Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM, pH 4,3
- ✓ Κινητή φάση B: Ακετονιτρίλιο

σε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που ακολουθεί:

Πίνακας 11: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	A%	B%	Ροή (mL/min)
0	88	12	1.0
10	73	27	1.0

- ✓ Στήλη: Agilent Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm
 - ✓ Θερμοκρασία στήλης: 25°C
 - ✓ Όγκος έγχυσης: 20 μL
 - ✓ Run Time: 10 min
 - ✓ Post run: 3 min
 - ✓ Μήκος κύματος: 268 nm
- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης μη φαρμακούχας ιχθυοτροφής με σκοπό τον έλεγχο της γραμμής καθαρισμού (Τριμεθοπρίμη):
 - Ακολουθείτε η κατεργασία που περιγράφεται παραπάνω για την γραμμή καθαρισμού με τελική αραίωση 50 μL στα 5 mL με διαλύτη φορμικό οξύ 0.05 % : Μεθανόλη σε αναλογία 75:25.

Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων για την καμπύλη αναφοράς:
 Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα τριμεθοπρίμης $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, αραιώνοντας $100 \text{ }\mu\text{L}$ πρότυπου διαλύματος $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ στα 10 mL μεθανόλης. Ακολουθεί διαδοχική αραιώση $100 \text{ }\mu\text{L}$ από τα $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ στα 10 mL με μεθανόλη, για την παρασκευή τελικού διαλύματος συγκεντρώσεως 10 ppb . Από αυτό γίνονται οι παρακάτω αραιώσεις σε διαλύτη φορμικό οξύ 0.05% : μεθανόλη, σε αναλογία $75:25$, για την παρασκευή των διαλυμάτων για την καμπύλη αναφοράς.

- $0,5 \text{ ppb}$: $25 \text{ }\mu\text{L}$ στα 5 mL
- $1,0 \text{ ppb}$: $50 \text{ }\mu\text{L}$ στα 5 mL
- $5,0 \text{ ppb}$: $250 \text{ }\mu\text{L}$ στα 5 mL
- $10,0 \text{ ppb}$: $500 \text{ }\mu\text{L}$ στα 5 mL
- $15,0 \text{ ppb}$: $750 \text{ }\mu\text{L}$ στα 5 mL
- $20,0 \text{ ppb}$: $1000 \text{ }\mu\text{L}$ στα 5 mL

- Χρωματογραφικές Συνθήκες:

- ✓ Κινητή φάση A: Διάλυμα φορμικού οξέος $0,01 \%$
- ✓ Κινητή φάση B: Μεθανόλη

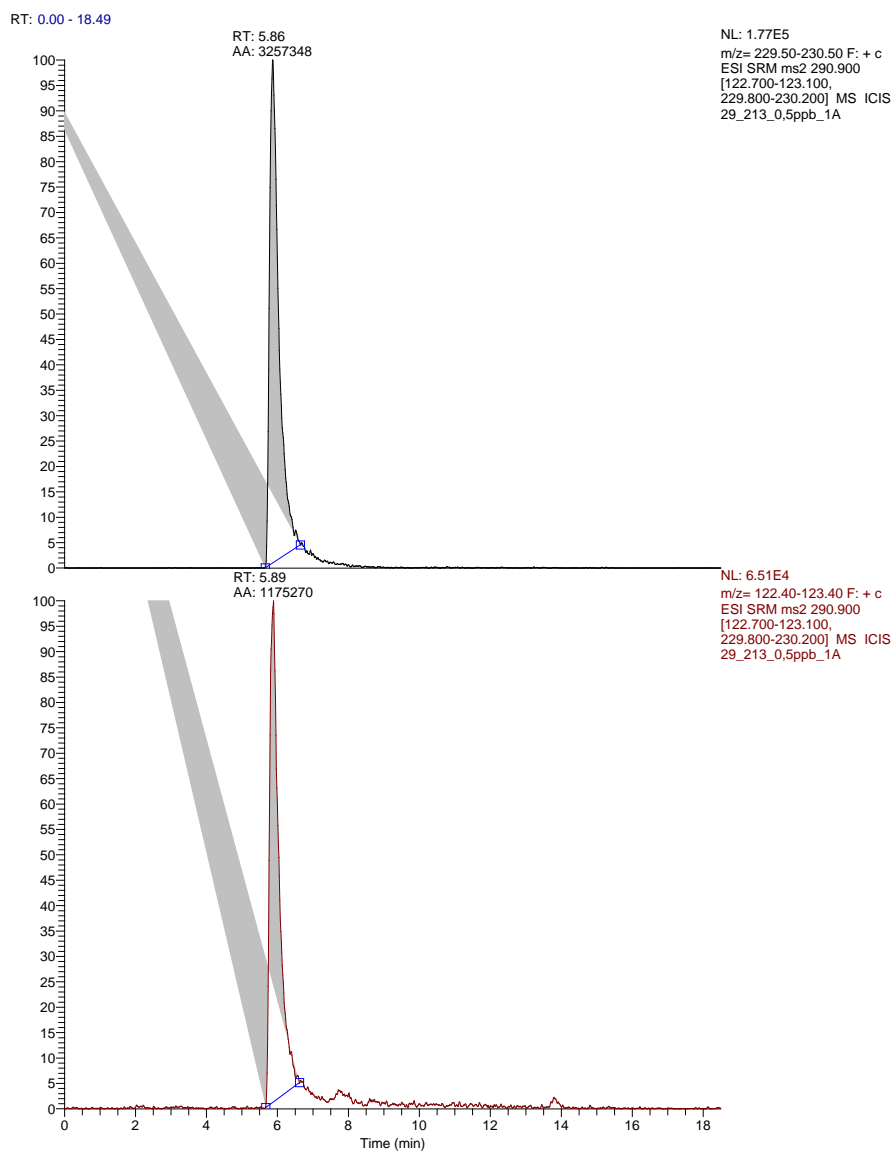
Πίνακας 12: Πρόγραμμα βαθμιδωτής εκλούσης LC MS-MS

Χρόνος (min)	A%	B%	Ροή ($\mu\text{L}/\text{min}$)
0,0	90	10	100
7,0	0	100	100
13,0	0	100	100
13,2	90	10	200
17,1	90	10	100
18,5	90	10	100

Πίνακας 13: Πίνακας θραυσμάτων

α/α	Parent mass	Product mass	Collision Energy	T Lens
1	290,9	122,9	30	87
2	290,9	230,0	25	87

- ✓ Στήλη : Waters Atlantis T3 100 x 2,1mm, 3 μm
- ✓ Όγκος έγχυσης: 10 μL
- ✓ Θερμοκρασία στήλης: 25 °C
- ✓ Πηγή ιοντισμού : ESI (+)



Σχήμα 22: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος τριμεθοπρίνης

4.3 Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης

4.3.1 Εισαγωγή

Η επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων ορίζεται ως η επιβεβαίωση, μέσω εξέτασης και παροχής αντικειμενικών αποδείξεων (τεκμηρίων), ότι ικανοποιούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για τον σκοπό που προορίζεται. Οι μέθοδοι που απαιτούν τη διενέργεια επικύρωσης είναι μη πρότυπες μέθοδοι, μέθοδοι που σχεδιάζονται από το εργαστήριο (in-house), πρότυπες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εκτός αντικειμένου, καθώς και οι ενισχυμένες και τροποποιημένες πρότυπες μέθοδοι.

Η επικύρωση περιλαμβάνει τα εξής: προδιαγραφή των απαιτήσεων (κριτήρια αποδοχής), μελέτη-προσδιορισμό των αναλυτικών χαρακτηριστικών των μεθόδων, έλεγχο ότι οι απαιτήσεις μπορούν να ικανοποιηθούν με τη χρήση της μεθόδου και τέλος δήλωση για την εγκυρότητα (καταλληλότητα) της μεθόδου. Οι αναλυτικές μέθοδοι για τις ανάγκες της επικύρωσης ταξινομούνται σε 4 κατηγορίες:

- Έλεγχοι ταυτοποίησης
- Ποσοτικοί προσδιορισμοί για την περιεκτικότητα των προσμίξεων
- Έλεγχοι ορίων για προσμίξεις
- Ποσοτικοί προσδιορισμοί δραστικών ουσιών

Κατά την επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου, όπως στην συγκεκριμένη μέθοδο που πρόκειται για in-house μέθοδο, μελετώνται τα ακόλουθα χαρακτηριστικά ποιότητας:

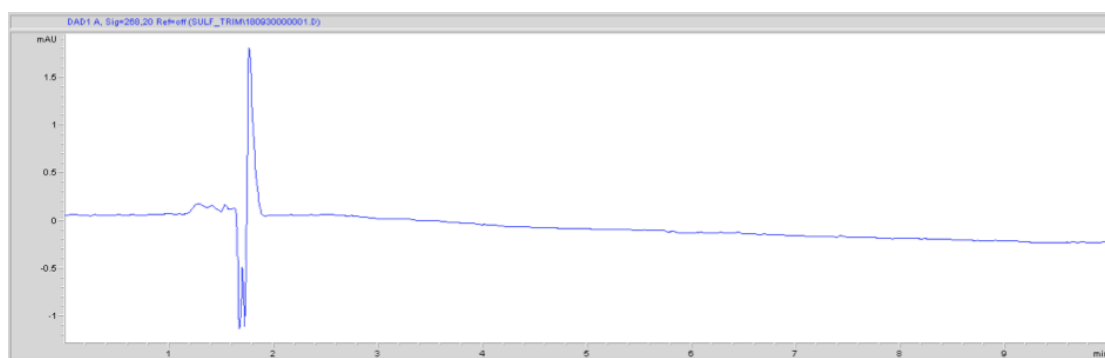
- 1.Ειδικότητα (Specificity)
- 2.Γραμμικότητα (Linearity)
- 3.Εύρος (Range)
- 4.Όριο ανίχνευσης (Limit of Detection) και ποσοτικοποίησης ((Limit of Quantitation)
- 5.Ακρίβεια (Accuracy)
- 6.Πιστότητα (Precision)

4.3.2 Ειδικότητα (Specificity)

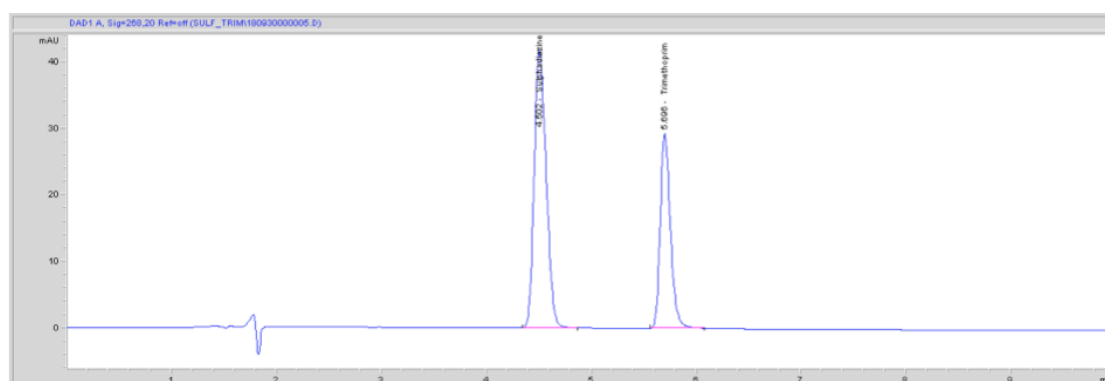
Ως ειδικότητα ορίζεται η ικανότητα του προσδιορισμού του αναλύτη, παρουσία άλλων ενώσεων που πιθανόν να πρόκειται για προσμίξεις, προϊόντα διάσπασης, έκδοχα καθώς και μητρικό υλικό.

Στην περίπτωση ποσοτικού προσδιορισμού, η απόδειξη της ειδικότητας απαιτεί η μέθοδος να παραμείνει ανεπηρέαστη παρουσία άλλων ενώσεων που μπορούν να προκαλέσουν επίδραση στο αναλυτικό αποτέλεσμα, είτε προκαλώντας αλληλοεπικάλυψη στο φάσμα, είτε δημιουργώντας θόρυβο στην γραμμή βάσης. Στις χρωματογραφικές μεθόδους απαιτούνται αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα των πιθανών παρεμποδίζουσων ουσιών για την απόδειξη ειδικότητας. Η ειδικότητα στις χρωματογραφικές μεθόδους αποδεικνύεται με τη διαχωριστική ικανότητα (Resolution, R_s) μεταξύ γειτονικών κορυφών (44,45).

Παρατίθενται τα εξής αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα, διαπιστώνοντας πως δεν παρουσιάζεται κάποιου είδους αλληλοεπικάλυψη:



Σχήμα 23: Χρωματογράφημα διαλύτη



Σχήμα 24: Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης – τριμεθοπρίμης

Ο συντελεστής διαχωρισμού μεταξύ των δύο ουσιών είναι 6,3

4.3.3 Γραμμικότητα (Linearity)

Η γραμμικότητα μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι η ικανότητα (μέσα σε μια δεδομένη περιοχή συγκεντρώσεων) της απόκτησης αποτελεσμάτων των μετρήσεων, που είναι ευθέως ανάλογα προς τη συγκέντρωση (ή ποσότητα) του αναλύτη στο δείγμα. Η γραμμικότητα πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της περιοχής συγκεντρώσεων της αναλυτικής μεθόδου.

Η γραμμικότητα πρέπει να αποδεικνύεται αρχικά με οπτική εξέταση του διαγράμματος των αναλυτικών σημάτων ως συνάρτηση της συγκεντρώσεως ή της περιεκτικότητας του αναλύτη, αλλά κυρίως με κατάλληλες στατιστικές μεθόδους, παραδείγματος χάριν, με υπολογισμό της ευθείας παλινδρόμησης (regression line) με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων (least squares method). Μερικές φορές για να ληφθεί γραμμικότητα μεταξύ των μετρούμενων παραμέτρων και των συγκεντρώσεων του δείγματος τα πειραματικά δεδομένα πρέπει να υποστούν μαθηματική επεξεργασία πριν από τη ανάλυση παλινδρόμησης (regression analysis). Τα δεδομένα της ευθείας παλινδρόμησης από μόνα τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εξαγωγή μαθηματικών εκτιμήσεων για το βαθμό γραμμικότητας. Ο συντελεστής συσχέτισεως (correlation coefficient, r), η τομή στον άξονα των y (y -intercept), η κλίση (slope) της ευθείας παλινδρόμησης και το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων (residual sum of squares) ή η τυπική απόκλιση των υπολοίπων είναι στατιστικά στοιχεία που πιστοποιούν την ύπαρξη γραμμικότητας. Για την απόδειξη της γραμμικότητας θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν το λιγότερο 5 επίπεδα συγκεντρώσεων (44,45,46).

Παρασκευάστηκε αρχικά ένα πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης $20 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ σουλφαδιαζίνης και $40 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ τριμεθοπρίμης ως εξής: Σε μία ογκομετρική φιάλη των 5 mL μεταφέρονται 100 μL και 200 μL πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ αντίστοιχα. Η αραιώση έγινε με μεθανόλη. Έπειτα παρασκευάστηκαν διαλύματα για 7 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4 : \text{ACN}$ (70:30), σύμφωνα με τον Πίνακα 14. Όλες οι αραιώσεις έγιναν σε ογκομετρική φιάλη του ενός mL.

Πίνακας 14: Αραιώσεις διαλυμάτων για τον έλεγχο γραμμικότητας

Συγκέντρωση (mg x L ⁻¹) Σουλφαδιαζίνης / Τριμεθοπρίμης	Όγκος σε μL σουλφαδιαζίνης	Όγκος σε μL τριμεθοπρίμης
0,5 – 1,0	25	25
1,0 – 2,0	50	50
2,0 – 4,0	100	100
4,0 – 8,0	200	200
6,0 – 12,0	300	300
8,0 – 16,0	400	400
10,0 – 20,0	500	500

4.3.3.1 Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 15 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων.

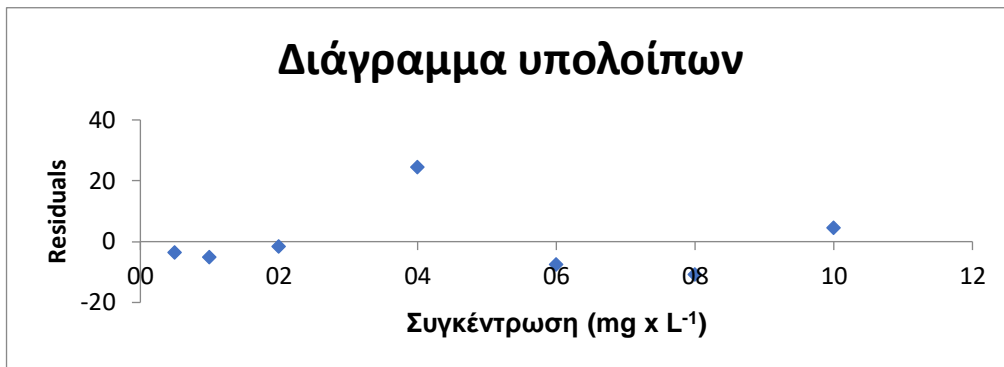
Πίνακας 15: Αποτελέσματα γραμμικότητας

Συγκέντρωση (mg x L ⁻¹) Σουλφαδιαζίνης/Τριμεθοπρίμης	Σουλφαδιαζίνη		Τριμεθοπρίμη	
	Εμβαδό (n=3)	RSD %	Εμβαδό (n=3)	RSD %
0,5 – 1,0	52,3	0,34	24,7	0,03
1,0 – 2,0	102,2	0,08	48,6	0,10
2,0 – 4,0	208,5	0,07	99,8	0,01
4,0 – 8,0	440,5	0,04	210,9	0,02
6,0 – 12,0	614,1	0,00	293,9	0,00
8,0 – 16,0	816,5	0,01	390,8	0,01
10,0 – 20,0	1037,7	0,05	497,1	0,01

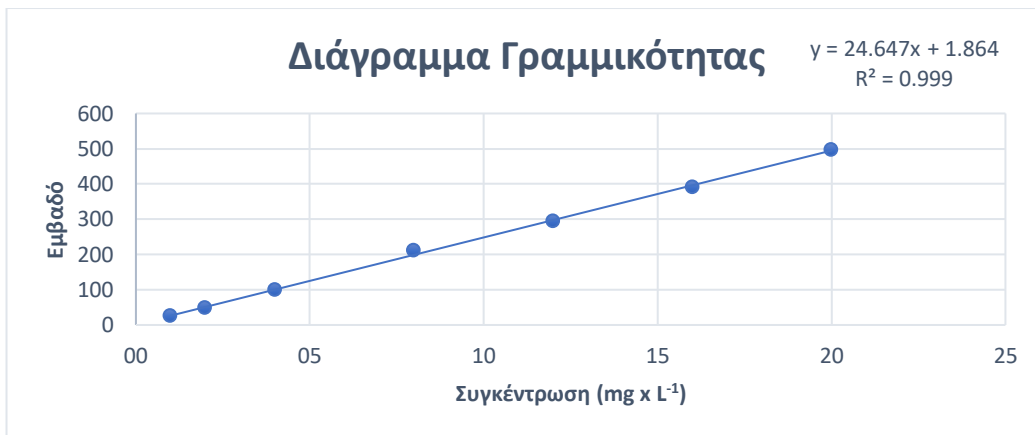
Στη συνέχεια από τα αποτελέσματα του παραπάνω Πίνακα κατασκευάστηκε η μέση καμπύλη αναφοράς καθώς και το διάγραμμα υπολοίπων για τη σουλφαδιαζίνη και την τριμεθοπρίμη.



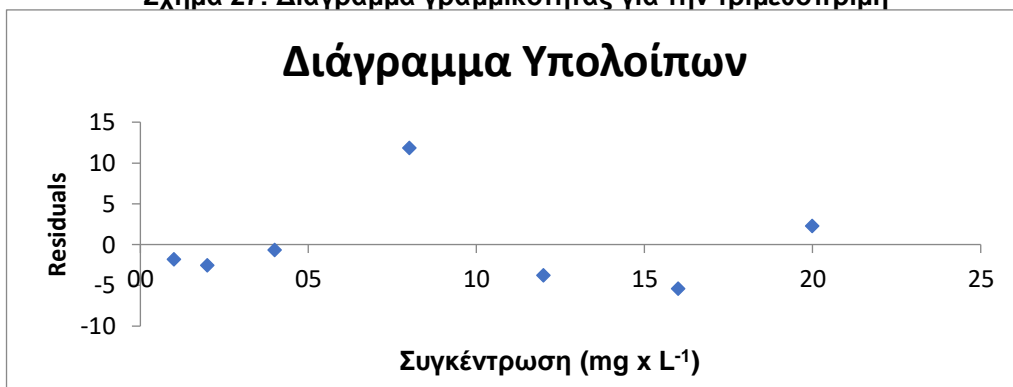
Σχήμα 25: Διάγραμμα Γραμμικότητας για την σουλφαδιαζίνη



Σχήμα 26: Διάγραμμα υπολοίπων για την σουλφαδιαζίνη



Σχήμα 27: Διάγραμμα γραμμικότητας για την τριμεθοπρίμη



Σχήμα 28: Διάγραμμα υπολοίπων για την τριμεθοπρίμη

4.3.4 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια της αναλυτικής διαδικασίας εκφράζει την εγγύτητα της συμφωνίας μεταξύ της τιμής η οποία είναι αποδεκτή είτε ως μια συμβατική πραγματική τιμή είτε ως μια αποδεκτή τιμή αναφοράς και της τιμής που βρέθηκε με την εφαρμογή της αναλυτικής μεθόδου. Η ακρίβεια πρέπει να αποδεικνύεται σε όλο το εύρος της καθοριζόμενης περιοχής συγκεντρώσεων/ποσοτήτων της αναλυτικής μεθόδου.

Η ακρίβεια πρέπει να προσδιορίζεται χρησιμοποιώντας τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς, σε τρία τουλάχιστον επίπεδα συγκεντρώσεων που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων (π.χ. 3 συγκεντρώσεις με 3 προσδιορισμούς στην κάθε μία).

Η ακρίβεια πρέπει να παρουσιάζεται, ως εκατοστιαία ανάκτηση (% recovery) της γνωστής ποσότητας του αναλύτη που προστέθηκε στο δείγμα (44,45,46). Παρασκευάστηκαν 6 διαφορετικά δείγματα της γραμμής καθαρισμού για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεως (80%, 100%, 120%), στα οποία έγινε κατάλληλος εμβολιασμός με πρότυπες ουσίες σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης, ώστε να πετύχουμε τα παραπάνω επίπεδα συγκεντρώσεων. Παρασκευάστηκε και ένα τυφλό δείγμα για αφαίρεση υποβάθρου, εφόσον υπάρχει.

Για το επίπεδο 80 % έγινε εμβολιασμός 320 μL πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης $10000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ και 640 μL πρότυπου διαλύματος τριμεθοπρίμης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$.

Για το επίπεδο 100 % έγινε εμβολιασμός 400 μL πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης $10000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ και 800 μL πρότυπου διαλύματος τριμεθοπρίμης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$.

Για το επίπεδο 120 % έγινε εμβολιασμός 480 μL πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης $10000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ και 960 μL πρότυπου διαλύματος τριμεθοπρίμης $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$.

4.3.4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για κάθε δείγμα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις των δύο δραστικών ουσιών με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα 16.

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\text{Πειραματική Συγκέντρωση}}{\text{Θεωρητική Συγκέντρωση} + \text{Συγκέντρωση στο τυφλό}} \times 100$$

Πίνακας 16: Πίνακας αποτελεσμάτων ακρίβειας

Επίπεδο Συγκέντρωσης (ως προς την αναμενόμενη)	Μέση Ανάκτηση % Σουλφαδιαζίνη (n=6)	RSD %	Μέση Ανάκτηση % Τριμεθοπρίμη (n=6)	RSD %
80 %	92,0	1,8	104,1	1,9
100 %	90,9	1,0	99,1	1,0
120 %	91,0	0,4	102,1	0,5

Οι ανακτήσεις βρίσκονται ανάμεσα στο εύρος (90.0-110.0 %) και το RSD < 2.0 %. Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής.

4.3.5 Πιστότητα (Precision)

Η πιστότητα μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζει την προσέγγιση της συμφωνίας (εγγύτητας) μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων εφαρμογών της μεθόδου υπό ρητά καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες. Η πιστότητα είναι μέτρο της διασποράς (μη πιστότητα) των αποτελεσμάτων, όταν επαναληφθεί η αναλυτική μεθοδολογία σε ένα δείγμα. Η πιστότητα πρέπει να μελετάται με χρήση αυθεντικών ομοιογενών δειγμάτων. Αν δεν είναι εφικτή η λήψη ομοιογενών δειγμάτων, η πιστότητα μπορεί να διερευνηθεί με χρήση τεχνητά παρασκευασμένων διαλυμάτων ή με ένα διάλυμα δείγματος. Η πιστότητα μιας αναλυτικής μεθόδου εκφράζεται ως η διακύμανση μιας σειράς μετρήσεων και συνήθως ως μέτρο τη πιστότητας της μεθόδου χρησιμοποιείται η τυπική απόκλιση ή η σχετική τυπική απόκλιση, η οποία δεν θα πρέπει να ξεπερνά το 2%. Η πιστότητα χωρίζεται στην επαναληψιμότητα (repeatability), την ενδιάμεση πιστότητα (intermediate precision).

Ως επαναληψιμότητα ορίζεται το μέτρο διασποράς των αποτελεσμάτων διαδοχικών ανεξάρτητων ελέγχων στο ίδιο δείγμα, που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες (ίδια μέθοδος ελέγχου, ίδιος αναλυτής, ίδια συσκευή, ίδιο εργαστήριο). Η εκτίμηση της επαναληψιμότητας γίνεται με:

α) Τουλάχιστον 9 προσδιορισμούς που καλύπτουν την καθοριζόμενη περιοχή συγκεντρώσεων της μεθόδου (π.χ. 3 επίπεδα συγκεντρώσεων με 3 προσδιορισμούς η κάθε μία)

β) Τουλάχιστον 6 προσδιορισμούς στο 100% της συγκεντρώσεως του ελέγχου για τον οποίο προτείνεται η μέθοδος.

Η ενδιάμεση πιστότητα είναι το μέτρο διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων ελέγχων που λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο στο ίδιο δείγμα κάτω από διαφορετικές συνθήκες (διαφορετικός αναλυτής, διαφορετική συσκευή, άλλη ημέρα, άλλα αντιδραστήρια) (44,45,46).

4.3.5.1 Πιστότητα (Precision) για δείγματα πρώτης ύλης

Παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα τριμεθοπρίμης $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, αραιώνοντας 100 mL πρότυπου διαλύματος $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ στα 10 mL μεθανόλης.

Επίσης παρασκευάζεται πρότυπο διάλυμα σουλφαδιαζίνης $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$, αραιώνοντας 100 mL πρότυπου διαλύματος $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ στα 10 mL NaOH 0,025N.

Για τη σουλφαδιαζίνη παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα στις συγκεντρώσεις 80%, 100%, 120%, αραιώνοντας 0.8, 1.0 και 1.2 mL πρότυπου διαλύματος $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε 5 mL διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4 : \text{ACN}$ (70:30).

Για τη τριμεθοπρίμη παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα στις συγκεντρώσεις 80%, 100%, 120%, αραιώνοντας 0.65, 0.8 και 0.95 mL πρότυπου διαλύματος $10 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε 5 mL διαλύτη $\text{CH}_3\text{COONH}_4 : \text{ACN}$ (70:30).

Γίνονται 3 επαναλήψεις για κάθε επίπεδο.

4.3.5.1.1 Αποτελέσματα

Υπολογίζεται η % σχετική τυπική απόκλιση για κάθε δραστική, σε κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων.

Πίνακας 17: Πίνακας αποτελεσμάτων πιστότητας Α ύλης

Επίπεδο Συγκέντρωσης	RSD % Σουλφαδιαζίνης	RSD % Τριμεθοπρίμης
80 % (n=3)	0,08	0,68
100 % (n=3)	0,03	0,30
120 % (n=3)	0,09	0,26

Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής $\text{RSD} \% < 2.0 \%$.

4.3.5.2 Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Χρησιμοποιήθηκαν τα 6 δείγματα που παρασκευάστηκαν για τα επίπεδα συγκέντρωσης 80%, 100%, 120% στην ακρίβεια. (4.3.3)

4.3.5.2.1 Αποτελέσματα

Πίνακας 18: Πίνακας αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας

Δείγμα 80 % (n=6)	Σουλφαδιαζίνη	Τριμεθοπρίμη
Μέσος Όρος (g/100g)	0,59	0,13
Τυπική Απόκλιση	0,01	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	1,83	1,92
Δείγμα 100 % (n=6)	Σουλφαδιαζίνη	Τριμεθοπρίμη
Μέσος Όρος (g/100g)	0,73	0,16
Τυπική Απόκλιση	0,01	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	1,04	1,02
Δείγμα 120 % (n=6)	Σουλφαδιαζίνη	Τριμεθοπρίμη
Μέσος Όρος (g/100g)	0,88	0,20
Τυπική Απόκλιση	0,00	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	0,41	0,46

Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής RSD % < 2.0 %

4.3.5.3 Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision)

Παρασκευάστηκαν δύο επιπλέον μέρες τα δείγματα που παρασκευάστηκαν και για την επαναληψιμότητα και έτρεξαν με τις ίδιες συνθήκες, αλλά διαφορετική μέρα και διαφορετική παρτίδα στήλης.

4.3.5.3.1 Αποτελέσματα

Πίνακας 19: Πίνακας αποτελεσμάτων ενδιάμεσης πιστότητας

80 %	1η Ημέρα (n=6)		2 ^η Ημέρα (n=6)		3 ^η Ημέρα (n=6)	
	SDZ*	TRI*	SDZ	TRI	SDZ	TRI
Μέσος Όρος (g/100g)	0,59	0,13	0,59	0,14	0,58	0,14
Τυπική Απόκλιση	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	1,83	1,92	1,66	0,31	0,65	0,16
100 %	1η Ημέρα (n=6)		2 ^η Ημέρα (n=6)		3 ^η Ημέρα (n=6)	
	SDZ	TRI	SDZ	TRI	SDZ	TRI
Μέσος Όρος (g/100g)	0,73	0,16	0,75	0,16	0,01	0,00
Τυπική Απόκλιση	0,01	0,00	0,01	0,00	0,74	0,16
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	1,04	1,02	1,41	0,15	1,57	0,34
120 %	1η Ημέρα (n=6)		2 ^η Ημέρα (n=6)		3 ^η Ημέρα (n=6)	
	SDZ	TRI	SDZ	TRI	SDZ	TRI
Μέσος Όρος (g/100g)	0,88	0,20	0,87	0,20	0,89	0,20
Τυπική Απόκλιση	0,00	0,00	0,00	0,00	0,01	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	0,41	0,46	0,26	1,40	0,68	0,52

* SDZ: Sulphadiazine TRI: Trimethoprim

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα υπολογίζονται η σχετική τυπική απόκλιση επί τις 100 $RSD_R = 1,7 \%$ για την σουλφαδιαζίνη και $RSD_R = 1,9 \%$ για την τριμεθοπρίμη στο επίπεδο 100 %, $RSD_R = 1,5 \%$ για την σουλφαδιαζίνη και $RSD_R = 1,9 \%$ για την τριμεθοπρίμη στο επίπεδο 80 %, $RSD_R = 0,8 \%$ για την σουλφαδιαζίνη και $RSD_R = 1,7 \%$ για την τριμεθοπρίμη στο επίπεδο 120 %
Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής $RSD < 2.0 \%$

4.3.6 Όριο Ανίχνευσης LOD και όριο ποσοτικοποίησης LOQ

Το όριο ανίχνευσης μιας αναλυτικής μεθόδου είναι η χαμηλότερη ποσότητα του αναλύτη σε ένα δείγμα που μπορεί να ανιχνευτεί αξιόπιστα, χωρίς να μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με ακρίβεια.

Ο προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης γίνεται με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και της κλίσεως) της καμπύλης αναφοράς

Το όριο ανιχνεύσεως (LOD) μπορεί να υπολογισθεί από τη σχέση :

$$LOD=3,3 \times \frac{SD}{b}$$

όπου: SD = τυπική απόκλιση της απόκρισης, b = η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Η κλίση b μπορεί να υπολογισθεί από την καμπύλη αναφοράς του αναλύτη.

Η εκτιμήτρια της τυπικής απόκλισης SD μπορεί να εξαχθεί με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα:

- Με βάση την τυπική απόκλιση του λευκού (standard deviation of blank)

Η μέτρηση της αναλυτικής απόκρισης του υποβάθρου (background), επιτυγχάνεται με την ανάλυση ικανοποιητικού αριθμού λευκών δειγμάτων και υπολογισμό της τυπικής αποκλίσεως των αντίστοιχων αποκρίσεων.

- Με βάση την καμπύλη αναφοράς

Κατασκευάζεται μία ειδική καμπύλη αναφοράς, χρησιμοποιώντας δείγματα που περιέχουν τον αναλύτη στην περιοχή συγκεντρώσεων του ορίου ανιχνεύσεως DL. Η τυπική απόκλιση των υπολοίπων (residual standard deviation)($S_{y/x}$) της ευθείας παλινδρόμησης ή η τυπική απόκλιση της τομής στον άξονα των y (standard deviation of the y -intercept) (s_a) μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως η τυπική απόκλιση για τον υπολογισμό του ορίου ανιχνεύσεως.

Το όριο ποσοτικοποίησης μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι το χαμηλότερο ποσό συγκέντρωσης της ουσίας σε ένα δείγμα που μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά με κατάλληλη ακρίβεια και πιστότητα. Το όριο ποσοτικοποίησης είναι μια παράμετρος των ποσοτικών δοκιμασιών για χαμηλά επίπεδα των ουσιών σε μήτρες δειγμάτων, και χρησιμοποιείται κυρίως για τον προσδιορισμό των προσμίξεων ή / και προϊόντων αποικοδόμησης.

Για τον προσδιορισμό του ορίου ποσοτικοποίησης (συγκέντρωση ή επίπεδο στο οποίο ο αναλύτης μπορεί να προσδιορισθεί ποσοτικά με αποδεκτή ακρίβεια και επαναληψιμότητα) μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι ίδιες προσεγγίσεις με τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης. Ως βάση υπολογισμού χρησιμοποιείται το 10-πλάσιο της τυπικής απόκλισης της απόκρισης ή λόγος $S/N = 10$.

Στην τεκμηρίωση πρέπει να παρουσιάζονται το όριο ποσοτικοποίησης και η μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του. Το όριο ποσοτικοποίησης πρέπει ακολούθως να πιστοποιηθεί ως προς την αξιοπιστία του με την ανάλυση ενός κατάλληλου αριθμού δειγμάτων που είναι γνωστό ότι

περιέχουν τον αναλύτη σε συγκέντρωση παραπλήσια του ορίου ποσοτικοποίησης ή έχουν παρασκευασθεί με συγκέντρωση ίση με το όριο ποσοτικοποίησης. Επιπλέον, θα πρέπει να διαπιστωθεί η ακρίβεια της μεθόδου, υπολογίζοντας την ανάκτηση συνθετικών μιγμάτων που περιέχουν τον αναλύτη στη συγκέντρωση του ορίου ποσοτικοποίησης (44,45,46).

Υπολογίζονται από την καμπύλη τα θεωρητικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, με βάση την καμπύλη αναφοράς.

Παρασκευάζονται 10 δείγματα στο όριο ποσοτικοποίησης και αναλύονται με την μέθοδο για την γραμμή καθαρισμού.

Για το LOQ σουλφαδιαζίνης έγινε εμβολιασμός 12 μL πρότυπου διαλύματος σουλφαδιαζίνης 1000 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ σε κάθε δείγμα. Παράλληλα αναλύθηκε και ένα τυφλό δείγμα.

Για το LOQ τριμεθοπρίμης έγινε εμβολιασμός 125 μL πρότυπου διαλύματος 10 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$ σε κάθε δείγμα. Παράλληλα αναλύθηκε και ένα τυφλό δείγμα.

4.3.6.1 Αποτελέσματα

Για τη σουλφαδιαζίνη επιβεβαιώθηκε το όριο ποσοτικοποίησης πειραματικά στο $5 \times 10^{-4} \text{ g}/100\text{g}$, δίνοντας σχετική τυπική απόκλιση 7,2 % και το όριο ανίχνευσης στο $2 \times 10^{-4} \text{ g}/100\text{g}$.

Για τη τριμεθοπρίμη επιβεβαιώθηκε το όριο ποσοτικοποίησης πειραματικά στο $8 \times 10^{-5} \text{ g}/100\text{g}$, δίνοντας σχετική τυπική απόκλιση 9,3 % και το όριο ανίχνευσης στο $3 \times 10^{-5} \text{ g}/100\text{g}$.

Πίνακας 20: Σουλφαδιαζίνη – Τριμεθοπρίμη Όριο Ανίχνευσης – Ποσοτικοποίησης

	Sulphadiazine (g/100g)	Trimethoprim (g/100g)
1	0,0006	0,00009
2	0,0006	0,00008
3	0,0006	0,00008
4	0,0007	0,00009
5	0,0006	0,00007
6	0,0007	0,00008
7	0,0007	0,00008
8	0,0007	0,00009
9	0,0007	0,00009
10	0,0007	0,00009
Μέσος Όρος	0,0007	0,00008
Τυπική Απόκλιση	0,00005	0,00001
Όριο ανίχνευσης	0,0002	0,00003
Όριο Ποσοτικοποίησης	0,0005	0,00008
Σχετική τυπική απόκλιση %	7,2	9,3

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΥΔΡΟΧΛΩΡΙΚΗ ΟΞΥΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΗ

5.1 Αντιδραστήρια – Οργανολογία

5.1.1 Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο (καθαρότητας HPLC), Fischer
- Μεθανόλη (καθαρότητας HPLC), Fischer
- Μονοένυδρο κιτρικό οξύ, Sigma Aldrich
- Φωσφορικό Οξύ, Sigma Aldrich
- Φορμικό οξύ, Carlo Erba
- Υδροχλωρικό οξύ, Merck
- Ώξινο φωσφορικό νάτριο άνυδρο, Sigma Aldrich
- EDTA, Serva
- Υπερκάθαρο νερό ($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$, παρεχόμενο από ένα σύστημα Milli-Q καθαρισμού του νερού)

Για την πειραματική διαδικασία παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα:

Διάλυμα κιτρικού οξέος 0,1 M: Ζυγίζονται 21,0 γραμμάρια μονοένυδρου κιτρικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL, διαλύονται σε νερό και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με νερό.

Διάλυμα όξινο φωσφορικού νατρίου 0,2 M: Ζυγίζονται 14,2 γραμμάρια άνυδρου όξινο φωσφορικού νατρίου σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL, διαλύονται σε νερό και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με νερό.

Φωσφορικό οξύ (1:10): Μεταφέρονται 5,0 mL πυκνού φωσφορικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 50 mL, η οποία περιέχει 20 mL νερό και αραιώνονται μέχρι χαραγής με νερό.

Υδροχλωρικό οξύ 0,1M: Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL μεταφέρονται 50 mL νερού και στην συνέχεια προστίθενται 821 μL πυκνού υδροχλωρικού οξέος. Το διάλυμα αραιώνεται μέχρι την χαραγή με νερό.

Φορμικό οξύ 1 %: Σε ογκομετρική φιάλη των 500 mL μεταφέρονται 5,0 mL φορμικού οξέος και αραιώνονται με νερό μέχρι την χαραγή.

Διάλυμα ACN : MeOH (60:40): Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL μεταφέρονται 100 mL μεθανόλης και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με ακετονιτρίλιο.

Ρυθμιστικό διάλυμα McInaine, pH:4,0 : Αναμιγνύονται 615 mL κιτρικού οξέος 0,1M με 385 mL όξινου φωσφορικού νατρίου 0,2M, ρυθμίζεται το pH στο 4,0 με την προσθήκη αραιού φωσφορικού οξέος.

McInaine buffer / EDTA 0,1 M: Ζυγίζονται 37,2 γραμμάρια EDTA και διαλύονται σε 950 mL με ρυθμιστικό διάλυμα McInaine, pH:4.0, ρυθμίζεται το pH εκ νέου στο 4,0 με αραιό φωσφορικό οξύ. Το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη των 1000 mL και αραιώνεται μέχρι την χαραγή.

McInaine buffer / EDTA 0,1 M: MeOH (90:10): Σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL μεταφέρονται 10 mL μεθανόλης και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με McInaine buffer / EDTA 0,1 M.

5.1.2 Πρότυπες ουσίες

- Υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη 96,7 %, Fluka Sigma Aldrich

Πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 1000 mg x L⁻¹ : Ζυγίστηκαν 10,00 mg πρότυπης ουσίας υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, διαλύθηκαν σε μεθανόλη και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής.

Πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 10000 mg x L⁻¹ : Ζυγίστηκαν 100,00 mg πρότυπης ουσίας υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης σε ογκομετρική φιάλη των 10 mL, διαλύθηκαν σε μεθανόλη και αραιώθηκαν μέχρι χαραγής.

5.1.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

- Υγροχρωματογράφος υψηλής απόδοσης της εταιρίας Agilent 1100 series, εξοπλισμένος με χειροκίνητο δειγματολήπτη, φούρνο για την ρύθμιση της θερμοκρασίας της στήλης, απαερωτή κινητής φάσης, αντλία και ανιχνευτή ορατού υπεριώδους (UV-VIS). Ο έλεγχος του συστήματος και η συλλογή, επεξεργασία δεδομένων πραγματοποιήθηκε από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με εγκατεστημένο το λογισμικό Chem Station.
- Αναλυτική στήλη χρωματογραφίας Agilent Zorbax Eclipse XDB C18 150 x 4,6 mm, 5μm
- Αναλυτικοί ζυγοί Mettler Toledo AT250 ακρίβειας πέντε δεκαδικών ψηφίων και Sartorius Basic ακρίβειας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.
- Λουτρό υπερήχων Selecta Ultrasons H-D
- Ογκομετρικές φιάλες κλάσης A και σιφώνια πληρώσεως κλάσης AS

- Αυτόματες πιπέτες 10-100 μL , 100-1000 μL της εταιρίας Brand.
- Φίλτρα σύριγγας αναγεννημένης κυτταρίνης RC, μέγεθος πόρων 0,2 μm , διαμέτρου 15 mm.
- Πεχάμετρο
- Συσκευή περιδίνησης (Vortex), Stuart

5.2 Βελτιστοποίηση μεθόδου

5.2.1 Βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο και ως προς το μέσο εκχύλισης – στάδιο 1^ο

Οι αρχικές συνθήκες προκατεργασίας του δείγματος σύμφωνα με το πρωτόκολλο του εργαστηρίου περιλάμβαναν αρκετά στάδια προκατεργασίας. Αρχικά, προσθήκη ποσότητας υδροχλωρικού 0,1 M στη ζυγισθείσα ποσότητα, χειροκίνητη ανακίνηση για 2 λεπτά, τοποθέτηση της φιάλης σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά στους 45 $^{\circ}\text{C}$. Εν συνεχεία, προσθήκη ποσότητας μεθανόλης, χειροκίνητη ανακίνηση για 2 λεπτά, τοποθέτηση της φιάλης σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά στους 45 $^{\circ}\text{C}$ και τέλος πλήρωση της ογκομετρικής με μείγμα MacInaine/EDTA : MeOH (90:10 v/v). Θεωρήθηκε σκόπιμο οι παραπάνω χρόνοι να βελτιστοποιηθούν για την απλούστευση της μεθόδου.

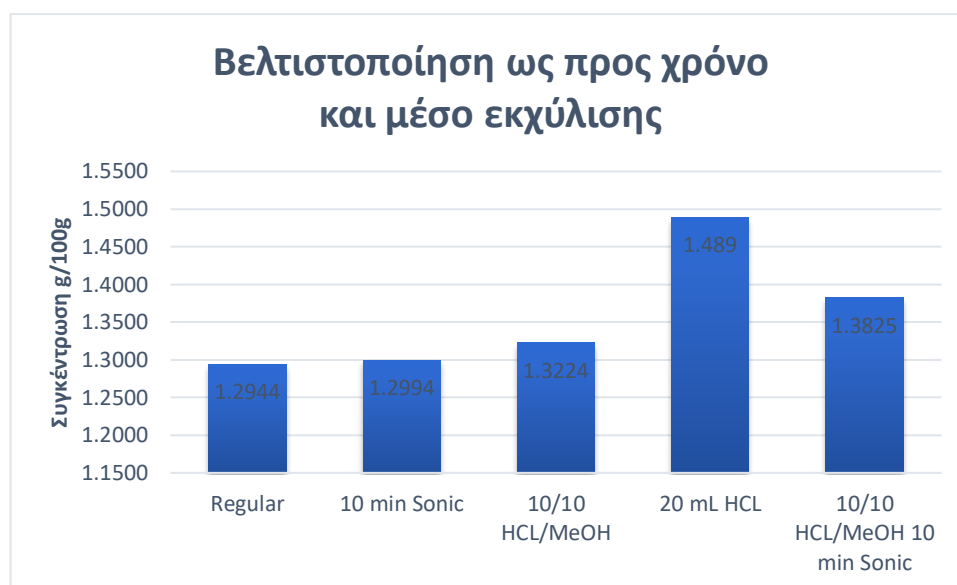
Παρασκευάστηκαν αρχικά πέντε δείγματα, ζυγίζοντας 0,5 g δείγματος medicated σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL. Στο πρώτο δείγμα ακολουθήθηκαν οι αρχικές συνθήκες προκατεργασίας. Στο δεύτερο ο χρόνος στο λουτρό υπερήχων μειώθηκε στα 10 λεπτά, για κάθε στάδιο. Στο τρίτο δείγμα προστέθηκαν στο ίδιο στάδιο η ποσότητα υδροχλωρικού 0,1 M και η ποσότητα μεθανόλης και στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά. Στο τέταρτο δείγμα προστέθηκαν 20mL υδροχλωρικού 0,1 M και καθόλου ποσότητα μεθανόλης και ακολούθησε λουτρό υπερήχων για 20 λεπτά. Στο πέμπτο δείγμα προστέθηκαν στο ίδιο στάδιο η ποσότητα υδροχλωρικού 0,1M και η ποσότητα μεθανόλης και στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά.

Και στα πέντε δείγματα έγινε πλήρωση μέχρι χαραγή με διαλύτη MacInaine/EDTA : MeOH (90:10 v/v), τα οποία φιλτραρίστηκα με τη βοήθεια

φίλτρων RC. Στη συνέχεια και από τα πέντε δείγματα έγινε η αντίστοιχη λήψη 100 μL και η ανάμειξή τους με 900 μL του ίδιου διαλύτη. Τα δείγματα έτρεξαν στον υγρό χρωματογράφο με βάση τη μέθοδο που αναφέρεται στο πρωτόκολλο.

5.2.1.1 Αποτελέσματα

Για την οξυτετρακυκλίνη τα αποτελέσματα δεν έδωσαν επαρκή και διακριτά στοιχεία ως προς το ποιες είναι οι βέλτιστες συνθήκες ανάλυσης και κατ'επέκταση τα πειράματα βελτιστοποίησης συνεχίστηκαν.



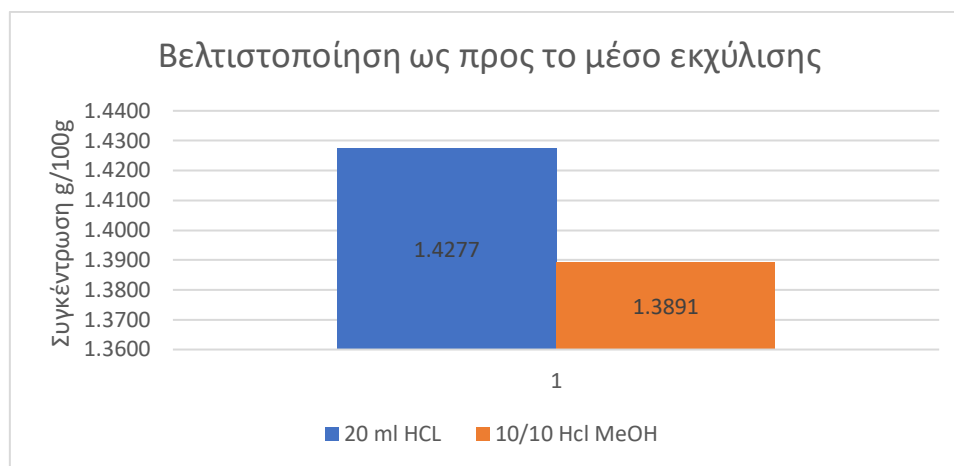
Σχήμα 29: Βελτιστοποίηση ως προς χρόνο και μέσο εκχύλισης

5.2.2 Βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο και ως προς το μέσο εκχύλισης – στάδιο 2^ο

Παρασκευάστηκαν έξι νέα δείγματα ως εξής: Στα τρία πρώτα δείγματα ζυγίστηκαν 0,5 g δείγματος medicated σε ογκομετρικές φιάλες των 100 mL, έγινε προσθήκη 20 mL υδροχλωρικού 0,1 M και καθόλου ποσότητα μεθανόλης και ακολούθησε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά. Στα επόμενα τρία πειράματα προστέθηκαν στο ίδιο στάδιο η ποσότητα υδροχλωρικού 0,1M και η ποσότητα μεθανόλης και στη συνέχεια η ογκομετρική φιάλη τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 10 λεπτά.

5.2.2.1 Αποτελέσματα

Τα παρασκευαστικά που έδωσαν τα βέλτιστα αποτελέσματα ήταν αυτά στα οποία η προσθήκη υδροχλωρικού 0,1 M και μεθανόλης έγινε στο ίδιο στάδιο και η χρήση λουτρού υπερήχων ήταν για 10 λεπτά.



Σχήμα 30: Βελτιστοποίηση ως προς χρόνο και μέσο εκχύλισης

5.2.3 Βελτιστοποίηση ως προς την ζύγιση του δείγματος

Βασιζόμενοι στα αποτελέσματα που έδωσε η βελτιστοποίηση ως προς τον χρόνο και ως προς το μέσο εκχύλισης, τα πειράματα συνεχίστηκαν για τη βελτιστοποίηση σχετικά με την ποσότητα ζύγισης του δείγματος ιχθυοτροφής. Παρασκευάστηκαν 5 δείγματα στα οποία ζυγίστηκαν 0,1 g, 0,25 g, 0,50 g, 0,75 g και 1,00 g ιχθυοτροφής αντίστοιχα. Ακολουθήθηκε η μέθοδος που αναφέρεται στο πρωτόκολλο, με εξαίρεση την προκατεργασία, όπου έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παραγράφου 5.2.1.

5.2.3.1 Αποτελέσματα

Τα αποτελέσματα των πέντε διαφορετικών δειγμάτων δεν έδειξαν σημαντικές διαφορές, οπότε το βάρος παρέμεινε στα 500 mg.

5.2.4 Προτεινόμενη μέθοδος για επικύρωση

- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης φαρμακούχας ιχθυοτροφής :
 - Ζύγιση 0,50 g δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
 - Προσθήκη 10,0 mL HCl 0,1 M και 10,0 mL MeOH
 - Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων στους 45 °C για 10 λεπτά
 - Vortex για 1 λεπτό

- Άφεση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αραίωση μέχρι χαραγή με McInaine buffer / EDTA 0,1 M
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Φιλτράρισμα με RC 0,20 μm
 - Αραίωση 100 μL στο 1 mL με διαλύτη McInaine buffer / EDTA 0,1M : MeOH (90:10)
- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης μη φαρμακούχας ιχθυοτροφής με σκοπό τον έλεγχο της γραμμής καθαρισμού :
 - Ζύγιση 1,0 g δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 100 mL
 - Προσθήκη 10,0 mL HCl 0,1M και 10,0 mL MeOH
 - Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων στους 45 °C για 10 λεπτά
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Άφεση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αραίωση μέχρι χαραγή με McInaine buffer / EDTA 0,1 M
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Φιλτράρισμα με RC 0,20 μm
- Για την παρασκευή δειγμάτων ανάλυσης πρώτης ύλης :
 - Ζύγιση 100,0 mg δείγματος σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL
 - Προσθήκη 200 mL McInaine buffer / EDTA 0,1 M : MeOH (90:10)
 - Vortex για 1 λεπτό
 - Τοποθέτηση σε λουτρό υπερήχων στους 45 °C για 30 λεπτά
 - Άφεση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και αραίωση μέχρι χαραγής με τον ίδιο διαλύτη
 - Αραίωση 125 μL στα 5.0 mL με διαλύτη McInaine buffer / EDTA 0,1 M : MeOH (90:10) για τον προσδιορισμό πρώτης ύλης 50 %
 - Αραίωση 125 μL στα 10.0 mL με διαλύτη McInaine buffer / EDTA 0,1 M : MeOH (90:10) για τον προσδιορισμό πρώτης ύλης 100 %

Παρασκευή πρότυπου διαλύματος: Μεταφέρονται σε ογκομετρική φιάλη των 5 mL 25 μL προτύπου διαλύματος υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 1000 mg x L⁻¹ και αραιώνονται μέχρι την χαραγή με διαλύτη McInaine buffer / EDTA 0,1 M : MeOH (90:10).

- Χρωματογραφικές Συνθήκες :

- ✓ Κινητή φάση A: Φορμικό οξύ 1 %
- ✓ Κινητή φάση B: Ακετονιτρίλιο – Μεθανόλη 60:40

σε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης που ακολουθεί:

Πίνακας 21: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης οξυτετρακυκλίνης

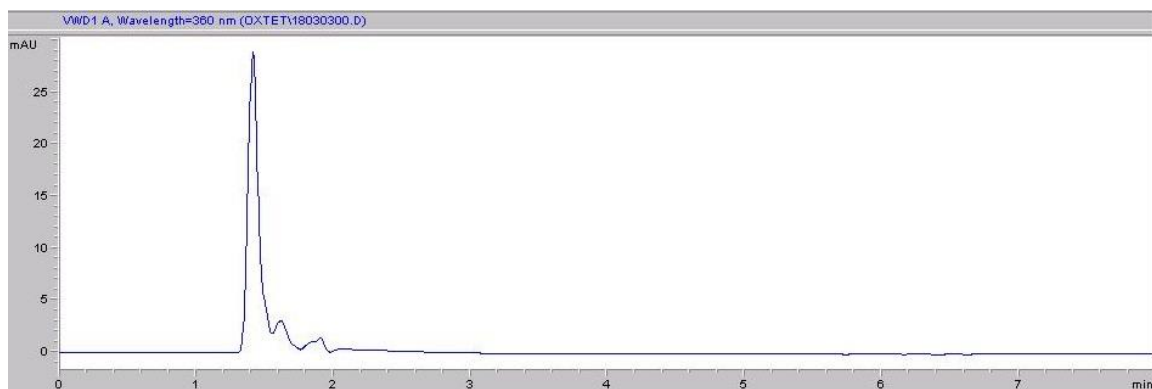
Χρόνος (min)	A%	B%	Ροή (mL/min)
0	90	10	1,0
8	50	50	1,0

- ✓ Στήλη : Agilent Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm
- ✓ Θερμοκρασία στήλης: 25°C
- ✓ Όγκος έγχυσης : 20 μL
- ✓ Run time: 8 min
- ✓ Post run: 4 min
- ✓ Μήκος κύματος : 360 nm

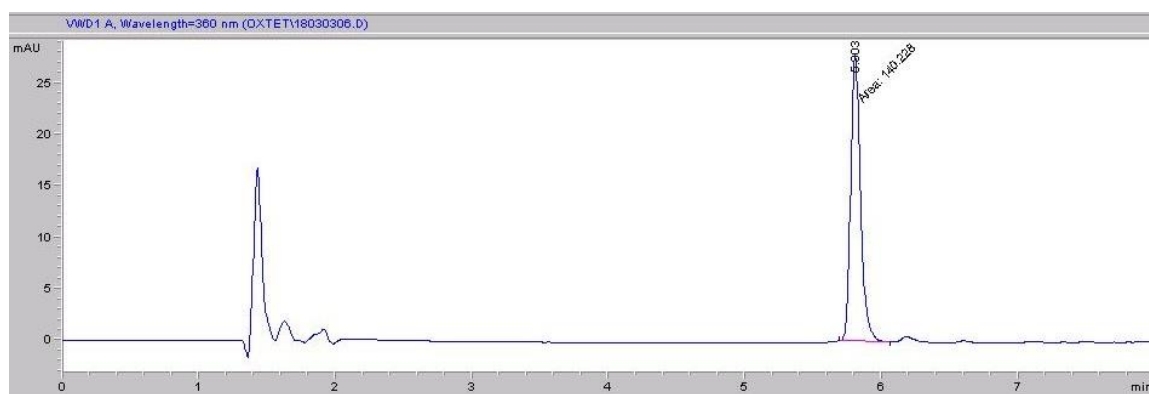
5.3 Επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου για τον προσδιορισμό της Οξυτετρακυκλίνης

5.3.1 Ειδικότητα (Specificity)

Παρατίθενται τα εξής αντιπροσωπευτικά χρωματογραφήματα, διαπιστώνοντας πως δεν παρουσιάζεται κάποιου είδους αλληλοεπικάλυψη:



Σχήμα 31: Χρωματογράφημα διαλύτη οξυτετρακυκλίνης



Σχήμα 32: Χρωματογράφημα δείγματος οξυτετρακυκλίνης

5.3.2 Γραμμικότητα (Linearity)

Παρασκευάστηκαν διαλύματα για 7 διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων με McInaine buffer / EDTA 0,1 M : MeOH (90:10), σύμφωνα με τον Πίνακα 19. Όλες οι αραιώσεις έγιναν από πρότυπο διάλυμα υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 1000 mg x L⁻¹.

Πίνακας 22: Αραιώσεις διαλυμάτων για τον έλεγχο γραμμικότητας οξυτετρακυκλίνης

Συγκέντρωση (mg x L ⁻¹) Υδροχλωρικής Οξυτετρακυκλίνης	Όγκος προτύπου (μL)	Τελικός όγκος (mL)
0,5	25	50
1,0	25	25
2,5	25	10
5,0	25	5
7,5	75	10
10,0	100	10
12,5	62,5	5

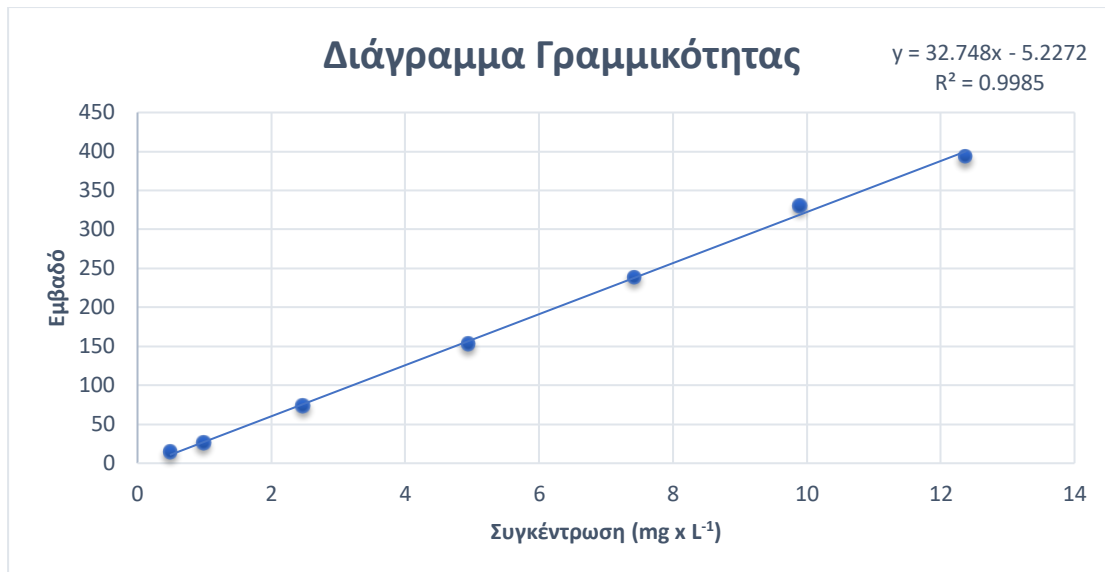
5.3.2.1 Αποτελέσματα

Στον Πίνακα 23 παρουσιάζεται ο μέσος όρος των αποτελεσμάτων για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων.

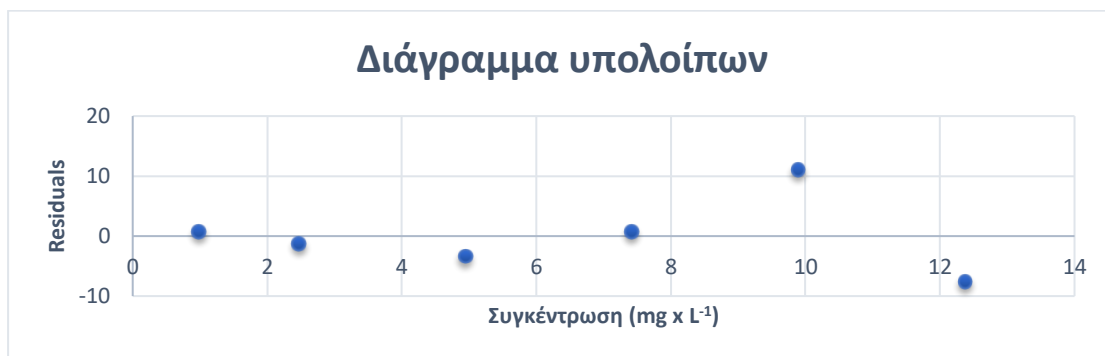
Πίνακας 23: Αποτελέσματα γραμμικότητας οξυτετρακυκλίνης

Συγκέντρωση (mg x L ⁻¹) Υδροχλωρικής Οξυτετρακυκλίνης	Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη	
	Εμβαδό (n=3)	RSD %
0,5	13,98	1,5
1,0	26,39	0,8
2,5	73,30	1,9
5,0	152,71	0,8
7,5	238,29	0,8
10,0	330,12	0,2
12,5	393,01	0,1

Στη συνέχεια από τα αποτελέσματα του παραπάνω Πίνακα κατασκευάστηκε η μέση καμπύλη αναφοράς καθώς και το διάγραμμα υπολοίπων.



Σχήμα 33: Διάγραμμα γραμμικότητας οξυτετρακυκλίνης



Σχήμα 34: Διάγραμμα υπολοίπων οξυτετρακυκλίνης

5.3.3 Ακρίβεια (Accuracy)

Παρασκευάστηκαν 6 διαφορετικά δείγματα της γραμμής καθαρισμού για κάθε επίπεδο συγκεντρώσεως (80%, 100%, 120%), στα οποία έγινε κατάλληλος εμβολιασμός με πρότυπη ουσία υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης, ώστε να πετύχουμε τα παραπάνω επίπεδα συγκεντρώσεων. Παρασκευάστηκε και ένα τυφλό δείγμα για αφαίρεση υποβάθρου, εφόσον υπάρχει.

Για το επίπεδο 80 % έγινε εμβολιασμός 540 μL πρότυπου διαλύματος υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 10000 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$.

Για το επίπεδο 100 % έγινε εμβολιασμός 680 μL πρότυπου διαλύματος υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 10000 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$.

Για το επίπεδο 120 % έγινε εμβολιασμός 816 μL πρότυπου διαλύματος υδροχλωρικής οξυτετρακυκλίνης 10000 $\text{mg} \times \text{L}^{-1}$.

5.3.3.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Για κάθε δείγμα σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης, υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις των δύο δραστικών ουσιών με τα αποτελέσματα να παρουσιάζονται στον Πίνακα 24

$$\% \text{ Ανάκτηση} = \frac{\text{Πειραματική Συγκέντρωση}}{\text{Θεωρητική Συγκέντρωση} + \text{Συγκέντρωση στο τυφλό}} \times 100$$

Πίνακας 24: Πίνακας αποτελεσμάτων ακρίβειας οξυτετρακυκλίνης

Επίπεδο Συγκέντρωσης (ως προς την αναμενόμενη)	Ανάκτηση % (n=6)	RSD %
80 %	99,4	0,2
100 %	101,2	1,1
120 %	101,9	0,8

Οι ανακτήσεις βρίσκονται ανάμεσα στο εύρος (90.0-110.0 %) και το RSD < 2.0 %. Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής.

5.3.4 Πιστότητα (Precision)

5.3.4.1 Πιστότητα (Precision) για δείγματα πρώτης ύλης

Παρασκευάζονται πρότυπα διαλύματα στις συγκεντρώσεις 80%, 100%, 120%, αραιώνοντας 20, 25 και 30 μL πρότυπου διαλύματος $1000 \text{ mg} \times \text{L}^{-1}$ αντίστοιχα, σε 5 mL διαλύτη McInaine buffer / EDTA 0,1 M : MeOH (90:10).

Γίνονται 3 επαναλήψεις για κάθε επίπεδο.

5.3.4.1.1 Αποτελέσματα

Υπολογίζεται η % σχετική τυπική απόκλιση για κάθε δραστική, σε κάθε επίπεδο συγκεντρώσεων.

- ✓ Για το επίπεδο 80 % η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίστηκε στο 0,2 %
- ✓ Για το επίπεδο 100 % η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίστηκε στο 0,2 %
- ✓ Για το επίπεδο 120 % η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίστηκε στο 0,3 %

Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής RSD % < 2.0 %

5.3.4.2 Επαναληψιμότητα (Repeatability)

Χρησιμοποιήθηκαν τα 6 δείγματα που παρασκευάστηκαν για τα επίπεδα συγκέντρωσης 80%, 100%, 120% στην ακρίβεια. (5.3.3)

5.3.4.2.1 Αποτελέσματα

Πίνακας 25: Πίνακας αποτελεσμάτων επαναληψιμότητας οξυτετρακυκλίνης

Δείγμα 80 % (n=6)	Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη
Μέσος Όρος (g/100g)	1,07
Τυπική Απόκλιση	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	0,24
Δείγμα 100 % (n=6)	Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη
Μέσος Όρος (g/100g)	1,38
Τυπική Απόκλιση	0,02
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	1,14
Δείγμα 120 % (n=6)	Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη
Μέσος Όρος (g/100g)	1,66
Τυπική Απόκλιση	0,01
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	0,80

Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής RSD % < 2.0 %

5.3.4.3 Ενδιάμεση Πιστότητα (Intermediate Precision)

Παρασκευάστηκαν δύο επιπλέον μέρες τα δείγματα που παρασκευάστηκαν και για την επαναληψιμότητα και έτρεξαν με τις ίδιες συνθήκες, αλλά διαφορετική μέρα και διαφορετική παρτίδα στήλης.

5.3.4.3.1 Αποτελέσματα

Πίνακας 26: Πίνακας αποτελεσμάτων ενδιάμεσης πιστότητας οξυτετρακυκλίνης

80 %	1^η Ημέρα (n=6)	2^η Ημέρα (n=6)	3^η Ημέρα (n=6)
Μέσος Όρος (g/100g)	1,07	1,08	1,10
Τυπική Απόκλιση	0,00	0,01	0,01
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	0,24	0,91	0,55
100 %	1^η Ημέρα (n=6)	2^η Ημέρα (n=6)	3^η Ημέρα (n=6)
Μέσος Όρος (g/100g)	1,38	1,35	1,37
Τυπική Απόκλιση	0,02	0,01	0,01
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	1,14	0,71	0,42
120 %	1^η Ημέρα (n=6)	2^η Ημέρα (n=6)	3^η Ημέρα (n=6)
Μέσος Όρος (g/100g)	1,66	1,63	1,64
Τυπική Απόκλιση	0,01	0,01	0,00
Σχετική Τυπική Απόκλιση %	0,80	0,41	0,27

Με βάση τα παραπάνω δεδομένα υπολογίζονται η σχετική τυπική απόκλιση επί τις 100 $RSD_R = 1,2 \%$ στο επίπεδο 100 %, $RSD_R = 1,1 \%$ στο επίπεδο 80 %, $RSD_R = 1,1 \%$ στο επίπεδο 120 %, $RSD_R = 1,1 \%$ στο επίπεδο 120 %, $RSD_R = 1,1 \%$ στο επίπεδο 120 %, $RSD_R = 1,1 \%$ στο επίπεδο 120 %,

Τα αποτελέσματα πληρούν τα κριτήρια αποδοχής $RSD \% < 2.0 \%$

5.3.5 Όριο Ανίχνευσης LOD και όριο ποσοτικοποίησης LOQ

Υπολογίζονται τα θεωρητικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, με βάση την καμπύλη αναφοράς.

Παρασκευάζονται 10 δείγματα στο όριο ποσοτικοποίησης και αναλύονται με την μέθοδο για τις φαρμακούχες ιχθυοτροφές, γραμμή καθαρισμού.

Για το LOQ έγινε εμβολιασμός 500 μ L πρότυπου διαλύματος 1000 mg x L⁻¹ σε κάθε δείγμα. Παράλληλα αναλύθηκε και ένα τυφλό δείγμα.

5.3.5.1 Αποτελέσματα

Επιβεβαιώθηκε το όριο ποσοτικοποίησης πειραματικά στο 12×10^{-3} g/100g, δίνοντας σχετική τυπική απόκλιση 1,2 % και το όριο ανίχνευσης στο 4×10^{-3} g/100g.

Πίνακας 27: Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη Όριο Ανίχνευσης – Ποσοτικοποίησης

	Oxytetracycline HCL g/100g
1	0,1035
2	0,1061
3	0,1067
4	0,1045
5	0,1045
6	0,1058
7	0,1058
8	0,1037
9	0,1029
10	0,1050
Μέσος Όρος	0,1048
Τυπική Απόκλιση	0,0012
Όριο ανίχνευσης	0,004
Όριο Ποσοτικοποίησης	0,012
Σχετική τυπική απόκλιση %	1,2

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση αποτελεσματικών και εύχρηστων αναλυτικών μεθόδων για τον ταυτόχρονο ποσοτικό προσδιορισμό της Σουλφαδιαζίνης και της Τριμεθοπρίμης καθώς και για τον ποσοτικό προσδιορισμό της Υδροχλωρικής Οξυτετρακυκλίνης σε δείγματα ιχθυοτροφών.

Η μελέτη βασίστηκε σε μεθόδους ανάλυσης που υπάρχουν σε βιβλιογραφικές αναφορές για τις ενώσεις αυτές. Με βάση αυτές τις αναφορές, στήθηκαν δύο πρωτόκολλα ανάλυσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό Σουλφαδιαζίνης και Τριμεθοπρίμης αλλά και τον ποσοτικό προσδιορισμό Υδροχλωρικής Οξυτετρακυκλίνης αντίστοιχα.

Στα πρωτόκολλα αυτά έγιναν πειραματικές δοκιμές στις οποίες ελέγχθηκαν παράγοντες οι οποίοι θα μπορούσαν να επηρεάσουν στον προσδιορισμό των συγκεκριμένων ουσιών.

Με την ολοκλήρωση της μελέτης εξάχθηκαν τα εξής συμπεράσματα:

Για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό της Σουλφαδιαζίνης και της Τριμεθοπρίμης ένας παράγοντας που κρίθηκε κρίσιμος ήταν ο τρόπος και ο χρόνος κατεργασίας των δειγμάτων με σκοπό την εκχύλιση των δραστικών ουσιών από τη μήτρα ιχθυοτροφής. Συμπερασματικά, για την επαρκή εκχύλιση των ουσιών απαιτείται τοποθέτηση των δειγμάτων για 30 λεπτά σε λουτρό υπερήχων, 1 λεπτό περιδίνηση του δείγματος και 10 λεπτά φυγοκέντρησης. Επιπλέον, έγιναν δοκιμές ως προς το βέλτιστο μέσο εκχύλισης των δειγμάτων αλλά και ως προς τις αναλογίες των διαλυτών σε αυτό. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως ταυτόχρονη εκχύλιση της Σουλφαδιαζίνης και της Τριμεθοπρίμης στο μέγιστο βαθμό επιτεύχθηκε με το μείγμα NaOH 0,025N /ACN σε αναλογία 50/50 v/v.

Συγκρίσιμα αποτελέσματα προέκυψαν κατά την ανάλυση τόσο με τη μέθοδο εξωτερικού προτύπου όσο και με τη μέθοδο καμπύλης αναφοράς. Τελικά, έγινε χρήση της μεθόδου εξωτερικού προτύπου καθώς κρίθηκε πιο εύχρηστη και λιγότερο χρονοβόρα.

Όλες οι μελέτες πραγματοποιήθηκαν σε σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με ανιχνευτή DAD, στα 268 nm. Έγινε χρήση της

στήλης Agilent Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4,6 mm, 5 μm και ακολουθήθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με κινητές φάσεις A: Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 10 mM, pH 4,3 και B: Ακετονιτρίλιο.

Λόγω των εξαιρετικά χαμηλών συγκεντρώσεων στα δείγματα της γραμμής καθαρισμού κατά την επικύρωση της μεθόδου για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης έγινε χρήση της μεθόδου σύζευξης υγροχρωματογραφίας με φασματομετρία μαζών. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν τριπλό τετράπολο.

Για τον προσδιορισμό της Υδροχλωρικής Οξυτετρακυκλίνης, ο παράγοντας που μελετήθηκε ήταν το μέσο εκχύλισης των δειγμάτων. Ως καταλληλότερο μέσο εκχύλισης κρίθηκε ο συνδυασμός υδροχλωρικού οξέος 0,1M και μεθανόλης ενώ κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων η χρήση λουτρού υπερήχων για τουλάχιστον 10 λεπτά κρίθηκε απαραίτητη. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC), με ανιχνευτή DAD, στα 360 nm. Έγινε χρήση της στήλης Agilent Zorbax Eclipse XDB C18, 150 x 4.6 mm, 5 μm και ακολουθήθηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με κινητές φάσεις A: Μυρμηγκικό οξύ 1% 3 και B: Ακετονιτρίλιο : Μεθανόλη (60:40 v/v).

Στους ελέγχους που διεξάχθηκαν για την επικύρωση μεθόδου, και οι δύο μέθοδοι ανάλυσης κρίθηκαν να είναι ειδικές, γραμμικές, ακριβείς και επαναλήψιμες.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
Accuracy	Ακρίβεια
Blank	Διάλυμα διαλύτη
Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροφόρηση
Chemical ionization-	Χημικός ιονισμός
Constant neutral loss scan	Σάρωση για την ανίχνευση απώλειας ουδέτερου μορίου
Correlation coefficient	Συντελεστής συσχέτισης
Electron impact-EI	Πρόσκρουση ηλεκτρονίων
Electrospray ionization	Ψεκασμός σε ηλεκτρικό πεδίο
Fast atom bombardment	Βομβαρδισμός με άτομα μεγάλης ταχύτητας
Field desorption	Εκρόφηση πεδίου
Full scan	Πλήρης σάρωση
Gas Chromatography	Αέρια χρωματογραφία
Hyphenated technique	Συζευγμένη τεχνική
Intermediate precision	Ενδιάμεση πιστότητα
Least squares method	Μέθοδος των ελαχίστων τετραγώνων
Limit of Detection	Όριο ανίχνευσης
Limit of Quantitation	Όριο ποσοτικοποίησης
Linearity	Γραμμικότητα
Liquid Chromatography	Υγρchromatography
Magnetic Sector Analyzer	Αναλυτής Μαγνητικού τομέα απλής εστίασης
Matrix assisted laser desorption ionization	Ιονισμός εκρόφησης με τη βοήθεια υλικού υποστρώματος
Oxytetracycline hydrochloride	Υδροχλωρική Οξυτετρακυκλίνη
Plasma desorption	Εκρόφηση πλάσματος
Precision	Πιστότητα
Precursor ion scan	Σάρωση πρόδρομου ιόντος

Product ion scan	Σάρωση παραγόμενων ιόντων
Quatrupole Mass Analyser	Τετραπολικός αναλυτής μαζών
Range	Εύρος
Regression line	Ευθεία παλινδρόμηση
Repeatability	Επαναληψιμότητα
Residual sum of squares	Άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων
Resolution	Διαχωριστική ικανότητα
Secondary ion Mass Spectrometry	Φασματομετρία μαζών δευτερογενούς ιόντος
Single ion monitoring	Επιλεκτικής παρακολούθησης ιόντων
Single/Selected Reaction Monitoring	Σάρωση επιλεκτικής παρακολούθησης θραυσματοποίησης ιόντων
Slope	Κλίση
Specificity	Ειδικότητα
Sulphadiazine	Σουλφαδιαζίνη
Tandem mass spectrometry	Συζευγμένη φασματομετρία μαζών
Trimethoprim	Τρεμεθοπρίμη
Yhermospray ionization	Ιοντισμός με θερμοψεκασμό

Συντμήσεις – Αρκτικόλεξα – Ακρωνύμια

ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
ACN	Acetonitrile
ADOTC	Acetyldeoxyoxytetracycline
ΑΟΤC	Anhydrous Oxytetracycline
APCI	Atmospheric pressure chemical ionization
C.E.	Capillary Electrophoresis
C.I.	Chemical Ionization
CNL	Constant Neutral Loss Scan
DAD	Diode Array Detector
EI	Electron Impact
ESI	Electrospray Ionization
EOTC	Epioxytetracycline
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FAB	Fast atom bombardment
FD	Field desorption
FT-ICR MS	Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry
GCMS	Gas chromatography- Mass Spectrometry
HPLC	High performance liquid chromatography
HCl	Hydrochloric acid
ICH	International conference of Harmonisation
IT	Ion Trap – TOF
LIT	Linear Ion Trap
MS	Mass Spectrometry
MALDI	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization
MeOH	Methanol
MRM	multiple-reaction monitoring

OTC	Oxytetracycline
PFOS	Perfluorooctanoate sulfonate
PD	Plasma desorption
Q-IT	Quadrupole - Ion Trap
RC	Regenerated Cellulose
R	Resolution
SIMS	Secondary Ion Mass Spectrometry
SIM	Single Ion Monitoring,
SRM	Single/Selected Reaction Monitoring
SDZS	sulfadiazine
TS	Thermospray ionization
TOF	Time of Flight
TMP	trimethoprim
USP	United States Pharmacopeia

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. E.J. Noga, Fish disease, Diagnosis and treatment, Ames: *Iowa State Press*, 2010, pp. 9-48.
2. D.A. Stoffregen, P.R. Bowser, and J.G. Babish, *Initial Disease Report of Streptococcus iniae Infection in Hybrid Striped (Sunshine) Bass and Successful Therapeutic Intervention with the Fluoroquinolone Antibacterial Enrofloxacin*. 4, Wiley Press, Initial Disease Report of Streptococcus iniae Infection in Hybrid Striped (Sunshine) Bass and Successful Therapeutic Intervention with the Fluoroquinolone Antibacterial Enrofloxacin, vol. 27, 1996, pp. 33-1881.
3. S.M. Amstrong, B.T. Hargrave, and K. Haya, Antibiotic Use in Finfish Aquaculture: Modes of Action, Environmental Fate, and Microbial Resistance, *Environmental Chemical*, Berlin : Springer-Verlag, vol. 5, 2005, pp. 341-357.
4. H.V. Bjorklund, and G. Bylund, Comparative pharmacokinetics and bioavailability of oxolinic acid and tetracyclin in rainbow trout, *Xenobiotica*, vol. 21, no. 11, 1991, pp. 1511-1520.
5. T. Aoki, Resistance plasmids and the risk of transfer. [book auth.] A.E. Ellis, P.J. Midtlyng, G. Oliver, P. Smith W.M Bernoth. Furunculosis Multidisciplinary Fish Disease Research. New York : *Academic Press*, 1997.
6. M.S. Bruun, A.S. Schmidt, L. Madsen, and L. Dalsgaard, Antimicrobial resistance patterns in Danish isolates of Flavobacterium psychrophilum, *Aquaculture*, vol. 187, no. 3, 2000, pp. 201-212.
7. C.Y. Ang, W. Luo, E.B. Hausen, J.P. Freeman, and H.C. Thomson. *AOAC International*, vol. 79, no. 2, 1996, p. 389.
8. B.T. Martinsen, T.E. Horberg, K.J. Varma, and R. Sams, Single dose pharmacokinetic study of florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*) in seawater at 11°C, *Aquaculture*, s.l. : Elsevier, vol. 112, 1993, pp. 1-11.
9. R.A Sams, Florfenicol: Chemistry and metabolism of a novel broad - spectrum antibiotic, Proc. XVIII World Buiatrics Congress, Bologna : s.n., 1994, p. 13.
10. T.E. Horsberg, B. Martinsen, and K. Varma, The disposition of ¹⁴C-florfenicol in Atlantic salmon (*Salmo salar*), *Aquaculture*, s.l. : Elsevier, vol. 122, no. 2-3, 1994, p. 97.

11. H. Hektoen, J.A. Berge, V. Hormazabol, and M. Yndestad, Persistence of antibacterial agents in marine sediments, *Aquaculture*, s.l. : Elsevier, vol. 133, no. 3-4, 1995, pp. 175-184.
12. Y.H. Park, S.Y. Hwang, M.K. Hong, and K.H. Kwon, Use of antimicrobial agents in aquaculture, *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, vol. 31, no. 1, 2012, pp. 189-197.
13. H. Pouliquen, *Oxytetracyclin and oxolonic acid in aquaculture. Chromatographic analysis in sea water, sediments and marine bivalves*, PhD Thesis, University of Nantes, 1994, p. 203.
14. H. Pouliquen, and H. Le Bris, Sorption of oxolinic acid and oxytetracycline to marine sediments, *Chemoaphere*, s.l. : Elsevier, vol. 33, no. 5, 1996, pp. 801-815.
15. M. Soltani, S. Shanker, B.L. Munday, Chemotherapy of Cytophaga/Flexibacter-like bacteria (CFLB) infections in fish: studies validating clinical efficacies of selected antimicrobials, *Journal of Fish Diseases*, s.l. : John Wiley & Sons, vol. 18, no. 6, 1995, p. 555.
16. C. Andrew, and M.D. Eschenbach, Enhanced Aquaculture and Seafood Inspection Report to Congress, Washington : United States Food and Drug Administration (FDA), 2008.
17. A. Burke, Nitrofurantoin: current concepts, *Urology*, Cunha, vol. 32, no. 1, 1988, pp. 67-71.
18. E. Karpman, and E.A. Kurzrock, Adverse reactions of nitrofurantoin, trimethoprim and sulfamethoxazole, *Urology*, vol. 172, no. 2, 2004, pp. 448-453.
19. Η.Π. Παπαπαναγιώτου, *Προσδιορισμός καταλοίπων σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης μετά από χορήγηση σε θεραπευτική δόση με την τροφή σε εκτρεφόμενη τσιπούρα (Sparus aurata L.) με υγροσωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)*, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Κτηνιατρικής., Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης (ΑΠΘ), Θεσσαλονίκη, 2001, p. 23.
20. Π. Μπέζα, *Ταυτόχρονος προσδιορισμός και μελέτη της αποικοδόμησης των αντιβιοτικών οξυτετρακυκλίνη, Οξολονικό Οξύ, Τριμεθοπρίμη και Σουλφαδιαζίνη σε επιφανειακά νερά*, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, 2010.

21. A.K. Lykkeberg, G. Sengelov, G. Cornett, J. Tjornelund, S. H. Hansen, and B.H. Sorensen, Isolation, structural elucidation and in vitro activity of 2-acetyl-2-decarboxamido-oxytetracycline against environmental relevant bacteria, including tetracycline-resistant bacteria, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, s.l. : Elsevier, vol. 34, no. 3, 2004, pp. 559-567.
22. A.K. Lykkeberg, B.H. Sorensen, C. Cornett, J. Tjornelund, and S.H. Hansen, Quantitative analysis of oxytetracycline and its impurities by LC-MS-MS, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, s.l. : Elsevier, vol. 34, no. 2, 2004, pp. 325-332.
23. P. Scott, Therapy in Aquaculture. Aquaculture for Veterinarians, Fish Husbandry and Medicine. s.l. : Pergamon Press, vol. 1, 1993, pp. 131-152.
24. K. Ingebrigtsen, Factors affecting drug disposition in fish, *Acta veterinaria Scandinavica*, vol. 87, 1991, pp. 44-56.
25. D.H.McCarthy, J.P.Stevenson, and A.W.Salsbury, A comparative pharmaco-kinetic study of seven sulphonamides and a sulphonamide potentiator, trimethoprim, in rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson), *Aquaculture*, s.l. : Elsevier, vol. 4, 1974, pp. 299-303.
26. D. Skoog, F. Holler, and T. Nieman, Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, Αθήνα : Κωσταράκης Α.Ε., 2005.
27. Borman, H. Russell, and G. Siuzdak, A Mass Spec Timeline, *Today's Chemist at work*, s.l. : ACS, vol. 8, 2003, pp. 47-49.
28. Ι. Στράτης, Γ. Ζαχαριάδης, Β. Σαμανίδου και Γ. Θεοδωρίδης, Ειδικές Μέθοδοι Διαχωρισμού και Χημικής Ανάλυσης, Θεσσαλονίκη : Ζήτη, 2004.
29. *Chemistry of Libretexts*, 23 May 2019 [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_\(Soderberg\)/Chapter_04%3A_Structure_Determination_I/4.1%3A_Mass_Spectrometry](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_(Soderberg)/Chapter_04%3A_Structure_Determination_I/4.1%3A_Mass_Spectrometry).
30. *Labome*, 23 May 2019 <https://www.labome.com/method/Monoclonal-Antibodies-Quality-Control-and-Quantification-through-Mass-Spectrometry.html>.
31. *University of Pittsburgh*, 23 May 2019 <https://www.chem.pitt.edu/facilities/mass-spectrometry/mass-spectrometry-introduction>.

32. Π. Παπαγιαννακόπουλος και Γ. Λαζάρου, *Φασματοσκοπία Μάζας*, Διδακτορική διατριβή, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Κρήτη.
33. Γ. Θεοδωρίδης, Σ. Γηρούση, Γ. Ζαχαριάδης, Α. Ζώτου και Β. Σαμανίδου, *Βιοαναλυτική Χημεία*, Αθήνα : Ελληνικά Ηλεκτρονικά Ακαδημαϊκά Συγγράμματα και Βοηθήματα, 2015.
34. P. Sandra, J. Nogueira, T. Sandra, and F. David, Recent Applicationw in LC-MS: Environmental Analysis, 2002, pp. 1-7.
35. M. Kurzawa, and A.Marzec, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 34, no. 1, 2004, pp. 95-102.
36. C. Couto, J. Lima, M. Conceicao, B. Montenegro, and S. Reis, Tetracycline, oxytetracycline and chlortetracycline determination by flow injection potentiometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, s.l. : Elsevier, vol. 18, no. 4-5, 1998, pp. 527-533.
37. N.Wangfuengkanagul, W.Siangproh, and O.Chailapakul, A flow injection method for the analysis of tetracycline antibiotics in pharmaceutical formulations using electrochemical detection at anodized boron-doped diamond thin film electrode, *Talanta*, s.l. : Elsevier, vol. 64, no. 5, 2004, pp. 1183-1188.
38. N. Smola, and U. Urleb, Qualitative and quantitative analysis of oxytetracycline by near-infrared spectroscopy, *Analytica Chimica, Acta*, s.l. : Elsevier, vol. 410, no. 1-2, 2000, pp. 203-210.
39. R. Fernandez-González, and J. Simal-Gándara, Quantitative analysis for oxytetracycline in medicated premixes and feeds by second-derivative synchronous spectrofluorimetry, *Analytica Chimica Acta*, s.l. : Elsevier, vol. 455, no. 1, 2002, pp. 143-148.
40. X. Zhenga, and Z. Zhang, Flow-injection chemiluminescence determination of tetracyclines with in situ electrogenerated bromine as the oxidant, s.l. : Elsevier, vol. 440, no. 2, 2001, pp. 143-149.
41. M. Yuvono, and G. Intrayanto, Oxytetracyclin: Analytical Profile, s.l. : Elsevier, vol. 32, 2005, pp. 97-117.
42. M.S. Peña, A.M. Peña, F. Salinas, M. C. Mahedero, and J. J. Aaron, Determination of binary mixtures of sulfonamides by photochemically induced fluorescence using partial least squares multivariate calibration, *Analyst*, s.l. : Royal Society of Chemistry, vol. 119, 1994, pp. 1177-1181.

43. M.M. Ghanem, and S.A. Abu-Lafi, Development and Validation of a Stability-Indicating HPLC Method for the Simultaneous Determination of Sulfadiazine Sodium and Trimethoprim in Injectable Solution Formulation, *Scientia Pharmaceutica*, s.l. : PMC, vol. 81, no. 1, 2013, pp. 167-182.
44. ICH, Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for human use., 1994, pp. 1-13.
45. ICH, Q2B Validation of Analytical Procedures: Methodology, Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, 1996, pp. 1-10.
46. C. Andrew, Enhanced Aquaculture and Seafood Inspection, Congress Food and Drug Administration, 2008.