

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου LC-MS για τον Προσδιορισμό Υπολειμμάτων Αντιβιοτικών και Μεταβολιτών τους σε Ψάρια

> ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΖΩΝΑΡΑΣ ΧΗΜΙΚΟΣ Μ*Sc*

> > AOHNA

ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2016

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου LC-MS για τον Προσδιορισμό Υπολειμμάτων Αντιβιοτικών και Μεταβολιτών τους σε Ψάρια

ΒΑΣΙΛΕΙΟΣ ΖΩΝΑΡΑΣ

A.M. 102713

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α. Νικόλαος Θωμαΐδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α. Ελένη Αρχοντάκη, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Χημείας Ε.Κ.Π.Α., α/α Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μιχαήλ Κουππάρης, Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Αντώνιος Καλοκαιρινός, Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Νικόλαος Θωμαΐδης, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Αναστάσιος Οικονόμου, Αναπληρωτής Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Ευάγγελος Μπακέας, Επίκουρος Καθηγητής Χημείας Ε.Κ.Π.Α.

Ευάγγελος Γκίκας, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

Ιωάννης Ντότσικας, Επίκουρος Καθηγητής Φαρμακευτικής Ε.Κ.Π.Α.

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 12/09/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σε αυτή τη διατριβή πραγματοποιήθηκε η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης (SDZ) και της τριμεθοπρίμης (TMP), καθώς και του κύριου μεταβολίτη της σουλφαδιαζίνης, της ακετυλο-σουλφαδιαζίνης (AcSDZ), με εσωτερικό πρότυπο τη δαπσόνη (DPS), σε ιστούς καλλιεργούμενων ιχθύων, όπως η σάρκα με δέρμα σε φυσική αναλογία, το ήπαρ και ο ορός. Οι δραστικές ουσίες SDZ και TMP είναι εγκεκριμένες στην Ελλάδα για χρήση τους στις ιχθυοκαλλιέργειες. Χρησιμοποιούνται συνήθως, σε αναλογία SDZ:TMP 5:1, τόσο για λόγους προώθησης της ανάπτυξης, όσο και για λόγους προφύλαξης και θεραπείας έναντι πολλών βακτηριακών, κυρίως, νοσημάτων.

Η ευρεία χρήση των αντιβιοτικών οδηγεί στην παρουσία καταλοίπων στους ιστούς των ιχθύων, με αποτέλεσμα να προκύπτουν κίνδυνοι για την υγεία των καταναλωτών. Έτσι, στις μεθόδους που αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική Υγροχρωματογραφίας-Φασματομετρίας μαζών (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry, LC/MS*), η οποία με την υψηλή ευαισθησία και την εκλεκτικότητα που έχει, επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από τα Ανώτατα Όρια Καταλοίπων (*Maximum Residue Limits, MRLs*) που έχει θέσει η Ευρωπαϊκή Ένωση (Ε.Ε.). Η παρουσία των ουσιών σε συγκεντρώσεις κάτω από τα *MRL*s θεωρείται «ασφαλής» για την υγεία των καταναλωτών. Το *MRL* για το σύνολο των σουλφοναμιδίων (*SA*s) είναι 100 μg kg⁻¹ και για την TMP 50 μg kg⁻¹ σάρκας με δέρμα.

Για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου χρησιμοποιήθηκε Υγροχρωματογραφικό Σύστημα Υψηλής Απόδοσης με αναλυτική στήλη *XTerra MS C*₁₈ (100,0×2,1 mm, 3,5 μm), θερμοστατούμενη στους 40 °C. Εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης στην κινητή φάση, η οποία αποτελείτο από ύδωρ και ακετονιτρίλιο με μυρμηκικό οξύ 0,05 % (v/v) και είχε ροή 0,2 mL min⁻¹. Ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε το φασματόμετρο μαζών, μοντέλο *Z*Q 2000, επιλέγοντας τη μέτρηση θετικών (πρωτονιωμένων) ιόντων των υπό μελέτη ουσιών. Για την κατεργασία των δειγμάτων σάρκας με δέρμα και ήπατος χρησιμοποιήθηκε το Σύστημα Επιταχυνόμενης Εκχύλισης, με το ύδωρ ως διαλύτη εκχύλισης, ο δε καθαρισμός έγινε με χρήση των στηλών Εκχύλισης Στερεάς Φάσης *Abselut Nexus* 60 mg /3 mL. Για την κατεργασία των δειγμάτων ορού πραγματοποιήθηκε Υγρό-υγρό Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και περαιτέρω καθαρισμός με *n*-εξάνιο.

Οι μέθοδοι επικυρώθηκαν σύμφωνα με την Απόφαση 2002/657/ΕΚ της Ευρωπαϊκής Κοινότητας και χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των SDZ, TMP και AcSDZ στους ιστούς τσιπούρας, μετά από βιολογικό πειραματισμό με δύο διαφορετικές τροφές. Τέλος, υπολογίστηκε ο χρόνος αποδρομής των (*Withdrawal time*, *Wt*), στις δύο περιπτώσεις, με το στατιστικό πρόγραμμα *WT*1.4.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αναλυτική Χημεία

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Ιχθυοκαλλιέργειες, υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών, ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου, χρόνος αποδρομής.

ABSTRACT

This thesis describes the development and validation of methods for the determination of sulfadiazine (SDZ), trimethoprim (TMP), and acetyl-sulfadiazine (AcSDZ), the main metabolite of SDZ, with dapsone as internal standard, in tissues of cultured fish, like muscle plus skin in natural proportion, liver and serum. In Greece, both SDZ and TMP are approved drugs for use in aquaculture. They are usually used in a ratio SDZ:TMP of 5:1, for the promotion of growth and for prophylactic and therapeutic purposes mainly against bacteria diseases.

The wide use of antibiotics in aquaculture results in the presence of drug residues in fish tissues, that can have undesirable effects on consumer health. Liquid Chromatography-Mass Spectrometry with high sensitivity and selectivity was used for the detection and quantitation of residues in concentrations below the Maximum Residue Limits (*MRLs*) which have been set by the European Union. The levels below *MRLs* are considered to be safe on consumer health. The *MRL* for the sum of sulfonamides has been set to 100 μ g kg⁻¹ and for TMP 50 μ g kg⁻¹ in muscle plus skin.

Analysis was performed by using High Performance-Liquid Chromatographic system and the analytical column *XTerra MS C*₁₈ (100,0×2,1 mm, 3,5 μ m) kept at 40 °C. The mobile phase was consisted of water and acetonitrile, both solvents containing formic acid 0,05 % (v/v), and was pumped at a programme of gradient elution and a constant flow rate of 0,2 mL min⁻¹. The detection of analytes and internal standard was performed by using the Mass Spectrometric system model *ZQ* 2000, monitoring the positive (protonated) ions of the drugs.

Extraction of drugs from muscle plus skin and liver samples was carried out by using water in Accelerated Solvent Extraction. *Abselut Nexus* 60 mg /3 mL Solid Phase Extraction cartridges were used for sample cleanup. Liquid-liquid extraction with ethyl acetate and cleanup with *n*-hexane were used for serum sample preparation.

The methods were validated according to the 2002/657/EC European Decision and were used for the determination of SDZ, TMP and AcSDZ in tissues of gilthead

seabream after a two diet trial. Withdrawal times (Wts) of the drugs were calculated by WT1.4 software.

SUBJECT AREA: Analytical Chemistry

KEYWORDS: Aquaculture, liquid chromatography-mass spectrometry, method development and validation, withdrawal time.

«Αυτό που επιλέξαμε χθες, μας κάνει αυτό που είμαστε σήμερα. Και οι επιλογές που θα κάνουμε σήμερα, θα μας τοποθετήσουν στο αύριο»

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ41
1.1 Εισαγωγή
1.2 Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα41
1.3 Κύρια εκτρεφόμενα είδη στη Μεσόγειο42
1.4 Εκτροφή των ιχθύων
 1.5 Κύριες παθολογικές καταστάσεις των καλλιεργούμενων ιχθύων στις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΙΣ
ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ
2.1 Εισαγωγή
2.2 Κατάλοιπα και ανώτατα όρια των καταλοίπων50
2.3 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία51
2.3.1 Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης51
2.3.2 Κώδικας Τροφίμων53
2.4 Κατάταξη των αντιμικροβιακών ουσιών54
2.5 Κατανάλωση των αντιβιοτικών55
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΙΧΘΥΕΣ59
3.1 Βιβλιογραφικές αναφορές για τον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων στους ιχθύες
3.1.1 Εισαγωγή59
3.1.2 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό (φθορο)κινολονών σε ιστούς ιχθύων

3.1.3 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό τετρακυκλινών σε ιστούς ιχθύων	64
3.1.4 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων/διαμινοπυριμιδινών σε ιστο	νύς
ιχθύων	64
3.1.5 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών διαφόρων ομάδων σε ιστούς	
ιχθύων	70
3.1.6 Στην παρούσα εργασία	70
3.2 Τεχνικές εκχύλισης	75
3.2.1 Γενικά	75
3.2.1.1 «Δια χειρός» τεχνικές εκχύλισης δείγματος	75
3.2.1.2 Ενόργανες τεχνικές εκχύλισης	76
3.3 Διαδικασία QuEChERS	76
3.3.1 Γενικά	76
3.3.2 Εκχύλιση των αναλυτών	76
3.3.3 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης Διασποράς	77
3.4 Υγρό Εκχύλιση Υπό Πίεση	78
3.4.1 Εισαγωγή	78
3.4.2 Οργανολογία	78
3.4.3 Προκατεργασία του δείγματος	79
3.4.4 Διαδικασία της εκχύλισης	80
3.4.5 Παράμετροι της διαδικασίας <i>ΑSE</i>	80
3.4.6 Πλεονεκτήματα και εφαρμογές της τεχνικής <i>ASE</i>	81
3.5 «Επίδραση του μητρικού υλικού» στην υγροχρωματογραφία-φασματομετ μαζών	ρία 81
3.5.1 Γενικά	81

	3.5.2 Μηχανισμοί του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»	82
	3.5.3 Επιπτώσεις του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»	83
	3.5.4 Αξιολόγηση του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»	83
	3.5.5 Μείωση ή εξάλειψη του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού	84
	3.5.6 «Σχετική επίδραση του μητρικού υλικού»	85
3.6	Επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων σύμφωνα με την Απόφαση 2002/657/Ι	EK 86
	3.6.1 Επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου σύμφωνα με την Απόφαση	
	2002/657/EK	86
	3.6.2 Επικύρωση μιας (βιο)αναλυτικής μεθόδου σύμφωνα με οδηγίες άλλων	
	διεθνών οργανισμών	88
KEQ	ΦΑΛΑΙΟ 4 ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΜΙΝΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ	89
4.1	Γενικά περί των σουλφοναμιδίων και των διαμινοπυριμιδινών	89
	4.1.1 Χημεία των σουλφοναμιδίων	89
	4.1.2 Χημεία των διαμινοπυριμιδινών	90
	4.1.3 Αντιβακτηριακές ιδιότητες-Ενισχυμένα σουλφοναμίδια	90
4.2	Σουλφαδιαζίνη και τριμεθοπρίμη	92
	4.2.1 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες της σουλφαδιαζίνης	92
	4.2.2 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες της τριμεθοπρίμης	93
	4.2.3 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες της ακετυλο-σουλφαδιαζίνης	94
	4.2.4 Χορήγηση της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης	95
	4.2.5 Μηχανισμός δράσης	95
	4.2.6 Τοξικότητα, κατάλοιπα και δημόσια υγεία	95
4.3	Μέθοδοι προσδιορισμού της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης σε	ιστούς
	ιχθύων	96

ΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ97
5.1 Γενικά
5.2 Διάθεση των φαρμάκων στους ιχθύες97
5.3 Κύριες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές παράμετροι
5.4 Μελέτες της φαρμακοκινητικής της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης στους ιχθύες
5.5 Προϊόντα μεταβολισμού της σουλφαδιαζίνης
5.6 Προϊόντα μεταβολισμού της τριμεθοπρίμης102
5.7 Ταυτοποίηση των προϊόντων μεταβολισμού της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ
ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ
ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ109
6.1 Σκοπός της εργασίας109
6.2 Εξοπλισμός-Οργανολογία110
6.2 Εξοπλισμός-Οργανολογία
 6.2 Εξοπλισμός-Οργανολογία

6.4.2.1 Εύρος συγκεντρώσεων Α	117
6.4.2.2 Εύρος συγκεντρώσεων Β	117
6.4.2.3 Εύρος συγκεντρώσεων <i>Γ</i>	118
6.5 Βελτιστοποίηση του συστήματος υγροχρωματογραφίας	118
6.5.1 Εισαγωγή	118
6.5.2 Αναλυτική στήλη	119
6.5.3 Παρασκευή της κινητής φάσης	120
6.5.4 Βελτιστοποίηση της κινητής φάσης	120
6.6 Βελτιστοποίηση του συστήματος φασματομετρίας μαζών	124
6.6.1 Εισαγωγή	124
6.6.2 Βελτιστοποίηση του συστήματος <i>M</i> S	126
6.7 Βέλτιστες συνθήκες του συστήματος υγροχρωματογραφίας-φασματ	ομετρίας
μαςων	129
κεφαλαίο 7 αναπτύξη μεθοδολογιάς κατεργάσιας δειγματός δ	129 ΣΑΡΚΑΣ
μαζων ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ	129 Σ ΑΡΚΑΣ 131
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE) 	EAPKAΣ 131 131
μαζων ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (<i>SPE</i>) 7.1.1 Εισαγωγή	EAPKAΣ 131 131 131
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (<i>SPE</i>) 7.1.1 Εισαγωγή 7.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>SPE</i> 	EAPKAΣ 131 131 131 136
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (<i>SPE</i>) 7.1.1 Εισαγωγή 7.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>SPE</i> 7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (<i>ASE</i>) 	EAPKAΣ 131 131 131 136 142
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (<i>SPE</i>) 7.1.1 Εισαγωγή 7.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>SPE</i> 7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (<i>ASE</i>) 7.2.1 Εισαγωγή	EAPKAΣ 131 131 131 136 142 142
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ	EAPKAΣ 131 131 131 136 142 142 145
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (<i>SPE</i>) 7.1.1 Εισαγωγή 7.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>SPE</i> 7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (<i>ASE</i>) 7.2.1 Εισαγωγή 7.2.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>ASE</i> 7.3 Βέλτιστη μέθοδος <i>ASE/SPE</i> για την παρασκευή δείγματος σάρκας μαι χθύος 	EAPKAΣ 131 131 131 131 136 142 142 145 ε δέρμα 152
 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ Σ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ 7.1 Ανάπτυξη της μεθόδου Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (<i>SPE</i>) 7.1.1 Εισαγωγή 7.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>SPE</i> 7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (<i>ASE</i>) 7.2.1 Εισαγωγή 7.2.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>ASE</i> 7.3 Βέλτιστη μέθοδος <i>ASE</i>/<i>SPE</i> για την παρασκευή δείγματος σάρκας με ιχθύος. 7.4 Εφαρμογή της βέλτιστης μεθόδου <i>ASE</i>/<i>SPE</i> σε διάφορες στήλες <i>SPE</i>. 	EAPKAΣ 131 131 131 131 136 142 142 145 ε δέρμα 152 155

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΝ ΙΧΘΥΟΣ	ΙΑΤΟΣ ΟΡΟΥ 159
8.1 Ανάπτυξη της μεθόδου υγρό-υγρό εκχύλισης (<i>LLE</i>) σε δείγματα ορού	
8.2 Βέλτιστη μέθοδος <i>LLE</i> σε δείγματα ορού	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑ ΙΧΘΥΟΣ	ΤΟΣ ΗΠΑΤΟΣ 169
9.1 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>QuEChERS</i> σε δείγματα ήπατος	
9.2 Ανάπτυξη της μεθόδου <i>ΑSE/SPE</i> σε δείγματα ήπατος	
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΕ	ονσιορισμο
ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔ ΔΕΙΓΜΑ ΣΑΡΚΑΣ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ	ΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ
10.1 Εισαγωγή	177
10.2 Έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος	
10.3 Έλεγχος της ειδικότητας, της εκλεκτικότητας και των παρεμποδ μητρικό υλικό	ίσεων από το 179
10.4 Έλεγχος της επιμόλυνσης	
10.5 Έλεγχος της σταθερότητας	
10.5.1 Συνθήκες μελέτης της σταθερότητας	
10.5.2 Σταθερότητα σε πρότυπα διαλύματα	
10.5.3 Σταθερότητα σε μητρικό υλικό	
10.6 Έλεγχος της ανθεκτικότητας	
10.6.1 Ανθεκτικότητα στο σύστημα <i>LC/M</i> S	
10.6.2 Ανθεκτικότητα στη μέθοδο παρασκευής ενός δείγματος σάρκαα	ς με δέρμα190
10.7 Καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς	
10.7.1 Εισαγωγή	191

10.7.2 Καμπύλη αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα
10.7.3 Καμπύλη αναφοράς σε διαλύματα μητρικού υλικού. Προσδιορισμός της
«επίδρασης του μητρικού υλικού»
10.7.4 Καμπύλη αναφοράς σε δείγματα εμβολιασμένα πριν την εκχύλιση.
Προσδιορισμός της «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού»
10.8 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης
10.8.1 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα
σάρκας με δέρμα210
10.8.2 Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης σε πρότυπα διαλύματα και σε
δείγματα σάρκας με δέρμα210
10.9 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης213
10.10 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου213
10.10.1 Γενικά
10.10.2 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου εντός της ημέρας
10.10.3 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου μεταξύ των ημερών
10.11 Προσδιορισμός του ορίου απόφασης και της ικανότητας ανίχνευσης
10.11.1 Προσδιορισμός του ορίου απόφασης216
10.11.2 Προσδιορισμός της ικανότητας ανίχνευσης
10.12 Εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων217
10.12.1 Εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης σε
δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος217
10.12.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης σε
δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος218
10.12.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό της ακετυλο-

σουλφαδιαζίνης σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος	218
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΔΕΙΓΜΑ ΟΡΟΥ ΙΧΘΥΟΣ	ΙΣΜΟ ΣΕ 223
11.1 Εισαγωγή	223
11.2 Έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος	223
11.3 Έλεγχος της ειδικότητας, της εκλεκτικότητας και των παρεμποδίσεων ατ μητρικό υλικό	тó то 223
11.4 Έλεγχος της επιμόλυνσης	224
11.5 Έλεγχος της σταθερότητας	224
11.6 Έλεγχος της ανθεκτικότητας	225
11.7 Καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς	225
11.7.1 Εισαγωγή	225
11.7.2 Καμπύλη αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα	226
11.7.3 Καμπύλη αναφοράς σε διαλύματα μητρικού υλικού. Προσδιορισμός της	
«επίδρασης του μητρικού υλικού»	226
11.7.4 Καμπύλη αναφοράς με δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση.	
Προσδιορισμός της «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού»	226
11.8 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης	228
11.8.1 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης σε δείγματα ορού	228
11.8.2 Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης σε δείγματα ορού	228
11.9 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης των καμπυλών αναφοράς σε δείγ ορού εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό	γματα 231
11.10 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου	231

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑ ΗΠΑΤΟΣ ΙΧΘΥΟΣ
12.1 Έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος233
12.2 Έλεγχος της ειδικότητας, της εκλεκτικότητας και των παρεμποδίσεων από το μητρικό υλικό
12.3 Έλεγχος της επιμόλυνσης
12.4 Έλεγχος της σταθερότητας234
12.5 Έλεγχος της ανθεκτικότητας
12.6 Καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς235
12.6.1 Καμπύλη αναφοράς σε διαλύματα του μητρικού υλικού. Προσδιορισμός της
«επίδρασης του μητρικού υλικού»
12.6.2 Καμπύλη αναφοράς σε δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση.
Προσδιορισμός της «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού»
12.7 Προσδιορισμός ορίου ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης σε δείγματα ήπατος 236
12.8 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης καμπυλών αναφοράς σε δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό
12.9 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου240
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ,
ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΙΧΘΥΩΝ ΜΕΤΑ
ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΡΟΝΩΝ ΑΠΟΔΡΟΜΗΣ243
13.1 Βιολογικοί πειραματισμοί243
13.1.1 Εισαγωγή243
13.1.2 Εξοπλισμός
13.1.3 Αντιβακτηριακός παράγοντας244
13.1.4 Πειραματόζωα

13.1.5 Διατροφή των ιχθύων24	45
13.1.6 Φαρμακούχος ιχθυοτροφή24	45
13.1.7 Συνθήκες πειραματισμών24	47
13.1.8 Δειγματοληψία24	47
13.2 Υπολογισμός των χρόνων αποδρομής24	48
13.2.1 Εισαγωγή24	48
13.2.2 Βιολογικός πειραματισμός με την ιχθυοτροφή <i>FO</i>	50
13.2.3 Βιολογικός πειραματισμός με την ιχθυοτροφή <i>ΡΟ</i>	58
13.2.4 Συζήτηση επί των αποτελεσμάτων των βιολογικών πειραματισμών με τις δύ	OÙ
ιχθυοτροφές FO και PO20	66
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 14 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	69
ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	71
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ2	73
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ2	77

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1 Βασικά στάδια της πορείας Q <i>uEChERS</i> 77
Σχήμα 3.2 Σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος <i>ASE</i>
Σχήμα 3.3 Κύρια στάδια της διαδικασίας εκχύλισης με σύστημα ASE80
Σχήμα 4.1 Γενική δομή των SAs89
Σχήμα 4.2 Γενική δομή των <i>DP</i> s92
Σχήμα 4.3 Δομή της SDZ93
Σχήμα 4.4 Δομή της TMP94
Σχήμα 4.5 Δομή της AcSDZ95
Σχήμα 5.1 Χημική δομή των κύριων μεταβολιτών των SAs
Σχήμα 5.2 Χημική δομή των κύριων μεταβολιτών της SDZ (AcSDZ: ακετυλο- σουλφαδιαζίνη, 4-OH-SDZ: 4-υδροξυ-σουλφαδιαζίνη, 5-OH-SDZ: 5-υδροξυ- σουλφαδιαζίνη, 5-OH-SDZ-glucuronide: 5-υδροξυ-γλυκουρονο-σουλφαδιαζίνη, 5-OH- SDZ-sulfate: 5-υδροξυ-θειική-σουλφαδιαζίνη)
Σχήμα 5.3 Χημική δομή των δύο νέων μεταβολιτών της SDZ
Σχήμα 5.4 Χημική δομή των μεταβολιτών της TMP103
Σχήμα 5.5 Μεταβολίτες οξειδωτικής πορείας της TMP104
Σχήμα 5.6 «Δραστικοί» μεταβολίτες οξειδωτικής πορείας της TMP
Σχήμα 5.7 Μεταβολίτες της TMP, συζευγμένοι και μη- με <i>GSH</i>
Σχήμα 5.8 Χαρακτηριστικά ιόντα-θραύσματα της SDZ και των μεταβολιτών της 107
Σχήμα 6.1 Χρωματογράφημα που ελήφθηκε με τις βέλτιστες συνθήκες. Η σειρά έκλουσης των ουσιών (σε παρένθεση δίνεται ο χρόνος συγκράτησης (t_R) και η συγκέντρωση κάθε ουσίας στο διάλυμα) είναι: (1) σουλφαδιαζίνη (t_R =5,34 min, 100 ng mL ⁻¹ <i>DS</i>), (2) τριμεθοπρίμη (t_R =5,80 min, 50 ng mL ⁻¹ <i>DS</i>), (3) ακετυλο-σουλφαδιαζίνη (t_R =6,22 min, 100 ng mL ⁻¹ <i>DS</i>), (4) δαπσόνη (t_R =7 29 min, 50 ng mL ⁻¹ <i>DS</i>)

Σχήμα 7.1 Ισορροπίες διάστασης της SDZ όπου φαίνεται και το επαγωγικό φαινόμ	ιενο
της σουλφονυλ-ομάδας (-SO ₂)	133
Σχήμα 7.2 Κλάσματα ιονισμένης και μη ιονισμένης δομής της SDZ σε συνάρτηση μ	ε то
<i>p</i> H	133
Σχήμα 7.3 Κλάσματα ιονισμένης και μη ιονισμένης δομής της AcSDZ σε συνάρτησι	η με
το <i>p</i> H	134
Σχήμα 7.4 Χημική δομή της DPS	134

Σχήμα 7.5 Ισορροπία της υδρόφιλης *Ν*-βινυλ-πυρρολιδόνης και του λιπόφιλου διβινυλο-βενζολίου στο συμπολυμερές των στηλών *Abselut Nexus*. Χαρακτηριστικά πληρωτικού υλικού: μέσο εμβαδό επιφάνειας 575 m² g⁻¹, μέγεθος πόρων 100 Å, **Σχήμα 7.6** Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκπλυσης......139 **Σχήμα 7.7** Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκπλυσης......139 **Σχήμα 7.8** Τιμές της υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκπλυσης......139 **Σχήμα 7.9** Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό υδρογονάνθρακα ως πρώτο διαλύτη έκπλυσης......140 **Σχήμα 7.10** Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό υδρογονάνθρακα ως πρώτο διαλύτη έκπλυσης......140 **Σχήμα 7.11** Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό υδρογονάνθρακα ως πρώτο διαλύτη έκπλυσης......140 **Σχήμα 7.12** Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκλουσης......142 **Σχήμα 7.13** Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη **Σχήμα 7.14** Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό **Σχήμα 7.15** Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών σε διαφορετικές **Σχήμα 7.16** Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών σε διαφορετικές πιέσεις (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων εμβολιασμένων με

Σχήμα 7.17 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών σε διαφορετικούς χρόνους στατικής εκχύλισης (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων

Σχήμα 7.21 Υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος σάρκας με δέρμα και ενός δείγματος σάρκας με δέρμα εμβολιασμένο με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη *ASE/SPE LC-ESI-MS* μέθοδο (5,22 min: SDZ 100 μ g kg⁻¹, 5,88 min: TMP 50 μ g kg⁻¹, 6,23 min: AcSDZ 100 μ g kg⁻¹, 7,38 min: DPS 50 μ g kg⁻¹). 154

Σχήμα 10.1 Υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος σάρκας με δέρμα και ενός δείγματος σάρκας με δέρμα εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη *ASE/SPE LC-ESI-MS* μέθοδο (5,22 min: SDZ 100 μ g kg⁻¹, 5,88 min: TMP 50 μ g kg⁻¹, 6,23 min: AcSDZ 100 μ g kg⁻¹, 7,38 min: DPS 50 μ g kg⁻¹). 181

Σχήμα 10.6 Σταθερότητα διάλυματος σε μητρικό υλικό κατά τη διάρκεια της ημέρας με συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*. 186

Σχήμα 13.5 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από το ήπαρ τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία).. 256

Σχήμα 13.13 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από το ήπαρ τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία).. 264

Σχήμα 13.17 Απομάκρυνση της SDZ από τη σάρκα με δέρμα τσιπούρας μετά από τη χορήγηση των φαρμακούχων ιχθυοτροφών *FO* και *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία) 266

Σχήμα 13.18 Απομάκρυνση της TMP από τη σάρκα με δέρμα τσιπούρας μετά από τη χορήγηση των φαρμακούχων ιχθυοτροφών *FO* και *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία) 267

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Τσιπούρα (<i>Sparus aurata</i> L.)
Εικόνα 1.2 Λαβράκι (<i>Dicentrarchus labrax</i>) 43
Εικόνα 6.1 Σύστημα LC/MS Alliance 2695-ZQ 2000 (Waters/Micromass)
Εικόνα 6.2 Σύστημα επιταχυνόμενης εκχύλισης <i>ASE</i> 200 (<i>Dionex</i>)
Εικόνα 6.3 Στατική φάση <i>XTerra</i> 120
Εικόνα 13.1. Δειγματοληψία αίματος από τσιπούρα
Εικόνα 13.2. Τα δείγματα αίματος τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάρια και μετά από 24 ώρες στο ψυγείο, φυγοκεντρούνται οπότε λαμβάνονται τα δείγματα ορού του αίματος249
Εικόνες 13.3 και 13.4 Λήψη δείγματος ήπατος από τσιπούρα
Εικόνα 13.5 Καταγραφή της προέλευσης των δειγμάτων που ελήφθησαν

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1 Φαρμακολογικά δραστικές ουσίες για τις οποίες έχει καθορισθεί ή δεν απαιτείται καθορισμός <i>MRL</i>
Πίνακας 2.2 Φαρμακολογικά δραστικές ουσίες για τις οποίες δε μπορεί να καθορισθεί <i>MRL</i> (απαγορευμένες)
Πίνακας 2.3 Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες σε ορισμένα Ευρωπαϊκά κράτη
Πίνακας 2.4 Κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών και μηχανισμοί δράσης
Πίνακας 3.1 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό (φθορο)κινολονών σε ιστούς ιχθύων
Πίνακας 3.2 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό τετρακυκλινών σε ιστούς ιχθύων
Πίνακας 3.3 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων σε ιστούς ιχθύων
Πίνακας 3.4 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών διαφόρων κατηγοριών σε ιστούς ιχθύων
Πίνακας 4.1 Ιδιότητες ορισμένων SAs91
Πίνακας 4.2 Ιδιότητες της SDZ93
Πίνακας 4.3 Ιδιότητες της ΤΜΡ94
Πίνακας 6.1 Βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης
Πίνακας 6.2 Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων της πηγής και του τετραπόλου
Πίνακας 6.3 Λόγοι <i>m/z</i> και δυναμικά κώνου για τους αναλύτες της εργασίας
Πίνακας 7.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό εξέταση αναλυτών
Πίνακας 7.2 Αρχικές τιμές των παραμέτρων του <i>ASE</i> (M1)
Πίνακας 7.3 Βέλτιστη μέθοδος <i>ASE</i>

Πίνακας συστήματ	10.1 ος	Κριτήρια	επίδοσης	για	тоу	έλεγχο	της 	καταλληλό	στητας	тоu 179
Πίνακας ΄	10.2 Пр	ότυπα διαλ	νύματα στα	οποία	ελέγγ	(θηκε η σ	ταθερ	ότητα		182
Πίνακας ΄	10.3 Вр	αχυπρόθεα	τμη και μακ	ροπρο	όθεσμ	η σταθερ	ότητα	των ΠΔΕΡ	και ΠΔ	E184
Πίνακας απόψυξης	10.4 Β _ί ζ/ψύξης	οαχυπρόθε του ΠΔΠ	σμη και μα	ακροπ	ρόθες	τμη σταθ	ερότη	τα κατά τη	διαδικα	ασία 185
Πίνακας ΄	10.5 Αξι	ιολόγηση τι	ης ανθεκτικό	ότητας	ς της μ	ιεθόδου	στο τμ	ήμα <i>LC</i>		192
Πίνακας ΄	10.6 Αξι	ιολόγηση τι	ης ανθεκτικό	ότητας	ς της μ	ιεθόδου	στο τμ	ήμα <i>M</i> S		193
Πίνακας ΄	10.7 Ек	τίμηση της	ανθεκτικότι	ιτας σ	την π	αρασκευ	αστική	πορεία		193
Πίνακας ΄	10.8 Ап	οτελέσματο	α της ανθεκ	τικότη	τας σ	την παρο	σκευο	ιστική πορε	:ία	194
Πίνακας των καμπ	10.9 Εξ υλών τr	ισώσεις πο ης SDZ (με	αλινδρόμησι /S)	ης, συ	ντελει	στές συσ	χετίσε	ως και τυπ	ικό σφό	ιλμα 197
Πίνακας αναφοράς	10.10 ; πρότυ	Στατιστική πων διαλυμ	αξιολόγησ μάτων της \$	η της SDZ (μ	ς μετο με /S).	αβολής ·	της κ	λίσης των	καμπυ	λών 197
Πίνακας ΄ χωρίς /S)	10.11 ∏	Ιροσδιορισ	μός της «ετ	ιίδρας	σης το	υ μητρικα	ού υλιι	<ού» στην \$	SDZ (µɛ	ε και 205
Πίνακας και χωρίς	10.12 Γ /S) στα	Ιροσδιορισ τρία εύρη	μός της «ετ συγκεντρώα	τίδραα σεων .	σης το	ου μητρικ	ού υλι	ικού» στην	AcSDZ	(με 205
Πίνακας ΄ χωρίς /S)	10.13 Π στα τρί	Ιροσδιορισ α εύρη συγ	μός της «επ κεντρώσεω	ίδραα ν	της το	υ μητρικα	ού υλικ	κού» στην ٦	ΓΜΡ (με	ε και 206
Πίνακας αναφοράς τον καθαρ	10.14 ; των δε οισμό, μ	Στατιστική ειγμάτων ε ε και χωρίς	αξιολόγησ μβολιασμέν ; /S, στα τρί	η της ων με α εύρι	ς μετα τους η συγι	αβολής αναλύτει κεντρώσε	της κά ς πριν ::ων	λίσης των ' από την ε	καμπυ κχύλιση	λών και 209
Πίνακας πρότυπα	10.15 διαλύμα	Όρια ανίχ [.] ατα (σε ng ι	νευσης και mL ⁻¹) και σε	ποσα δείγμ	οτικού ατα σ	προσδι άρκας με	ορισμ δέρμα	ού των αν α (σε μg kg	′αλυτών ⁻¹)	' σε 211
Πίνακας ΄	10.16 A	ποδεκτά όμ	οια ορθότητ	ας						213
Πίνακας ΄	1 0.17 A	ποδεκτά όρ	οια πιστότη	rας						214

Πίνακας 10.18 Ορθότητα και πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day inter-batch) 215

Πίνακας 10.19 Ορθότητα και πιστότητα μεταξύ των ημερών (inter-day inter-batch).216

Πίνακας 11.1 Κριτήρια επίδοσης για τον έλεγχο καταλληλότητας του συστήματος 224

Πίνακας 11.7 Ορθότητα και πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day inter-batch) 232

Πίνακας 11.8 Ορθότητα και πιστότητα μεταξύ των ημερών (inter-day inter-batch) 232

Πίνακας 12.1 Κριτήρια επίδοσης για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος 233

Πίνακας 12.7 Ορθότητα και πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day inter-batch) 241

Πίνακας 12.8 Ορθότητα και πιστότητα μεταξύ των ημερών (inter-day inter-batch) 242
ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Διατροφής και Παθολογίας Υδρόβιων Οργανισμών, του Ινστιτούτου Υδατοκαλλιεργειών και μετέπειτα Ινστιτούτου Θαλάσσιας Βιολογίας, Βιοτεχνολογίας και Υδατοκαλλιεργειών (Ι.ΘΑ.Β.ΥΚ.), του Ελληνικού Κέντρου Θαλάσσιων Ερευνών (ΕΛ.ΚΕ.Θ.Ε) στον Άγιο Κοσμά Αττικής.

Η διατριβή αποτελείται από δύο κύρια μέρη: το θεωρητικό μέρος (κεφάλαια 1 έως 5) και το πειραματικό μέρος (κεφάλαια 6 έως 13). Στο τελευταίο κεφάλαιο (κεφάλαιο 14) δίνονται τα συμπεράσματα από τη διατριβή αλλά και δυνατότητες εξέλιξης της συγκεκριμένης έρευνας. Τέλος, η έντυπη μορφή συνοδεύεται από *CD*, το οποίο περιέχει τα Παραρτήματα Ι έως VIII, με δεδομένα που αντιστοιχούν στα κεφάλαια 6 έως 13 του πειραματικού μέρους, αντίστοιχα.

Θα ήθελα να εκφράσω θερμά τις ευχαριστίες μου στον επιβλέποντα της διατριβής μου κ. Μιχαήλ Κουππάρη, καθηγητή της Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α.), για την ανάθεση της εργασίας και την συνεχή επιστημονική καθοδήγηση καθ'όλη της διάρκεια της διατριβής. Ευχαριστώ, επίσης, τον κ. Νικόλαο Θωμαΐδη, αναπληρωτή καθηγητή της Αναλυτικής Χημείας του Ε.Κ.Π.Α. και την κ. Ελένη Αρχοντάκη, αναπληρώτρια καθηγήτρια της Αναλυτικής Χημείας του Ε.Κ.Π.Α., μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τις παρατηρήσεις και τις υποδείξεις τους. Ευχαριστώ, επίσης, όλα τα μέλη της επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για τις εύστοχες διορθώσεις τους.

Ευχαριστώ την κ. Μαρία Αλέξη, Διευθύντρια Ερευνών του ΕΛ.ΚΕ.ΘΕ., που μου έδωσε τη δυνατότητα εκπόνησης της διατριβής, παράλληλα με τις επαγγελματικές μου υποχρεώσεις στο χώρο αυτό, αλλά και τη δυνατότητα χρησιμοποίησης των δειγμάτων τσιπούρας από τους βιολογικούς πειραματισμούς του ευρωπαϊκού προγράμματος "AQUAMAX". Ευχαριστώ τον Δρ. Αθανάσιο Τυρπένου, Υγιεινολόγο Τροφίμων, για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων από τους βιολογικούς πειραριστώ, επίσης, όλους τους συναδέλφους στο

I.ΘΑ.Β.ΥΚ., ερευνητές και τεχνικούς, για τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια υλοποίησης της εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά την Β. Αυγεράκη και τον Δρ. Φρ. Κρόκο για τις πολύτιμες συμβουλές που μου έδωσαν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στους γονείς μου για τη σημαντική υποστήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια για την υλοποίηση της διατριβής.

Βασίλης Ζωναράς Αθήνα, 2016

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Η ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΩΝ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

1.1 Εισαγωγή

Ο όρος υδατοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται για να περιγράψει την ελεγχόμενη εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, κατά την οποία διατηρείται ο έλεγχος ολόκληρου ή μέρους του κύκλου ζωής των. Ο έλεγχος αυτός διακρίνει τις υδατοκαλλιέργειες από τις συμβατικές μεθόδους αλιείας, στις οποίες οι οργανισμοί συλλέγονται από φυσικά αποθέματα.¹

Σύμφωνα με στοιχεία του Παγκόσμιου Οργανισμού Τροφίμων και Γεωργίας (*FAO*)² η παγκόσμια παραγωγή των προϊόντων υδατοκαλλιεργειών παρουσίασε σημαντική αύξηση τις τελευταίες δεκαετίες, με την Κίνα να κατέχει την πρώτη θέση.

Στην Ε.Ε. παράγεται περίπου το 5 % της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής ιχθυηρών, γεγονός που την καθιστά τη δεύτερη μεγαλύτερη παραγωγό δύναμη στον κόσμο.^{3,4}

Σημαντικούς ρυθμούς ανάπτυξης παρουσίασε και η μεσογειακή υδατοκαλλιέργεια τα τελευταία χρόνια.⁵

1.2 Οι υδατοκαλλιέργειες στην Ελλάδα

Στην Ελλάδα η συστηματική εκτροφή των ευρύαλων ιχθύων ξεκίνησε το 1982 με την ίδρυση της πρώτης μονάδας και τα τελευταία χρόνια παρατηρήθηκε μια αλματώδης ανάπτυξη, οφειλόμενη κυρίως:

- ✓ στη συνεχή μείωση των φυσικών αποθεμάτων ιχθύων υψηλής ζήτησης, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι,
- ✓ στη συστηματική αύξηση της ζήτησης των ειδών αυτών,
- ✓ στις υψηλές τιμές διάθεσής των και στη προσδοκία υψηλών κερδών από τους επενδυτές,
- ✓ στην καταλληλότητα των κλιματολογικών, των φυσικών και των μορφολογικών συνθηκών της χώρας μας που εξασφαλίζουν τις ευνοϊκές προϋποθέσεις για την ίδρυση των μονάδων και για την ανάπτυξη των ειδών,
- ✓ στην εξέλιξη και γνώση της τεχνολογίας και τέλος,

✓ στα κίνητρα της πολιτείας και της Ε.Ε.

Σημαντικό γεγονός είναι, ότι τα τελευταία χρόνια η χώρα μας κατέχει τη πρώτη θέση στην παραγωγή ευρύαλων ιχθύων, τόσο στην Ε.Ε. όσο και μεταξύ των Μεσογειακών χωρών.⁶

Σε γενικές γραμμές, η ιχθυοκαλλιέργεια στην Ελλάδα επικεντρώνεται στην παραγωγή γόνου και ιχθύων τσιπούρας και λαβρακιού, ενώ γίνονται συνεχείς προσπάθειες και έρευνα από τις εταιρείες του κλάδου, με στόχο την ανάπτυξη της καλλιέργειας νέων ειδών ιχθύων (μυτάκι, λυθρίνι, φαγκρί, σαργός, συναγρίδα, κρανιός, μυλοκόπι, μαγιάτικο).

1.3 Κύρια εκτρεφόμενα είδη στη Μεσόγειο

Η τσιπούρα και το λαβράκι αποτελούν τα σημαντικότερα εμπορικά είδη της Μεσογείου Θάλασσας.⁷⁻⁹

Η τσιπούρα (*Sparus aurata* L.) (εικόνα 1.1) ανήκει στην ομοταξία των οστεϊχθύων και την οικογένεια *Sparidae*. Συναντάται ευρέως στη Μεσόγειο Θάλασσα, ενώ στον Ατλαντικό Ωκεανό η γεωγραφική κατανομή του είδους εκτείνεται από τις Βρετανικές Νήσους έως τη Σενεγάλη.¹⁰ Είναι είδος ευρύαλο και ευρύθερμο, με αντοχές σε αλατότητα μεταξύ 4 - 44 ‰ και θερμοκρασίες μεταξύ 5 - 35 °C, η δε άριστη θερμοκρασία είναι μεταξύ 2 - 22 °C.^{11,12} Το σχήμα του σώματός της είναι ατρακτοειδές, έχει χονδρά χείλη και ισχυρό κεφάλι, ενώ το κοινό μέγεθος της είναι περίπου 25 cm και το μέγιστο μήκος της 70 cm. Στο εμπόριο διατίθενται τσιπούρες ιχθυοκαλλιέργειας βάρους 250 - 400 g. Χαρακτηρίζεται από πρωτανδρικό ερμαφροδιτισμό. ¹³

Στη βιβλιογραφία η τσιπούρα αναφέρεται ως *Gilthead seabream* (στην αγγλική γλώσσα). Σύνηθες συνώνυμο είναι το *Chrysophrys aurata* (UNESCO, 1986).



Εικόνα 1.1 Τσιπούρα (Sparus aurata L.)

Το λαβράκι (*Dicentrarchus labrax*) (εικόνα 1.2) ανήκει στην ομοταξία των οστεϊχθύων και την οικογένεια *Serranidae*. Παρουσιάζει αρκετά ευρεία εξάπλωση. Εκτείνεται στον Ατλαντικό Ωκεανό, από τις ακτές του Μαρόκου έως τη Βαλτική Θάλασσα. Συναντάται σε κάθε περιοχή της Μεσογείου και των γύρω θαλασσών, εισχωρώντας στις εκβολές των ποταμών και στις λιμνοθάλασσες.¹⁴ Είναι κατ'εξοχήν ευρύαλο και ευρύθερμο είδος. Προσαρμόζεται και αναπτύσσεται εύκολα ακόμη και σε σχεδόν γλυκά νερά. Η θερμοκρασία στην οποία εκτρέφεται είναι 7 - 30 °C, με άριστες τιμές θερμοκρασίας 14 - 28 °C.



Εικόνα 1.2 Λαβράκι (Dicentrarchus labrax)

Το λαβράκι είναι ιχθύς με επίμηκες σώμα, μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους (μήκος σώματος 50 - 100 cm).¹⁵ Το εμπορεύσιμο μέγεθος του λαβρακιού είναι περίπου σε μήκος 32 cm και σε βάρος (350 ± 50) g.¹² Στη βιβλιογραφία το λαβράκι αναφέρεται ως *European seabass* (στην αγγλική γλώσσα). Σύνηθες συνώνυμο είναι το *Morone labrax* (*UNESCO*, 1986).

1.4 Εκτροφή των ιχθύων

Η ακριβής γνώση των επιδράσεων διαφόρων παραγόντων αφενός στην ανάπτυξη και αφετέρου στην υγεία των ιχθύων, συνιστώσες που καθορίζουν τόσο την αειφόρο ανάπτυξη των βιολογικών πόρων όσο και τη βελτιστοποίηση των αποδόσεων παράλληλα με τη μεγιστοποίηση του οικονομικού αποτελέσματος, κρίνεται απαραίτητη, ως πρώτο βήμα για την υπερκέρασή τους.

Η πραγματική αύξηση των ιχθύων συνίσταται στην επαύξηση της ποσότητας της σάρκας (πρωτεΐνες) και των οστών τους. Σε αυτήν, δε συμπεριλαμβάνονται οι εναποθέσεις λίπους και ύδατος του σώματός των.^{16,17}

Η αύξηση στους οστεϊχθύες διαμορφώνεται τόσο από καθοριστικούς παράγοντες, όπως η θερμοκρασία, η αλατότητα και η φωτοπερίοδος, που δρουν άμεσα στους υποδοχείς επιταχύνοντας ή καθυστερώντας την ανάπτυξη, όσο και από περιοριστικούς παράγοντες, όπως η συγκέντρωση οξυγόνου, της αμμωνίας, του διοξειδίου του άνθρακα, των υδρογονοκατιόντων (*p*H), που λειτουργούν με συγκεκριμένα ερεθίσματα και σε συγκεκριμένο εύρος ανοχής.¹⁸⁻²⁰

Εκτός από τους παράγοντες του περιβάλλοντος που την καθορίζουν, η αύξηση των ιχθύων εξαρτάται από το σωματικό βάρος και τη τροφή τους, αλλά και από βιοτικούς παράγοντες, όπως το φύλο, τα γενετικά τους χαρακτηριστικά και η φυσιολογική τους κατάσταση.²⁰

Η κατάσταση της υγείας των ιχθύων καθορίζεται από γενετικούς παράγοντες, από την προγενέστερη διαβίωσή των, από την ποιότητα του περιβάλλοντος διαβίωσής των, από τη διατροφή τους, από τη φύση των παθογόνων με τα οποία έρχονται σε επαφή μέσω του περιβάλλοντος ή της τροφής των, καθώς και από εγγενείς των ίδιων των ιχθύων παράγοντες που τους προκαλούν ένταση (στρες).²¹

Παράλληλα με την ανάπτυξη του κλάδου εκτροφής των ευρύαλων ιχθύων εμφανίστηκαν και τα πρώτα προβλήματα στην υγεία τους, με άμεση επίπτωση στο κόστος παραγωγής είτε με τη μορφή των απωλειών είτε με το κόστος καταπολέμησης ή πρόληψης των ασθενειών.^{22,23} Οι μοναδικές και ιδιαίτερες καταστάσεις οι οποίες παρατηρούνται στις εκτροφές ιχθύων, όπως π.χ. η μεγάλη πυκνότητα του πληθυσμού ανά μονάδα όγκου

ύδατος, έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας των νοσημάτων και την ταχύτερη μετάδοσή των, σε αντίθεση με τις συνθήκες της ελεύθερης διαβίωσης.^{24,25}

Οι συνθήκες του περιβάλλοντος στο οποίο ζουν οι ιχθύες, όπως ο τύπος των εγκαταστάσεων, η ποιότητα και η σύσταση του ύδατος της περιοχής, η ταχύτητα με την οποία κινείται το ύδωρ, η θερμοκρασία κ.ά. καθορίζουν και τον τρόπο με τον οποίο θα εφαρμοσθεί η θεραπευτική αγωγή. Οι ασθένειες των ιχθύων μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τα προσβληθέντα όργανα, το είδος, την ηλικία και την εποχή. Επίσης διακρίνονται ανάλογα με την αιτία τους, σε νοσήματα που οφείλονται σε παράγοντες του περιβάλλοντος, σε ιούς, σε βακτήρια, σε μύκητες, σε παράσιτα, σε σφάλματα διατροφής και σε νεοπλάσματα.²⁶ Αν και η προσβολή των ιχθύων μιας εκτροφής από παθογόνα για τον άνθρωπο βακτήρια (*Vibrio, Listeria, Salmonella, Aeromonas, Clostridium*) εξαρτάται από το περιβάλλον και από το βακτηριακό φορτίο του ύδατος, οι ασθένειες των ιχθύων δε μεταδίδονται στον άνθρωπο μετά το μαγείρεμα. Εξαίρεση αποτελούν μερικά παρασιτικά νοσήματα όπως π.χ. το κεστώδες *Diphylobothrium latum* κ.ά.^{27,28}

1.5 Κύριες παθολογικές καταστάσεις των καλλιεργούμενων ιχθύων στις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες

Οι κυριότερες παθολογικές καταστάσεις των καλλιεργούμενων ιχθύων στις ελληνικές υδατοκαλλιέργειες αφορούν στη προσβολή από παθογόνα βακτήρια και ιογενή νοσήματα, σε προσβολές από παράσιτα (μολυσματικές ασθένειες), διατροφικά νοσήματα και νοσήματα άγνωστης αιτιολογίας (μη μολυσματικές ασθένειες).

<u>Μερικά από τα πιο συχνά νοσήματα των ιχθύων που οφείλονται σε βακτήρια είναι</u>:^{29,30} (1) η φυματίωση των ιχθύων: προκαλείται από τα βακτήρια *Mycobacterium*, (2) η Βακτηριακή Ασθένεια των Βραγχίων (*Bacterial Gills Disease*, *BGD*): προκαλείται από τα βακτήρια *Flavobacterium branchiophila*, ή από τον μύκητα *Branchiomyces*, (3) η δονακίωση (*Vibriosis*): προκαλείται από τα βακτήρια του γένους *Vibrio*, όπως το *Vibrio anguillarum*, (4) το *Columnaris*: αιτία της ασθένειας είναι το βακτήριο *Flavobacterium columnare*, (5) η *Furunculosis*: το βακτήριο *Aeromonas salmonicida* προκαλεί *Furunculosis* που συνεπάγεται σηψαιμία με την επακόλουθη θνησιμότητα, (6) η σηψαιμία που προκαλείται από *Αερομονάδες*: οφείλεται σε είδη του γένους *Aeromonas* (*A. hydrophila, A. sobria, A. caviae*), (7) η παστεριδίαση (*Pasteurellosis*): οφείλεται στο βακτήριο *Pasteurella piscicida*, (8) η μυξοβακτηριδίαση (*Myxobacteriosis*): κύριο αίτιο της νόσου είναι το αρνητικό κατά *Gram* βακτήριο *Flexibacter maritimus*.

<u>Τα σημαντικότερα νοσήματα των ιχθύων που οφείλονται σε μύκητες είναι τα εξής</u>: ^{29,30}

(1) η σαπρολεγνίαση: από μύκητες της κλάσης των ωομυκήτων saprolegnia και achlya,
(2) οι κόκκινες πληγές: η ασθένεια αυτή προκαλείται από τους μύκητες saprolegnia sp.,
(3) η ασθένεια των βραγχίων: είναι μόλυνση που οφείλεται σε συγκεκριμένα είδη υδρόβιων μυκήτων (Βραγχιομύκητες), σε βακτηρίδια, πρωτόζωα και μονογενετικές ψείρες (Dactylogyrus) ή σε κακές συνθήκες ύδατος, (4) το σάπισμα των πτερυγίων και της ουράς: η μόλυνση αυτή προκαλείται από διάφορα είδη υδρόβιων μυκήτων, όπως Saprolegnia και Achlya, (5) το Ichthyosporidium: προκαλείται από μέλη της τάξης των Φυκομυκήτων (Ichthyophonus hoferi), (6) οι μύκητες στο στόμα: προκαλείται από το βακτηρίδιο Chondrococcus columnaris, (7) οι άσπρες τούφες: ο μύκητας μπορεί να μοιάζει με τον Epistylis και Cotton-Wool ή και την ασθένεια από το βακτήριο Columnaris.

Νοσήματα των ιχθύων οφειλόμενα σε ιούς είναι: (1) λεμφοκύστη: οφείλεται σε μια ομάδα συγγενικών ιριδοιών (*iridovirus-like viruses*), (2) ιογενής εγκεφαλοπάθεια και αμφιβληστροειδοπάθεια/ιογενής νευρική νέκρωση (*Viral encephalopathy and retinopathy*, *Viral nervous necrosis-VNN*): ο ιός της νευρικής νέκρωσης είναι ένας *Noda* ιός με παγκόσμια εξάπλωση.

Νοσήματα των ιχθύων οφειλόμενα σε χλαμύδιες και ρικέτσιες είναι: (1) επιθηλιοκύστη: οφείλεται σε έναν προκαρυωτικό οργανισμό που ανήκει στην οικογένεια των χλαμυδιών, (2) Νέκρωση νευρικού συστήματος: οφείλεται σε κοκκοειδείς ενδοκυττάριους οργανισμούς που μοιάζουν με ρικέτσιες (*Rickettsia-like organisms*, *RLO*).

Πολλά παράσιτα (εξωπαράσιτα, ενδοπαράσιτα) προκαλούν, επίσης, πλήθος νοσημάτων στους εκτρεφόμενους ιχθύες, όπως η Αμυλοδινίαση (που οφείλεται στον παθογόνο οργανισμό *Amyloodinium ocellatum*), η Κρυπτοβίοση (που οφείλεται στον παθογόνο οργανισμό *Cryptobia*), η Τριχοδινίαση (που οφείλεται στον παθογόνο οργανισμό *Trichodina sp.*), νοσήματα οφειλόμενα σε Μυξοσπορίδια (*Myxosporea*) *Myxisium spp.* και πολλά άλλα.³¹⁻³⁷

46

Τέλος, τα σημαντικότερα μη μολυσματικά νοσήματα των εκτρεφόμενων ιχθύων είναι μεταβολικά και διατροφικά νοσήματα, όπως η συστηματική κοκκιωμάτωση (Systemic Granuloma) και το χειμερινό σύνδρομο (winter syndrome), το οποίο εμφανίζεται όταν η θερμοκρασία του ύδατος κατέβει κάτω από τους 13 °C και εξαφανίζεται όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 16 - 18 °C.

Οι θεραπευτικές αγωγές που εφαρμόζονται διακρίνονται σε αντιπαρασιτικές και αντιμικροβιακές. Οι κυριότερες μέθοδοι θεραπευτικής αγωγής είναι η θεραπεία εμβάπτισης (εξωτερική θεραπεία), η συστηματική θεραπεία μέσω της τροφής, ο συνδυασμός θεραπείας εμβάπτισης και συστηματικής, η θεραπεία σπόγγισης (*Swab*) και η παρεντερική θεραπεία (ενέσιμη). Οι δύο τελευταίες εφαρμόζονται σπάνια και μόνο σε γεννήτορες, ενώ η εφαρμογή τους απαιτεί εφαρμογή αναισθησίας και χειρισμό των ιχθύων έξω από το ύδωρ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΧΡΗΣΗ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΙΣ ΥΔΑΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ

2.1 Εισαγωγή

Πλήθος κτηνιατρικών φαρμακευτικών παρασκευασμάτων (Veterinary Medicinal Products, VMPs) χρησιμοποιούνται, διεθνώς, για την αντιμετώπιση των νοσημάτων των ιχθύων των εντατικών εκτροφών. Στις περισσότερες των περιπτώσεων, ακολουθούνται οι κανονισμοί και οι πρακτικές της Καλής Διαχείρισης της Εντατικής Εκτροφής, οι οποίες είναι ουσιώδεις για τη διατήρηση της καλής ποιότητας του περιβάλλοντος των εκτρεφόμενων ιχθύων. Η χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι άμεση και περισσότερο εκείνη των αντιβακτηριακών παραγόντων.³⁸

Η χρησιμοποίησή των φαρμακευτικών ουσιών υπόκεινται σε κανονισμούς, οι οποίοι ποικίλλουν ανάλογα με το είδος που πρόκειται να εκτραφεί και ανάλογα με την εθνική πολιτική της κάθε χώρας.^{39,40}

Από το σύνολο των χημικών ουσιών που χρησιμοποιούνται διεθνώς στην εκτροφή των ιχθύων, μόνο λίγες από αυτές είναι επίσημα εγκεκριμένες, για χρήση στους ιχθύες των εντατικών εκτροφών, γιατί τα υπάρχοντα τοξικολογικά δεδομένα είναι ελάχιστα και ελλιπή, ενώ απαιτούνται πολύ περισσότερα για την έγκριση της κυκλοφορίας των.²⁴ Αυτό οφείλεται στο ότι κάθε φαρμακευτική ουσία μαζί με όλους τους μεταβολίτες της, πρέπει αρχικά να μελετηθεί φαρμακολογικά, τοξικολογικά και βακτηριολογικά. Στη συνέχεια, αφού διαπιστωθεί ποιά είναι η πλέον ασφαλής, σε συνδυασμό πάντα με την ποσοστιαία συμμετοχή της στα κατάλοιπα, καθορίζεται ως η ουσία κατάλοιπο δείκτης (*marker residue*). Είναι μια χρονοβόρα διαδικασία, στην οποία βασίζεται ο προσδιορισμός του Μέγιστου Ορίου Καταλοίπου (*Maximum Residue Level, MRL*).⁴¹ Η διαδικασία αυτή συμπεριλαμβάνει τη μελέτη ασφάλειας (*Safety File*) και τη μελέτη καταλοίπων (*Residue File*). Στη πρώτη εμπεριέχονται όλα τα φαρμακολογικά, τοξικολογικά, τοξικολογικά και λοιπά αποτελέσματα της υπό μελέτη ουσίας, μαζί με την προτεινόμενη Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη (*Acceptable Daily Intake, ADI*) για τον άνθρωπο. Στη δεύτερη μελέτη,

εμπεριέχονται όλα τα δεδομένα, τα οποία έχουν σχέση με την παρουσία και την παραμονή των καταλοίπων στους ιστούς, μαζί με όλα τα αποτελέσματα και τα προτεινόμενα για αυτούς *MRL*⁴², αλλά και τις επιπτώσεις που έχουν με τη διάθεσή τους στο περιβάλλον.⁴³

2.2 Κατάλοιπα και ανώτατα όρια των καταλοίπων

Οι τιμές *MRL* ορίζονται από οργανισμούς, όπως ο Αμερικανικός Οργανισμός Τροφίμων και Φαρμάκων (*FDA*) και η Ε.Ε., αλλά και η Επιτροπή του Κώδικα Τροφίμων του δικτύου Οργανισμού Τροφίμων & Γεωργίας/ Παγκόσμιου Οργανισμού Υγείας (*FAO*/*WHO*), με την επιστημονική υποστήριξη της Κοινής Ειδικής Επιτροπής σε Πρόσθετα Τροφίμων των *FAO*/*WHO*.⁴³⁻⁴⁸

Η διαθεσιμότητα των αντιμικροβιακών παραγόντων για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες επηρεάζεται από τη θέσπιση των *MRLs*. Ωστόσο, οι χρόνοι αποδρομής που υπολογίζονται, βασίζονται σε μελέτες οι οποίες πραγματοποιούνται, συνήθως, με ιχθύες σε γλυκά ύδατα. Ο χρόνος απομάκρυνσης ενός φαρμάκου από το σώμα του ιχθύος μπορεί να ποικίλλει ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες και ιδιαίτερα τη θερμοκρασία.^{49,50} Εξαιτίας αυτής της διακύμανσης, έχει εισαχθεί ό όρος «βαθμοημέρα», προκειμένου για την εκτίμηση του απαιτούμενου χρόνου απομάκρυνσης του φαρμάκου. Με τον όρο αυτό σχετίζεται η θερμοκρασία του ύδατος με τις ημέρες εφαρμογής της θεραπευτικής αγωγής. Ωστόσο, αν τα δεδομένα δε δείχνουν επίδραση της θερμοκρασίας στην απομάκρυνση, τότε ο χρόνος αποδρομής βασισμένος στις ημέρες είναι αποδεκτός.⁵¹

Στην Ε.Ε., οι χημικές ουσίες οι οποίες είναι εγκεκριμένες για χρήση στις εντατικές εκτροφές ιχθύων και για τις οποίες έχει καθορισθεί *MRL* ή δεν απαιτείται ο καθορισμός *MRL*, συμπεριλαμβάνονται στον πίνακα 1 του Παραρτήματος του Κανονισμού (EOK) 37/2010, ενώ οι χημικές ουσίες οι οποίες είναι γενικά απαγορευμένες και για τις οποίες δεν έχει καθορισθεί *MRL*, βρίσκονται στον πίνακα 2 του Παραρτήματος αυτού.⁵² Στον πίνακα 2.1 δίνονται μερικές από τις χημικές ουσίες για τις οποίες έχει καθορισθεί *MRL* (ή δεν απαιτείται ο καθορισμός του) και στον πίνακα 2.2 δίνονται οι απαγορευμένες ουσίες.

Στην Ελλάδα αρμόδιος φορέας για την έγκριση των κτηνιατρικών φαρμάκων είναι ο Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων (ΕΟΦ). Σύμφωνα με τον ΕΟΦ, τα κτηνιατρικά φάρμακα τα οποία είναι εγκεκριμένα για χρήση στην αντιμετώπιση των νοσημάτων των ιχθύων είναι η υδροχλωρική οξυτετρακυκλίνη, ο συνδυασμός της σουλφαδιαζίνης με τη τριμεθοπρίμη, το οξολινικό οξύ και η φλουμεκίνη (πίνακας 2.3).⁵³

2.3 Ευρωπαϊκή Νομοθεσία

2.3.1 Κανονισμοί της Ευρωπαϊκής Ένωσης

Στην Ε.Ε ο έλεγχος των καταλοίπων σε τρόφιμα και σε τροφές διέπεται από αυστηρή νομοθεσία, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των καταναλωτών.^{52,54-73}

Σχετικά με την ασφάλεια των τροφίμων, ο Κανονισμός 178/2002 μπορεί να θεωρηθεί ως ο πρώτος στην ιεραρχία των Κανονισμών της Ε.Ε σχετικά με τα τρόφιμα.⁵⁴ Με τον Κανονισμό αυτό θεσπίζονται οι νόμοι βάσει των οποίων διακινούνται τα τρόφιμα και οι τροφές εντός της Ε.Ε, διασφαλίζοντας την ανθρώπινη υγεία και δημιουργώντας, ταυτόχρονα, κλίμα εμπιστοσύνης μεταξύ των παραγωγών, των καταναλωτών και των εταιρειών. Ταυτόχρονα, δημιουργήθηκε η Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (*European Food Safety Authority, EFSA*),⁷⁴ η οποία, ως ανεξάρτητη Αρχή, έχει ως σκοπό την παροχή συμβουλών και πληροφοριών σχετικά με την αλυσίδα των τροφίμων και των τροφών.

Με τον Κανονισμό 183/2005 τίθενται οι γενικοί κανόνες για την υγιεινή των τροφών, ενώ αναφέρονται οι συνθήκες και οι ρυθμίσεις για την διασφάλιση της ιχνηλασιμότητας (*traceability*) των τροφών.⁷⁰

Ο κυριότερες νομοθετικές δράσεις που αφορούν τα κτηνιατρικά φάρμακα είναι ο Κανονισμός 726/2004⁶⁷ και η Οδηγία 2001/82.⁶² Με τον Κανονισμό 726/2004 περιγράφεται η δομή και ο σκοπός του *ΕΜΑ*⁵⁵, ο οποίος ιδρύθηκε το 1995 σύμφωνα με τις διατάξεις του αναθεωρημένου, πλέον, Κανονισμού 2309/93.

Βασικός σκοπός του *EMA* είναι να παρέχει συμβουλές επιστημονικού περιεχομένου στα Ινστιτούτα της Κοινότητας σχετικά με την έγκριση των φαρμακευτικών προϊόντων για ανθρώπινη και κτηνιατρική χρήση.

Ουσία	Κατάλοιπο δείκτης	Είδος ζώου ^Α	<i>MRL</i> (μg kg⁻¹)	Ιστός στόχος ^Β
<u>Αντιβιοτικά</u>				
Αμοξικιλίνη	Αμοξικιλίνη	Όλα τα ΤΖΠ	50	Σάρκα
Αμπικιλίνη	Αμπικιλίνη	Όλα τα ΤΖΠ	50	Σάρκα
Βενζυλοπενικιλίνη	Βενζυλοπενικιλίνη	Όλα τα ΤΖΠ	50	Σάρκα
Χλωροτετρακυκλίνη	Άθροισμα δραστικής +	Όλα τα ΤΖΠ	100	Σάρκα
Κλοξακιλίνη	4-επιμερούς Κλοξακιλίνη	Όλα τα ΤΖΠ	300	Σάρκα
Κολιστίνη	Κολιστίνη	Όλα τα ΤΖΠ	150	Σάρκα
Δανοφλοξακίνη	Δανοφλοξακίνη	Όλα τα ΤΖΠ	100	Σάρκα
Διφλοξακίνη	Διφλοξακίνη	Όλα τα ΤΖΠ	300	Σάρκα
Ενροφλόξακίνη	Άθροισμα ενροφλοξακίνης +	Όλα τα ΤΖΠ	100 ^г	Σάρκα
	σιπροφλοξακίνης		۸	
Ερυθρομυκίνη	Ερυθρομυκίνη Α	Όλα τα ΤΖΠ	200 ⁴	Σάρκα
Δυκλοξακιλίνη	Δυκλοξακιλίνη	Όλα τα ΤΖΠ	300	Σάρκα
Φθοροφαινικόλη	Άθροισμα	Ιχθύες	1000	Σάρκα+δέρμα
	φθοροφαινικόλης +			
	αμινο-φθοροφαινικόλης			
Φλουμεκίνη	Φλουμεκίνη	Ιχθύες	600	Σάρκα+δέρμα
Λινκομυκίνη	Λινκομυκίνη	Όλα τα ΙΖΙΙ	100	Σάρκα
Νεομυκίνη	Νεομυκίνη Β	Όλα τα ΙΖΙΙ	500-	Σάρκα
Οξακιλίνη	Οξακιλίνη	Όλα τα ΙΖΠ	300	Σάρκα
Οξολινικό όξυ	Οξολινικό όξυ	Ιχθυες	100	Σαρκα+όερμα
Οξυτετρακυκλίνη	Άθροισμα δραστικής + 4-επιμερούς	Όλα τα ΙΖΠ	100	Σάρκα
Παρομομυκίνη	Παρομομυκίνη	Όλα τα ΤΖΠ	500	Σάρκα
Σαραφλοξακίνη	Σαραφλοξακίνη	Σολομοειδή	30	Σάρκα+δέρμα
Σπεκτινομυκίνη	Σπεκτινομυκίνη	Όλα τα ΤΖΠ	300	Σάρκα
Σουλφοναμίδια	Εκάστοτε δραστική	Όλα τα ΤΖΠ	100	Σάρκα
(σύνολο) Τετοακικλίνη	Άθορισμα δραστικής +	Όλα τα ΤΖΠ	100	Σάοκα
reipakokavij	4-επιμερούς		100	Zapita
Θειαμφαινικόλη	Θειαμφαινικόλη	Όλα τα ΤΖΠ	50	Σάρκα
Τιλμικοσίνη	Τιλμικοσίνη	Όλα τα ΤΖΠ	50	Σάρκα
Τριμεθοπρίμη	Τριμεθοπρίμη	Όλα τα ΤΖΠ	50	Σάρκα
Τυλοσίνη	Τυλοσίνη Α	Όλα τα ΤΖΠ	100	Σάρκα
<u>Αντιψειριακά</u>			• • H	-, -,
Αζαμεθιφος	$\Delta E \phi^{-}$	Σολομοειόη	ΔA	Σαρκα+όερμα
κυπερμεθρινη (αναφορικά με ιχθύες)	κυπερμεθρινη (άθροισμα ισομερών)	Σολομοειδή	50	Σάρκα+δέρμα
Δελταμεθρίνη	Δελταμεθρίνη	Ιχθύες	10	Σάρκα+δέρμα
Εμαμεκτίνη	Εμαμεκτίνη Β1α	Σολομοειδή	100	Σάρκα+δέρμα
Διφλουβενζουρόνη	Διφλουβενζουρόνη	Σολομοειδή	1000	Σάρκα+δέρμα
Τεφλουβενζουρόνη	Τεφλουβενζουρόνη	Σολομοειδή	500	Σάρκα+δέρμα
Αντιπαρασιτικά και				
<u>μικροβιοκτόνα</u>		. .		
Οξικό οξύ		Όλα τα ΤΖΠ		Σάρκα
Υπεροξικό οξύ	ΔΕφ	Όλα τα ΤΖΠ	ΔΑ	Σάρκα
Βρωνοπόλη	ΔΕφ	Ιχθύεςິ	ΔA	Σάρκα

Πίνακας 2.1 Φαρμακολογικά δραστικές ουσίες για τις οποίες έχει καθορισθεί ή δεν απαιτείται ο καθορισμός MRL

Πίνακας 2.1 (συνέχεια)

· · · · ·				
Χλωραμίνη Τ Θειικός χαλκός Φορμαλίνη	ΔΕφ	Ιχθύες ^Ι Όλα τα ΤΖΠ Όλα τα ΤΖΠ Όλα τα ΤΖΠ	ΔΑ	Σάρκα Σάρκα Σάρκα
ι λουταραλοευοη	ΔΕφ	Ολά τα ΤΖΠ	ΔA	Σαρκα
Υπεροξείδιο του υδρογόνου	ΔΕφ	Όλα τα ΤΖΠ	ΔΑ	Σάρκα
Ιωδοφόρες ενώσεις	ΔΕφ	Ιχθύες	ΔΑ	Σάρκα
Άλας (χλωριούχο νάτριο)	ΔΕφ	Όλα τα ΤΖΠ	ΔΑ	Σάρκα
Αναισθητικά				
Βενζοκαΐνη	ΔΕφ	Όλα τα ΤΖΠ ^κ	ΔΑ	Σάρκα
Μεθανοσουλφονική τρικαΐνη	ΔΕφ	Ιχθύες ^ι	ΔΑ	Σάρκα

^A ΤΖΠ: Τρόφιμα Ζωικής Προέλευσης (*Food Producing Species, FPS*)

^B Για τους ιχθύες ο ιστός στόχος είναι πάντα «σάρκα και δέρμα σε φυσική αναλογία»

Αφορά το σύνολο ενροφλοξακίνης και σιπροφλοξακίνης

ΔΑφορά την ερυθρομυκίνη Α

Ε Αφορά τη νεομυκίνη Β

^z ΔΕφ: Δεν εφαρμόζεται

Α: Δεν απαιτείται

Θ Μόνο σε γονιμοποιημένα αυγά ιχθύων

Μόνο για θεραπεία στο ύδωρ

^κ Μόνο για χρήση ως αναισθητικό

Πίνακας 2.2 Απαγορευμένες φαρμακολογικά δραστικές ουσίες

Aristolochia spp. και άλλα παρασκευάσματα Χλωραμφαινικόλη Χλωροφόρμιο Χλωροπρομαζίνη Κολχικίνη Δαπσόνη Διμετριδαζόλη Μετρονιδαζόλη Νιτροφουράνια (συμπεριλαμβάνεται η φουραζολιδόνη) Ρονιδαζόλη

Τέλος, με την Απόφαση 2002/657⁶³ τίθενται οι διαδικασίες επικύρωσης και τα κριτήρια επίδοσης των αναλυτικών μεθόδων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό καταλοίπων των κτηνιατρικών φαρμακευτικών ουσιών.

2.3.2 Κώδικας Τροφίμων

Ο Κώδικας Τροφίμων (Codex Alimentarius) συνίσταται από πρότυπα, κώδικες

πρακτικής, οδηγίες και άλλες συστάσεις και αποτελεί την κύρια διεθνή αναφορά στην

Δραστική ουσία	Ελλάδα	Ισπανία	Γαλλία	Ηνωμένο Βασίλειο
Αντιμικροβιακές ουσίες				
Φλουμεκίνη		\checkmark		
Οξυτετρακυκλίνη	\checkmark			
Σουλφαδιαζίνη-Τριμεθοπρίμη				\checkmark
Οξολινικό οξύ	\checkmark			
Φθοροφαινικόλη				\checkmark
Σαραφλοξακίνη				\checkmark
Αμοξικιλίνη				
Αντιπαρασιτικές ουσίες				
Βρωνοπόλη				\checkmark
Υπεροξείδιο του υδρογόνου				
Βενζοϊκή εμαμεκτίνη				
Τεφλουβενζουρόνη				
Κυπερμεθρίνη				
Αζαμεθιφός				
<u>Αναισθητικά</u>				
Μεθανοσουλφονική τρικαΐνη				

Πίνακας 2.3 Εγκεκριμένες δραστικές ουσίες για χρήση στις υδατοκαλλιέργειες σε ορισμένα Ευρωπαϊκά κράτη

ασφάλεια των τροφίμων.⁷⁵ Αποτέλεσμα των εργασιών των σχετικών επιτροπών, ήταν η έκδοση διαφόρων εγγράφων που αφορούν την παρακολούθηση των καταλοίπων των κτηνιατρικών φαρμάκων. Σε αυτά τα έγγραφα περιλαμβάνονται μεταξύ άλλων, οδηγίες για τη δειγματοληψία σε τρόφιμα, οδηγίες για τις αναλυτικές μεθόδους που πρόκειται να αναπτυχθούν για τον προσδιορισμό ουσιών με *MRL*, αλλά και οδηγίες για τα χαρακτηριστικά επίδοσης για την επικύρωση των μεθόδων αυτών.^{76,77}

2.4 Κατάταξη των αντιμικροβιακών ουσιών

Οι αντιμικροβιακές ουσίες (αντιβιοτικά) είναι τα συνηθέστερα κτηνιατρικά φάρμακα που χρησιμοποιούνται στις εντατικές εκτροφές των ιχθύων για θεραπευτικούς λόγους, αλλά και για λόγους πρόληψης ή συχνά και ως αυξητικοί παράγοντες.

Διακρίνονται σε βακτηριοκτόνα (*bactericidal*) και βακτηριοστατικά (*bacteriostatic*). Τα βακτηριοκτόνα (π.χ. πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες) θανατώνουν

εκλεκτικά τα βακτήρια, ενώ τα βακτηριοστατικά (π.χ. τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδια, χλωραμφαινικόλη) εμποδίζουν την ανάπτυξη των βακτηρίων με βακτηριακή αλληλεπίδραση.

Ένα άλλο κριτήριο διαχωρισμού των αντιβιοτικών είναι το αντιμικροβιακό τους φάσμα. Έτσι, τα αντιβιοτικά που δρουν εναντίον ενός μόνο βακτηρίου ή μιας ομάδας ομοειδών βακτηρίων (όπως τα θετικά ή τα αρνητικά κατά *Gram* βακτήρια) χαρακτηρίζονται ως «στενού» ή περιορισμένου φάσματος αντιβιοτικά (π.χ. ισονιαζίδιο), ενώ τα αντιβιοτικά που δρουν έναντι πολλών ειδών βακτηρίων χαρακτηρίζονται ως «ευρέως» ή εκτεταμένου φάσματος (π.χ. πενικιλλίνες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη).⁷⁸

Διακρίνονται, επίσης, με κριτήριο τον μηχανισμό δράσης των. Έτσι, έχουμε αντιβιοτικά που δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων (π.χ. πενικιλλίνες, κεφαλοσπορίνες), αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν τη πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων (π.χ. τετρακυκλίνες, μακρολίδια) και αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊνικών οξέων (π.χ. σουλφοναμίδια, κινολόνες).⁷⁸

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος ταξινόμησης των αντιβιοτικών είναι με βάση την χημική των δομή. Αντιβιοτικά με κοινά χαρακτηριστικά στη δομή ανήκουν στην ίδια ομάδα. Στον πίνακα 2.4 δίνονται οι κυριότερες ομάδες των αντιβιοτικών με βάση τα κοινά χαρακτηριστικά στη δομή και τον μηχανισμό δράσης των, καθώς και αντιπροσωπευτικά παραδείγματα από την κάθε ομάδα.

2.5 Κατανάλωση των αντιβιοτικών

Η χρήση των αντιβιοτικών, η οποία εκφράζεται σύμφωνα με τον WHO ως η καθορισμένη ημερήσια δόση (Defined Daily Dose, DDD), ποικίλλει από χώρα σε χώρα και δεδομένα για την κάθε χώρα υπάρχουν καταχωρημένα στην ιστοσελίδα του Ευρωπαϊκού Δικτύου Επιτήρησης της Κατανάλωσης των Αντιμικροβιακών Ουσιών (European Surveillance Antimicrobials Consumption, ESAC). Στην Ευρώπη, περίπου τα δύο τρίτα των αντιβιοτικών που καταναλώνονται, είναι για ιατρικούς σκοπούς στους ανθρώπους, ενώ το υπόλοιπο ένα τρίτο για τη κτηνοτροφία.^{79,80}

Ειδικότερα, στη κτηνοτροφία τα περισσότερα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στην ορνιθοτροφία και στη χοιροτροφία. Σημαντικές ποσότητες αντιβιοτικών καταναλώνονται,

Ομάδα αντιβιοτικών	Μηχανισμός Δράσης	Παραδείγματα
β – Λακτάμες Πενικιλλίνες Κεφαλοσπορίνες (1 ^{ης} , 2 ^{ης} , 3 ^{ης} και 4 ^{ης} γεννιάς) Καρμπαπενέμες	Αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος	Βενζυλοπενικιλλίνη Αμοξυκιλλίνη Φλουκλοξακιλλίνη Κεφοξιτίνη Κεφοταξίμη Κεφτριαξόνη Ιμιπενέμη Μεροπενέμη
Μακρολίδες	Αναστολή της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης	Ερυθρομυκίνη Αζιθρομυκίνη Κλαριθρομυκίνη
Τετρακυκλίνες	Αναστολή της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης	Τετρακυκλίνη Οξυτετρακυκλίνη Μινοκυκλίνη Δοξυκυκλίνη
Φθοροκινολόνες (1 ^{ης} , 2 ^{ης} , 3 ^{ης} και 4 ^{ης} γεννιάς)	Αναστολή της σύνθεσης του DNA του βακτηρίου	Νορφλοξακίνη Ενροφλοξακίνη Σιπροφλοξακίνη Φλουμεκίνη Οξολινικό οξύ
Σουλφοναμίδια [#]	Εμποδίζουν το μεταβολισμό του κυττάρου με αναστολή των ενζύμων	Σουλφαδιαζίνη Σουλφαμεθαζίνη
Αμινογλυκοσίδες Ιμιδαζόλια	Αναστολή της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης Αναστολή της σύνθεσης του DNA του βακτηρίου	Αμικακίνη Γενταμυκίνη Μετρονιδαζόλη
Πεπτίδια	Αναστολή της σύνθεσης του βακτηριακού κυτταρικού τοιχώματος	Βακιτρακίνη
Λινκοσαμίδες	Αναστολή της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης	Λινκομυκίνη Κλινδαμυκίνη
Άλλα	Αναστολή της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης	Φουσιδικό οξύ

Πίνακας 2.4 Κυριότερες ομάδες αντιβιοτικών και μηχανισμοί δράσης

[#] Τα σουλφοναμίδια δρουν, σχεδόν πάντα, σε συνδυασμό με διαμινοπυριμιδίνες (π.χ. τριμεθοπρίμη)

επίσης, κάθε χρόνο και στον τομέα των υδατοκαλλιεργειών, τόσο για προληπτικούς ή θεραπευτικούς λόγους, όσο και για τη προώθηση της ανάπτυξης των εκτρεφόμενων ειδών.

Η χρήση και, κυρίως, η μη ορθή χρήση των αντιβιοτικών μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη της μικροβιακής αντοχής έναντι των αντιβιοτικών (ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά) από μολυσματικούς οργανισμούς.

Σοβαρές είναι οι επιπτώσεις από την αλόγιστη χρήση των αντιβιοτικών σε ζώα που εκτρέφονται και προορίζονται για κατανάλωση από τον άνθρωπο με σημαντικότερη την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηρίων στα ζώα ή στο περιβάλλον τους, αλλά και την ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών ικανών να «μεταπηδήσουν» στον άνθρωπο. Μάλιστα, αποτελέσματα ευρωπαϊκών και αμερικανικών ερευνών καταλήγουν στο συμπέρασμα ότι ανθεκτικά βακτήρια προκαλούν μολύνσεις στον άνθρωπο, οι οποίες δε θεραπεύονται, πλέον, με τα συνηθισμένα αντιβιοτικά που συνταγογραφούνται.⁸¹

Επιπλέον, τα αντιβιοτικά αποτελούν σοβαρούς ρύπους του περιβάλλοντος.⁸² Μία σημαντική πηγή εισόδου των αντιβιοτικών στο περιβάλλον είναι η χρήση των στις υδατοκαλλιέργειες.⁸³ Στις εντατικές εκτροφές ιχθύων, λόγω της υπερδιατροφής, αλλά και της μειωμένης όρεξης των ασθενών ιχθύων, μεγάλο ποσοστό της φαρμακούχου ιχθυοτροφής καταλήγει στο περιβάλλον.⁸⁴ Επιπλέον, η βιοδιαθεσιμότητα πολλών αντιβακτηριακών παραγόντων είναι σχετικά χαμηλή, με αποτέλεσμα τα αντιβιοτικά, μετά τη χορήγησή των στους ιχθύες με ενέσεις ή φαρμακούχες ιχθυοτροφές, να εισέρχονται στο περιβάλλον, έίναι σχετικά χαμηλή, με αποτέλεσμα τα αντιβιοτικά, μετά τη χορήγησή των στους ιχθύες με ενέσεις ή φαρμακούχες ιχθυοτροφές, να εισέρχονται στο περιβάλλον, έχει ως αποτέλεσμα την άμεση διάθεσή των στο υδάτινο περιβάλλον. Έτσι, επηρεάζεται σοβαρά η βακτηριακή χλωρίδα, μειώνεται η αντιβακτηριακή δράση των φαρμάκων και αυξάνεται σημαντικά η αντοχή των μικροοργανισμών. Την ίδια στιγμή, ένα μέρος των χημικών αυτών ουσιών εισέρχεται στην τροφική αλυσίδα και έτσι τα κατάλοιπά των ανιχνεύονται στα μαλάκια, στα οστρακόδερμα και στους ελεύθερους (άγριους) ιχθύες της περιοχής γύρω από τον χώρο εκτροφής.^{23,85,86}

57

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΩΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ ΣΤΟΥΣ ΙΧΘΥΕΣ

3.1 Βιβλιογραφικές αναφορές για τον προσδιορισμό κτηνιατρικών φαρμάκων στους ιχθύες

3.1.1 Εισαγωγή

Στο κεφάλαιο αυτό, παρουσιάζεται η βιβλιογραφική επισκόπηση των αναλυτικών μεθόδων, οι οποίες περιλαμβάνουν, κυρίως, υγροχρωματογραφική τεχνική και χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών σε ιστούς ιχθύων. Αρχικά, παρουσιάζονται οι μέθοδοι για τις συνηθέστερες ομάδες αντιβιοτικών του πίνακα 2.4 που χρησιμοποιούνται στις ιχθυοκαλλιέργειες και στο τέλος, παρουσιάζονται οι πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι (*multi-class methods*), με τις οποίες προσδιορίζονται, ταυτόχρονα, ουσίες από διάφορες ομάδες.

3.1.2 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό (φθορο)κινολονών σε ιστούς ιχθύων

Στον πίνακα 3.1 δίνονται οι σημαντικότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των (φθορο)κινολονών (*fluoroquinolones*, *FQN*s) σε ιστούς ιχθύων. Οι συντμήσεις που χρησιμοποιούνται στον πίνακα 3.1 είναι οι εξής:

<u>Αναλύτες και άλλα</u>: ΟΧΟ (οξολινικό οξύ), ΝΑL (ναλιδιξικό οξύ), PIR (πιρομιδικό οξύ), FLU (φλουμεκίνη), SAR (σαραφλοξακίνη), CIP (σιπροφλοξακίνη), ENR (ενροφλοξακίνη), DIF (διφλοξακίνη), MAR (μαρμποφλοξακίνη), NOR (νορφλοξακίνη), KΦ (κινητή φάση), THF (τετραϋδροφουράνιο), ΡΔ (ρυθμιστικό διάλυμα).

<u>Είδη ιχθύων</u>: *Rt* (*Rainbow trout*, ιριδίζουσα πέστροφα), *As* (*Atlantic salmon*, σολομός του Ατλαντικού), *Ee* (*European eel*, Ευρωπαϊκό χέλι), *Rsb* (*Red sea bream*, κοκκινόχρωμη τσιπούρα), *Gsb* (*Gilthead sea bream*, τσιπούρα), *Tlp* (*Tilapia*, τιλάπια), *Crp* (*Carp*, κυπρίνος), *Ctf* (*Catfish*, γατόψαρο), *Pc* (*Pacu*, πακού)

Αναλύτες (είδος ιχθύος)	Αναλυτική τεχνική	Χρωματογραφικές συνθήκες	Δείγμα/Προκατεργασία δείγματος	Ανάκτηση (%)	LODILOQ	Αναφορά
OXO (<i>Rt</i> , <i>As</i>)	<i>HPLC-UV</i> λ=258 nm	Nova-Pak C ₁₈ 150×3,9 mm, 4 μm (40 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) ΜeOH-ΡΔ φωσφορικών (<i>p</i> H 8,2 που περ. 7,5 g/L KH ₂ PO ₄ ×2H ₂ O, 40/60 (v/v)	<u>Ορός</u> Καθαρισμός με SPE (Sep-Pak Accell)	96-98	LOD 1 ng mL ⁻¹	87
OXO, NAL, PIR (<i>Ee</i> , <i>Rt</i> , <i>Rsb</i>)	<i>HPLC-UV</i> <i>λ</i> =295 nm	Nucleosil 2 C ₁₈ 75×4,6 mm, 3 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) ACN/MeOH/0,01 M οξαλικό οξύ (3:1:6)	Ιστός ιχθύος Εκχύλιση με <i>n</i> - εξάνιο/οξικό αιθυλεστέρα (1:3) Καθαρισμός με SPE (Baker)	73,9-95,5	LOD 0,05 ppm	88
FLU (<i>Gsb</i>)	HPLC-FLD λ_{exc} =324 nm λ_{em} =363 nm	<i>Ultracarb</i> 5 <i>ODS</i> 150×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα KH₂PO/H₃PO₄/ACN και THF (55/26,5/18,5 v/v)	<u>Σάρκα, ήπαρ, δέρμα,</u> <u>οστά</u> Εκχύλιση με ΡΔ φωσφορικών, <i>n</i> - εξάνιο, διχλωρομεθάνιο Έκπλυση με ΡΔ McIlvaine <i>p</i> H 3,6	73,0-86,3		89
OXO, FLU, SAR (<i>As</i> , <i>Rt</i>)	HPLC-FLD λ_{exc} =280, 320 nm λ_{em} =360, 380, 450 nm	<i>PLRP-S</i> 150×4,6 mm, 5 <i>μ</i> m (50 °C) ΚΦ (βαθμωτή έκλουση)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ΡΔ <i>p</i> Η 9,0 και ACN Καθαρισμός με <i>n</i> -εξάνιο		<i>LOD</i> 2, 5, 7 μg kg ⁻¹	90
OXO, FLU, PIR, ENR, CIP, DAN, SAR, ORB (<i>Rt</i>)	LC-MS/MS	Zorbax Extend-C ₁₈ 150×2,1 mm, 5 μm (30 °C) KΦ (βαθμωτή έκλουση) A: 2 % FA B: ACN C: H ₂ O Poή 0,2 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ACN Καθαρισμός με SPE (ENVI Chrom P)		<i>LOQ</i> 10, 20 <i>µ</i> g kg ⁻¹	91

Πίνακας 3.1 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των FQNs σε ιστούς ιχθύων

Πίνακας 3.1	(συνέχεια)					
SAR (<i>Gsb</i>)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =278 nm $\lambda_{\rm em}$ =450 nm	Zorbax SB-C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm (60 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/TFA (<i>p</i> H 2,15)	<u>Σάρκα, δέρμα, ήπαρ,</u> <u>νεφρός, οστά</u>	76,6-82,1	LOD 1 μg kg ⁻¹	92
OXO (Gsb, Ssb)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =327 nm $\lambda_{\rm em}$ =369 nm	Zorbax SB-C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm (60 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/TFA (<i>p</i> H 2,15)	<u>Σάρκα, δέρμα, ήπαρ,</u> <u>πλάσμα, χολή</u> Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα	69-75		93
CIP, ENR SAR, OXO, FLU (<i>As</i>)	HPLC-FLD λ_{exc} =280, 312 nm λ_{em} =450, 366 nm	Symmetry C ₁₈ 150×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ΑCN/ΡΔ φωσφορικών 0,02 Μ (<i>p</i> H 3,0)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ΡΔ φωσφορικών <i>p</i> Η 7,4 Καθαρισμός με SPE (Discovery DSC-18)	85,5-95,2	<i>LOD</i> 5-10 μg kg ⁻¹	94
ENR, CIP (<i>Gsb</i>)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =278 nm $\lambda_{\rm em}$ =440 nm	Ultracarb 5 ODS 150×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ΚΗ ₂ PO ₄ /ACN 85/15 (v/v) και Μίγμα ΚΗ ₂ PO ₄ /ACN/THF 75/15/10 (v/v)	Ορός Εκχύλιση με μίγμα ΕtOH/AcOH <u>Σάρκα+δέρμα</u> Εκχύλιση με KH ₂ PO ₄ <i>p</i> H 2/ <i>n</i> -εξάνιο/ διχλωρομεθάνιο		LOQ 0,01 μg mL ⁻¹ (ορός) 0,015 μg mL ⁻¹ (σάρκα+δέρμα)	95
OXO (Gsb)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =327 nm $\lambda_{\rm em}$ =369 nm	Zorbax SB-C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm (50 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/TFA Ροή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα και έκπλυση με <i>n</i> -πεντάνιο	69,6-81,0	LOQ 5 μg kg ⁻¹	96
ENR, CIP, SAR, DAN, OXO, FLU, DIF, MAR	LC–ESI– MS/MS	Symmetry C ₁₈ 150×2,1 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H ₂ O/MeOH/TFA Ροή 0,3 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με Η₂Ο Καθαρισμός με <i>SPE</i> (C ₁₈)	86-107		97

Πίνακας 3.1	(συνέχεια)					
CIP, ENR, SAR, DAN OXO, NAL, FLU (<i>Gsb</i>)	LC-MS/MS	<i>Perfectsil ODS</i> – 2 250×4 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H ₂ O/MeOH/FA 0,2 % (v/v)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ΝaOH 0,1Μ Καθαρισμός με S <i>PE</i> (<i>Oasis HLB</i>)	90–132	LOQ 6–8 μg kg ⁻¹	98
OXO, SAR, DAN, ENR, CIP (<i>TIp</i>)	LC–ESI– MS/MS Q/ToF	<i>XTerra</i> C ₁₈ 150×3 mm, 5 μm (30 °C) ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H ₂ O/ACN/AcOH 0,1 % (v/v) Ροή 0,2 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα ΤCA/MeOH Καθαρισμός με SPE	89–112	LOQ 14–21 μg kg	99
ENR (<i>Crp</i>)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =280 nm $\lambda_{\rm em}$ =450 nm	<i>Sunfire C</i> 18 150×4,6 mm, 3,5 <i>μ</i> m ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H₃PO₄/ACN Ροή 0,8 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα, νεφρός, ήπαρ</u> Εκχύλιση με ACN Καθαρισμός με <i>n</i> -εξάνιο		LOQ 20 μg kg ⁻¹	100
SAR, CIP, ENR, DAN, OXO, NAL, FLU (<i>TIp</i>)	HPLC-FLD λ_{exc} =280, 327 nm λ_{em} =450, 367 nm	XTerra C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm (θερμοκρασία δωματίου) Προστήλη 4×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα ACN/οξαλικού οξέος 0,01 M <i>p</i> H 4 Ροή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα ΤCA/MeOH Καθαρισμός με SPE (<i>Oasis HLB</i>)	73–10	LOQ 5–27 μg kg ⁻¹	101
	LC–MS/MS Q/ToF	<i>XTerra</i> C ₁₈ 150×2,1 mm, 5 μm (30 °C) ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H ₂ O/ACN/AcOH 0,1 % (v/v) Ροή 0,2 mL min ⁻¹				
CIP, DAN, ENR, SAR (<i>As, Tlp</i>)	UPLC- MS/MS	Acquity HSS T3 C ₁₈	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο Καθαρισμός με <i>SPE</i>	51–111	LOQ 0,06-0,55 μg kg ⁻¹	102

Πίνακας 3.1	(συνέχεια)					
ENR, CIP (<i>Ctt</i>)	LC–MS/MS	<i>Polari</i> s C ₁₈ 150×2,0 mm, 3 μm Προστήλη Chromsep SS 10×2,0 mm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα FA (<i>p</i> H 2,5)/ACN Ροή 0,4 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ACN Καθαρισμός με <i>n</i> -εξάνιο	94-106	<i>LO</i> Q 10, 14 μg kg ⁻¹	103
CIP, ENR, SAR, DAN, OXO, NAL, FLU (<i>Gsb</i>)	<i>HPLC–PDA</i> <i>λ</i> =255, 275 nm	<i>Perfectsil ODS</i> – 2 250×4 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/TFA 0,1 % (v/v) Ροή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ΡΔ κιτρικών Καθαρισμός με SPE (Oasis HLB)	95,7-102,7		104
ENR (<i>Pc</i>)	LC–ESI- MS/MS Q/ToF	<i>XTerra</i> C ₁₈ 150×2,1 mm, 5 μm (25 °C) Προστήλη ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H ₂ O/ACN/FA 0,1 % (v/v) Βαθμωτή ροή	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα Η₂Ο/ACN/AcOH 1 % (v/v)	91-112	LOQ 25 μg kg ⁻¹	105
NOR, DAN, ENR, CIP (<i>TIp</i> , <i>Pc</i>)	LC–ESI- MS/MS Q/ToF	<i>XTerra C</i> ₁₈ 150×2,1 mm, 5 μm (25 °C) ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα H ₂ O/ACN/FA 0,1 % (v/v) Ροή 0,2 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα MeOH/AcOH 1 % και ACN/AcOH 1 % (v/v)	90-111	LOQ 25 μg kg ⁻¹	106
SAR, DIF, CIP, ENR, DAN, OXO, NAL, NOR, FLU	HPLC-FLD λ_{exc} =280, 312 nm λ_{em} =450, 360 nm	Zorbax Eclipse-C ₈ 150×3 mm, 5 μm Varian Inertsil C ₁₈ 50DS-3 250×4,6 mm, 5 μm Zorbax Eclipse-XDB C ₁₈ 150×3 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/FA 0,1 % (v/v), Ροή 0,5 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ACN Καθαρισμός με SPE (Oasis HLB)	87-121	LOQ 7,5-100 μg kg ⁻¹	107

3.1.3 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό τετρακυκλινών σε ιστούς ιχθύων

Στον πίνακα 3.2 δίνονται οι σημαντικότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών (*tetracyclines*, *TC*s) σε ιστούς ιχθύων. Οι συντμήσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

<u>Αναλύτες και άλλα</u>: OTC (οξυτετρακυκλίνη), CTC (χλωροτετρακυκλίνη), DMC (δεμεκλοκυκλίνη), DOX (δοξυκυκλίνη), TC (τετρακυκλίνη), SHS (επτανοσουλφονικό νάτριο).

<u>Είδη ιχθύων</u>: Ss (Silver salmon, ασημοσολομός), Esb (European sea bass, Ευρωπαϊκό λαβράκι), Wl (Walleye, ποταμολάβρακο), Sb (Striped bass, ραβδωτή πέρκα), Ws (White sturgeon, λευκός οξύρυγχος), Cc (Channel catfish, γατόψαρο των καναλιών), Yt (Yellowtail, κυπρίνος).

3.1.4 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων/διαμινοπυριμιδινών σε ιστούς ιχθύων

Εκτός από την SDZ, άλλα *SA*s είναι: η σουλφαθειαζόλη (STZ), η σουλφισοζόλη (SSZ), σουλφισοζόλη (SSZ), σουλφαμεθοξαζόλη (SMX), η σουλφαμεραζίνη (SMR), η σουλφαδιμιδίνη (SDM), η σουλφαμονομεθοξίνη (SMMX), η σουλφαδιμεθοξίνη (SDMX), η σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη (SMPZ), η σουλφακινοξαλίνη (SQX).

Στον πίνακα 3.3 δίνονται οι σημαντικότερες μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των SAs σε ιστούς ιχθύων. Οι συντμήσεις που χρησιμοποιούνται είναι οι εξής:

<u>Είδη ιχθύων</u>: Cns (Chinook salmon, βασιλικός σολομός), Chs (Coho salmon, ασημοσολομός).

Αναλύτες (είδος ιχθύος)	Αναλυτική τεχνική	Χρωματογραφικές συνθήκες	Δείγμα/Προκατεργασία δείγματος	Ανάκτηση, %	LODILOQ	Αναφορά
OTC (As)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =358 nm $\lambda_{\rm em}$ =461 nm	PLRP-S C ₁₈ 150×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/SHS/H ₃ PO ₄ , 23/77 (v/v)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ΗCI και <i>n</i> - εξάνιο	100,6	LOD 5 μg kg ⁻¹	108
TC, OTC, CTC (Ss)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =390 nm $\lambda_{\rm em}$ =512 nm	Capcell C ₁₈ SG-120 250×4,6 mm, 5 μm KΦ Μίγμα ΡΔ οξικών, CaCl ₂ , EDTA/MeOH (45/55, v/v)	<u>Ιστός ιχθύος</u> Εκχύλιση με διάλυμα ΗCI και μεθανολικό διάλυμα TCA	73,6-95,5	<i>LOD</i> 32-90 μg kg ⁻¹	109
OTC (Gsb, Esb)	<i>HPLC-UV</i> <i>λ</i> =355 nm	Supelcosil LC–18-DB 150×4,6 mm, 5 μm ΚΦ Μίγμα ΡΔ φωσφορικών <i>p</i> H 2/ACN/THF (87/4/9, v/v)	<u>Σάρκα, ήπαρ, δέρμα,</u> <u>οστά</u> Εκχύλιση με ΡΔ McIlvaine <i>p</i> Η 4 Καθαρισμός με <i>SPE</i>	55,6–71,1	LOQ 0,02–0,2 μg g ⁻¹	110
TC, OTC, DMC, CTC (<i>As</i> , <i>Rt</i>)	<i>HPLC-UV</i> λ=350 nm	<i>PLRP-S</i> 150×4,6 mm, 5 μm (50 °C) KΦ (βαθμωτή έκλουση) A:KH ₂ PO₄/κιτρικό oξύ/EDTA B:ACN/MeOH/PΔ κιτρικών <i>p</i> H 5 (25/10/65)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ΡΔ <i>p</i> Η 9,0 και ACN Καθαρισμός με <i>n</i> -εξάνιο	50–101	<i>LOD</i> 5, 3, 6 μg kg ⁻¹	111
OTC (WI, As, Sb, Ws, Rt, Cc)	<i>LC-UV</i> λ=355 nm	YMC-C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm (45 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα οξαλικού οξέος και οκτανοσουλφονικού νατρίου/ACN (70,5/29,5 v/v)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine/EDTA Καθαρισμός με SPE (phenyl)	59,0–98,4	<i>LOD</i> 2-6 μg kg ⁻¹	112

Πίνακας 3.2 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των TCs σε ιστούς ιχθύων

Πίνακας 3.2	(συνέχεια)					
TC, CTC, DOX, DMC (<i>Yt, Ee</i>)	LC–MS/MS	Bakerbond-C ₈ 250×4,6 mm, 5 μm (30 °C) KΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/οξαλικού οξέος (18/27/55, v/v/v)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine/EDTA Καθαρισμός με SPE (Bond Elut ENV, 500 mg/6 mL)	66,8–85,1	LOD 0,001-0,004 ppm	113
OTC (<i>Rt</i>)	<i>HPLC-UV</i> <i>λ</i> =350 nm	PLRP-S-C ₁₈ 150×4,6 mm, 5 μm (60 °C) KΦ (βαθμωτή έκλουση) A: H ₂ O 0,1 % TFA B: ACN 0,1 % TFA	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine/EDTA Καθαρισμός με SPE (Oasis HLB)	84-102	<i>LOD</i> 0,04 μg g ⁻¹	114
TC, OTC (<i>As</i>)	HPLC-FLD	Chromspher C ₈ 100×3 mm, 5 μm ΚΦ Μίγμα ACN/οξαλικό οξύ (<i>p</i> H 2,0) 20/80 (v/v)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine / EDTA Καθαρισμός με SPE (Oasis HLB)	83,9–93,4	LOQ 50 μg kg ⁻¹	115
OTC (As)	HPLC-FLD λ_{exc} =378 nm λ_{em} =500 nm	Pursuit Diphenyl 300×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ΑCN/ΡΔ TRIS 10/90 (v/v) Ροή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα+δέρμα</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine/EDTA Καθαρισμός με tandem SPE (Strata-X + aminopropyl)	70–85		116
TC, OTC, CTC, DOX (<i>Cc</i>)	<i>HPLC-UV</i> λ=355 nm	<i>Kromasil ODS</i> 250×4,6 mm, 5 μm KΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/οξαλικού οξέος <i>p</i> H 3 (20/20/60, v/v) Poή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine/EDTA <i>p</i> H 4		<i>LOD</i> 16-30 ng g ⁻¹	117

Πίνακας 3.2	(συνέχεια)					
OTC (<i>Rt</i>)	<i>HPLC-UV</i> λ=355 nm	<i>Allure biphenyl</i> 150×4,6 mm, 5 μm (40 °C) ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα ΑCN/οξαλικού οξέος Ροή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Ορός</u> Εκχύλιση ΡΔ McIlvaine/EDTA	102	<i>LOQ</i> 0,04 μg mL ⁻¹	118

Αναλύτες (είδος ιχθύος)	Αναλυτική τεχνική	Χρωματογραφικές συνθήκες	Δείγμα/Προκα- τεργασία δείγματος	Ανάκτηση %	LODILOQ	Αναφορά
STZ, SSZ, SMX, SDZ, SMR, SDM, SMMX, SDMX, SMPZ, SQX(<i>Rt Ee,St</i>)	<i>HPLC-UV</i> λ=272 nm	Wakosil 5 C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/H ₃ PO ₄ , 24/76 (v/v)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με οξικό αιθυλεστέρα Καθαρισμός με SPE	84,7–98,4	LOD 0,05 ppm	119
21 σουλφοναμίδια (<i>As</i>)	<i>HPLC–UV</i> λ=270 nm <i>LC–MS/MS</i>	<i>Vydac</i> 201 <i>TP</i> 250×2,1 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή) Μίγμα ACN/H ₂ O 0,1% TFA, ροή 0,2 mLmin ⁻¹	<u>Σάρκα ιχθύος</u> Εκχύλιση με ακετόνη Καθαρισμός με διχλωρομεθάνιο	60	<i>LOD</i> 13 µg kg⁻¹	120
	HPLC-PDA λ=250, 260, 265, 270, 280, 290 nm	Supelclosil LC 18DB 250×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα ACN/H ₂ O 0,1% FA, ροή 1,0mL min ⁻¹				
SDZ, TMP (<i>As</i>)	<i>HPLC-UV</i> λ=370 nm	Supelcosil LC–18-DB 250×4,6 mm, 5 μm Προστήλη 20×4,6 mm, 5 μm ΚΦ Μίγμα Νa ₃ PO ₄ με σουλφονικό εξάνιο <i>p</i> H 2,8/ ACN με 0,1 % τριεθυλαμίνη Ροή 0,9 mL min ⁻¹	<u>Πλάσμα</u> Εκχύλιση με ΤCA/EtOH <u>Σάρκα, ήπαρ</u> Εκχύλιση με TCA/ακετόνη	74-92 (SDZ) 60–97 (TMP)	LOQ <u>Πλάσμα</u> 50 ng mL ⁻¹ (SDZ) 250 ng mL ⁻¹ (TMP) <u>Σάρκα</u> 15 ng g ⁻¹ (SDZ) 80 ng g ⁻¹ (TMP) <u>Ήπαρ</u> 30 ng g ⁻¹ (SDZ) 160 ng g ⁻¹ (TMP)	121
SDMX (<i>Cns</i>)	<i>LC–MS/MS</i> UV λ=280 nm	<i>Ultrasphere ion pair</i> 250×4,6 mm, 5 μm	<u>Σάρκα, ήπαρ</u> Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο	78 (σάρκα) 61 (ήπαρ)	<i>LOD</i> 50 μg kg⁻¹ (σάρκα) 200 μg kg⁻¹ (ήπαρ)	122

Πίνακας 3.3 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των SAs σε ιστούς ιχθύων

Πίνακας 3.3	(συνέχεια)					
SDZ (Chs)	LC-APCI- MS	150×4,6 mm, 5 μm (45 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα 2 % AcOH/ACN (80/20)	<u>Σάρκα και δέρμα</u> Καθαρισμός με SPE (PRS)	75,4	<i>LOD</i> 0,2 μg kg ⁻¹	123
					LOQ 1,0 μg kg ⁻¹	
SMMX (Edible fish)	<i>HPLC-UV</i> <i>λ</i> =265 nm	<i>Hisep</i> 150×4,6 mm, 5 μm (30 °C) ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα κιτρικού οξέος, Na ₂ HPO ₄ , βρωμιούχο τετρα- <i>n</i> -βουτυλ- αμμώνιο/ACN (85/15, v/v)	<u>Σάρκα,</u> Εκχύλιση με μίγμα ACN/THF	80	<i>LOD</i> 20-40 μg kg ⁻¹	124
SDZ (<i>Gsb</i>)	<i>HPLC-UV</i> <i>λ</i> =271 nm	Nucleosil 100 RP-C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) ACN/H ₃ PO ₄ 16/84, v/v	<u>Σάρκα και δέρμα,</u> <u>ήπαρ, βράγχια, λίπος, και νεφρός</u> Εκχύλιση με διχλωρομεθάνιο	77,8–87,4	<i>LOD</i> 3,1 μg kg ⁻¹	125
12 σουλφοναμίδια (<i>Rt</i>)	LC-ESI-MS	Alltima C ₁₈ 250×4,6 mm, 5 μm Προστήλη 7,5×4,6 mm (35 °C) ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα MeOH/H ₂ O/FA	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με θερμό ύδωρ (<i>Matrix Solid</i> Phase Dispersion, MSPD)	73–104	LOQ 3-13 μg kg ⁻¹	126
14 σουλφοναμίδια (<i>Cf, As</i>)	HPLC-FLD $\lambda_{\rm exc}$ =400 nm $\lambda_{\rm em}$ =495 nm	Symmetry C ₁₈ 150×4,6 mm, 3,5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Μίγμα ACN/MeOH/AcOH Ροή 1,0 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα+δέρμα</u> Εκχύλιση με ACN Καθαρισμός με SPE (SCX 500mg/3mL)	64,2-100,6	LOQ 5-20 μg kg ⁻¹	127

3.1.5 Μέθοδοι για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών διαφόρων ομάδων σε ιστούς ιχθύων

Στον πίνακα 3.4 δίνονται οι σημαντικότερες από τις πιο πρόσφατες δημοσιευμένες μεθόδους που αναπτύχθησαν και επικυρώθηκαν προκειμένου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό αντιβιοτικών διαφόρων κατηγοριών. Οι επιπλέον συντμήσεις που χρησιμοποιούνται στον πίνακα αυτό είναι:

<u>Αναλύτες και άλλα</u>: MLX (μιλοξακίνη), SD (σουλφαδοξίνη), ERM (ερυθρομυκίνη), MG (πράσινο μαλαχίτη), LMG (πράσινο λευκομαλαχίτη) CL (όριο επιβεβαίωσης, *confirmation limit*), *N*⁴–AcSDZ (*N*⁴–ακετυλο-σουλφαδιαζίνη), SMZ (σουλφαμεθαζίνη), *N*⁴–AcSMZ (*N*⁴–ακετυλο-σουλφαμεθαζίνη), *N*⁴–AcSMR (*N*⁴–ακετυλο-σουλφαμεραζίνη), AMX (αμιξικιλίνη), AMA (αμοξικιλικό οξύ), AMP (αμπικιλίνη), APA (αμπικιλικό οξύ), CLF (χλωραμφαινικόλη), TIF (θειαμφαινικόλη).

<u>Είδη ιχθύων</u>: Rs (Red snapper, κόκκινος σολομός), Hm (Horse mackerel, σκουμπρί), Bh (Bastard halibut, μπακαλιάρος), C (Carp), Auf (Ayu fish), As (Amago salmon, σολομός), Crc (Crucian carp, κυπρίνος), Hk (Hake, μουρούνα), Ac (Anchovy, αντσούγια).

3.1.6 Στην παρούσα εργασία

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό των SDZ, TMP και AcSDZ, με εσωτερικό πρότυπο (*Internal Standard*, *IS*) την DPS, σε ιστούς τσιπούρας και λαβρακιού (σάρκα με δέρμα, ήπαρ, ορός). Η απομόνωση των παραπάνω ουσιών από τη σάρκα με δέρμα και το ήπαρ, πραγματοποιήθηκε με το σύστημα *ASE*, ακολουθούμενη από στάδιο καθαρισμού με *SPE*, ενώ από τον ορό έγινε με *LLE*, ο δε καθαρισμός έγινε με *κ*-εξάνιο. Για τον διαχωρισμό και τον προσδιορισμό των ουσιών αυτών χρησιμοποιήθηκε σύστημα *LC/MS*.

Στη συνέχεια του κεφαλαίου αυτού, παρουσιάζονται οι σημαντικότερες τεχνικές απομόνωσης ουσιών από διάφορα μητρικά υλικά, ενώ γίνεται ειδική παρουσίαση των βασικών αρχών λειτουργίας του συστήματος *ASE*, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία. Αναφέρονται, επίσης, η διαδικασία *QuECHERS* (*Quick, Easy*,

Αναλύτες (είδος ιχθύος)	Αναλυτική τεχνική	Χρωματογραφικές συνθήκες	Δείγμα/Προκατεργασία δείγματος	Ανάκτηση %	LOD/LOQ CC_{α}/CC_{β}	Αναφορά
OTC, OXO, MLX, SMMX (Yt, Rs, Hm, Bh, C, Rt, Ee, Auf, Sf, Tl, As, Cc, Ss)	<i>HPLC-UV</i> λ=360, 265 nm	Ηisep C ₁₈ 150×4,6 mm, 5 μm ΚΦ (ισοκρατική έκλουση) Μίγμα MeOH/οξαλικού οξέος/NH ₃ (OTC) Μίγμα κιτρικού οξέος/ΡΔ Na ₂ HPO ₄ σε βρωμιούχο τετρα- <i>n</i> -βουτυλ- αμμώνιο/ACN (85/15, v/v) (OXO, MLX, SMMX)	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με MeOH/EDTA (OTC), μίγμα ACN/THF (OXO, MLX, SMMX)	77-92	<i>LOD</i> 0,002–0,04 μg g ⁻¹	128
ΟΧΟ, ENR, FLU, ERM, μυκητοκτόνα: MG, LMG, παρασιτοκτόνα: EB (<i>As</i>)	LC–ESI- ToF/MS	Zorbax SB C ₁₈ 250×3 mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Α: ACN Β: MeOH 0,1% FA (v/v) Ροή 0,4 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα ιχθύος</u> Εκχύλιση με ACN/FA Καθαρισμός με <i>Bondesil</i> - NH ₂	80-100 (ENR: 40 %)	LOD 1-3 μ g kg ⁻¹ LOQ 3-9 μ g kg ⁻¹ CC _a 103-218 μ g kg ⁻¹ CC _b 107-234 μ g kg ⁻¹	129
OXO, FLU, OTC, SDZ, TMP (<i>Gsb</i>)	LC–ESI- MS	Atlantis dC ₁₈ 150×2,0 mm, 5 μm (30 °C) Προστήλη 20×4,6 mm, 5 μm KΦ A: H ₂ O 0,1% FA (v/v) B: MeOH Poή 0,3 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα και δέρμα</u> Εκχύλιση με μίγμα ACN/κιτρικού οξέος/EDTA	71,3-103,5	LOD 4-8 μg kg ⁻¹ LOQ 10-20 μg kg ⁻¹	130

Πίνακας 3.4 Σημαντικότερες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι για τον προσδιορισμό αντιβιοτικών διαφόρων κατηγοριών σε ιστούς ιχθύων

Πίνακας 3.4	(συνέχεια)					
CIP, SAR, DAN, ENR, DIF, OTC, TC, CTC (<i>Ct</i>)	HPLC-FLD λ_{exc} =275, 375 nm λ_{em} =425, 535 nm	Zorbax Eclipse XDB-phenyl 150×3,0 mm, 3,5 μm (30 °C) KΦ (βαθμωτή ἑκλουση) A: PΔ, B: MeOH 0,1% FA (v/v) Poή 0,5 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα ΑCN/ΡΔ κιτρικών/MgCl ₂	60–92	LOQ 0,15–1,15 ng g ⁻¹	131
38 ουσίες (Rt, As, Cf, Tl)	LC–Ion Trap-MS	YMC Phenyl S-3 50×4,0 mm, 3 μm Προστήλη ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) A: H ₂ O/FA/NaOH B: ACN Poή 0,5 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα+δέρμα</u> Εκχύλιση με ACN Καθαρισμός με <i>n</i> -εξάνιο	Διάφορα	CL 0,0,1-2 ppm	132
100 ουσίες (As, Rt, Ee, Cf, Hm)	LC– ToF/MS	Acquity UPLC BEH C ₁₈ 100×2,1 mm, 1,7 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) A: H ₂ O/FA B: ACN/FA Poή 0,4 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα,</u> Εκχύλιση με μίγμα ACN/H ₂ O Καθαρισμός με <i>SPE</i> (<i>StrataX</i> , 60 mg/3 mL)	50-118		133
SDZ, N^4 -AcSDZ, SMZ, N^4 - AcSMZ, SMR, N^4 -AcSMR, SMX, TMP, AMX, AMA,	HPLC– PDA-FLD $λ_{abs}=200-$ 450 nm $λ_{exc}=235,$ 260, 265	Gemini-C _{18e} 150×4,6 mm, 5 μm Προστήλη LiChroCART 4-4 LiChrospher 100 <i>RP</i> -18, 4×4	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με Η₂Ο Καθαρισμός με διχλωρομεθάνιο	52,7–93,1	LOD 0,02–0,19 μg g ⁻¹ LOQ 0,05–0,61 μg g ⁻¹	134
Πίνακας 3.4	(συνέχεια)					
---	--	--	--	--------	---	-----
AMP, APA, CLF, TIF, OTC, CTC (<i>Hk, Ac</i>)	nm λ _{em} =296, 310, 340, 381, 430 nm	mm, 5 μm ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) Α: Η ₂ Ο 0,1% FA (v/v) Β: ACN Ροή 0,7 mL min ⁻¹				
SDZ, SMR, SDMX, OTC, CTC, TC (<i>Gsb</i>)	LC–ESI– MS/MS	Mediterranea C ₁₈ 150×2,1 mm, 5 μ m (25 °C) KΦ (βαθμωτή έκλουση) Α: A: H ₂ O 0,1% FA (v/v) B: ACN Poή 0,3 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα MeOH/H ₂ O (70/30, v/v) και Na ₂ EDTA 0,14 % (w/v)	88-110	<i>LOD</i> 1,2-16 μg kg ⁻¹	135
17 SAs 5 TCs (Gsb Esb)	LC–ESI- MS/MS	Zorbac Eclipse plus C ₁₈ 50×2,1 mm, 1,8 μm Προστήλη ΚΦ (βαθμωτή έκλουση) A: H ₂ O 0,1% FA (v/v) B: ACN Poή 0,1 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με μίγμα ACN/MeOH με 0,05% FA (v/v)		<i>LOD</i> 5,65–25,8 μ g kg ⁻¹ <i>LOQ</i> 17,1–72,7 μ g kg ⁻¹ <i>CC_a</i> 3,99–25,1 μ g kg ⁻¹ <i>CC_β</i> 6,8–37,1 μ g kg ⁻¹	136
SDZ, N^4 – AcSDZ, SMZ, N^4 –AcSMZ, SMR, N^4 – AcSMR, SMX,	LC–ESI- MS/MS	Gemini-C _{18e} 150×4,6 mm, 5 μm Προστήλη <i>LiChroCART</i> 4-4	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με Η₂Ο Καθαρισμός με Διχλωρομεθάνιο	70-100	LOD 2-16 ng g ⁻¹ LOQ 5-57 ng g ⁻¹	137

Πίνακας 3.4	(συνέχεια)					
TMP, AMX, AMA, AMP, APA, CLF, TIF, OTC, CTC (<i>Hk,</i> <i>Ac</i>)		<i>LiChrospher</i> 100 <i>RP</i> -18, 4×4 mm, 5 μm KΦ (βαθμωτή) A: H ₂ O 0,1% FA (v/v) B: ACN Poή 0,4 mL min ⁻¹				
OXO, ENR, CIP, NOR, SMPZ, SD, SDM, SMR (<i>As</i>)	LC–ESI- MS/MS	Zorbax SB C ₁₈ 150×4,6 mm, 5 μm KΦ KΦ ΚΦ (βαθμωτή) A: Λ: Μίγμα οξικού αμμωνίου/FA/H ₂ O B: MeOH Ροή 0,7 mL min ⁻¹ Po Po	<u>Σάρκα ιχθύος</u> Εκχύλιση με ACN/FA	75-104	CC _α 1,69–3,34 μg kg ⁻¹ CC _β 2,09–4,13 μg kg ⁻¹	138
18 ουσίες (μακρολίδες, β- λακτάμες, λινκοσαμίνες, κινολόνη)	UPLC–ESI -MS/MS	Acquity UPLC HSS T3 100x2,1 mm, 1,8 μm KΦ (βαθμωτή) A: H ₂ O 0,05% FA (v/v) B: ACN Poή 0,3 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με 2 διαλύματα: Ι (0,2 % μεταφωσφορικό/MeOH, 30/70, v/v) και ΙΙ (NaH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄ /NaCl/H2O) Καθαρισμός με <i>n</i> -εξάνιο και <i>SPE</i> (<i>Oasis HLB</i> , 500 mg/6 mL)	52,9-127,7	LOD 0,5-5 ng g ⁻¹ LOQ 1-10 ng g ⁻¹	139
32 ουσίες (13 σουλφοναμίδια, 2 τετρακυκλίνες, 3 μακρολίδες, 2 β-λακτάμες, 1 λινκοσαμίνη, 8 φθοροκινολόνες, 2 αμφαινικόλες κλπ)	UPLC–ESI -MS/MS	HypersilGOLDPhenyl Column $50 \times 2,1 \text{ mm}, 3 \mu \text{m}$ $K\Phi$ (βαθμωτή) $A:H_2O$ B:ACN0,1% FA (v/v)Poή βαθμωτή 0,3–0,4 mL min ⁻¹	<u>Σάρκα</u> Εκχύλιση με ACN 0,1% FA (v/v)	70-120	LOQ 0,062–4,6 μg kg ⁻¹	140

Cheap, Effective, Rugged and Safe) (Γρήγορη, Εύκολη, Φθηνή, Αποτελεσματική, Ανθεκτική, Ασφαλής), η οποία δοκιμάστηκε κατά την ανάπτυξη της μεθόδου σε ήπαρ, χωρίς, όμως, ικανοποιητικά αποτελέσματα, ωστόσο, πιστεύεται ότι είναι μια ευέλικτη πορεία που επιτρέπει τη γρήγορη εκχύλιση και τον καθαρισμό ενός δείγματος, με πολλές πιθανές μελλοντικές εφαρμογές. Τέλος, γίνεται αναφορά στο φαινόμενο "*matrix* effect", το οποίο είναι συχνό στη φασματομετρία μαζών με ηλεκτροδιάχυση, καθώς και τα κριτήρια επίδοσης (χαρακτηριστικά ποιότητας) που πρέπει να ελέγχονται κατά την επικύρωση μιας μεθόδου, σύμφωνα με την Απόφαση 2002/657/ΕΚ.

3.2. Τεχνικές εκχύλισης

3.2.1. Γενικά

Κατά την παρασκευή ενός δείγματος (sample preparation) και τον μετέπειτα καθαρισμό του (clean-up) πρέπει να λαμβάνεται υπόψη ότι η ουσία-στόχος μεταβολίζεται σε μικρό ή μεγάλο βαθμό μέσα στον οργανισμό, οπότε μέρος της αρχικής ποσότητας της μητρικής ουσίας δύναται να βρίσκεται και υπό μορφή μεταβολιτών. Επιπλέον, η μητρική ουσία και οι μεταβολίτες μπορεί να βρίσκονται υπό συζευγμένη μορφή (π.χ. ως γλυκουρονίδια) και να απαιτείται αποδέσμευση της ουσίας με ενζυματική ή χημική υδρόλυση πριν από την εκχύλιση. Με την ενζυματική υδρόλυση (π.χ. με χρήση του μίγματος ενζύμων β-γλυκουρονιδάση και αρυλοσουλφατάση) εφαρμόζονται ηπιότερες συνθήκες απ'ό,τι στην όξινη ή αλκαλική υδρόλυση. Τέλος, οι ουσίες που είναι δεσμευμένες με τις πρωτεΐνες μέσω ασθενών αλληλεπιδράσεων, μπορούν εύκολα να εκχυλιστούν με διαπίδυση, πρωτεόλυση ή μετουσίωση των πρωτεϊνών, θερμαίνοντας ή οξινίζοντας το διάλυμα της εκχύλισης.¹⁴¹ Η επιλογή της τεχνικής εκχύλισης εξαρτάται από τη φύση του δείγματος (π.χ. αν είναι υγρό ή στερεό) και από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των προς εκχύλιση ουσιών (πολικότητα και τιμή pK_a).

3.2.1.1. «Δια χειρός» τεχνικές εκχύλισης δείγματος

Οι σημαντικότερες «δια χειρός» τεχνικές εκχύλισης είναι η Απλή Εκχύλιση με Διαλύτη (Simple Solvent Extraction, SSE),¹⁴¹ η Υγρό-υγρό εκχύλιση (*LLE*), η διαδικασία

QuEChERS (εδάφιο 3.3) και η διαδικασία MSPD (Διασπορά Μητρικού Υλικού Στερεάς Φάσης) (*Matrix Solid-Phase Dispersion*), η οποία είναι εναλλακτική της τεχνικής QuEChERS.^{142,143}

3.2.1.2. Ενόργανες τεχνικές εκχύλισης

Οι σημαντικότερες ενόργανες τεχνικές εκχύλισης είναι η Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα (*Microwave-assisted extraction*, *MAE*)¹⁴⁴, η Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού (*Supercritical Fluid Extraction*, *SFE*)^{145,146} και η Υγρό Εκχύλιση Υπό Πίεση (*Pressurized Liquid Extraction*, *PLE*) (εδάφιο 3.4). Βασικά πλεονεκτήματα των τεχνικών αυτών είναι η αυτοματοποίηση της διαδικασίας εκχύλισης, η μεγαλύτερη εκλεκτικότητα στην απομόνωση ουσιών μέσω της ρύθμισης των παραμέτρων του οργάνου και η δυνατότητα σύνδεσης *on-line* με σύστημα καθαρισμού του δείγματος. Κύριο μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος των οργάνων.

3.3. Διαδικασία QuEChERS

3.3.1 Γενικά

Η διαδικασία παρασκευής δείγματος *QuEChERS* (σχήμα 3.1) είναι μία παραλλαγή της *LLE*.¹⁴⁷⁻¹⁶¹

3.3.2 Εκχύλιση των αναλυτών

Η εκχύλιση γίνεται με οργανικό διαλύτη, συνήθως με το ACN. Το *p*H του διαλύτη εκχύλισης ρυθμίζεται ανάλογα με την πολικότητα των αναλυτών. Ωστόσο, σε αρκετές εφαρμογές η εκχύλιση γίνεται χωρίς την προσθήκη αλάτων ως ρυθμιστικών μέσων, αλλά πάντα με τη προσθήκη αλάτων όπως MgSO₄ και NaCl, που βοηθούν στην εξαλάτωση και απομάκρυνση των πρωτεϊνών. Συχνά, προστίθεται οξύ στο ACN ώστε να ελαττωθεί η αλληλεπίδραση της πρωτοταγούς-δευτεροταγούς αμίνης *PSA* (*Primary-Secondary Amine*), που χρησιμοποιείται στον καθαρισμό του δείγματος, με τους ανα-



Σχήμα 3.1 Βασικά στάδια της πορείας QuEChERS

λύτες που φέρουν όξινες ομάδες.¹⁶² Σε δείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε υγρασία (< 80 %) απαιτείται η προσθήκη ύδατος.

3.3.3 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης Διασποράς

Η dSPE χρησιμοποιείται για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος. Κατά τη διαδικασία αυτή, το δείγμα αναμιγνύεται με το μέσο διασποράς, το οποίο προσροφά στην επιφάνειά του συστατικά του μητρικού υλικού, αφήνοντας τους αναλύτες στον διαλύτη. Το MgSO₄ που προστίθεται, απομακρύνει υπολείμματα ύδατος καθώς και άλλα συστατικά, μέσω συμπλοκοποίησης, από το εκχύλισμα.¹⁶³

Τα πιο συνήθη μέσα διασποράς είναι: η πρωτοταγής-δευτεροταγής αμίνη PSA, η οκταδεκυλοσίλικα (C₁₈) και ο γραφιτοποιημένος άνθρακας (Graphitised Carbon Black,

GCB)¹⁵⁰. Το *PSA* δρα κατακρατώντας λιπαρά οξέα και άλλα οργανικά οξέα που βρίσκονται στα τρόφιμα.¹⁴⁶ Ωστόσο, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τους αναλύτες και να προκαλέσει απώλεια αυτών. Για τρόφιμα ζωικής προέλευσης που περιέχουν υψηλότερα επίπεδα λίπους, το C_{18} ή συνδυασμός *PSA/C*₁₈ είναι πιο αποτελεσματικά, διότι το C_{18} απομακρύνει λιπόφιλα μόρια.¹⁶⁴

3.4. Υγρό Εκχύλιση Υπό Πίεση

3.4.1. Εισαγωγή

Η επιλογή του διαλύτη εκχύλισης εξαρτάται, κυρίως, από τους αναλύτες και το μητρικό υλικό.^{165,166} Η θερμοκρασία και η πίεση παίζουν σημαντικό ρόλο στην κινητική της εκχύλισης. Έτσι, στις ενόργανες τεχνικές εκχύλισης (*MAE*, *SFE*, *PLE*) οι υψηλές τιμές θερμοκρασίας και/ή πίεσης που εφαρμόζονται, έχουν ως αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη ταχύτητα και τη μεγαλύτερη απόδοση της εκχύλισης με σχετικά μικρή κατανάλωση διαλύτη.¹⁶⁵

Από τις ενόργανες τεχνικές εκχύλισης, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη είναι η Υγρό Εκχύλιση Υπό Πίεση (Pressurized Liquid Extraction, PLE). Είναι γνωστή και ως Επιταχυνόμενη Εκχύλιση με Διαλύτη (Accelerated Solvent Extraction, ASE) ή Εκχύλιση Υπό Πίεση με Ρευστό (Pressurized Fluid Extraction, PFE) ή Εκχύλιση Υπό Πίεση με Θερμό Διαλύτη (Pressurized Hot Solvent Extraction, PHSE) ή Εκχύλιση Υποκρίσιμου Διαλύτη (Subcritical Solvent Extraction, SSE) ή Εκχύλιση Θερμού Ύδατος (Hot Water Extraction, HWE), στην περίπτωση που ο διαλύτης είναι το ύδωρ.¹⁶⁷ Με την τεχνική αυτή, η εκχύλιση των οργανικών αναλυτών από στερεά και ημιστερεά δείγματα πραγματοποιείται με τους συνήθεις διαλύτες κάτω από υψηλές τιμές θερμοκρασίας και πίεσης, συνθήκες που οδηγούν στην υψηλή αποδοτικότητα της εκχύλισης.

Το σύστημα ASE αναπτύχθηκε από την εταιρεία Dionex Corporation.^{165,168}

3.4.2. Οργανολογία

Ένα σχηματικό διάγραμμα του συστήματος ASE φαίνεται στο σχήμα 3.2. Αποτελείται από ένα έως τέσσερα δοχεία διαλυτών (solvent tanks), μία αντλία (solvent pump), μια

κυψελίδα δείγματος (*extraction cell*), έναν φούρνο (*heating oven*), ένα φιαλίδιο συλλογής του δείγματος (*collection vial*) και μια φιάλη αζώτου (*nitrogen tank*).^{169,170}



Σχήμα 3.2 Σχηματικό διάγραμμα ενός συστήματος ASE

3.4.3. Προκατεργασία του δείγματος

Κατά τη προκατεργασία του δείγματος, αρχικά, αλέθεται το υλικό που πρόκειται να αναλυθεί (π.χ. σάρκα, ήπαρ) ώστε να ληφθεί αντιπροσωπευτικό δείγμα της όλης μάζας του υλικού και να αυξηθεί η επιφάνεια του ώστε να είναι ευκολότερη η εκχύλιση των αναλυτών.¹⁷¹ Το προζυγισμένο δείγμα τοποθετείται σε γουδί και προστίθεται το υλικό διασποράς. Η αναλογία μάζα δείγματος/μάζα υλικού διασποράς είναι, τις περισσότερες φορές, συγκεκριμένη (π.χ. 1:2, 1:3 κ.λ.π.). Το μίγμα μετατρέπεται σε ομοιογενή πάστα με τη βοήθεια ενός γουδιού και τοποθετείται στην κυψελίδα, στο κάτω μέρος της οποίας υπάρχει φίλτρο. Η κυψελίδα πληρώνεται με το υλικό διασποράς.

Ως μέσο διασποράς χρησιμοποιείται το θειικό νάτριο (Na₂SO₄), το διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂, γη διατόμων μεγέθους σωματιδίων 20 - 30 *mesh*, «άμμος θαλάσσης» μεγέθους σωματιδίων 0,25 - 0,30 mm), η αλουμίνα (οξείδιο του αργιλίου, Al₂O₃, όξινο, ενεργοποιημένο με θέρμανση στους 350 °C για 15 min) αλλά και η χημικά τροποποιημένη σίλικα (π.χ. *C*₁₈ διαμέτρου σωματιδίων 35 - 70 μm και μεγέθους πόρων 60 Å).

3.4.4. Διαδικασία της εκχύλισης

Τα στάδια της διαδικασίας ASE φαίνονται στο ροόγραμμα του σχήματος 3.3.¹⁷²



Σχήμα 3.3 Κύρια στάδια της διαδικασίας εκχύλισης με σύστημα ASE

3.4.5. Παράμετροι της διαδικασίας ASE

<u>Θερμοκρασία και Πίεση</u>: η θερμοκρασία είναι η σημαντικότερη παράμετρος της τεχνικής ASE. Η αύξηση της θερμοκρασίας οδηγεί σε μείωση του ιξώδους του διαλύτη, οπότε αυξάνεται η ικανότητά του να διαβρέχει το μητρικό υλικό και να διαλυτοποιεί τους αναλύτες. Συνήθεις τιμές θερμοκρασίας είναι 70 - 160 °C, ενώ το όργανο μπορεί να φτάσει τους 200 °C. Ωστόσο, απαιτείται ταυτόχρονα και υψηλή πίεση ώστε να διατηρείται ο διαλύτης στην υγρή του κατάσταση, όταν η θερμοκρασία είναι πάνω από το σημείο ζέσεως του διαλύτη υπό ατμοσφαιρική πίεση.¹⁷³ Διαλύτες: βασικό κριτήριο για την επιλογή του διαλύτη είναι η υψηλή διαλυτότητα των αναλυτών και η χαμηλή διαλυτότητα του μητρικού υλικού σε αυτόν. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν όλοι οι συνήθεις διαλύτες.¹⁷¹

<u>Κύκλοι εκχύλισης</u>: με τη χρήση των στατικών κύκλων εισάγεται κάθε φορά φρέσκος διαλύτης, διατηρώντας, έτσι, την επιθυμητή ισορροπία εκχύλισης.¹⁷¹

<u>Χρόνος</u>: αυξάνοντας τον χρόνο της στατικής εκχύλισης, διευκολύνεται η απομάκρυνση ουσιών μέσα από τους πόρους του μητρικού υλικού και η διάχυσή τους στον διαλύτη.¹⁷¹

3.4.6. Πλεονεκτήματα και εφαρμογές της τεχνικής ASE

Βασικά πλεονεκτήματα της τεχνικής είναι ότι χρησιμοποιεί μικρότερα ποσά διαλύτη απ'ό,τι οι συμβατικές τεχνικές εκχύλισης και είναι πλήρως αυτοματοποιημένη, γεγονός που οδηγεί σε υψηλή αναπαραγωγιμότητα. Επιπλέον, οι διαλύτες οι οποίοι δεν αποδίδουν με τις συμβατικές τεχνικές εκχύλισης, μπορούν να δώσουν ικανοποιητικά αποτελέσματα κάτω από τις συνθήκες του *ASE*. Τέλος, είναι δυνατή η χρήση του ύδατος, του πλέον φθηνού, μη τοξικού και φιλικού προς το περιβάλλον διαλύτη, ως διαλύτη εκχύλισης σε μεθόδους προσδιορισμού καταλοίπων.¹⁴¹

Βασικό μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος του οργάνου, ωστόσο, το κόστος ανά δείγμα είναι σχετικά χαμηλό.¹⁶⁵ Πολλές φορές, απαιτείται και περαιτέρω στάδιο καθαρισμού του εκχυλίσματος, επειδή κάτω από τις έντονες συνθήκες της τεχνικής εκλούονται πολλά συστατικά του μητρικού υλικού που παρεμποδίζουν την ανάλυση.¹⁴¹

Πλήθος εφαρμογών έχουν δημοσιευθεί για την εκχύλιση ουσιών από διάφορα δείγματα.^{165,174-192}

3.5. «Επίδραση του μητρικού υλικού» στην υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μαζών

3.5.1 Γενικά

Η αρχική αντίληψη ότι η τεχνική *LC/MS* εγγυάται εκλεκτικότητα και αξιοπιστία, έχει εγκαταληφθεί, εξαιτίας της ανακάλυψης του φαινομένου «επίδραση του μητρικού

υλικού» ("matrix effect"), το οποίο οδηγεί άλλοτε σε υποβάθμιση (suppression) και άλλοτε σε ενίσχυση (enhancement) του σήματος MS ενός συστατικού σε μητρικό υλικό, σε σχέση με ένα πρότυπο διάλυμα.¹⁹³⁻¹⁹⁸ Εμφανίζεται, κυρίως, όταν ο ιονισμός γίνεται σε πηγή API (Atmospheric Pressure Ionization), δηλαδή σε πηγή ESI (Electrospray Ionization) και σε πηγή APCI (Atmospheric Pressure Chemical Ionization). Η αξιολόγηση του φαινομένου αυτού, κρίνεται αναγκαία κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και επικύρωσης μιας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού, ώστε να καθίσταται η μέθοδος αυτή αξιόπιστη, ως προς την ορθότητα, την πιστότητα και την εκλεκτικότητα.¹⁹⁹⁻²⁰⁰ Διακρίνεται σε «απόλυτη επίδραση του μητρικού υλικού» ("absolute matrix effect', AME ή ME) και σε «σχετική επίδραση του μητρικού υλικού» ("relative matrix effect', RME). Η πρώτη αναφέρεται στη διαφοροποίηση του σήματος μεταξύ ενός πρότυπου διαλύματος και ενός εμβολιασμένου εκχυλίσματος δείγματος, ενώ η δεύτερη στη διαφοροποίηση του σήματος μεταξύ εμβολιασμένων εκχυλισμάτων διαφόρων «παρτίδων» δείγματος/μητρικού υλικού.¹⁹⁸ Συνήθως, το "matrix effect" επηρεάζει την ορθότητα της μεθόδου και μπορεί να περιοριστεί με τη χρήση εμβολιασμένων εκχυλισμάτων με πρότυπα (matrix-matched standards). Το "relative matrix effect' επηρεάζει τον έλεγχο της πιστότητας της μεθόδου και αποτελεί βασικό κριτήριο της αξιοπιστίας των αναλυτικών δεδομένων.¹⁹⁶ Η χρήση της δίδυμης φασματομετρίας μαζών (MS/MS) δεν περιορίζει το φαινόμενο, παρ'ότι πολλοί αυτό πιστεύουν. Το "matrix effect" οφείλεται, γενικά, στην επίδραση συνεκχυλιζόμενων συστατικών ή συστατικών της κινητής φάσης στη διαδικασία ιονισμού του αναλύτη, δηλαδή, πολύ πριν τα ιόντα του αναλύτη εισέλθουν στην περιοχή υψηλού κενού του αναλυτή μαζών.

3.5.2 Μηχανισμοί του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»

Τα συνεκχυλιζόμενα συστατικά του μητρικού υλικού ανταγωνίζονται τα μόρια των αναλυτών ως προς τον ιονισμό μέσα στην πηγή του *M*S.²⁰¹⁻²⁰³ Επιπλέον, η παρουσία των συστατικών αυτών σε υψηλές συγκεντρώσεις δύναται να επηρεάσει το ιξώδες και την επιφάνειακή τάση των σταγονιδίων που παράγονται στην πηγή *ESI* ή *APCI* και να μειώσει την εξάτμιση του διαλύτη και κατά συνέπεια την ικανότητα των αναλυτών να

φτάσουν στην αέριο φάση. Μη-πτητικά μακρομόρια που συνεκχυλίζονται με τους αναλύτες, μπορούν, επίσης, να περιορίσουν τη μεταφορά στην αέριο φάση, επειδή εμποδίζουν τα σταγονίδια να φτάσουν την «κρίσιμη» ακτίνα.²⁰¹⁻²⁰³ Πιστεύεται ότι και στην αέριο φάση αντιδράσεις αποπρωτονίωσης με αέρια αλκαλικά συστατικά οδηγούν στην εξουδετέρωση των ιόντων του αναλύτη, με αποτέλεσμα την υποβάθμιση του σήματος του.²⁰³

3.5.3 Επιπτώσεις του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»

Το "*matrix effect*" προκαλεί μείωση της ικανότητας ανίχνευσης στην περίπτωση της υποβάθμισης του σήματος των αναλυτών. Επηρεάζει, επίσης, αρνητικά την επαναληψιμότητα της μεθόδου επειδή ο βαθμός της υποβάθμισης ή της ενίσχυσης του σήματος μπορεί να διαφέρει αρκετά από δείγμα σε δείγμα. Επιπλέον, η γραμμικότητα της μεθόδου επηρεάζεται αρνητικά και κατ'επέκταση ο ποσοτικός προσδιορισμός των αναλυτών.

Η υποβάθμιση του σήματος μπορεί να οδηγήσει στη μη ανίχνευση ενός υπάρχοντος αναλύτη, στην υποτίμηση (underestimation) της πραγματικής συγκέντρωσης ενός αναλύτη, ή στη μη-πλήρωση των κριτηρίων ταυτοποίησης (identification criteria), οπότε αυξάνεται η πιθανότητα απόδοσης ενός «ψευδώς» αρνητικού αποτελέσματος (false negative, compliant). Αν το *IS* επηρεάζεται σε μεγαλύτερο βαθμό από τον αναλύτη, η υποβάθμιση του σήματος μπορεί να οδηγήσει στην υπερεκτίμηση της συγκέντρωσης του αναλύτη με αυξημένη πιθανότητα απόδοσης ενός «ψευδώς» αρνητικού αποτελέσματος (false του αναλύτη με αυξημένη πιθανότητα απόδοσης ενός αποτελέσματος (false αποτελέσματος (false η αναλύτη).

3.5.4 Αξιολόγηση του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»

Η αξιολόγηση του "matrix effect" μπορεί να γίνει κατασκευάζοντας διαγράμματα βαθμονόμησης (calibration plot) με τρεις ομάδες δειγμάτων. Η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει πρότυπα διαλύματα των αναλυτών και του IS (standard solutions, SS), η δεύτερη ομάδα αφορά εμβολιασμένα εκχυλίσματα του μητρικού υλικού (matrix-matched standards, MMS) και η τρίτη ομάδα περιλαμβάνει δείγματα εμβολιασμένα πριν από την

εκχύλιση (fortified real samples, FRS). Από την ανάλυση των δειγμάτων των ομάδων αυτών, μπορούν να υπολογιστούν το % ποσοστό επίδρασης του μητρικού υλικού (% *matrix effect*, % *ME*), το % ποσοστό της ανάκτησης (% *recovery*, % *RE*) και το % ποσοστό της απόδοσης της όλης διαδικασίας (% *overall efficiency*, % *PE*), σύμφωνα με τις σχέσεις:

$$ME(\%) = \frac{E\Pi I \Phi A NE IA MMS}{E\Pi I \Phi A NE IA SS} x100$$
(3.1)

$$RE(\%) = \frac{E\Pi I \Phi A NEIA MMS}{E\Pi I \Phi A NEIA FRS} x100$$
(3.2)

$$PE(\%) = \frac{E\Pi I \Phi A NE IA FRS}{E\Pi I \Phi A NE IA SS} x100$$
(3.3)

Ωστόσο, στη πράξη είναι πιο σημαντικό να διερευνηθεί η παρουσία ή απουσία του "*relative matrix effect*" (εδάφιο 3.5.6).^{198,204}

3.5.5 Μείωση ή εξάλειψη του φαινομένου «επίδραση του μητρικού υλικού»

Τα συστατικά που είναι υπεύθυνα για την υποβάθμιση ή την ενίσχυση του σήματος του αναλύτη, συχνά δεν ιονίζονται από την πηγή *ESI* ή *APCI* του *MS*, που σημαίνει ότι δεν μπορούν να ανιχνευτούν από το *MS*. Τα συστατικά αυτά μπορεί να είναι:

- ✓ ενδογενή συστατικά του μητρικού υλικού που μεταφέρονται στο τελικό εκχύλισμα, όπως ιονίσιμα μόρια (ανόργανοι ηλεκτρολύτες, άλατα), πολικά συστατικά (φαινόλες, υδατάνθρακες, αμίνες, λιπίδια, πεπτίδια, χρωστικές κ.λπ.),^{205,206}
- ✓ εξωγενή συστατικά, δηλαδή μόρια που προέρχονται από εξωτερικές πηγές κατά τη διάρκεια της παρασκευαστικής πορείας, π.χ. υπολείμματα πλαστικών και άλλων πολυμερικών υλικών,²⁰⁷ φθαλικοί εστέρες (πλαστικοποιητές), ουσίες με μεγάλη δραστική επιφάνεια ή/και ιδιότητες σχηματισμού ζεύγους ιόντων,²⁰⁸⁻²¹⁰ ουσίες με υψηλή συγγένεια πρωτονίου (προκειμένου για την ανίχνευση θετικών ιόντων) όπως οργανικά οξέα²¹⁰⁻²¹² ή με χαμηλή οξύτητα στην αέριο φάση (προκειμένου για την ανίχνευση αρνητικών ιόντων),
- ✓ συστατικά της κινητής φάσης, π.χ. το TFA, το οποίο σχηματίζει ισχυρά ζεύγη ιόντων με τους αναλύτες που δύσκολα διασπώνται, εμποδίζοντας τον ιονισμό των μορίων των αναλυτών.²¹³⁻²¹⁴

Το "matrix effect" μπορεί να αντιμετωπιστεί με δύο γενικές προσεγγίσεις. Η πρώτη αφορά την απομάκρυνση ή τον περιορισμό των συστατικών που θεωρούνται υπεύθυνα για το φαινόμενο αυτό. Περιλαμβάνει τη βελτιστοποίηση της μεθόδου παρασκευής του δείγματος (εκλεκτικότερη διαδικασία εκχύλισης, καλύτερος καθαρισμός κ.λπ.)²¹⁵ και/ή τη TOU χρωματογραφικού διαχωρισμού (αποδοτικότητα και/ή βελτιστοποίηση διαχωριστικότητα). Μείωση του φαινομένου μπορεί, επίσης, να επιτευχθεί με την αραίωση του δείγματος ή με την ένεση μικρότερης ποσότητας στο σύστημα LC/MS που, ωστόσο, δε χρησιμοποιούνται συχνά, διότι αυξάνονται το LOD και το LOQ της μεθόδου. Η δεύτερη προσέγγιση αφορά στην αλλαγή των μεθόδων ιονισμού, την αλλαγή των συστατικών της κινητής φάσης ή/και τη χρήση /S. Πιο συγκεκριμένα, η αλλαγή της πηγής ιονισμού από ESI σε APCI περιορίζει το φαινόμενο, 198,216 όπως, επίσης, ο τρόπος ανίχνευσης αρνητικών ιόντων σε σχέση με την ανίχνευση θετικών ιόντων. Πιθανόν, ο πιο αποτελεσματικός τρόπος περιορισμού των αρνητικών επιδράσεων του φαινομένου είναι η τεχνική της σταθερής προσθήκης, η οποία, όμως, δε χρησιμοποιείται συχνά γιατί είναι χρονοβόρος. Αντί αυτής, προτιμάται η χρήση προτύπων σε εμβολιασμένα εκχυλίσματα και/ή η χρήση /S. Το /S μπορεί να είναι μόριο ανάλογης δομής με του αναλύτη ή μόριο του αναλύτη ισοτοπικά επισημασμένο.²¹⁵ Σε αμφότερες των περιπτώσεων είναι σημαντικό να προστίθεται πριν από την έναρξη της παρασκευαστικής πορείας, ώστε να λαμβάνει χώρα «διόρθωση» αφ'ενός λόγω απώλειας του αναλύτη κατά τη διαδικασία αυτή, αφ'ετέρου λόγω υποβάθμισης ή ενίσχυσης του σήματος εξαιτίας του μητρικού υλικού κατά τον ιονισμό του αναλύτη.

3.5.6 «Σχετική επίδραση του μητρικού υλικού»²¹⁷

Μεγάλη σημασία σε μία βιοαναλυτική μέθοδο έχει η μελέτη, «ποσοτικοποίηση» και εξάλειψη του "relative matrix effect", ώστε η μέθοδος αυτή να δώσει αξιόπιστα αποτελέσματα ως προς την ορθότητα και την πιστότητα.

Σύμφωνα με τον Matuszewski BK και τους συνεργάτες του²¹⁷ η αξιολόγηση του "*relative matrix effect*" μπορεί να γίνει κατασκευάζοντας πέντε καμπύλες βαθμονόμησης με εμβολιασμένα δείγματα πέντε διαφορετικών παρτίδων του μητρικού υλικού και συγκρίνοντας τις κλίσεις των καμπυλών αυτών. Η πιστότητα των κλίσεων αυτών,

εκφρασμένη με το συντελεστή διακύμανσης (CV, %), αποτελεί δείκτη για την παρουσία ή μη του "relative matrix effect". Οι συγγραφείς προτείνουν ότι όταν ο συντελεστής διακύμανσης δεν υπερβαίνει την τιμή 3-4 %, η μέθοδος θεωρείται ότι πρακτικά στερείται «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού» και είναι αξιόπιστη. Επίσης, η σύγκριση της ανωτέρω τιμής CV (%) με αυτή που λαμβάνεται όταν κατασκευάζονται πέντε καμπύλες βαθμονόμησης από την ίδια «παρτίδα» του μητρικού υλικού, αποτελεί, επίσης, ένδειξη της παρουσίας ή της απουσίας του φαινομένου. Η κατασκευή των καμπυλών βαθμονόμησης γίνεται με τη χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων και, επομένως, οι αποκρίσεις των αναλυτών και του /S αντιπροσωπεύουν την «όλη αποδοτικότητα της διαδικασίας», δηλαδή τον συνδυασμό της αποδοτικότητας της ανάκτησης των αναλυτών και της επίδρασης του μητρικού υλικού στον ιονισμό.

3.6 Επικύρωση των αναλυτικών μεθόδων σύμφωνα με την Απόφαση 2002/657/EK

3.6.1 Επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου σύμφωνα με την Απόφαση 2002/657/EK

Αφορά την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Η απόφαση αυτή διασφαλίζει την ποιότητα και τη συγκρισιμότητα των αναλυτικών αποτελεσμάτων των εργαστηρίων που διενεργούν ελέγχους καταλοίπων φαρμακολογικά ενεργών ενώσεων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Αυτό επιτυγχάνεται με τη χρήση συστημάτων διασφάλισης ποιότητας και συγκεκριμένα με την εφαρμογή μεθόδων που έχουν επικυρωθεί σύμφωνα με κοινές διαδικασίες και κριτήρια επίδοσης,^{58,63,218,219} αλλά και τις απαιτήσεις του προτύπου *EN ISO/IEC* 17025 (εδάφιο 5.9).^{220,221}

Με την απόφαση αυτή καθορίζονται οι κανόνες για τις αναλυτικές μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν κατά τις δοκιμές ανάλυσης των επίσημων δειγμάτων. Σύμφωνα με τις γενικές απαιτήσεις της απόφασης αυτής, η λήψη, ο χειρισμός και η επεξεργασία των δειγμάτων πρέπει να γίνονται κατά τρόπο, ώστε η δυνατότητα ανίχνευσης της προσδιοριζόμενης ένωσης να είναι η μέγιστη. Οι διαδικασίες χειρισμού του δείγματος πρέπει να εμποδίζουν την τυχαία επιμόλυνση ή απώλεια της προσδιοριζόμενης ένωσης.

Στο παράρτημα της απόφασης δίνονται οι σχετικοί ορισμοί (Κεφάλαιο 1), ορίζονται τα κριτήρια επίδοσης και οι άλλες απαιτήσεις για τις αναλυτικές μεθόδους (Κεφάλαιο 2) και περιγράφεται ο τρόπος επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου (Κεφάλαιο 3). Επίσης, σύμφωνα με το άρθρο 6 της συγκεκριμένης απόφασης καθορίζεται ο τρόπος ερμηνείας των αποτελεσμάτων. Τα χαρακτηριστικά επίδοσης (*efficiency characteristics*) ή χαρακτηριστικά ποιότητας (*quality characteristics*), τα οποία πρέπει να ελέγχονται κατά την επκύρωση μιας μεθόδου ποσοτικού προσδιορισμού είναι:

- η ειδικότητα (specificity) και η εκλεκτικότητα (selectivity),
- ✓ η ορθότητα (trueness),
- η δυνατότητα εφαρμογής/ανθεκτικότητα (συνήθως, η ανθεκτικότητα αναφέρεται ως robustness και η έννοια της αντοχής, η οποία ελέγχεται κατά την αξιολόγηση της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, αναφέρεται ως ruggedness),
- ✓ σταθερότητα (stability),
- καμπύλες βαθμονόμησης (calibration curves) με τουλάχιστον πέντε επίπεδα συγκεντρώσεων (συμπεριλαμβανομένου του μηδενός),
- επαναληψιμότητα (repeatability),
- ✓ ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (within-laboratory reproducibility),
- ✓ αναπαραγωγιμότητα (reproducibility) (όταν πρόκειται να επαληθευτεί η αναπαραγωγιμότητα, τα εργαστήρια πρέπει να συμμετέχουν σε διεργαστηριακές συγκρίσεις σύμφωνα με το ISO 5725-2),²²²
- ✓ όριο απόφασης, CC_α (decision limit),
- \checkmark ικανότητα ανίχνευσης, CC_{β} (detection capability).

Σύμφωνα με πιο πρόσφατους ορισμούς, που έγιναν δεκτοί και από τον ΕΛΟΤ, εισήχθη ο όρος *trueness* (ορθότητα) για να εκφράσει το συστηματικό σφάλμα μιας μέτρησης, ενώ ο όρος *precision* εκφράζει το τυχαίο σφάλμα της μέτρησης. Ο όρος *precision* αποδιδόταν παλιά ως επαναληψιμότητα, ενώ τώρα ως πιστότητα, και ο όρος *accuracy* ως ακρίβεια. Έτσι, η ακρίβεια μιας μέτρησης έχει ως «συστατικά» την ορθότητα (συστηματικό σφάλμα) και την πιστότητα (τυχαίο σφάλμα):

AKPIBEIA (ACCURACY) = OPOOTHTA (TRUENESS) + ΠΙΣΤΟΤΗΤΑ (PRECISION)

Η απόφαση 2002/657/ΕΚ αναφέρεται στην ανάλυση βιολογικών δειγμάτων για τον προσδιορισμό καταλοίπων και προσμίξεων (οργανικές ενώσεις ή μέταλλα, απαγορευμένες ή μη ουσίες), βάσει ποιοτικών και ποσοτικών μεθόδων, διαλογής (screening methods) και επιβεβαίωσης (confirmatory methods). Με την απόφαση αυτή, εισάγεται και η έννοια των Μονάδων Ταυτοποίησης (Identification Points, IPs) για τις μεθόδους επιβεβαίωσης, ενώ πέραν του Ορίου Ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και του Ορίου Ταυτοποίησης (Limit of Identification, LOI) προστίθενται το Όριο Απόφασης CC_α και η Ικανότητα Ανίχνευσης CC_β.²²³ Οι όροι CC_α και CC_β είχαν ήδη εισαχθεί από το πρότυπο /SO 11843, ως x_C και x_D, αντίστοιχα, αλλά ο τρόπος υπολογισμού των ήταν διαφορετικός. 224-226 Όταν η ευρεθείσα συγκέντρωση ενός αναλύτη (με καθορισμένο MRL) σε ένα άγνωστο δείγμα είναι χαμηλότερη από το CC_a, το δείγμα θεωρείται «συμμορφούμενο», διότι ο αναλύτης παρίσταται σε συγκέντρωση χαμηλότερη από το MRL, με επίπεδο εμπιστοσύνης 1-α. Αν η συγκέντρωση είναι μεγαλύτερη από το CC_α και μάλιστα μεγαλύτερη και από το CC_β, τότε το δείγμα θεωρείται «μη συμμορφούμενο» (ο αναλύτης βρίσκεται σε συγκέντρωση υψηλότερη από το MRL) με επίπεδο εμπιστοσύνης 1-β. Αν η συγκέντρωση είναι μεταξύ των τιμών CC_α και CC_β υπάρχει σοβαρή υποψία μη συμμορφούμενου δείγματος, αλλά από στατιστικής άποψης το αποτέλεσμα παραμένει αδιευκρίνιστο (αβέβαιο). 220,223,224

3.6.2 Επικύρωση μιας (βιο)αναλυτικής μεθόδου σύμφωνα με οδηγίες άλλων διεθνών οργανισμών

Διάφοροι φορείς ή οργανισμοί, παγκοσμίως, έχουν εκδώσει κατά καιρούς οδηγίες για τον ορθό προσδιορισμό και την αξιολόγηση, μέσω κριτηρίων αποδοχής, των παραμέτρων επικύρωσης, όπως ο *FDA*,²²⁷ η Εθνική Αρχή Επιτήρησης Υγείας της Βραζιλίας (*National Health Surveillance Agency, ANVISA*)²²⁸ και η *EMA*²²⁹. Αν και υπάρχει γενικά συμφωνία μεταξύ των οδηγιών αυτών ως προς την αξιολόγηση των παραμέτρων επικύρωσης μιας βιοαναλυτικής μεθόδου, υπάρχουν διαφορές ως προς τη μεθοδολογία της επικύρωσης και τα κριτήρια αποδοχής σε ορισμένες από τις παραμέτρους. Είναι σημαντικό να σημειωθούν οι διαφορές αυτές, προς διευκόλυνση εφαρμογής της νομοθεσίας στα κράτη αυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΜΙΝΟΠΥΡΙΜΙΔΙΝΕΣ

4.1 Γενικά περί των σουλφοναμιδίων και των διαμινοπυριμιδινών

4.1.1 Χημεία των σουλφοναμιδίων

Τα SAs, που συχνά αναφέρονται και ως "sulfa drugs", είναι τα πρώτα αντιμικροβιακά φάρμακα που παρασκευάστηκαν, ανοίγοντας το δρόμο για τη σύνθεση μεγάλου αριθμού ουσιών με αντιμικροβιακές ιδιότητες. Παραμένουν, ωστόσο, μεταξύ των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων αντιβιοτικών στη κτηνιατρική, κυρίως γιατί έχουν μικρό κόστος παραγωγής και σχετικά καλή αποτελεσματικότητα σε μερικές κοινές βακτηριακές λοιμώξεις.²³⁰ Έχουν συντεθεί πολλά ανάλογα και περίπου ογδόντα (80) από αυτά χρησιμοποιούνται στη κτηνιατρική. Χρησιμοποιούνται ευρέως στις υδατοκαλλιέργειες, τόσο ως προληπτικό μέσο, όσο και για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων.

Στο σχήμα 4.1 δίνεται η γενική δομή των SAs. Όπως βλέπουμε, αποτελούνται από ένα βενζολικό πυρήνα, μία αμινομάδα (-NH₂) και μία σουλφοναμιδο-ομάδα (-SO₂NHR). Για να έχουν οι ουσίες αυτές αντιβακτηριακές ιδιότητες, η αμινομάδα και σουλφοναμιδοομάδα πρέπει να βρίσκονται σε θέση *para* η μία με την άλλη.²³¹

Οι φυσικές, χημικές, φαρμακολογικές και αντιμικροβιακές ιδιότητες των σουλφοναμιδίων ποικίλλουν λόγω του διαφορετικού υποκαταστάτη *R*- στο άτομο *N* της σουλφοναμιδοομάδας. Είναι αμφοτερικές ενώσεις, αν και γενικά συμπεριφέρονται ως ασθενή οξέα.²³⁰



Σχήμα 4.1 Γενική δομή των SAs

Χαρακτηρίζονται από δύο σταθερές ιονισμού, από τις οποίες η μία αποδίδεται στην πρωτονίωση της αμινομάδας σε *p*H 2 - 3 και η δεύτερη στην αποπρωτονίωση του ατόμου *N* της σουλφοναμιδο-ομάδας σε *p*H 4,5 - 10.²³² Οι τιμές *log*K_{ow} κυμαίνονται από -0,1 έως 1,7, οπότε χαρακτηρίζονται ως μη υδρόφοβες ενώσεις. Είναι ελάχιστα διαλυτές στο ύδωρ, όμως τα μετά νατρίου άλατα των ενώσεων αυτών είναι εξαιρετικά διαλυτά στο ύδωρ. Στον πίνακα 4.1 δίνονται ορισμένες ιδιότητες των συνηθέστερα χρησιμοποιούμενων SAs.

4.1.2 Χημεία των διαμινοπυριμιδινών

Οι διαμινοπυριμιδίνες (diaminopyridines, DPs) είναι ουσίες οι οποίες δρουν ως αναστολείς της αναγωγάσης του διυδροφυλλικού οξέος, του ενζύμου, δηλαδή, που καταλύει τη μετατροπή του διυδροφυλλικού σε τετραϋδροφυλλικό οξύ. Όταν χρησιμοποιούνται μόνες, δεν έχουν αντιβακτηριακή δράση, παρά μόνο όταν συνδυάζονται με SAs (σε αναλογία 1:1 έως 1:20). Το μόριό τους αποτελείται από τρία τμήματα, τα οποία καθορίζουν την αντιβακτηριακή των δράση. Τα τμήματα αυτά είναι ένας δακτύλιος πυριμιδίνης, ένας δακτύλιος βενζολίου και μια αλυσίδα-γέφυρα.²³³ Στο σχήμα 4.2 δίνεται η γενική δομή των διαμινοπυριμιδινών.

Η αντιβακτηριακή δράση του δακτυλίου της πυριμιδίνης βασίζεται στην παρουσία των αμινομάδων στις θέσεις 2 και 4 και στην έλλειψη υποκαταστάτη στη θέση 6. Η φύση της ομάδας-γέφυρα επηρεάζει την αντιβακτηριακή δράση των *DP*s. Χαρακτηριστικά παραδείγματα των ενώσεων αυτών είναι η τριμεθοπρίμη (TMP), η ορμετοπρίμη (OMP), η βακιλοπρίμη (VCP), η μεθοπρίμη (MTP), η αντιτοπρίμη (ATP), η διαβερίνη (DV) και η πυριμεθαμίνη (PM).²³⁰

4.1.3 Αντιβακτηριακές ιδιότητες-Ενισχυμένα σουλφοναμίδια

Τα SAs, ως χημικά ανάλογα του π-αμινοβενζοϊκού οξέος (*p-aminobenzoic acid*, *PABA*), αναστέλλουν τη δράση του βακτηριακού ενζύμου διυδροπτεροάση (συνθετάση του διυδροπτερικού οξέος), το οποίο είναι υπεύθυνο για την ενσωμάτωση του *PABA* στο

Πίνακας 4.1	Ιδιότητες	ορισμένων	SAs ^A
-------------	-----------	-----------	------------------

Όνομα (Σύντμηση)	Δομή	Συντακτικός τύπος	Σχετική μοριακή μάζα	<i>р</i> К _а ^в	logK₀w [₿]
Σουλφακεταμίδιο (SAM)	O NH H ₂ N O O O O O O O O	$C_8H_{10}N_2O_8S$	214,24	5,4	Πειρ0,96 Θεωρ0,60
Σουλφαμεθοξαζόλη (SMX)	NH S NH CH ₃ CH ₃	$C_{10}H_{11}N_3O_3S$	253,28	1,57 6,40	Πειρ0,89 Θεωρ0,48
Σουλφαθειαζόλη (STZ)	H ₂ N	$C_9H_9N_3O_2S_2$	255,31	2,4 7,1	Πειρ0,05 Θεωρ. 0,72
Σουλφαμεθοξυ- διαζίνη (SME)		$C_{11}H_{12}N_4O_3S$	280,30		Πειρ0,41 Θεωρ. 0,26
Σουλφαμεθαζίνη (SMZ)	NH N H ₂ N O CH ₃	$C_{12}H_{14}N_4O_2S$	278,33	2,79 7,59	Πειρ0,89 Θεωρ. 0,76
Σουλφισοξαζόλη (SIX)	O NH CH ₃ S O O-N CH ₃	$C_{11}H_{13}N_3O_3S_2$	267,30		Πειρ1,01 Θεωρ. 1,03
Σουλφαμεραζίνη (SMR)	NH N CH ₃ H ₂ N	$C_{11}H_{12}N_4O_2S$	264,30		Πειρ. 0,14 Θεωρ. 0,21

^A Στον πίνακα δεν αναφέρεται η SDZ, επειδή περιγράφεται στο εδάφιο 4.2.1
^B Οι τιμές *p*K_a και *log*K_{ow} βρέθηκαν στην ιστοσελίδα http://www.syrres.com/esc/efdb.htm

διυδροφολικό οξύ, το οποίο είναι ο άμεσος πρόδρομος του φολικού οξέος. Δρώντας ως αντιμεταβολίτες του PABA, τα SAs αναστέλλουν πολλά ένζυμα που είναι υπεύθυνα για



Σχήμα 4.2 Γενική δομή των DPs

тη βιοσύνθεση των πουρινών, της μεθειονίνης, της γλυκίνης και TOU φορμυλομεθειονυλο-μεταφορικού RNA. Ως αποτέλεσμα όλων αυτών, είναι η αναστολή της πρωτεϊνοσύνθεσης, η εξασθένιση των μεταβολικών διαδικασιών και η αναστολή της ανάπτυξης και του πολλαπλασιασμού των μικροοργανισμών. Η δράση των, επομένως, είναι βακτηριοστατική.^{188,230,234,235} Χρησιμοποιούνται, συνήθως, σε συνδυασμό με DPs, οι οποίες ενεργούν κατά της διυδροφολικής ρεδουκτάσης. Η συνεργιστική δράση των SAs και των DPs (ενισχυμένα SAs) οδηγεί στη θανάτωση του βακτηρίου. Αυτή η αυξημένη αποτελεσματικότητα έχει επιφέρει μια τεράστια αύξηση στη χρήση των SAs σε όλους τους τομείς, κατά τη διάρκεια της τελευταίας εικοσαετίας.^{230,236}

Τα SAs είναι αντιβακτηριακά φάρμακα ευρέος φάσματος, τα οποία αναστέλλουν τη σύνθεση του βακτηριακού υποστρώματος, τόσο των θετικών (+) όσο και των αρνητικών (-) κατά Gram βακτηρίων. Το *in vivo* φάσμα τους περιλαμβάνει τα γένη Streptococcus pyogenes, Streptococcus pneumoniac, Bacillus anthracis, Corynebacterium diphtheria, Haemophilus influenzae, Vibrio cholera, Chlamydia trachomatis, Actinomyces, Nocardia και τα πρωτόζωα Plasmodium falciparum και Toxoplasma gondii. Τα είδη Klebsiela, Proteus mirabilis και Serratia marcescens ποικίλλουν στην *in vitro* αντίδρασή τους με τα SAs.²³⁷

4.2 Σουλφαδιαζίνη και τριμεθοπρίμη

4.2.1 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες της σουλφαδιαζίνης

Η σουλφαδιαζίνη ή 2-σουλφανιλαμιδοπυριμιδίνη (σχήμα 4.3) ανήκει στην ομάδα των SAs, των παραγώγων, δηλαδή, του σουλφανιλαμιδίου (*sulfanilamide*, SMD).^{238,239}

Στον πίνακα 4.2 δίνονται ορισμένες από τις ιδιότητες της SDZ.²³⁹⁻²⁴³



Σχήμα 4.3 Δομή της SDZ

Είναι μετρίως διαλυτή στο ύδωρ, με τις βιβλιογραφικές πηγές να δίνουν διαφορετικές τιμές για διάφορες τιμές *p*H και σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας.^{238,243-245}

Ονομασία	Σουλφαδιαζίνη		
Χημική ονομασία	4-αμινο- <i>Ν</i> -(2-πυριδινυλ)- βενζυλοδουλφοναμίδιο		
Άλλες ονομασίες	Sanodiazin, sulfapyrimidine, sulfazin		
Μοριακός τύπος	$C_{10}H_{10}N_4O_2S$		
Σχετική μοριακή μάζα	250,28		
logK _{ow}	-0,09 (στους 35 [°] C και <i>p</i> H 4,24)		
рК _а	2,1 6,4		

Πίνακας 4.2 Ιδιότητες της SDZ

4.2.2 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες της τριμεθοπρίμης

Η τριμεθοπρίμη ή 2,4-διαμινο-5-(3,4,5-τριμεθοξυβενζυλ)πυριμιδίνη (σχήμα 4.4) ανήκει στην ομάδα των 2,4- διαμινοπυριμιδινών.

Δρα βακτηριοστατικά, αφού παρεμποδίζει το μεταβολισμό του φολικού οξέος, αναστέλλοντας τη δράση του διυδροφυλλικού σε τετραϋδροφυλλικό οξύ. Χορηγείται, συνήθως, σε συνδυασμό με ένα SA (π.χ. με την SDZ), ώστε να δρουν συνεργιστικά

στην αναστολή της σύνθεσης του φολικού οξέος. Στον πίνακα 4.3 δίνονται οι κυριότερες ιδιότητές της.



Σχήμα 4.4 Δομή της TMP

|--|

Ονομασία	Τριμεθοπρίμη		
Χημική ονομασία (κατά <i>IUPAC</i>)	5-[(3,4,5- τριμεθοξυφαινυλο)μεθυλο]πυριμιδινο- 2,4-διαμίνη		
Άλλες ονομασίες	Monotrim		
Μοριακός τύπος	$C_{14}H_{18}N_4O_3$		
Σχετική μοριακή μάζα	290,32		
Διαλυτότητα στο ύδωρ (g L ⁻¹)	0,4		
logK _{ow}	0,91		
<i>p</i> K _a [#]	1,32 7,12		

[#]Οι τιμές pK_{a} αναφέρονται στην πρωτονίωση των δύο ετεροκυκλικών ατόμων $N(N^{1}$ και $N^{3})$ του μορίου της TMP

4.2.3 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες της ακετυλο-σουλφαδιαζίνης

Η *Ν*⁴-ακετυλο-σουλφαδιαζίνη (*N*⁴-*acetyl-sulfadiazine*, AcSDZ) (σχήμα 4.5) είναι ο κύριος μεταβολίτης της SDZ.

Η ακετυλίωση λαμβάνει χώρα σε δύο στάδια: αρχικά σχηματίζεται το ακετυλοσυνένζυμο Α και ακολουθεί η πυρηνόφιλη προσβολή της αμινο-ομάδας της SDZ στο ακετυλιωμένο ένζυμο. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στο ήπαρ, στη σπλήνα και στο έντερο.²⁴⁶



Σχήμα 4.5 Δομή της AcSDZ

Η AcSDZ με μοριακό τύπο C₁₂H₁₂N₄O₃S, έχει μεγαλύτερη σχετική μοριακή μάζα (292,3) και μικρότερη τιμή *p*K_a (5,86) από την SDZ.²³⁸ Η ακετυλίωση αυξάνει τη διαλυτότητα της SDZ στο ύδωρ.²³⁸ Η διαλυτότητα εξαρτάται από το *p*H.

4.2.4 Χορήγηση της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης

Όπως προαναφέρθηκε, οι ουσίες αυτές χορηγούνται, συνήθως, από το στόμα, εκτός από περιπτώσεις απειλητικών για τη ζωή συστηματικών λοιμώξεων. Μπορούν να χορηγηθούν, επίσης, ενδομυικά, ενδοπεριτοναϊκά, αλλά και τοπικά. Είναι αποτελεσματικά έναντι πολλών θετικών και αρνητικών κατά *Gram* βακτηρίων, η δε συνήθης αναλογία της θεραπευτικής δόσης είναι SDZ:TMP 5:1, π.χ. 25 mg/kg σ.β. SDZ και 5 mg/kg σ.β. TMP, για πάνω από επτά συνεχόμενες ημέρες στην περίπτωση των ιχθύων.²⁴⁷⁻²⁵⁰

4.2.5 Μηχανισμός δράσης

Το φολικό οξύ αποτελεί πρόδρομο ουσία για την πουρινική σύνθεση. Πολλά βακτήρια παράγουν το απαραίτητο φολικό οξύ από το *PABA*. Ακριβώς σε αυτό το σημείο, δηλαδή, στη σύνθεση του φολικού οξέος από το *PABA*, δρουν η SDZ (και γενικά τα *SA*s) και η TMP.

4.2.6 Τοξικότητα, κατάλοιπα και δημόσια υγεία

Τόσο η SDZ όσο και η TMP, μπορεί να έχουν τοξική επίδραση όταν χορηγούνται σε

θεραπευτικές δόσεις. Αλλεργικές και άλλες αντιδράσεις μπορεί να προκληθούν στους καταναλωτές από υπολείμματα των ουσιών αυτών σε τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, όπως στους ιχθύες. Έτσι, η Ε.Ε. έχει καθορίσει τις τιμές *MRL* για το σύνολο των SAs²⁵¹ σε 100 μg kg⁻¹ και για την TMP²⁵² σε 50 μg kg⁻¹, προκειμένου για τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης σε διάφορους ιστούς-στόχους (στην περίπτωση των ιχθύων ο ιστός-στόχος είναι η σάρκα με δέρμα σε φυσική αναλογία). Σε κάθε περίπτωση, θα πρέπει να τηρούνται οι απαραίτητοι χρόνοι αναμονής (αποδρομής) των ουσιών αυτών σε κάθε οργανισμό, προτού διοχετευθούν στην αγορά προς κατανάλωση.

4.3 Μέθοδοι προσδιορισμού σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης σε ιστούς ιχθύων

Στον πίνακα 3.3 του εδαφίου 3.1.4 δόθηκαν οι βιβλιογραφικές αναφορές που περιλαμβάνουν μεθόδους για τον προσδιορισμό των SAs σε ιστούς ιχθύων. Ωστόσο, λίγες εξ αυτών αναφέρονται στον ταυτόχρονο προσδιορισμό των SDZ και TMP σε ιστούς ιχθύων.^{121,130,133,137}

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΦΑΡΜΑΚΟΚΙΝΗΤΙΚΗ ΚΑΙ ΜΕΤΑΒΟΛΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΑΝΤΙΜΙΚΡΟΒΙΑΚΩΝ ΦΑΡΜΑΚΩΝ

5.1 Γενικά

Η Φαρμακοκινητική (*Pharmacokinetics*, *PK*) των αντιμικροβιακών φαρμάκων μελετά τις διαδικασίες της απορρόφησης (*absorption*),^{40,248,249} της μεταφοράς (*transport*) και της κατανομής (*distribution*),²⁵⁰ του μεταβολισμού (*metabolism*)^{248,253} και της απομάκρυνσής (*excretion*)²⁵⁴ των από τον οργανισμό, με βάση τη μεταβολή των συγκεντρώσεων τους στη συστηματική κυκλοφορία και στους ιστούς, στην πορεία του χρόνου.

Σημαντικό φαινόμενο που λαμβάνει χώρα εντός του οργανισμού, είναι η πρόσδεση του εισερχόμενου φαρμάκου με τις πρωτεΐνες του πλάσματος (*Plasma Protein Binding*, *PPB*)²⁴⁸⁻²⁵⁰ ή με άλλους ιστούς.

5.2 Διάθεση των φαρμάκων στους ιχθύες

Γενικά, η διάθεση μιας φαρμακευτικής ουσίας στον οργανισμό των ιχθύων είναι μια πολύπλοκη διαδικασία, τα στάδια της οποίας αλληλοσχετίζονται και επηρεάζονται από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες. Οι σημαντικότεροι βιοτικοί παράγοντες είναι το είδος, το φύλο και η ηλικία του ιχθύος.²⁵⁴ Οι αβιοτικοί παράγοντες διακρίνονται σε παράγοντες που έχουν σχέση με το ίδιο το φαρμακευτικό μόριο και σε παράγοντες που έχουν σχέση με το ίδιο το φαρμακευτικό μόριο και σε παράγοντες που έχουν σχέση με το περιβάλλον. Η λιποφιλικότητα και η σταθερά *p*K_a μιας χημικής ουσίας καθορίζουν σε σημαντικό βαθμό την ικανότητά της να διεισδύει, να παραμένει ή να αποβάλλεται από τους ιστούς και τελικά από τον οργανισμό. Επίσης, η χημική δομή της ουσίας, η χορηγούμενη ποσότητα και η οδός χορήγησης του φαρμάκου επηρεάζουν άμεσα τον μεταβολισμό και την απέκκριση. Φάρμακα τα οποία απορροφώνται από τον γαστρεντερικό σωλήνα, αρχικά μεταβολίζονται στο ήπαρ, ενώ εκείνα, τα οποία απορροφώνται από τα βράγχια, φθάνουν απ'ευθείας στους νεφρούς.²⁵⁵ Από τους περιβαλλοντικούς παράγοντες, σημαντικότερος είναι η θερμοκρασία. Γενικά, αύξηση της

θερμοκρασίας κατά 1 °C προκαλεί αύξηση της μεταβολικής συχνότητας κατά 10 % περίπου. Το *p*H, η ιοντική ισχύς και η συγκέντρωση του οξυγόνου (O₂) στο ύδωρ είναι, επίσης, παράγοντες οι οποίοι επηρεάζουν την απορρόφηση και την απέκκριση των φαρμάκων.²⁵⁶ Μετά τη βιομετατροπή του, το φάρμακο αποβάλλεται από τον οργανισμό του ιχθύος, με τον μηχανισμό της παθητικής διάχυσης, δια μέσου των βραγχίων ή με άλλους μηχανισμούς δια μέσου της χολής και των ούρων.²⁵⁵

5.3 Κύριες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές παράμετροι

Οι κύριες παράμετροι που περιγράφουν την κινητική των φαρμάκων²⁵⁷⁻²⁵⁹ είναι: η ολική σωματική απομάκρυνση (body, total, systemic, plasma CLearance, CL_B), (β) ο φαινομενικός όγκος κατανομής (apparent Volume of distribution, V_d), (γ) ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$),²⁶⁰ η μέγιστη συγκέντρωση στον ορό ή στο πλάσμα του αίματος (C_{max}), ο χρόνος κατά τον οποίο επιτυγχάνεται η C_{max} (T_{max}), το εμβαδό της περιοχής κάτω από την καμπύλη συγκέντρωσης-χρόνου (*Area Under the Concentration-Time Curve*, *AUC*), και ο μέσος χρόνος παραμονής του φαρμάκου στον οργανισμό (*Mean Residence Time*, *MRT*). Σημαντική παράμετρος είναι η βιοδιαθεσιμότητα (*Bioavailability*, *F*), η οποία εκφράζει το ποσοστό της συνολικής δόσης του φαρμάκου που απορροφήθηκε από το σημείο χορήγησης και εισήλθε στη συστηματική κυκλοφορία.

Η Φαρμακοδυναμική (*Pharmacodynamics*, *PD*) των αντιμικροβιακών φαρμάκων μελετά τη σχέση της συγκέντρωσής των με το αποτέλεσμα που επιφέρουν. Οι κυριότερες φαρμακοδυναμικές παράμετροι προσδιορίζονται *in vitro* σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα²⁶¹ και είναι: (α) η Ελάχιστη Ανασταλτική Συγκέντρωση (*Minimal Inhibitory Concentration*, *MIC*), (β) η Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση (*Minimal Bactericidal Concentration*, *MBC*). Στα βακτηριοκτόνα αντιβιοτικά, ισχύει, κατά κανόνα, ότι *MBC* = (1-2) *MIC*, ενώ στα βακτηριοστατικά *MBC/MIC* > (8 - 10).^{262,263}

Η Φαρμακοκινητική/ Φαρμακοδυναμική Συσχέτιση ή Ολοκλήρωση (*Pharmacokinetic*/ *Pharmacodynamic Correlation* ή *Integration*) αποτελεί μέθοδο έκφρασης της αλληλεπίδρασης των φαρμακοκινητικών και φαρμακοδυναμικών ιδιοτήτων ενός φαρμάκου, με σκοπό την περιγραφή ή την πρόβλεψη της αποτελεσματικότητάς του.²⁶⁴

98

5.4 Μελέτες της φαρμακοκινητικής της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης στους ιχθύες

Όπως έχει προαναφερθεί η αναλογία SDZ/TMP που, συνήθως, χρησιμοποιείται είναι 5:1, για δε τους ιχθύες η θεραπευτική δόση είναι 25 mg SDZ + 5 mg TMP, ανά kg σωματικού βάρους. Ωστόσο, η δόση αυτή έχει προκύψει από μελέτες που έχουν γίνει σε ιχθύες ψυχρού ή/και γλυκού ύδατος, αφού, ενώ χρησιμοποιούνται ευρέως στην υδατοκαλλιέργεια ευρύαλων ιχθύων σε Μεσογειακές χώρες, δεν έχουν γίνει μελέτες φαρμακοκινητικής και μελέτες της αποτελεσματικότητάς των έναντι παθογόνων βακτηρίων.²⁶⁵

Σύμφωνα με τον Hormazabal V και τον Rogstad A,¹²¹ η C_{max} για την SDZ στο πλάσμα βρέθηκε ίση με 20,3 μg mL⁻¹, 24 ώρες μετά τη χορήγηση του *Tribrissen* (SDZ:TMP σε αναλογία 5:1) σε σολομό του Ατλαντικού, σε θαλασσινό ύδωρ θερμοκρασίας 8 °C και αλατότητας 29 ‰. Η αντίστοιχη C_{max} για την TMP βρέθηκε ίση με 3,25 μg mL⁻¹, 12 ώρες μετά τη χορήγηση του *Tribrissen*. Η χορήγηση έγινε μέσω της τροφής στη δόση των 100 mg ανά kg σωματικού βάρους, με ποσοστό διατροφής 0,5 % της βιομάζας.

Σύμφωνα με τον Horsberg Ε και τους συνεργάτες του²⁶⁶ υπολογίσθηκε η βιοδιαθεσιμότητα της SDZ και βρέθηκε ίση με 46 % και της TMP ίση με 100 % σε πειραματισμούς με το σολομό του Ατλαντικού (*Salmo salar*), μετά από χορήγηση των δύο ουσιών σε αναλογία 5:1, σε θαλασσινό ύδωρ, θερμοκρασίας 10 °C.

5.5 Προϊόντα μεταβολισμού της σουλφαδιαζίνης

Ο μεταβολισμός της SDZ, όπως και όλων των SAs, εξαρτάται από το είδος του ζωντανού οργανισμού (species dependent).^{267,268} Μεταβολίζεται, κυρίως, στο ήπαρ, αλλά και σε άλλα όργανα. Η βιομετατροπή της SDZ λαμβάνει χώρα, κυρίως, με αντιδράσεις οξείδωσης στη φάση Ι και αντιδράσεις ακετυλίωσης στη φάση ΙΙ, δίνοντας την *N*⁴-υδροξυ-σουλφαδιαζίνη και την *N*⁴-ακετυλο-σουλφαδιαζίνη, αντίστοιχα. Και οι δύο αυτοί μεταβολίτες δεν εμφανίζουν αντιμικροβιακή δράση.²⁶⁹ Η γλυκουρονίωση και η υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου, επίσης, λαμβάνουν χώρα, ο δε τελευταίος μεταβολίτης εμφανίζει αντιμικροβιακή δράση σε ποσοστό 5 - 39,5 % του μητρικού

συστατικού, σε ορισμένα είδη. Στο σχήμα 5.1 δίνονται οι τρεις κύριοι μεταβολίτες των σουλφοναμιδίων, γενικά, ενώ στο σχήμα 5.2 δίνονται οι μεταβολίτες της SDZ.

Η ακετυλίωση της SDZ πραγματοποιείται σε δύο στάδια: αρχικά, σχηματίζεται το ακετυλο-συνένζυμο A και στη συνέχεια λαμβάνει χώρα πυρηνόφιλη προσβολή της αμινο-ομάδας της SDZ στο ακετυλιωμένο ένζυμο. Τα δύο αυτά στάδια λαμβάνουν χώρα, κυρίως, στο ήπαρ, αλλά και στη σπλήνα και στο βλεννογόνο του εντέρου.²⁴⁸ Η AcSDZ έχει μεγαλύτερη σχετική μοριακή μάζα από την SDZ (292,3) και μικρότερη την τιμή της αντίστοιχης *p*K_a (5,86), ενώ αποτελεί τον κύριο μεταβολίτη της SDZ στο ύδωρ.²³⁸ Η αντίδραση υδροξυλίωσης του αρωματικού δακτυλίου της SDZ καταλύεται από το σύστημα *P* 450 (*CYP*), κυρίως, στο ήπαρ και σε μικρότερο ποσοστό στο έντερο, στο δέρμα και σε άλλους ιστούς. Για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση χρειάζεται η παρουσία φωσφονικοτιναμιδο-αδενινονουκλεοτιδίου (*NADPH*) και οξυγόνου.²⁵⁰



Σχήμα 5.1 Χημική δομή των κύριων μεταβολιτών των SAs

Η υδροξυλίωση του αρωματικού δακτυλίου της SDZ μπορεί να γίνει είτε στη θέση 4 είτε στη θέση 5, ανάλογα με το είδος του οργανισμού.²⁷⁰ Λίγες είναι οι γνώσεις για την 4- ή 5- υδροξυ-σουλφαδιαζίνη (OH-SDZ), αφού η AcSDZ είναι ο κύριος μεταβολίτης της SDZ στα περισσότερα είδη, η δε σύνθεση της OH-SDZ είναι αρκετά δύσκολη.²⁷⁰ Εκτός από

τη σχετική μοριακή μάζα (266,28), καμία άλλη φυσικοχημική ιδιότητα της OH-SDZ δεν αναφέρεται στη βιβλιογραφία.

Εκτός από τους μεταβολίτες που προαναφέρθηκαν, σε μία μελέτη του Lamshöft και των συνεργατών του²⁷¹ ταυτοποιήθηκαν δύο νέοι μεταβολίτες της SDZ, μετά από τη χορήγησή της σε χοίρους. Οι ουσίες αυτές είναι η *N*-φορμυλο-σουλφαδιαζίνη (*N-formylsulfadiazine*, *For*-SDZ) και η *N*-ακετυλο-4-υδροξυ-σουλφαδιαζίνη (*N-acetyl-4-hydroxysulfadiazine*, Ac-4-OH-SDZ), οι χημικές δομές των οποίων δίνονται στο σχήμα 5.3. Πράγματι, πολλές μελέτες ταυτοποίησης των μεταβολιτών της SDZ έχουν πραγματοποιηθεί σε διάφορα ζώα, όπως σε αρουραίους,²⁷² στη μαϊμού *Rhesus*,²⁶⁸ στους χοίρους²⁷¹ αλλά και σε νεογέννητους μόσχους,²⁷³ λίγες, όμως, αφορούν ιχθύες και μάλιστα ευρύαλους ιχθύες, όπως η τσιπούρα και το λαβράκι.



Σχήμα 5.2 Χημική δομή των κύριων μεταβολιτών της SDZ: ακετυλοσουλφαδιαζίνη (AcSDZ), 4-υδροξυ-σουλφαδιαζίνη (4-OH-SDZ), 5-υδροξυσουλφαδιαζίνη (5-OH-SDZ), 5-υδροξυ-γλυκουρονο-σουλφαδιαζίνη (5-OH-SDZglucuronide), 5-υδροξυ-θειική-σουλφαδιαζίνη (5-OH-SDZ-sulfate)



Σχήμα 5.3 Χημική δομή των δύο νέων μεταβολιτών της SDZ

5.6 Προϊόντα μεταβολισμού της τριμεθοπρίμης

Ο μεταβολισμός της TMP έχει διερευνηθεί σε μικρότερη έκταση από το μεταβολισμό της SDZ, ωστόσο και στην περίπτωση αυτή, οι πορείες μεταβολισμού και ο ρυθμός απομάκρυνσης εξαρτάται από το είδος του οργανισμού.²⁷⁴

Σύμφωνα με τους Nordholm L και Dalgaard L²⁷⁵, οι κύριοι μεταβολίτες της TMP είναι η 3'-υδροξυ-τριμεθοπρίμη (3'-OH-TMP) και η 4'-υδροξυ-τριμεθοπρίμη (4'-OH-TMP) που αποτελούν προϊόντα οξείδωσης της TMP (αντίδραση μεταβολισμού φάσης Ι). Στη μελέτη τους, η οποία πραγματοποιήθηκε σε ούρα χοίρου, αναφέρουν ότι οι ουσίες αυτές συζεύγνυται, σε δεύτερη φάση, με γλυκουρονικό ή/και θειικό οξύ (σχήμα 5.4).

Σύμφωνα με τον van't Klooster και τους συνεργάτες του,²⁷⁴ η TMP υφίσταται υδροξυλίωση όχι μόνο στις θέσεις 3' και 4', αλλά και στη θέση *α*, δηλαδή στο άτομο *C* που συνδέει τους δύο αρωματικούς δακτυλίους, οπότε προκύπτει η *α*-υδροξυτριμεθοπρίμη (*α*-OH-TMP). Επίσης, η TMP υφίσταται οξείδωση στο άτομο *N* του πυριμιδινικού δακτυλίου, στις θέσεις 1 και 3, οπότε προκύπτουν οι μεταβολίτες 1-*N*-οξοτριμεθοπρίμη (1-*NO*-TMP) και 3-*N*-οξο-τριμεθοπρίμη (3-*NO*-TMP). Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ήπαρ αρουραίου, χωρίς, ωστόσο να επιτευχθεί ικανοποιητική ανάκτηση των *N*-οξειδίων της TMP (σχήμα 5.5).

Εκτός από τους προαναφερθέντες μεταβολίτες της TMP, ο Lai WG και οι συνεργάτες του,²⁷⁶ αναφέρουν τη δημιουργία ενός «δραστικού» ενδιάμεσου ιμινοκινόνης-μεθενίου της TMP σε ηπατικά μικροσωμάτια ανθρώπου ή/και αρουραίου. Το ενδιάμεσο αυτό αντιδρά με την *N*-ακετυλο-κυστεΐνη (*NAc*) (σχήμα 5.6). Σύμφωνα με τους συγγραφείς, ο

σχηματισμός του «δραστικού» ενδιαμέσου μπορεί να ευθύνεται για την εμφάνιση παρενεργειών μετά από τη χορήγηση της TMP σε ανθρώπους.



Σχήμα 5.4 Χημική δομή των μεταβολιτών της TMP

Τέλος, η Damsten MC και οι συνεργάτες της,²⁷⁷ αναφέρουν την ύπαρξη πέντε επιπλέον μεταβολιτών της TMP, σε ηπατικά μικροσωμάτια ανθρώπου. Οι ουσίες αυτές προκύπτουν με σύζευξη με γλουταθειόνη (*glutathione*, *GSH*) και διακρίνονται σε δύο κύριους μεταβολίτες και τρεις δευτερεύοντες μεταβολίτες της TMP. Οι δύο κύριες ενώσεις προσθήκης *GSH* πιστεύεται ότι προέρχονται από το ενδιάμεσο ιμινο-κινόνης ιμίνης της TMP, ενώ οι άλλες τρεις ενώσεις πιστεύεται ότι προκύπτουν από άλλους δραστικούς μεταβολίτες της TMP, όπως τα ενδιάμεσα ο-κινόνης και π-κινόνης μεθενίου, τα οποία προέρχονται, κυρίως, από αντίδραση *Ο*-απομεθυλίωσης της TMP. Στο σχήμα



Σχήμα 5.5 Μεταβολίτες της οξειδωτικής πορείας της TMP



Σχήμα 5.6 «Δραστικοί» μεταβολίτες οξειδωτικής πορείας της TMP

5.7 δίνονται όλοι οι μεταβολίτες της TMP σύμφωνα με την Damsten και τους συνεργάτες της.



Σχήμα 5.7 Μεταβολίτες της TMP, συζευγμένοι και μη- με GSH

5.7 Ταυτοποίηση των προϊόντων μεταβολισμού της σουλφαδιαζίνης και της τριμεθοπρίμης

Η τεχνική *LC/MS* αποτελεί το κύριο εργαλείο για την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό της δομής των μεταβολιτών των φαρμάκων, εξαιτίας της υψηλής ευαισθησίας και της εκλεκτικότητάς της.²⁷⁸

Η χρήση απλού τετραπολικού ανιχνευτή μπορεί να παράγει φάσματα με θραύσματα με «διάσταση προκαλούμενη με πρόσκρουση εντός πηγής» (*in-source collision-induced dissociation*, *CID*), ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν είναι αξιόπιστα λόγω της ταυτόχρονης θραυσματοποίησης των αναλυτών και των συστατικών του μητρικού υλικού.

Με τη χρήση της δίδυμης Φασματομετρίας Μαζών (Tandem Mass Spectrometry) επιλέγεται η θραυσματοποίηση των μητρικών ιόντων κι έτσι η εκλεκτικότητα της τεχνικής είναι πολύ πιο μεγάλη. Το τριπλό τετράπολο (triple quadrupole, QqQ), η παγίδα ιόντων (Ion Trap, IT) και η τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadrupole Ion Trap, QqIT) είναι όργανα που χρησιμοποιούνται στην ταυτοποίηση μεταβολιτών. Συνήθως, πραγματοποιείται σάρωση του μητρικού ιόντος (precursor-ion scan) και σάρωση με σταθερή απώλεια ενός ουδέτερου μορίου (constant neutral-loss scan), οπότε η ταυτοποίηση των ουσιών γίνεται χωρίς να απαιτείται η γνώση της σχετικής μοριακής μάζας των. Ισχυρό εργαλείο για τον δομικό χαρακτηρισμό των ουσιών είναι το Φασματόμετρο Μαζών Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας (High Resolution Mass Spectrometer, HRMS), όπως το Φασματόμετρο Μαζών «Χρόνου Πτήσης» (Time of Flight Mass Spectrometer, ToF MS). Ειδικά η σύζευξή του με τετράπολο (Quadrupole Time of Flight, QqToF) συνδυάζει τη μέτρηση της ακριβούς μάζας (accurate mass) και την υψηλή ευαισθησία.

Η δυνατότητα σάρωσης *MS*ⁿ που έχει η παγίδα ιόντων, της προσδίδει αποτελεσματικότητα στη δομική ανάλυση των μεταβολιτών και προτιμάται έναντι του τριπλού τετραπολικού ανιχνευτή.²⁷⁹

Τέλος, η σύζευξη της QqIT με το QqToF δίνει τεράστιες δυνατότητες στην ταυτοποίηση αγνώστων ουσιών.²⁷⁹

Η SDZ, όπως όλα τα SAs δίνει ορισμένα χαρακτηριστικά ιόντα-θραύσματα. Έτσι, η SDZ με σχετική μοριακή μάζα 250, δίνει χαρακτηριστικά ιόντα-θραύσματα με λόγο μάζα/φορτίο (*m/z ratio*) 108, 156, 92, 96 και 158 (σχήμα 5.8). Η AcSDZ, η οποία έχει σχετική μοριακή μάζα 292 δίνει τα ιόντα-θραύσματα με *m/z* 134, 198, 96 και 158.

Για την TMP, σχετικής μοριακής μάζας 290, τα χαρακτηριστικά ιόντα-θραύσματα έχουν *m*/*z* 230 και 123.

Τέλος, η DPS η οποία χρησιμοποιήθηκε ως *IS*, έχει σχετική μοριακή μάζα 248 και τα χαρακτηριστικά ιόντα-θραύσματα έχουν *m*/*z* 108, 156 και 92.



Σχήμα 5.8 Χαρακτηριστικά ιόντα-θραύσματα της SDZ και των μεταβολιτών της

Λίγες είναι οι μελέτες που έχουν γίνει σχετικά με την ταυτοποίηση των μεταβολιτών των SDZ και TMP στους ιχθύες. Γενικά, πιστεύεται ότι η AcSDZ είναι ο κύριος μεταβολίτης της SDZ,¹³⁷ αλλά για την TMP δεν έχει αναφερθεί κάτι αντίστοιχο. Έτσι, μια τέτοια μελέτη θα μπορούσε να γίνει χρησιμοποιώντας τα δείγματα των βιολογικών πειραματισμών, ελέγχοντας, ταυτόχρονα, τυχόν διαφοροποιήσεις στους μεταβολίτες όταν οι ιχθύες λαμβάνουν τροφή διαφορετικής σύστασης.
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΩΝ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ– ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ

6.1 Σκοπός της εργασίας

Η SDZ και η TMP χρησιμοποιούνται συχνά στις ιχθυοκαλλιέργειες σε συνδυασμό και σε αναλογία 5:1 (SDZ:TMP)²⁸⁰ σε φαρμακευτικό σκεύασμα το οποίο αναμιγνύεται με τη τροφή των ιχθύων κατά την παρασκευή των. Η Οδηγία *EMEA/CVMP/080/95-FINAL* αναφέρεται στις απαιτήσεις ποιότητας των φαρμακευτικών κτηνιατρικών σκευασμάτων που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν σε ζωοτροφές.²⁸¹

Η Ε.Ε. δίνει, τις τελευταίες δεκαετίες, ιδιαίτερη έμφαση στη προστασία του καταναλωτή από υπολείμματα αντιβιοτικών, έχοντας ορίσει *MRL*s αυτών. Προκειμένου για την SDZ και την TMP οι τιμές αυτές στους ιχθύες είναι 100 και 50 μg kg⁻¹, αντίστοιχα.^{55,58} Επίσης, προκειμένου να διασφαλίζεται η ποιότητα των μετρήσεων των ελέγχων, έχει εκδοθεί από την Ε.Ε. η Οδηγία 2002/657/EC που αφορά στην επίδοση των μεθόδων και την παρουσίαση των αποτελεσμάτων στους επίσημους ελέγχους υπολειμμάτων σε προϊόντα ζωϊκής προέλευσης.⁶³

Σκοπός της παρούσας διατριβής ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό της SDZ, της TMP και του κύριου μεταβολίτη της SDZ, την AcSDZ, με εσωτερικό πρότυπο την DPS, σε ιστούς ιχθύων. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκε σύστημα *LC/MS* με την τεχνική παρακολούθησης ενός ιόντος για κάθε αναλύτη (*Single lon Monitoring, SIM*) και μετρώντας θετικά ιόντα (*positive ion mode*). Εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης (*gradient elution programme*) για τον καλύτερο διαχωρισμό των αναλυτών μεταξύ των, αλλά και με τις ουσίες των μητρικών υλικών. Η στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *XTerra MS C*₁₈, με διαστάσεις 2,1×100 mm και μεγέθους πόρων των σωματιδίων 3,5 μm.

Οι αναλύτες εκχυλίστηκαν με ύδωρ από τους ιστούς σάρκας με δέρμα και ήπατος με το σύστημα ASE. Στη συνέχεια, τα δείγματα καθαρίστηκαν με SPE χρησιμοποιώντας στήλες Nexus 60 mg/3 mL. Οι αναλύτες εκχυλίστηκαν από τον ορό αίματος με LLE χρησιμοποιώντας οξικό αιθυλεστέρα. Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν, επικυρώθηκαν σύμφωνα με την Οδηγία 2002/657/EC, ακολουθώντας, ταυτόχρονα, διαδικασία για τον προσδιορισμό του "matrix effect" και του "relative matrix effect".

Οι μέθοδοι αυτές, εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό των αναλυτών σε ιστούς τσιπούρας που ελήφθησαν από βιολογικούς πειραματισμούς του Ευρωπαϊκού Προγράμματος "AQUAMAX". Εκτράφησαν τσιπούρες με δύο διαφορετικές δίαιτες, η μία με κύριο συστατικό το ιχθυέλαιο και η άλλη περιελάμβανε αντικατάσταση μέρους του ιχθυελαίου με φυτικά έλαια. Και στις δύο περιπτώσεις, η φαρμακούχος ιχθυοτροφή περιελάμβανε SDZ και TMP σε αναλογία 5:1. Προσδιορίστηκαν οι συγκεντρώσεις των αναλυτών στους τρεις ιστούς (σάρκα με δέρμα, ήπαρ, ορός) και υπολογίστηκαν οι χρόνοι αποδρομής των σε ιστούς σάρκας με δέρμα με το στατιστικό πρόγραμμα WT1.4.

6.2 Εξοπλισμός-Οργανολογία

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω όργανα:

<u>Σύστημα υγροχρωματογραφίας</u>: χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο 2695 Alliance Waters Separations Module της εταιρείας Waters (Milford, USA). Ο υγροχρωματογράφος αυτός με ενιαίο σύστημα διαχείρισης διαλυτών και δείγματος, αποτελείτο από προγραμματιζόμενη αντλία βαθμιαίας έκλουσης τεσσάρων διαλυτών με ανάμιξη χαμηλής πίεσης (quaternary pump), ενσωματωμένο δειγματολήπτη (autosampler) αυτόματης διαχείρισης δειγμάτων με κλειστό και θερμοστατούμενο θάλαμο προστατευόμενο από την έκθεση στο φως, ενσωματωμένο σύστημα απαέρωσης με κενό τεσσάρων διαλυτών (degasser), τμήμα ψύξης/θέρμανσης της αναλυτικής στήλης (Column Heater/Cooler Module for 2695 Separations Module) και βρόχο εισαγωγής δείγματος (loop) 50 μL. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η XTerra MS C_{18} , διαστάσεων 100,0×2,1 mm i.d. και μεγέθους σωματιδίων 3,5 μm, της εταιρείας Waters (Massachusetts, USA). Σύστημα φασματομετρίας μαζών: ήταν της εταιρείας Micromass (Manchester, UK) μοντέλο ZQ 2000 με απλό τετράπολο (single quadrupole mass spectrometer). Το λογισμικό πρόγραμμα ελέγχου και επεξεργασίας των δεδομένων ήταν το MassLynx V4.1 με ενσωματωμένες εφαρμογές (Application Managers), μεταξύ των οποίων το QuanLynx που χρησιμοποιήθηκε για την ποσοτικοποίηση των δεδομένων.

Στην εικόνα 6.1 φαίνεται το σύστημα *LC/MS* που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία.



Εικόνα 6.1 Σύστημα *LC/MS Alliance* 2695–*Z*Q 2000 (*Waters/Micromass*)

<u>Περιστροφική αντλία παραγωγής υψηλού κενού</u>: χρησιμοποιήθηκε η αντλία BOC Edwards E2M28 Rotary Vacuum Pumps της εταιρείας BOC Edwards (West Sussex, UK).

<u>Γεννήτρια παραγωγής αζώτου</u>: χρησιμοποιήθηκε η γεννήτρια Peak Scientific Instruments Ltd μοντέλο NM30LA της εταιρείας Peak (Scotland, UK).

Σύστημα επιταχυνόμενης εκχύλισης: χρησιμοποιήθηκε σύστημα επιταχυνόμενης εκχύλισης (Accelerated Solvent Extractor, ASE) μοντέλο ASE 200 της εταιρείας Dionex (Sunnyvale, CA, USA). Χρησιμοποιήθηκαν κυψελίδες (cell) όγκου 11 mL και φίλτρα GLASS MICROFIBRE GF/B διαμέτρου 21 mm της εταιρείας Whatman. Στην εικόνα 6.2 φαίνεται το σύστημα επιταχυνόμενης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή.



Εικόνα 6.2 Σύστημα επιταχυνόμενης εκχύλισης ASE 200 (Dionex)

Σύστημα εκχύλισης στερεάς φάσης: ο καθαρισμός των δειγμάτων σάρκας με δέρμα και ήπατος μετά από την εκχύλιση με το ASE, έγινε με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) χρησιμοποιώντας στήλες Abselut Nexus (60 mg/3 mL) της εταιρείας Varian (Middelberg), και μετέπειτα της εταιρείας Agilent Technologies. Η διαδικασία έγινε με τη συσκευή Visiprep DL της εταιρείας Supelco (Sigma-Aldrich), η δε παραγωγή του απαιτούμενου κενού επετεύχθη με την αντλία ROTAVAC valve control της εταιρείας Heidolph Instruments.

Χρησιμοποιήθηκαν ακόμα τα εξής όργανα:

Ψυχόμενη φυγόκεντρος μοντέλο RC 2-B της εταιρείας Sorval.

<u>Σύστημα εξάτμισης διαλυτών</u> με άζωτο μοντέλο *TurboVap Evaporator* (*Caliper*) της εταιρείας *Zymark*.

<u>Ηλεκτρονικός ζυγός</u> τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας Sartorius μοντέλο ED 2245.

<u>Ηλεκτρονικός ζυγός</u> πέντε δεκαδικών ψηφίων της εταιρείας Mettler Toledo μοντέλο XS 105.

Λουτρό υπερήχων SONICA, Ultrasonic Cleaner της εταιρείας SOLTEC.

Πολυκόφτης κουζίνας Singer Multi.

<u>Ομογενοποιητής</u> ΙΚΑ ULTRA-TURRAX T25 digital, με στέλεχος 8G, της εταιρείας ΙΚΑ.

<u>Ομογενοποιητής</u> Heidolph RZR 2020, με στέλεχος Potter-Teflon homogenizer, της εταιρείας Heidolph Instruments.

Πεχάμετρο μοντέλο PHM 210 MeterLab της εταιρείας RadioMeter.

<u>Αυτόματες πιπέτες</u> Eppendorf Research 10-100 μL και Brand Transferpette S 100-1000 μL και 0,5-5 mL.

Δοσομετρητής διαλυτών (dispenser) Dispensett Organic, Analog 1-10 mL της εταιρείας Brand.

Μηχανικός αναδευτήρας (vortex) μοντέλο Stuart SA8 της εταιρείας Bibby Scientific.

Συσκευή διήθησης-απαέρωσης διαλυτών κινητής φάσης που διαθέτει ηθμούς Durapore *PVDF* διαμέτρου πόρων 0,45 μm της εταιρείας *Millipore*.

Συσκευή αντίστροφης ώσμωσης για την παραγωγή απιονισμένου ύδατος Elix 3 της εταιρείας Millipore.

Συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού ύδατος ειδικής αγωγιμότητας 18,2 ΜΩ×cm Simplicity 185 της εταιρείας Millipore που τροφοδοτείτο με ύδωρ από τη συσκευή αντίστροφης ώσμωσης.

Τα διαλύματα των δειγμάτων φιλτράρονταν με φίλτρα *Millex-GV* (διαμέτρου πόρων 0,22 μm και διαμέτρου φίλτρου 4 mm) υλικού *PVDF* (*Low protein Binding Durapore Membrane*) της εταιρείας *Millipore*.

6.3 Πρότυπες ουσίες-Αντιδραστήρια-Διαλύτες

6.3.1 Πρότυπες ουσίες

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής πρότυπες ουσίες (σκόνες):

- Σουλφαδιαζίνη (2-σουλφονυλ-αμιδο-πυριμιδίνη) καθαρότητας 99,7 % (VETRANAL), της εταιρείας Fluka,
- Τριμεθοπρίμη (2,4-διαμινο-5-(3,4,5-τριμεθοξυ-βενζυλ)-πυριμιδίνη) καθαρότητας

99,5 % (VETRANAL), της εταιρείας Fluka,

- *N*⁴-Ακετυλο-σουλφαδιαζίνη (*N*⁴-ακετυλο-2-σουλφονυλαμιδο-πυριμιδίνη) καθαρότητας
 90 %, της εταιρείας *Maybridge*,
- Δαπσόνη (4-(4-αμινο-βενζυλ)-σουλφονυλ-ανιλίνη) καθαρότητας 98,4 % (VETRANAL), της εταιρείας Fluka,
- Σουλφα-μεθοξυ-διαζίνη (5-μεθοξυ-2-σουλφανιλαμιδο-πυριμιδίνη) καθαρότητας 99,9
 % (VETRANAL), της εταιρείας Fluka.

6.3.2 Φαρμακούχα σκευάσματα

 Φαρμακούχο πρόμιγμα TRIMETHOPRIM-SULPHADIAZINE 50 % (σύστασης 83,3 g τριμεθοπρίμης και 416,7 g σουλφαδιαζίνης ανά kg προϊόντος) (VETHELLAS A.E.B.E.).

6.3.3 Στερεά αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής στερεά αντιδραστήρια:

- Θειικό μαγνήσιο (MgSO₄), άνυδρο, καθαρότητας > 99,5 %,
- Διένυδρο κιτρικό νάτριο, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας,
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας,
- Οξικό νάτριο (CH₃COONa), άνυδρο, καθαρότητας Ευρωπαϊκής Φαρμακοποϊίας,
- Δισοξινο-φωσφορικό κάλιο (KH₂PO₄),
- Οξικό αμμώνιο (CH₃COONH₄),
- Μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH₄), καθαρότητας 97 %,
- Θειικό νάτριο (Na₂SO₄), άνυδρο, καθαρότητας Αμερικανικής Φαρμακοποϊίας.

6.3.4 Υγρά αντιδραστήρια-διαλύτες

Χρησιμοποιήθηκαν οι εξής διαλύτες:

- *n*-πεντάνιο, CH₃(CH₂)₃CH₃, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, της εταιρείας Merck,
- *n*-εξάνιο, CH₃(CH₂)₄CH₃, καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck,
- *n*-επτάνιο, CH₃(CH₂)₅CH₃, καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck,
- *n*-επτάνιο, CH₃(CH₂)₅CH₃, αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, της εταιρείας SDS Carlo Erba,
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Acros Organics,
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), καθαρότητας HPLC gradient grade, της εταιρείας Merck,
- Μεθανόλη (CH₃OH), καθαρότητας HPLC gradient grade, της εταιρείας Merck,
- Ακετονιτρίλιο (CH₃CN), καθαρότητας LC MS, της εταιρείας Sigma-Aldrich,
- Μεθανόλη (CH₃OH), καθαρότητας LC MS, της εταιρείας Sigma-Aldrich,

- Διχλωρομεθάνιο (CH₂Cl₂), καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Merck,
- Οξικός αιθυλεστέρας (CH₃COOC₂H₃), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, της εταιρείας Merck,
- Υδωρ (H₂O), καθαρότητας HPLC (υπερκαθαρό), παραγόμενο από Elix 3 και Simplicity 185, της εταιρείας Millipore,
- Φαινοξυ-αιθανόλη, GR–Phenoxyethanol, της εταιρείας Pharmaqua.

Χρησιμοποιήθηκαν τα εξής οξέα και βάσεις:

- Τριχλωροξικό οξύ (CCI₃COOH), αναλυτικού βαθμού καθαρότητας, της εταιρείας Fluka,
- Οξικό οξύ παγόμορφο (CH₃COOH), καθαρότητας Ευρωπαϊκής Φαρμακοποϊίας, της εταιρείας Panreac,
- Ορθοφωσφορικό οξύ (H_3PO_4), καθαρότητας > 85%, της εταιρείας Fisher Scientific,
- Μυρμηκικό οξύ (HCOOH), καθαρότητας 98 %, της εταιρείας Fluka,
- Υδροχλωρικό οξύ (HCl) συγκέντρωσης 1 mol L⁻¹, της εταιρείας Chem-Lab NV,
- Τριφθοροξικό οξύ (TF₃COOH), καθαρότητας HPLC, της εταιρείας Fisher Scientific.
- Αμμωνία 25 % (Reag. USP, Ph. Eur.) PA, της εταιρείας Panreac.

6.3.5 Διάφορα άλλα υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης τα υλικά:

- ISOLUTE MSPDC₁₈, της εταιρείας Biotage AB,
- PSA Bonded Silica (πρωτοταγής-δευτεροταγής αμίνη), της εταιρείας Supelco,
- «Άμμος θαλάσσης» μεγέθους σωματιδίων ~0,25-0,30 mm, της εταιρείας Panreac,
- Αλουμίνα (Al₂O₃), της εταιρείας Agilent Technologies,
- «Γη διατόμων» (100 %) ASE Prep DE, μεγέθους σωματιδίων 13 μm, της εταιρείας Dionex,
- Bondesil C₁₈, της εταιρείας Varian,
- Άζωτο αέριο καθαρότητας 99,99 %.

Εκτός από τις στήλες Nexus (60 mg/3 mL), χρησιμοποιήθηκαν και οι εξής στήλες SPE:

- Oasis HLB 60 mg/3 mL, της εταιρείας Waters,
- Supel-Select HLB 60 mg/3 mL, της εταιρείας Supelco,
- Strata-X Polymeric RP 200 mg/3 mL, της εταιρείας Phenomenex,

- ATOLL 60 mg/3 mL, της εταιρείας Interchim,
- Isolute C18 (EC) 500 mg/3 mL, της εταιρείας Biotage,
- Discovery SPE RP DSC-18 500 mg/3 mL, της εταιρείας Supelco,
- Strata-X-C Polymeric RP 60 mg/3 mL, της εταιρείας Phenomenex.

6.4 Διαλύματα παρακαταθήκης και εργασίας

6.4.1 Διαλύματα παρακαταθήκης

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα παρακαταθήκης (stock solutions):

Διάλυμα παρακαταθήκης σουλφαδιαζίνης συγκέντρωσης 0,1 mg mL⁻¹ (ή 0,25 mg mL⁻¹):

ζυγίζονται με ακρίβεια (5,0 ± 0,1) mg πρότυπης ουσίας SDZ σε ογκομετρική φιάλη 50,0 mL (ή 20,0 mL). Προστίθεται ποσότητα MeOH καθαρότητας *HPLC* και με τη βοήθεια του λουτρού υπερήχων και του μηχανικού αναδευτήρα διαλύνται πλήρως οι κόκκοι της SDZ. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται με MeOH μέχρι της χαραγής. Το διάλυμα μεταφέρεται σε μικρά φιαλίδια (*vials*) τα οποία φυλάσσονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία -20 °C. Παρασκευάζεται φρέσκο διάλυμα κάθε τρεις μήνες (λεπτομέρειες για τη σταθερότητα των διαλυμάτων αναφέρονται στο κεφάλαιο 10).

Διάλυμα παρακαταθήκης τριμεθοπρίμης 0,1 mg mL⁻¹ (0,25 mg mL⁻¹): όπως το διάλυμα σουλφαδιαζίνης.

Διάλυμα παρακαταθήκης ακετυλο-σουλφαδιαζίνης 0,1 mg mL⁻¹ (ή 0,25 mg mL⁻¹): όπως το διάλυμα σουλφαδιαζίνης.

Διάλυμα παρακαταθήκης δαπσόνης 0,1 mg mL⁻¹ (ή 0,25 mg mL⁻¹): όπως το διάλυμα σουλφαδιαζίνης.

Διάλυμα παρακαταθήκης σουλφαμέτερ 0,1 mg mL⁻¹: όπως το διάλυμα σουλφαδιαζίνης.

6.4.2 Διαλύματα εργασίας

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα εργασίας (working solutions):

6.4.2.1 Εύρος συγκεντρώσεων Α

- 1 25 ng / mL διαλύματος του μίγματος κινητής φάσης (Dilution Solvent, DS) ή διαλύματος του μητρικού υλικού (matrix) ή g ιστού ιχθύος (για την SDZ και την AcSDZ),
- 0,1 25 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την TMP),
- 50 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την DPS).

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης της SDZ και της AcSDZ παρασκευάστηκε ενδιάμεσο διάλυμα μίγματος των δυο αναλυτών συγκέντρωσης 10000 ng mL⁻¹. Παρασκευάστηκαν, επίσης, ενδιάμεσα διαλύματα της ίδιας συγκέντρωσης της TMP και της DPS. Για την παρασκευή των διαλυμάτων αυτών χρησιμοποιήθηκε μίγμα H₂O/MeOH με αναλογία 90/10 % (v/v).

Από τα ενδιάμεσα διαλύματα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας συγκεντρώσεων 10 - 250 ng mL⁻¹ (για την SDZ και την AcSDZ) και 1 - 250 ng mL⁻¹ (για την TMP) και 500 ng mL⁻¹ (για την DPS) χρησιμοποιώντας το μίγμα H₂O/MeOH με αναλογία 90/10 % (v/v). Τα διαλύματα εργασίας χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των διαλυμάτων της καμπύλης αναφοράς (*neat calibration standards*) και τον εμβολιασμό (*spike*) των δειγμάτων της καμπύλης αναφοράς (*matrix calibration standards*) και των υπόλοιπων παραμέτρων ποιότητας κατά τη διαδικασία της επικύρωσης της μεθόδου.

6.4.2.2 Εύρος συγκεντρώσεων Β

- 25 200 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την SDZ και την AcSDZ),
- 12,5 200 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την TMP),
- 50 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την DPS).

Από τα ενδιάμεσα διαλύματα παρασκευάστηκαν τα διαλύματα εργασίας συγκεντρώσεων 250 - 2000 ng mL⁻¹ (για την SDZ και την AcSDZ) και 125 - 2000 ng mL⁻¹

¹ (για την TMP) και 500 ng mL⁻¹ (για την DPS) χρησιμοποιώντας το μίγμα H₂O/MeOH με αναλογία 90/10 % (v/v).

6.4.2.3 Εύρος συγκεντρώσεων Γ

- 150 10000 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την SDZ και την AcSDZ),
- 75 10000 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την TMP),
- > 50 ng / mL DS ή διαλύματος του μητρικού υλικού ή g ιστού ιχθύος (για την DPS).

Από τα διαλύματα παρακαταθήκης της SDZ, της AcSDZ, της TMP και της DPS παρασκευάστηκαν απευθείας τα διαλύματα εργασίας συγκεντρώσεων 1500 - 100000 ng mL⁻¹ (για την SDZ και την AcSDZ) και 750 - 100000 ng mL⁻¹ (για την TMP) και 500 ng mL⁻¹ (για την DPS) χρησιμοποιώντας το μίγμα $H_2O/MeOH$ με αναλογία 90/10 % (v/v).

6.5 Βελτιστοποίηση του συστήματος υγροχρωματογραφίας

6.5.1 Εισαγωγή

Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες για τον προσδιορισμό των SDZ, TMP, και AcSDZ με /S την DPS, σε υδατικά διαλύματα και κατόπιν σε διαλύματα ιστών ιχθύων, καθορίστηκαν μετά από τις παρακάτω προκαταρκτικές μελέτες με ισοκρατική έκλουση των διαλυτών της κινητής φάσης:

- ✓ Μελέτη της επίδρασης της αναλογίας του οργανικού τροποποιητή στον χρόνο συγκράτησης, τον παράγοντα χωρητικότητας (k) και στη διαχωριστικότητα (R_s) των αναλυτών,
- ✓ Μελέτη της επίδρασης του pH της κινητής φάσης στις ανωτέρω παραμέτρους.

Μελετήθηκε, επίσης, η χρήση διαφορετικών οξέων στο μίγμα της κινητής φάσης, ο όγκος έγχυσης (ένεσης) στον υγροχρωματογράφο, η θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης.

Κατά τη διαδικασία της βελτιστοποίησης του υγροχρωματογραφικού συστήματος δόθηκε έμφαση στο σχήμα και στο ύψος των χρωματογραφικών κορυφών, τη διαχωριστικότητα, τον χρόνο έκλουσης των αναλυτών, αλλά και το συνολικό χρόνο ανάλυσης.

Ο πλήρης χρωματογραφικός διαχωρισμός των αναλυτών επετεύχθη με την εφαρμογή ενός προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης των συστατικών της κινητής φάσης. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν η *XTerra MS C*₁₈, με διαστάσεις 100,0×2,1 mm *i.d.* και μεγέθους σωματιδίων 3,5 μm, της εταιρείας *Waters*. Σημειώνεται ότι κατά την ανάπτυξη των μεθόδων δοκιμάστηκαν δύο ουσίες προκειμένου να βρεθεί *IS* για τον προσδιορισμό των SDZ, TMP και AcSDZ: η δαπσόνη (DPS) και η σουλφαμεθοξυδιαζίνη (SME). Από τις ουσίες αυτές, η DPS παρουσίασε καλύτερη χρωματογραφική κορυφή και υψηλότερη ανάκτηση με τη μέθοδο *ASE/SPE* που αναπτύχθηκε, επομένως, επελέχθηκε ως *IS*. Στα αποτελέσματα της βελτιστοποίησης του συστήματος *HPLC* και του συστήματος *MS* που παρουσιάζονται παρακάτω, δίνονται οι τιμές μόνο για την DPS.

6.5.2 Αναλυτική στήλη^{282,283}

Οι στήλες XTerra της εταιρείας Waters κατασκευάζονται με την Τεχνολογία Υβριδικών Σωματιδίων (Hybrid Particle Technology) συνδυάζοντας τα πλεονεκτήματα της σίλικα (υψηλή αποδοτικότητα, υψηλή μηχανική αντοχή) και των πολυμερικών πληρωτικών υλικών (χρησιμοποίηση σε μεγάλο εύρος τιμών *p*H), ενώ ταυτόχρονα περιορίζει τα μειονεκτήματα και των δύο αυτών υλικών. Το εύρος τιμών του *p*H αποδοτικής λειτουργίας των στηλών XTerra είναι 1 - 12, δηλαδή περίπου διπλάσιο του αντίστοιχου των στηλών σίλικα (*p*H 2 - 8). Έτσι, η ανάπτυξη μιας μεθόδου είναι δύο φορές γρηγορότερη και δύο φορές πιο εύκολη, εφ'όσον η μορφή των κορυφών είναι βελτιωμένη, η συγκράτηση είναι αυξημένη και οι διαχωρισμοί είναι καλύτεροι. Οι στήλες XTerra μπορεί να είναι συνδεδεμένες ή μη συνδεδεμένες στατικές φάσεις (εικόνα 6.3). Οι πλέον συνηθισμένες στήλες XTerra είναι οι *C*₈ και *C*₁₈.



Εικόνα 6.3 Στατική φάση XTerra

6.5.3 Παρασκευή της κινητής φάσης

Η κινητή φάση με το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης περιελάμβανε δύο διαλύτες: τον διαλύτη *A* [H₂O που περιείχε μυρμηκικό οξύ (HCOOH) σε αναλογία 0,05 % (v/v)] και το διαλύτη *B* [ACN που περιείχε μυρμηκικό οξύ σε αναλογία 0,05 % (v/v)].

<u>Παρασκευή διαλύτη Α</u>: σε ογκομετρική φιάλη 1000 mL τοποθετείται ποσότητα H₂O (περίπου 500 mL) και προστίθενται 500 *μ*L HCOOH. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι της χαραγής με H₂O και ανακινείται ισχυρά.

<u>Παρασκευή διαλύτη B</u>: σε ογκομετρική φιάλη 1000 mL τοποθετείται ποσότητα ACN (περίπου 500 mL) και προστίθενται 500 *μ*L HCOOH. Η ογκομετρική φιάλη συμπληρώνεται μέχρι της χαραγής με ACN και ανακινείται ισχυρά.

Οι διαλύτες Α και Β διηθώνται-απαερώνονται με τη συσκευή της Millipore.

6.5.4 Βελτιστοποίηση της κινητής φάσης

Κατά τη διαδικασία εύρεσης της βέλτιστης κινητής φάσης δοκιμάστηκαν οι δύο πλέον συνήθεις οργανικοί τροποποιητές στη χρωματογραφία αντιστρόφου φάσεως, η MeOH και το ACN. Οι κινητές φάσεις που δοκιμάστηκαν ήταν μίγματα καθενός εκ των οργανικών διαλυτών με H₂O, σε διάφορες αναλογίες, ενώ κάθε φορά προστίθετο

ΗCOOH σε ποσοστό 0,05 %. Αποφεύχθηκε η χρήση μη πτητικών διαλυτών (π.χ. ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών) ώστε να μη προκληθούν προβλήματα στην πηγή ιονισμού *ESI*, αλλά και στο σύστημα παραγωγής κενού. Η χρήση πτητικών ρυθμιστικών διαλυμάτων δε θεωρήθηκε απαραίτητη, αφού η παρουσία τους δε βελτίωνε τη χρωματογραφική συμπεριφορά των αναλυτών.

Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση του % ποσοστού καθενός εκ των δύο οργανικών τροποποιητών στις χρωματογραφικές παραμέτρους. Η ροή της κινητής φάσης ήταν 0,2 mL min⁻¹, η θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης ήταν 40 °C και ο όγκος έγχυσης (ένεσης) ήταν 5 *μ*L.

Παρατηρήθηκε ότι με αύξηση του % ποσοστού της MeOH και του ACN μειώνεται ο χρόνος συγκράτησης των αναλυτών και του *IS*. Ωστόσο, με τις δοκιμές ισοκρατικής έκλουσης που έγιναν, δεν επετεύχθη διαχωρισμός των SDZ και AcSDZ, οπότε δεν κρίθηκε απαραίτητο να μελετηθεί η επίδραση του *p*H.

Ακολούθησαν δοκιμές βαθμιδωτής έκλουσης με διάφορα προγράμματα, με MeOH και ACN, προκειμένου να διαχωριστούν χρωματογραφικά όλοι οι αναλύτες και το *IS*. Στις δοκιμές αυτές, μελετήθηκε παράλληλα με το % ποσοστό του οργανικού τροποποιητή, η επίδραση της ταχύτητας ροής της κινητής φάσης (από 0,15 έως 0,30 mL min⁻¹), του όγκου έγχυσης (από 5 έως 20 μ L) και της θερμοκρασίας της αναλυτικής στήλης (από 30 έως 50 °C).

Η μελέτη έδειξε ότι χρησιμοποιώντας ACN ως οργανικό τροποποιητή επιτυγχάνεται καλύτερη διαχωριστικότητα μεταξύ των αναλυτών, οι δε χρωματογραφικές κορυφές των, είναι οξύτερες. Επομένως, προτιμήθηκε ως οργανικός τροποποιητής το ACN έναντι της MeOH. Παρατηρήθηκε, επίσης, ότι αυξάνοντας τη θερμοκρασία της αναλυτικής στήλης λαμβάνονταν οξύτερες κορυφές. Προτίμηθηκε, ωστόσο, η θερμοκρασία των 40 °C και όχι υψηλότερη, προκειμένου να μη μειωθεί σημαντικά ο χρόνος ζωής της στήλης.

Ο βέλτιστος όγκος έγχυσης βρέθηκε ίσος με 5 μL επειδή συνδύαζε τη λήψη οξύτερων κορυφών και επαναλήψιμων τιμών επιφάνειας κορυφών, αλλά και τη μικρότερη υποβάθμιση σήματος. Στον αυτόματο δειγματολήπτη επελέχθη η θερμοκρασία των 15 °C. Υψηλότερη θερμοκρασία αποφεύχθηκε προκειμένου να διατηρούνται τα δείγματα μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εντός του δειγματολήπτη κατά τη διάρκεια της ημερήσιας

ανάλυσης. Επίσης, αποφεύχθηκε θερμοκρασία χαμηλότερη των 15 °C προκειμένου να μην παρουσιαστούν προβλήματα διαλυτότητας των αναλυτών.

Το βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης με διαλύτες H₂O και ACN, μαζί με τη βέλτιστη ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, δίνονται στον πίνακα 6.1.

Στο σχήμα 6.1 δίνεται το χρωματογράφημα που ελήφθηκε με τις ανωτέρω βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες (οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του φασματομέτρου μαζών δίνονται στο εδάφιο 6.6). Οι συγκεντρώσεις των ουσιών στο διάλυμα που ενέθηκε είναι εκφρασμένες σε ng ουσίας ανά mL μίγματος H₂O/ACN σε αναλογία 90/10 (v/v) που περιέχει HCOOH σε αναλογία 0,05 % (v/v) (*DS*).

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η χρήση διαφορετικών οξέων στην κινητή φάση, προκειμένου να διευκολυνθεί η πρωτονίωση των αναλυτών. Έτσι, εκτός από το μυρμηκικό οξύ (*Formic Acid, FA*) που χρησιμοποιήθηκε από την αρχή για τη βελτιστοποίηση του συστήματος *HPLC* (αλλά και του συστήματος *MS*), έγιναν δοκιμές με το οξικό οξύ

Χρόνος (min)	Η₂Ο (%) με 0,05% (ν/ν) μυρμηκικό οξύ	ACN (%) με 0,05% (ν/ν) μυρμηκικό οξύ	Κωδικός Κλίσης	Ροή κινητής φάσης (mL min ⁻¹)
0,00	90	10	1	0,20
10,00	2	98	6	0,20
10,50	98	2	6	0,20
17,00	98	2	6	0,20

Πίνακας 6.1 Βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

(Acetic Acid, AcOH) και το τριφθοροξικό οξύ (Trifluoroacetic Acid, TFA). Στο σχήμα 6.2 δίνονται τα υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με τα τρία διαφορετικά οξέα.

Τα χρωματογραφήματα του σχήματος 6.2 ελήφθησαν με τις ανωτέρω βέλτιστες συνθήκες και με διαλύματα ίδιας συγκέντρωσης (100 ng mL⁻¹ *DS*). Επίσης, για κάθε περίπτωση οξέος εφαρμόζονταν οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του *MS* (εδάφιο 6.6). Παρατηρήθηκε μείωση στο σήμα όταν το FA αντικαταστάθηκε από το AcOH και



Σχήμα 6.1 Χρωματογράφημα των υπό μελέτη ουσιών σε *DS* που ελήφθηκε με τις βέλτιστες συνθήκες. Η σειρά έκλουσης των ουσιών (σε παρένθεση δίνεται ο χρόνος συγκράτησης (t_R) και η συγκέντρωση κάθε ουσίας στο διάλυμα) είναι: (1) σουλφαδιαζίνη (t_R =5,34 min, 100 ng mL⁻¹ *DS*), (2) τριμεθοπρίμη (t_R =5,80 min, 50 ng mL⁻¹ *DS*), (3) ακετυλο-σουλφαδιαζίνη (t_R =6,22 min, 100 ng mL⁻¹ *DS*), (4) δαπσόνη (t_R =7,29 min, 50 ng mL⁻¹ *DS*)

περαιτέρω μείωση όταν χρησιμοποιήθηκε το TFA. Επελέχθη, επομένως, η προσθήκη FA στην κινητή φάση, προκειμένου να διευκολυνθεί η πρωτονίωση των μορίων των ουσιών.

Τέλος, μελετήθηκε η επίδραση του *p*H (% ποσοστό του FA) στους χρόνους συγκράτησης των ουσιών εφαρμόζοντας το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν οι εξής συγκεντρώσεις FA: 0,01, 0,05, 0,10 και 0,20 % (v/v).

Στο σχήμα 6.3 δίνονται τα υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις FA στην κινητή φάση. Οι υπόλοιπες χρωματογραφικές συνθήκες είναι οι βέλτιστες. Βέλτιστες είναι και οι συνθήκες του *MS* για κάθε συγκέντρωση του FA.



Σχήμα 6.2 Υπερτιθέμενα χρωματογράφηματα (Α) σουλφαδιαζίνης και (Β) ακετυλο-σουλφαδιαζίνης που ελήφθησαν με τις βέλτιστες συνθήκες *LC/MS* με τα τρία διαφορετικά οξέα. Σε κάθε περίπτωση η συγκέντρωση είναι 100 ng mL⁻¹ *DS*

Παρατηρούμε ότι μεγαλύτερο σήμα λαμβάνεται (και για τις τέσσερις ουσίες) όταν προστίθεται FA σε αναλογία 0,05 % (v/v).

6.6 Βελτιστοποίηση του συστήματος φασματομετρίας μαζών

6.6.1 Εισαγωγή

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η τεχνική ιονισμού με ESI. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται αρκετά συχνά διότι η πηγή ESI συνδυάζεται επιτυχώς με υγροχρωματογραφικό σύστημα και επιτρέπει την ανάλυση δειγμάτων θερμοευαίσθητων ουσιών υψηλής, σχετικά, μοριακής μάζας.

Ο μηχανισμός της διαδικασίας ιονισμού με ηλεκτροδιάχυση δεν είναι αρκετά κατανοητός. Σύμφωνα με μία θεωρία, αρχικά, δημιουργείται αερόλυμα φορτισμένων σταγονιδίων. Με τη βοήθεια ξηραντικού αερίου εξατμίζεται ο διαλύτης, τα σταγονίδια συρρικνώνονται και αυξάνεται η πυκνότητα του ηλεκτρικού φορτίου στην επιφάνειά των.



Σχήμα 6.3 Υπερτιθέμενα χρωματογράφηματα (Α) σουλφαδιαζίνης, (Β) τριμεθοπρίμης, (Γ) ακετυλο-σουλφαδιαζίνης και (Δ) δαπσόνης. Σε παρένθεση δίνεται το % ποσοστό του FA (ν/ν) που προστίθεται στην κινητή φάση. Τα χρωματογραφήματα ελήφθησαν ενίοντας διαλύματα συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹ DS (A, B) και 50 ng mL⁻¹ DS (Γ, Δ) με τις βέλτιστες συνθήκες LC/MS

Τα σταγονίδια διασπώνται σε ολοένα και μικρότερα σταγονίδια (κώνοι *Taylor*), από τα οποία εκροφώνται τα ιόντα. Τα ιόντα αυτά κατευθύνονται μέσω ηλεκτροστατικών φακών προς τον αναλυτή μαζών.^{193,284-288}

Το *ESI* φάσμα μαζών αντιστοιχεί σε στατιστική κατανομή των διαδοχικών κορυφών χαρακτηριστικών των πολλαπλά φορτισμένων μοριακών ιόντων που λαμβάνονται από τη πρωτονίωση [M+zH]^{z+}, χωρίς να συμμετέχουν διαστάσεις και θραυσματοποιήσεις.²⁸⁹ Λαμβάνοντας πολλαπλά φορτισμένα ιόντα βελτιώνεται η ευαισθησία της τεχνικής και επιτρέπεται η ανάλυση μορίων υψηλής μοριακής μάζας με αναλυτές μικρού ορίου ονομαστικής μάζας.^{284,285,290}

6.6.2 Βελτιστοποίηση του συστήματος MS

Στο σύστημα *MS* που χρησιμοποιήθηκε, βρέθηκε αρχικά η βέλτιστη μέθοδος "*Tune*" (βέλτιστες τιμές των παραμέτρων της πηγής και του απλού τετραπόλου) και στη συνέχεια η βέλτιστη μέθοδος *MS* (βέλτιστες τιμές των παραμέτρων για τη λήψη των δεδομένων *MS*).

<u>Μέθοδος "Tune"</u>: Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των SDZ, TMP και AcSDZ, με εσωτερικό πρότυπο την DPS, γινόταν κάθε φορά (ισοκρατική έκλουση με τους δύο οργανικούς τροποποιητές, βαθμιδωτή έκλουση με τους δύο οργανικούς τροποποιητές, χρήση διαφορετικών οξέων στην κινητή φάση, χρήση διαφορετικής συγκέντρωσης μυρμηκικού οξέος κ.λπ.) βελτιστοποίηση του σήματος των πρωτονιωμένων μορίων [M+H]⁺ στο φασματόμετρο μαζών (*positive ion mode*). Αυτό επιτυγχανόταν αρχικά με απ'ευθείας έκχυση πρότυπου διαλύματος συγκέντρωσης 50 ή 100 ng mL⁻¹ (ή δεκαπλάσιας) καθενός εκ των αναλυτών και του *IS*. Η βελτιστοποίηση ολοκληρωνόταν με έκχυση των διαλυμάτων ταυτόχρονα με είσοδο κινητής φάσης στην πηγή του *MS* (μέσω συνδέσμου "*T-fitting*") ώστε να πραγματοποιείται αυτή υπό κανονικές συνθήκες ανάλυσης.

Εφαρμόζοντας τις βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες (πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης κ.λπ.), βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες *MS* του πίνακα 6.2.

Για κάθε αναλύτη χρησιμοποιήθηκε διαφορετικό δυναμικό κώνου. Στον πίνακα 6.3 δίνονται οι τιμές των λόγων *m/z* και τα αντίστοιχα δυναμικά κώνου για κάθε αναλύτη. Στο σχήμα 6.4 δίνονται τα φάσματα μαζών των αναλυτών που ελήφθησαν με τις βέλτιστες συνθήκες.

Στο σχήμα 6.5 δίνονται τα υπερτιθέμενα φάσματα μαζών που ελήφθησαν με έκχυση πρότυπων διαλυμάτων συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹ (SDZ, AcSDZ) και 500 ng mL⁻¹ (TMP, DPS) κατά τη σύγκριση των οξέων που προστίθεντο στο μίγμα της κινητής φάσης. Παρατηρούμε ότι η παρουσία του AcOH αντί του FA προκαλεί μείωση του

Τεχνική Ιονισμού (<i>Ionization Technique</i>)	ES+
Δυναμικό Τριχοειδούς (Capillary Voltage) (kV)	3,00
Δυναμικό Κώνου (Cone Voltage) (V)	πίνακας 6.3
Δυναμικό 2 ^{ου} Κώνου (<i>Extractor Voltage</i>) (V)	4
Φακοί <i>RF</i> (<i>RF Lens</i>) (V)	0,1
Θερμοκρασία Πηγής (Source Temperature) (°C)	120
Θερμοκρασία Αποδιαλύτωσης (Desolvation Temperature) (°C)	450
Παροχή Αερίου Αποδιαλύτωσης (<i>Desolvation Gas Flow</i>) (L h ⁻¹)	600
Παροχή Αερίου στον Κώνο (<i>Cone Gas Flow</i>) (L h ⁻¹)	25
Διαχωριστικότητα Χαμηλών Μαζών (LM Resolution)	15,0
Διαχωριστικότητα Υψηλών Μαζών (HM Resolution)	15,3
Ιοντική Ενέργεια (<i>Ion Energy</i>)	0,3

Πίνακας 6.2 Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων της πηγής και του τετραπόλου

Πίνακας 6.3 Λόγοι *m*/z και δυναμικά κώνου για τους αναλύτες της εργασίας

Ουσία	[M+H] ⁺	Δυναμικό Κώνου (V)
SDZ	251	20
ТМР	291	35
AcSDZ	293	27
DPS (IS)	249	25

σήματος των αναλυτών, η δε παρουσία του TFA προκαλεί περαιτέρω μείωση του σήματος. Το φαινόμενο παρατηρείται πιο έντονα στην SDZ και στην AcSDZ. Φαίνεται, λοιπόν, ότι είναι προτιμότερο να προστεθεί FA και όχι AcOH ή TFA κατά την ανάλυση δειγμάτων για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών αυτών.



Σχήμα 6.4 Φάσματα μαζών των αναλυτών: (Α) σουλφαδιαζίνης, (Β) τριμεθοπρίμης, (Γ) ακετυλο-σουλφαδιαζίνης, και (Δ) δαπσόνης, που ελήφθησαν με έκχυση διαλύματος συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹ (SDZ, AcSDZ) και 500 ng mL⁻¹ (TMP, DPS) στις βέλτιστες συνθήκες. Σε κάθε φάσμα η φασματική γραμμή με τη μέγιστη ένταση αντιστοιχεί στο πρωτονιωμένο μόριο του πίνακα 6.3

<u>Μέθοδος MS</u>: Κατά τη διάρκεια της χρωματογραφικής ανάλυσης εφαρμόζονταν οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του MS. Για τη λήψη των δεδομένων χρησιμοποιήθηκε η τεχνική SIM, κατά την οποία μετράται ένα μόνο ιόν (πιο σωστά ένας λόγος *m/z*) για κάθε αναλύτη, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μεγαλύτερη εκλεκτικότητα κατά τον προσδιορισμό των ουσιών. Ταυτόχρονα, γινόταν σάρωση των μαζών σε εύρος 100 - 500 *m/z*.

Να σημειωθεί, τέλος, ότι δοκιμάστηκε και η τεχνική ιονισμού με *ESI* προκειμένου να μετρώνται αρνητικά ιόντα (*ES*-), χωρίς, όμως, να ανιχνευθούν αποπρωτονιωμένα μόρια των αναλυτών [M-H]⁻ και επομένως, εγκαταλήφθηκε η προσπάθεια.



Σχήμα 6.5 Υπερτιθέμενα φάσματα μαζών των αναλυτών: (A) σουλφαδιαζίνης, (B) τριμεθοπρίμης, (Γ) ακετυλο-σουλφαδιαζίνης, και (Δ) δαπσόνης, που ελήφθησαν με έκχυση διαλύματος συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹ (SDZ, AcSDZ) και 500 ng mL⁻¹ (TMP, DPS) με τα τρία διαφορετικά οξέα (FA, AcOH, TFA). Παρατηρείται μείωση του σήματος των αναλυτών στην περίπτωση του AcOH και μεγαλύτερη μείωση με τη προσθήκη του TFA

6.7 Βέλτιστες συνθήκες του συστήματος υγροχρωματογραφίας-φασματομετρίας μαζών

Συνοψίζοντας, οι βέλτιστες συνθήκες του συστήματος *LC/MS* για τον προσδιορισμό των SDZ, TMP και AcSDZ, με *IS* την DPS, είναι:

- Στατική φάση: αναλυτική στήλη XTerra MS C₁₈, με διαστάσεις 100,0×2,1 mm *i.d.* και μεγέθους σωματιδίων 3,5 μm, της εταιρείας Waters, θερμοστατούμενη στους 40 °C,
- Κινητή φάση: H₂O και ACN που περιέχουν FA σε ποσοστό 0,05 % (v/v). Εφαρμογή του προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης του πίνακα 6.1,
- Όγκος ένεσης: 5 μL,
- Θερμοκρασία θαλάμου αυτόματου δειγματολήπτη: 15 °C,
- Ανιχνευτής: MS ρυθμισμένο να μετρά επιλεγμένα ιόντα (SIM), τα πρωτονιωμένα μόρια [M+H]⁺ των αναλυτών (positive mode, ESI+). Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων δίνονται στον πίνακα 6.2.

Τα πρωτονιωμένα μόρια των αναλυτών και τα αντίστοιχα δυναμικά κώνου που εφαρμόζονται, δίνονται στον πίνακα 6.3.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΣΑΡΚΑΣ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ

7.1 Ανάπτυξη μεθοδολογίας Εκχύλισης Στερεάς Φάσης (SPE)

7.1.1 Εισαγωγή

Η SPE χρησιμοποιείται συχνά κατά την κατεργασία ενός δείγματος, αφ'ενός για τον καθαρισμό από διάφορες προσμίξεις, αφ'ετέρου για την προσυγκέντρωση των αναλυτών. Η αποδοτικότητα στον καθαρισμό του δείγματος επηρεάζει άμεσα την υποβάθμιση του σήματος, φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στη φασματομετρία μαζών όταν τα ιόντα παράγονται με μηχανισμό *ESI*.

Η επιλογή του υποστρώματος (sorbent) στην SPE είναι καθοριστική επειδή επιδρά στην αποδοτικότητα της μεθόδου (εκλεκτικότητα, συγγένεια και χωρητικότητα). Η επιλογή εξαρτάται από τους προς προσδιορισμό αναλύτες και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ του υποστρώματος και των δραστικών ομάδων των αναλυτών. Εξαρτάται, επίσης, από το είδος του μητρικού υλικού του δείγματος και τις αλληλεπιδράσεις, τόσο με το υπόστρωμα, όσο και με τους αναλύτες.²⁹¹⁻²⁹³

Σε δείγματα με ουσίες διαφορετικής πολικότητας, οι πολικοί αναλύτες περιπλέκουν την επιλογή του καταλληλότερου υποστρώματος *SPE*.²⁹⁴ Στην παρούσα εργασία, το μίγμα των αναλυτών χαρακτηρίζεται από μεγάλο εύρος πολικότητας, δεδομένου ότι η SDZ έχει πολύ πιο υδρόφιλο μόριο (*log* K_{ow} -0,09) σε σχέση με την TMP (*log* K_{ow} 0,91) και το εσωτερικό πρότυπο DPS (*log* K_{ow} 0,97), τα οποία έχουν πιο λιπόφιλα μόρια (πίνακας 7.1). Έτσι, το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί στη διαδικασία *SPE* για τον καθαρισμό του δείγματος, θα πρέπει να συγκρατεί, τόσο υδρόφιλα, όσο και λιπόφιλα μόρια.

Επιπλέον του εύρους της πολικότητας των αναλυτών, το *p*H του δείγματος αποτελεί σημαντικό παράγοντα, ειδικά στην περίπτωση που οι αναλύτες είναι αμφολύτες.²⁹⁸ Από τη χημική δομή του μορίου της SDZ (σχήμα 4.3), βλέπουμε ότι η SDZ έχει δύο ομάδες

Αναλύτης	Εμπειρικός Τύπος	CAS no.	рК _а	$\log K_{ow}$
SDZ	$\begin{array}{c} C_{10}H_{10}N_4O_2S\\ C_{14}H_{18}N_4O_3\\ C_{12}H_{12}N_4O_3S\\ C_{12}H_{12}N_2O_2S \end{array}$	68-35-9	2,10/6,28 ²⁹⁵	-0,09 ²⁹⁷
TMP		738-70-5	3,23/6,76 ²⁹⁵	0,91 ²⁹⁷
AcSDZ		127-74-2	5,86 ²³⁸	0,48 ¹⁸²
DPS		80-08-0	1 ²⁹⁶	0,97 ²⁹⁶

Πίνακας 7.1 Φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό εξέταση αναλυτών

όπου μπορεί να γίνει διάσταση: μια όξινη ομάδα αμιδίου (N^1) και μια βασική ομάδα αμινομάδας (N^4). Συμπεριφέρεται, δηλαδή, ως αμφολύτης. Το άτομο αζώτου της αμινομάδας (-NH₂) μπορεί να δεχθεί ένα πρωτόνιο (H¹), ενώ το άτομο αζώτου του αμιδίου (-SO₂NH-) μπορεί να δώσει πρωτόνιο κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες *p*H. Έτσι, η πρώτη ισορροπία διάστασης αναφέρεται στη διάσταση της αμινομάδας (pK_{a1}) και η δεύτερη ισορροπία στη διάσταση της σουλφοναμιδο-ομάδας (pK_{a2}). Η SDZ είναι θετικά φορτισμένη υπό όξινες συνθήκες, αρνητικά φορτισμένη υπό αλκαλικές συνθήκες και ουδέτερη σε ενδιάμεσες τιμές *p*H (γύρω από την τιμή 4). Στο σχήμα 7.1 δίνονται οι ισορροπίες διάστασης της SDZ και στο σχήμα 7.2 φαίνεται το διάγραμμα που δίνει το % ποσοστό κλάσματος ιονισμένης και μη ιονισμένης μορφής της SDZ σε συνάρτηση με το *p*H.

Όπως βλέπουμε στο σχήμα 7.2 το κλάσμα της SDZ που βρίσκεται υπό μορφή διπολικού ιόντος είναι αμελητέο σε σχέση με την ουδέτερη μορφή, εξαιτίας της μεγάλης τιμής της σταθεράς ταυτομέρειας (*K*_t). Οι τιμές *p*K_{a1} και *p*K_{a2} της SDZ δίνονται στον πίνακα 7.1.

Η TMP χαρακτηρίζεται, επίσης, από δύο τιμές *p*K_a που αντιπροσωπεύουν την πρωτονίωση των δύο ετεροκυκλικών ατόμων αζώτου (*N*¹ και *N*³).

Η AcSDZ χαρακτηρίζεται από μία μόνο σταθερά διάστασης (*p*K_a 5,86) που αντιπροσωπεύει την αποπρωτονίωση της σουλφοναμιδο-ομάδας (-SO₂NH-).²⁹⁹ Η πρωτονίωση της αμινομάδας που παρατηρείται στην SDZ δεν είναι δυνατή επειδή σε



Σχήμα 7.1 Ισορροπίες διάστασης της SDZ όπου φαίνεται και το επαγωγικό φαινόμενο της σουλφονυλ-ομάδας (-SO₂)



Σχήμα 7.2 Κλάσματα ιονισμένης και μη ιονισμένης δομής της SDZ σε συνάρτηση με το *p*H σε υδατικό διάλυμα

αυτή την ομάδα το μόριο υπέστη ακετυλίωση. Έτσι, ανάλογα με το *p*H, η AcSDZ μπορεί να υφίσταται υπό μορφή ανιόντος ή υπό μορφή ουδέτερου μορίου (σχήμα 7.3).

Τέλος, η DPS, η χημική δομή της οποίας δίνεται στο σχήμα 7.4, δύναται να αποβάλλει ένα πρωτόνιο (H¹) από τη μία αρωματική αμινομάδα (συμπεριφέρεται ως οξύ και χαρακτηρίζεται από *p*K_a με τιμή 1) αλλά και να προσλάβει ένα πρωτόνιο από την άλλη



Σχήμα 7.3 Κλάσματα ιονισμένης και μη ιονισμένης δομής της AcSDZ σε συνάρτηση με το *p*H σε υδατικό διάλυμα

αρωματική αμινομάδα (συμπεριφέρεται ως βάση και χαρακτηρίζεται από *p*K_b με τιμή 13).²⁹⁶

Εξαιτίας της διαφορετικής πολικότητας των αναλυτών αλλά και του αμφολυτικού χαρακτήρα ορισμένων εξ'αυτών (π.χ. η SDZ) είναι σημαντικό να επιλεγεί η κατάλληλη τιμή για το *p*H του δείγματος και το κατάλληλο υλικό υποστρώματος *SPE*. Από τις τιμές *p*K_a του πίνακα 7.1 μπορούμε να πούμε ότι *p*H με τιμή 4 είναι η βέλτιστη για όλες τις ουσίες, ώστε αυτές να είναι σε ουδέτερη μορφή, προκειμένου να χρησιμοποιηθεί διαδικασία *SPE* αντιστρόφου φάσεως.



Σχήμα 7.4 Χημική δομή της DPS

Οι στήλες Abselut Nexus κατασκευάζονται από ένα συμπολυμερές υλικό με ισορροπημένο λόγο των δύο μονομερών: του υδρόφιλου Ν-βινυλ-πυρρολιδόνη και του λιπόφιλου δι-βινυλ-βενζόλιο³⁰⁰ (σχήμα 7.5). Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διαδικασία SPE αντιστρόφου φάσεως για τη συγκράτηση, τόσο υδρόφιλων, όσο και

λιπόφιλων μορίων, όξινων, ουδέτερων και βασικών ουσιών. Ο μηχανισμός συγκράτησης στηρίζεται κυρίως σε μη-πολικές αλληλεπιδράσεις (δυνάμεις *Van de Waals* ή δυνάμεις διασποράς) μεταξύ δεσμών C-H των μορίων των αναλυτών και δεσμών C-H του υποστρώματος. Ωστόσο, ο πολικός χαρακτήρας της *N*-βινυλπυρρολιδόνης διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις με ένα συστατικό που φέρει πολικές ομάδες (π.χ. δημιουργία δεσμών υδρογόνου).³⁰¹ Οι στήλες *Abselut Nexus* χαρακτηρίζονται από υψηλή αντοχή σε ακραίες τιμές *p*H και εξαιρετική χωρητικότητα για τη συγκράτηση μεγάλου εύρους πολικών αναλυτών.



Σχήμα 7.5 Ισορροπία της υδρόφιλης *Ν*-βινυλ-πυρρολιδόνης και του λιπόφιλου δι-βινυλο-βενζολίου στο συμπολυμερές των στηλών *Abselut Nexus*. Χαρακτηριστικά πληρωτικού υλικού: μέσο εμβαδό επιφάνειας 575 m² g⁻¹, μέγεθος πόρων 100 Å, μέγεθος σωματιδίων 70 μm (σφαιρικά)

Κρίσιμη είναι, τέλος, και η επιλογή της μάζας του υποστρώματος (sorbent mass) στη στήλη SPE. Θα πρέπει να είναι κατάλληλη ώστε να συγκρατεί τα μόρια των αναλυτών κατά το στάδιο της «φόρτωσης» του δείγματος. Μη ικανοποιητική μάζα υποστρώματος οδηγεί σε «υπερφόρτωση» της στήλης με αποτέλεσμα να λαμβάνονται χαμηλές ή μη επαναλήψιμες τιμές ανάκτησης, λόγω απώλειας των αναλυτών κατά το στάδιο της «φόρτωσης». Ωστόσο, όταν η μάζα είναι αρκετά μεγαλύτερες ποσότητες διαλύτη (για

την έκλουση των αναλυτών) και μπορεί να οδηγήσει σε χαμηλές τιμές ανάκτησης.²⁹² Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες *Abselut Nexus* μάζας υποστρώματος 60 mg και όγκου στήλης 3 mL (60 mg/ 3 mL). Η συγκεκριμένη στήλη θεωρήθηκε ικανή δεδομένου ότι σε αυτήν «φορτώνεται» κλάσμα όγκου 4 mL από το εκχύλισμα όγκου 20 mL (όπως περιγράφεται παρακάτω, κατά την ανάπτυξη της μεθόδου *ASE*).

7.1.2 Ανάπτυξη της μεθόδου SPE

Προκειμένου να ελεγχθεί η καταλληλότητα των στηλών *Nexus* (υλικό υποστρώματος αλλά και μέγεθος στηλών) και στη συνέχεια να βρεθεί η βέλτιστη μέθοδος *SPE* για τον καθαρισμό δείγματος σάρκας με δέρμα ιχθύος, έγιναν αρχικά δοκιμές με υδατικά διαλύματα των αναλυτών. Στο στάδιο αυτό ελέγχθηκαν, επιπλέον, οι στήλες *Oasis HLB* και *Strata X*, που αποτελούνται από παρόμοιας δομής πολυμερικό πληρωτικό υλικό. Παρασκευάστηκαν διαλύματα με κάθε αναλύτη ξεχωριστά και στη συνέχεια μίγματα αυτών. Ρυθμίστηκε το *p*H των διαλυμάτων στη τιμή 4 με τη προσθήκη διαλύματος (ορθο)φωσφορικού οξέος 1 % (v/v) και τοποθετήθηκαν σε στήλες *SPE*. Οι δοκιμές

- ✓ Abselut Nexus 60 mg/ 3 mL,
- ✓ Oasis HLB 60 mg/ 3 mL,
- ✓ Strata X 200 mg/ 3 mL.

Οι στήλες είχαν προηγουμένως υποστεί ενεργοποίηση/ επιδιαλύτωση (activation/ solvation) με 2 mL MeOH και εξισορρόπηση (equilibration) με 2 mL H₂O, με εξαίρεση τις στήλες Strata X, στις οποίες οι αντίστοιχοι όγκοι ήταν 4 mL λόγω της μεγαλύτερης μάζας πληρωτικού υλικού. Ο όγκος των διαλυμάτων που τοποθετήθηκε στις στήλες ήταν 4 mL. Ακολούθησαν δοκιμές για την εύρεση του καταλληλότερου διαλύτη έκλουσης (elution solvent), ελέγχοντας την αναπαραγωγιμότητα στις τιμές ανάκτησης των αναλυτών. Οι διαλύτες που δοκιμάστηκαν ήταν οι: MeOH, ACN, οξικός αιθυλεστέρας (EA ή EtOAc), διχλωρομεθάνιο (DCM) αλλά και MeOH που περιείχε FA σε ποσοστό 1 % (v/v) και 2 % (v/v). Καλύτερες τιμές ανάκτησης βρέθηκαν με χρήση της MeOH (όγκου 2 mL για τις στήλες Abselut Nexus και Oasis HLB και 4 mL για τις στήλες Strata X) για την έκλουση των ουσιών. Καλύτερες τιμές ελήφθησαν με τις στήλες Abselut Nexus και Oasis HLB, ωστόσο, προτιμήθηκαν οι πρώτες λόγω του χαμηλότερου κόστους των.

Στη συνέχεια, έγιναν δοκιμές χρησιμοποιώντας διαλύματα των αναλυτών σε μητρικό υλικό (εκχυλίσματα σάρκας με δέρμα) που ελήφθησαν με την τεχνική *ASE*, όπως περιγράφεται στο εδάφιο 7.2. Ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε το H₂O. Το υδατικό εκχύλισμα αραιώθηκε στα 20 mL και ρυθμίστηκε το *p*H του στη τιμή 4 με τη προσθήκη διαλύματος (ορθο)φωσφορικού οξέος 1 % (v/v). Μετά από ψύξη (15 min) και φυγοκέντρηση (10000 rpm/ 4 °C/ 15 min) του εκχυλίσματος, κλάσμα όγκου 4 mL από το υπερκείμενο διάλυμα, τοποθετήθηκε στη στήλη *SPE*. Ακολουθήθηκε η εξής πορεία:

- 1. Ενεργοποίηση/ επιδιαλύτωση ⇒ 2 mL MeOH
- 2. Εξισορρόπηση \Rightarrow 2 mL H₂O
- 3. Τοποθέτηση του δείγματος \Rightarrow κλάσμα 4 mL *p*H ~4
- 4. Εύρεση του/των βέλτιστου/ων διαλύτη/ών έκπλυσης
- 5. Ξήρανση της στήλης
- 6. Εύρεση του βέλτιστου διαλύτη έκλουσης

Το έκλουσμα από τη στήλη *SPE* εξατμίστηκε με ρεύμα αζώτου στους 40 °C και ανασυστάθηκε με 0,2 mL μίγματος H₂O/ACN 90/10 (v/v) που περιείχε 0,05 % FA (v/v). Το διάλυμα που προέκυψε αναδεύτηκε, διηθήθηκε με φίλτρο *PVDF* 0,22 μm και ενέθηκε στο σύστημα *LC/MS*.

Υπολογίστηκαν οι τιμές της % απόλυτης και της % σχετικής ανάκτησης. Η % απόλυτη ανάκτηση υπολογίστηκε από τα εμβολιασμένα εκχυλίσματα πριν και μετά την SPE για κάθε αναλύτη και το /S ξεχωριστά. Η % σχετική ανάκτηση υπολογίστηκε χρησιμοποιώντας τους λόγους αναλύτης//S των εμβολιασμένων πριν και μετά την SPE.

Εύρεση του/των βέλτιστου/ων διαλύτη/ών έκπλυσης

Εφαρμόστηκε η πορεία που περιγράφηκε παραπάνω και δοκιμάστηκαν τα εξής μίγματα διαλυτών (όγκου 4 mL): H₂O 100 %, μίγμα MeOH/ H₂O 5/95 (v/v), μίγμα MeOH/ H₂O 10/95 (v/v), μίγμα MeOH/ H₂O 15/95 (v/v) και μίγμα MeOH/ H₂O 20/95 (v/v).

Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε αρχικά η MeOH (2 mL).

Για κάθε δοκιμή παρασκευάστηκαν:

- ✓ Τρία πρότυπα διαλύματα σε μίγμα αρχικής κινητής φάσης (DS),
- ✓ Ένα «λευκό» δείγμα για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου,
- ✓ Δύο δείγματα εμβολιασμένα μετά την SPE,
- ✓ Τρία δείγματα εμβολιασμένα πριν την SPE.

Στα ανωτέρω διαλύματα/δείγματα οι συγκεντρώσεις ήταν: 100 ng mL⁻¹ διαλύματος του μητρικού υλικού (SDZ, AcSDZ), 50 ng mL⁻¹ διαλύματος του μητρικού υλικού (TMP) και 50 ng mL⁻¹ διαλύματος του μητρικού υλικού (DPS).

Στο σχήμα 7.6 φαίνονται οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του /S που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας κάθε έναν από τους ανωτέρω διαλύτες έκπλυσης, ενώ στο σχήμα 7.7 φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών.

Υπολογίστηκε για κάθε περίπτωση το % ποσοστό υποβάθμισης του σήματος (Σχήμα 7.8) με βάση την εξίσωση:

$$Y\Pi OBA\Theta MI\Sigma H(\%) = (1 - \frac{I_s - I_b}{I_n})x100$$

όπου I_s = σήμα ενός δείγματος εμβολιασμένου μετά την SPE,

*I*_b = σήμα του «λευκού» δείγματος,

*I*_n = σήμα του πρότυπου διαλύματος σε *DS*.

Παρατηρήθηκε σημαντική υποβάθμιση του σήματος σε κάθε περίπτωση, με μικρότερη όταν η στήλη εκπλύθηκε με μίγμα MeOH/H₂O 5/95 (v/v). Για το λόγο αυτό, κρίθηκε απαραίτητη η προσθήκη και δεύτερου σταδίου έκπλυσης, το οποίο θα προηγείται χρονικά της έκπλυσης με το ανωτέρω μίγμα. Έγιναν δοκιμές με τρεις υδρογάνθρακες (*n*-πεντάνιο, *n*-εξάνιο, *n*-επτάνιο) όγκου 2 mL, με τους οποίους απομακρύνονται μη πολικά





Σχήμα 7.6 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκπλυσης

Σχήμα 7.7 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκπλυσης



Σχήμα 7.8 Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκπλυσης

συστατικά, όπως π.χ. λιπίδια. Ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε και πάλι η MeOH (2 mL).

Στο σχήμα 7.9 φαίνονται οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου /S, ενώ στο σχήμα 7.10 φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών. Στο σχήμα 7.11 φαίνεται το % ποσοστό υποβάθμισης του σήματος σε κάθε περίπτωση.



Σχήμα 7.9 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό υδρογονάνθρακα ως πρώτο διαλύτη έκπλυσης



Σχήμα 7.10 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό υδρογονάνθρακα ως πρώτο διαλύτη έκπλυσης



Σχήμα 7.11 Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό υδρογονάνθρακα ως πρώτο διαλύτη έκπλυσης

Παρατηρήθηκε ότι η μικρότερη υποβάθμιση του σήματος λαμβάνει χώρα με το *n*-εξάνιο και το *n*-επτάνιο. Προτιμήθηκε το *n*-επτάνιο λόγω της μικρότερης τοξικότητάς του. Έτσι, η βέλτιστη διαδικασία έκπλυσης της στήλης περιλαμβάνει δύο στάδια:

- 1. *n*-επτάνιο όγκου 2 mL (απομακρύνονται λιπίδια και άλλες μη πολικές παρεμποδίζουσες ουσίες).
- 2. μίγμα MeOH/H₂O 5/95 (v/v) όγκου 4 mL (απομακρύνονται πολικές, ουδέτερες και βασικές παρεμποδίζουσες ουσίες).

Εύρεση του βέλτιστου διαλύτη έκλουσης

Χρησιμοποιώντας την παραπάνω διαδικασία έκπλυσης, έγιναν δοκιμές ώστε να βρεθεί ο βέλτιστος διαλύτης έκλουσης των αναλυτών. Έγιναν δοκιμές με τους εξής διαλύτες (όγκου 2 mL): MeOH, ACN, EtOAc, DCM, MeOH με 1 % FA (v/v) και MeOH με 2 % FA (v/v).

Για κάθε δοκιμή παρασκευάστηκαν διαλύματα και δείγματα παρόμοια με εκείνα της διαδικασίας εύρεσης του βέλτιστου διαλύτη έκπλυσης. Ωστόσο, στην περίπτωση της MeOH που περιείχε FA σε ποσοστό 1 % (v/v) και 2 % (v/v) υπήρχε δυσκολία διήθησης του δείγματος και δε προχώρησε η ανάλυση.

Στο σχήμα 7.12 φαίνονται οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του *IS*, ενώ στο σχήμα 7.13 φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών.

Στο σχήμα 7.14 φαίνεται το % ποσοστό υποβάθμισης του σήματος σε κάθε περίπτωση. Παρατηρείται ότι οι υψηλότερες τιμές της ανάκτησης και η μικρότερη μείωση του σήματος ελήφθηκε όταν ως διαλύτης έκλουσης χρησιμοποιήθηκε η MeOH. Το γεγονός αυτό ενισχύεται από την καλύτερη ειδικότητα που ελήφθηκε σε αυτή τη περίπτωση, εφ'όσον δεν υπήρχαν χρωματογραφικές κορυφές που να παρεμποδίζουν τους εκλουόμενους αναλύτες. Έτσι, η βελτιστοποιημένη μέθοδος SPE είναι:

1. Ενεργοποίηση/επιδιαλύτωση	\Rightarrow 2 mL MeOH
2. Εξισορρόπηση	\Rightarrow 2 mL H ₂ O
3. Τοποθέτηση του δείγματος	⇒ κλάσμα υδατικού εκχυλίσματος όγκου 4 mL
	рН ~4
4. Έκπλυση	⇒ 2 mL <i>n</i> -επτανίου
	\Rightarrow 4 mL μίγματος MeOH/H ₂ O 5/95 (v/v)
5. Ξήρανση της στήλης	
6. Έκλουση των αναλυτών	\Rightarrow 2 mL MeOH



Σχήμα 7.12 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκλουσης



Σχήμα 7.13 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκλουσης



Σχήμα 7.14 Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη έκλουσης

7.2 Ανάπτυξη της μεθόδου Επιταχυνόμενης Εκχύλισης (ASE)

7.2.1 Εισαγωγή

Η εκχύλιση των αναλυτών από τη σάρκα με δέρμα ιχθύος πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το σύστημα επιταχυνόμενης εκχύλισης *ASE* 200, της εταιρείας *Dionex* (Sunnyvale, CA, USA). Στην παρούσα διατριβή, το H₂O χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης εκχύλισης. Το H₂O έχει χαμηλή συγγένεια με τις λιπαρές ύλες, ωστόσο, στην υψηλή θερμοκρασία της διαδικασίας *ASE*, μειώνεται η διηλεκτρική σταθερά και πολικότητά του, με αποτέλεσμα να είναι κατάλληλο για την εκχύλιση των μέτριας πολικότητας αναλυτών SDZ και TMP. Είναι φθηνός διαλύτης, μη τοξικός και φιλικός προς το περιβάλλον. Η διαλυτότητα της SDZ εξαρτάται από τη θερμοκρασία και το *p*H.^{243,245} H ακετυλίωση της SDZ έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας στο H₂O.²³⁸ H TMP είναι μετρίως διαλυτή στο H₂O (400 mg L⁻¹ στους 20 °C)³⁰², ενώ η DPS είναι ακόμα λιγότερο διαλυτή στο H₂O.²⁹⁶ Η χρήση του H₂O ως διαλύτη εκχύλισης με την *ASE* διευκολύνει την περαιτέρω κατεργασία του δείγματος για καθαρισμό με τη διαδικασία *SPE*.³⁰³

Η επιλογή του μεγέθους της κυψελίδας εξαρτάται, κυρίως, από το μέγεθος του δείγματος. Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε 1 g δείγματος νωπής σάρκας με δέρμα. Επειδή το δείγμα ήταν νωπό, χρησιμοποιήθηκε αρκετή ποσότητα υλικού διασποράς (σε αναλογία 1:3) ώστε να δεσμευθεί η υγρασία και να δημιουργηθεί μια ομοιογενής πάστα. Για το λόγο αυτό, χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα όγκου 11 mL και επειδή ο διαλύτης ήταν το H₂O, το φίλτρο που τοποθετείται στο κάτω μέρος της κυψελίδας ήταν φίλτρο υαλωδών ινών. Ως υλικό διασποράς δοκιμάστηκε η «άμμος θαλάσσης», μεγέθους σωματιδίων 0,20 - 0,30 mm, και η γη διατόμων, μεγέθους σωματιδίων 13 μm. Καθαρότερα εκχυλίσματα ελήφθησαν με την «άμμο θαλάσσης», η οποία επελέχθη για τη διασπορά των δειγμάτων.

Για την κατεργασία του δείγματος ζυγίζεται με ακρίβεια 1 g αλεσμένου και ομογενοποιημένου, με τη βοήθεια πολυκόφτη κουζίνας, νωπού μυϊκού ιστού με δέρμα, και μεταφέρεται σε γυάλινο γουδί. Προστίθενται περίπου 3 g «άμμου θαλάσσης» και αναμιγνύονται ώστε να προκύψει μια ομοιογενής πάστα. Για την παρασκευή ενός εμβολιασμένου δείγματος η προσθήκη του μίγματος των αναλυτών γίνεται πάνω στον ιστό, πριν την προσθήκη του υλικού διασποράς. Σε κάθε περίπτωση, προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα /S την ίδια χρονική στιγμή. Τα διαλύματα των αναλυτών και του /S αφήνονται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου σε επαφή με τη σάρκα και το δέρμα, ώστε οι ουσίες να κατανεμηθούν σε όλη την επιφάνεια του δείγματος. Στη συνέχεια, το μίγμα μεταφέρεται στην κυψελίδα, η οποία πληρώνεται με «άμμο θαλάσσης».

αραιώνεται μέχρι τα 20 mL σε ογκομετρική φιάλη, αφού πρώτα προστεθεί διαλύμα (ορθο)φωσφορικού οξέος 1 %, ώστε το *p*H του αραιωμένου εκχυλίσματος να έχει τιμή 4. Η προσθήκη του οξέος διευκολύνει, επίσης, την καταβύθιση των πρωτεϊνών, οι οποίες βρίσκονται σε μεγάλη ποσότητα στα προς ανάλυση δείγματα.³⁰⁴ Το αραιωμένο εκχύλισμα ψύχεται, αρχικά στους - 15 °C, για 15 min και στη συνέχεια στους 0 °C, επίσης για 15 min. Η ψύξη βοηθά στη καθίζηση των λιπαρών υλών και άλλων συνεκχυλιζόμενων, με τους αναλύτες, συστατικών, λόγω της μειωμένης διαλυτότητάς των σε χαμηλές θερμοκρασίες.^{187,304} Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 10000 rpm, για 15 min, στους 4 °C. Τέσσερα (4) mL από το υπερκείμενο διάλυμα «φορτώνονται» στη στήλη *SPE*.

Η υψηλή θερμοκρασία που εφαρμόζεται στην *ASE*, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της διαλυτότητας των αναλυτών και την υψηλότερη αποδοτικότητα της εκχύλισης. Ωστόσο, οι έντονες συνθήκες οδηγούν σε σκουρόχρωμα εκχυλίσματα λόγω του υψηλότερου «φορτίου» που προέρχεται από το μητρικό υλικό, γεγονός κρίσιμο για την ποσοτικοποίηση με σύστημα *LC/MS*, εξαιτίας της υποβάθμισης του σήματος στην πηγή *ESI*. Η χρήση του *IS* μετριάζει το φαινόμενο αυτό και δεν επηρεάζεται σημαντικά η ποσοτικοποίηση, η μείωση, όμως, της ευαισθησίας δε μπορεί ν'αποφευχθεί. Συνήθως, προτιμάται να λαμβάνονται υψηλές αποδόσεις εφαρμόζοντας υψηλές θερμοκρασίες, παρά τη μικρή μείωση στην ευαισθησία.¹⁸²

Η εφαρμογή της υψηλής θερμοκρασίας οδηγεί, πολλές φορές, στη διάσπαση των ουσιών-αναλυτών. Για το λόγο αυτό, πρέπει να ελέγχεται η θερμική σταθερότητα των αναλυτών στις συνθήκες του συστήματος *ASE* με ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων του υλικού διασποράς, χωρίς, δηλαδή, την παρουσία του μητρικού υλικού.

Κατά τη βελτιστοποίηση της διαδικασίας ASE, αξιολογήθηκαν όλες οι σημαντικές παράμετροι που επιδρούν στην αποδοτικότητα της εκχύλισης:

- θερμοκρασία της εκχύλισης,
- εφαμοζόμενη πίεση κατά την εκχύλιση,
- χρόνος της στατικής εκχύλισης,
- ✓ μέγεθος της κυψελίδας δείγματος,
- αριθμός κύκλων εκχύλισης,
- όγκος έκπλυσης (% του όγκου κυψελίδας),
- ✓ κατεργασία του μέσου διασποράς.
7.2.2 Ανάπτυξη της μεθόδου ASE

Ανάπτυξη της μεθόδου ASE με εμβολιασμένα δείγματα του μέσου διασποράς

Πραγματοποιήθηκαν, αρχικά, δοκιμές με εμβολιασμένα δείγματα του μέσου διασποράς («άμμου θαλάσσης»), χωρίς, δηλαδή, την παρουσία μητρικού υλικού. Ελέγχθηκε, κυρίως, η θερμοκρασία, ως ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την εκχύλιση παρασκευάζοντας δείγματα με κάθε αναλύτη ξεχωριστά και στη συνέχεια δείγματα με μίγματα αυτών.

Υπολογίστηκε η % απόλυτη και η % σχετική ανάκτηση Ελέγχθηκε, επίσης, η πιθανότητα διάσπασης των μορίων των αναλυτών λόγω της αυξανόμενης θερμοκρασίας (*thermal degradation*).

Οι αρχικές τιμές για τις παραμέτρους του ASE δίνονται στον πίνακα 7.2

Παράμετρος	Τιμή	
Χρόνος προθέρμανσης (min)	0	
Χρόνος θέρμανσης (min)	5	
Χρόνος στατικής εκχύλισης (min)	5	
Flush volume (%)	60	
Purge (s)	60	
Κύκλοι	1	
Θερμοκρασία (°C)	70	
Πίεση (<i>psi</i>)	1500	

Πίνακας 7.2 Αρχικές τιμές των παραμέτρων του ASE (M1)

Το «λευκό δείγμα» της «άμμου θαλάσσης» κατεργάστηκε με τη μέθοδο Μ1, ενώ τα εμβολιασμένα δείγματα με το πρόγραμμα (*schedule*) 1. Με το πρόγραμμα αυτό, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση του ίδιου δείγματος τρεις φορές, σε τρία διαφορετικά φιαλίδια και ελέγχθηκε κατά πόσο ήταν πλήρης η εκχύλιση.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας. Οι μέθοδοι M2 και M3 διαφέρουν από τη M1 στη θερμοκρασία, η οποία είναι 130 °C και 160 °C, αντίστοιχα, ενώ εφαρμόστηκαν και τα ανάλογα προγράμματα (2 και 3) του ASE.

Οι βέλτιστες τιμές της ανάκτησης των αναλυτών ελήφθησαν κατά την εκχύλιση σε

<u>θερμοκρασία 100 °C</u>. Αυξάνοντας τη θερμοκρασία στους 130 °C μειώθηκαν οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης, γεγονός που μπορεί να ερμηνευθεί ως πιθανή διάσπαση των αναλυτών σε αυτή τη θερμοκρασία. Έτσι, εφαρμόζοντας θερμοκρασία 100 °C, εξετάστηκε κατά πόσο βελτιώνεται η αποδοτικότητα της εκχύλισης, αν αυτή πραγματοποιείται σε δύο κύκλους (μέθοδοι M4 και M5 και αντίστοιχα προγράμματα 4 και 5). Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι η βέλτιστη μέθοδος για την εκχύλιση των αναλυτών από δείγματα «άμμου θαλάσσης», είναι

Παράμετρος	Βέλτιστη μέθοδος		
 Χρόνος προθέρμανσης (min)	0		
Χρόνος θέρμανσης (min)	5		
Χρόνος στατικής εκχύλισης (min)	5		
Flush volume (%)	60		
Purge (s)	60		
Κύκλοι	1		
Θερμοκρασία (°C)	100		
Πίεση (<i>psi</i>)	1500		

Ανάπτυξη μεθόδου ASE με εμβολιασμένα δείγματα σάρκας με δέρμα

Στη συνέχεια, έγιναν δοκιμές με εμβολιασμένα δείγματα σάρκας με δέρμα. Για κάθε δοκιμή παρασκευάστηκαν:

- ✓ Τρία πρότυπα διαλύματα σε μίγμα αρχικής κινητής φάσης (DS),
- ✓ Ένα «λευκό» δείγμα σάρκας με δέρμα για τον έλεγχο της ειδικότητας,
- ✓ Δύο δείγματα εμβολιασμένα μετά την πορεία ASE και πριν την πορεία SPE,
- ✓ Τρία δείγματα εμβολιασμένα πριν την πορεία ASE.

Στα ανωτέρω διαλύματα/δείγματα οι συγκεντρώσεις ήταν: 100 ng mL⁻¹ διαλύματος του μητρικού υλικού (SDZ, AcSDZ), 50 ng mL⁻¹ διαλύματος του μητρικού υλικού (TMP) και 50 ng mL⁻¹ διαλύματος του μητρικού υλικού (DPS).

Υπολογίστηκαν οι τιμές της % απόλυτης και της % σχετικής ανάκτησης και ελέγχθηκε η αναπαραγωγιμότητα στην ανάκτηση για κάθε αναλύτη ξεχωριστά και στη συνέχεια σε μίγμα αυτών.

(Α) Εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας εκχύλισης

Βέλτιστη ανάκτηση των αναλυτών βρέθηκε σε θερμοκρασία 100 °C (σχήμα 7.15).

(Β) Εύρεση της βέλτιστης πίεσης

Εφαρμόστηκαν οι εξής τιμές πίεσης: 1000, 1500, 2000 *psi*. Σε κάθε περίπτωση εφαρμόστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία 100 °C.

Στο σχήμα 7.16 φαίνεται ότι εφαρμόζοντας <u>πίεση 1500 *psi*</u> λαμβάνονται οι βέλτιστες τιμές ανάκτησης και για τις τέσσερις ουσίες. Παρ'ότι διάφορες μελέτες έχουν δείξει ότι η πίεση δεν αποτελεί κρίσιμο παράγοντα,¹⁸⁴ διότι έχει μικρή ή καμμία επίδραση στην εκχύλιση με *ASE* και ότι χρειάζεται απλά για να διατηρεί τον διαλύτη στην υγρή φάση,^{187,192} φαίνεται, στην παρούσα μελέτη, ότι επιδρά θετικά στην αποδοτικότητα της εκχύλισης όταν αυξάνεται από 1000 σε 1500 *psi*. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι διευκολύνεται, με την υψηλή πίεση, η διείσδυση των μορίων του διαλύτη στο μητρικό υλικό και κατ'επέκταση η διάσπαση των αλληλεπιδράσεων αναλύτη-μητρικού υλικού. Έτσι, λαμβάνονται υψηλότερες τιμές ανάκτησης του αναλύτη.³⁰⁴ Ωστόσο, όταν η πίεση αυξήθηκε περαιτέρω (2000 *psi*), οι τιμές της ανάκτησης παρέμειναν σταθερές ή και χαμηλότερες.

(Γ) Εύρεση του βέλτιστου χρόνου στατικής εκχύλισης

Η διαδικασία εφαρμόστηκε σε διάφορους χρόνους: 2, 5, 10 και 15 min. Σε κάθε περίπτωση εφαρμόστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία 100 °C και η βέλτιστη πίεση 1500 *psi*.

Στο σχήμα 7.17 παρατηρείται ότι εφαρμόζοντας τη διαδικασία στατικής εκχύλισης στη συσκευή ASE για 15 min λαμβάνονται οι βέλτιστες τιμές ανάκτησης και για τις τέσσερις ουσίες.

Στη συνέχεια, εφαρμόζοντας ως βέλτιστη πίεση 1500 *psi* και βέλτιστο χρόνο στατικής εκχύλισης 15 min, μελετήθηκε, εκ νέου, η επίδραση της θερμοκρασίας στην αποδοτικότητα της εκχύλισης, δεδομένου ότι αυτή αποτελεί τον πιο κρίσιμο παράγοντα στην διαδικασία *ASE*.



Σχήμα 7.15 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών σε διαφορετικές θερμοκρασίες, εφαρμόζοντας, κάθε φορά, πρόγραμμα δύο εκχυλίσεων



Σχήμα 7.16 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών σε διαφορετικές πιέσεις (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων εμβολιασμένων με μίγμα αναλυτών), εφαρμόζοντας κάθε φορά πρόγραμμα δύο εκχυλίσεων

(Δ) Εύρεση της νέας βέλτιστης θερμοκρασίας εκχύλισης

Εφαρμόστηκαν οι θερμοκρασίες: 70, 100, και 130 °C. Βρέθηκε ότι σε θερμοκρασία 70 °C υπάρχει ένα ποσοστό των ουσιών που εκχυλίζεται με τη δεύτερη φορά, παρ'ότι ο χρόνος στατικής εκχύλισης αυξήθηκε σε 15 min. Σε θερμοκρασίες 100 και 130 °C, οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης ήταν ικανοποιητικές. Ωστόσο, το υδατικό εκχύλισμα στους 130 °C ήταν αρκετά «επιβαρυμένο» από συστατικά του μητρικού υλικού, γεγονός που είχε ως αποτέλεσμα να μην είναι ικανοποιητική η ειδικότητα της χρωματογραφικής μεθόδου, αλλά και η % υποβάθμιση του σήματος ήταν μεγαλύτερη.



Σχήμα 7.17 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών σε διαφορετικούς χρόνους στατικής εκχύλισης (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων εμβολιασμένων με μίγμα αναλυτών) εφαρμόζοντας κάθε φορά πρόγραμμα δύο εκχυλίσεων

Έτσι, η <u>βέλτιστη θερμοκρασία εκχύλισης είναι 100 °C</u>, με βέλτιστο χρόνο στατικής εκχύλισης 15 min και βέλτιστη πίεση 1500 *psi*.

(Ε) Εύρεση της βέλτιστης τιμής % Flush volume

Μελετήθηκαν οι τιμές: 30, 60 και 80 % *flush volume*. Οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης βρέθηκαν μεγαλύτερες με 60 και 80 % *flush volume*. Προτιμήθηκε η τιμή 60 % επειδή λαμβάνεται μικρότερος όγκος εκχυλίσματος (σχήμα ΠΙΙ_4).

(ΣΤ) Άλλες δοκιμές

Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με έναν και δύο κύκλους της διαδικασίας *ASE*. Δε βρέθηκε σημαντική διαφορά στις τιμές της % ανάκτησης μεταξύ των δύο περιπτώσεων (σχήμα ΠΙΙ_5). Έτσι, επιλέχθηκε η εκχύλιση να λαμβάνει χώρα σε έναν κύκλο του *ASE*.

Ελέγχθηκαν, επίσης, κυψελίδες διαφορετικού όγκου (5 mL και 11 mL). Καλύτερα αποτέλεσματα ανάκτησης ελήφθησαν με τη χρήση κυψελίδας όγκου 11 mL.

Ελέγχθηκε η επίδραση της κατεργασίας της «άμμου θαλάσσης» με υδατικό διάλυμα Na₂EDTA 0,1 M στην αποδοτικότητα της εκχύλισης. Η κατεργασία περιλαμβάνει πολύ καλή ανάδευση 60 g «άμμου θαλάσσης» με 120 mL υδατικού διαλύματος Na₂EDTA 0,1 M. Ακολουθεί διήθηση και θέρμανση στους 100 °C για 1 h. Η διαδικασία έκπλυσης της «άμμου θαλάσσης» οδηγεί, συνήθως, σε βελτίωση των τιμών της ανάκτησης, δεδομένου ότι το Na₂EDTA απενεργοποιεί προσμίξεις μετάλλων που βρίσκονται στην επιφάνειά της¹⁹² και πιθανόν δεσμεύει μέταλλα που βρίσκονται στο δείγμα, διευκολύνοντας την αποδέσμευση των αναλυτών από τα μέταλλα αυτά.¹⁸⁹ Η δοκιμή, ωστόσο, έδειξε ότι η κατεργασία της «άμμου θαλάσσης» με υδατικό διάλυμα Na₂EDTA

Εκτός από την «άμμο θαλάσσης» μελετήθηκε και η «γη διατόμων», χωρίς, ωστόσο, να παρατηρηθούν αξιοσημείωτες μεταβολές στις τιμές της ανάκτησης.

Τέλος, μελετήθηκε η περίπτωση απώλειας μέρους μιας ή περισσοτέρων ουσιών κατά τη ψύξη και/ή φυγοκέντρηση, αναλύοντας δείγματα εμβολιασμένα λίγο πριν και αμέσως μετά το στάδιο ψύξης/φυγοκέντρησης. Δεν παρατηρήθηκε «απώλεια» σε καμία από τις ουσίες.

7.3 Βέλτιστη μέθοδος ASE/SPE για την παρασκευή δείγματος σάρκας με δέρμα ιχθύος

Στο σχήμα 7.18 δίνεται η πορεία της εκχύλισης και στον πίνακα 7.3 δίνονται οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων *ASE*. Το έκλουσμα από τη στήλη *SPE* εξατμίζεται με ρεύμα N₂ στους 40 °C και ανασυστάται με 0,2 mL μίγματος H₂O/ACN 90/10 (v/v) που περιέχει 0,05 % FA (v/v). Το διάλυμα που προκύπτει αναδεύεται, διηθείται με φίλτρο *PVDF* 0,22 μm και ενίεται στο σύστημα *LC/MS*.



Σχήμα 7.18 Βασικά στάδια της εκχύλισης ASE

Υπολογίστηκε το % ποσοστό υποβάθμισης του σήματος (σχήμα 7.19). Παρατηρείται ότι αυτό είναι μικρό (~ 2 %) στην περίπτωση της AcSDZ, ενώ κυμαίνεται στα ίδια επίπεδα για τις τρεις άλλες ουσίες (10 – 13 %). Στο σχήμα 7.20 φαίνονται οι τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών.

Παράμετρος	Βέλτιστη τιμή	
Χρόνος προθέρμανσης (min) Χρόνος θέρμανσης (min) Χρόνος στατικής εκχύλισης (min) <i>Flush volume</i> (%) <i>Purge</i> (s) Κύκλοι Θρμοκρασία ([°] C) Πίεση (<i>psi</i>) Όγκος κυψελίδας (mL) Υλικό διασποράς	0 5 15 60 60 1 100 1500 11 «Άμμος θαλάσσης»	

Πίνακας 7.3 Βέλτιστη μέθοδος ASE



Σχήμα 7.19 Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος των αναλυτών και του *IS* που ελήφθησαν με τη βέλτιστη *ASE/SPE* μέθοδο (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων)



Σχήμα 7.20 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών που ελήφθησαν με τη βέλτιστη ASE/SPE μέθοδο (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων εμβολιασμένων με μίγμα αναλυτών)

Στο σχήμα 7.21 δίνονται τα υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος σάρκας με δέρμα και ενός δείγματος σάρκας με δέρμα εμβολιασμένο με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη *ASE/SPE LC-ESI-MS* μέθοδο. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση από ουσίες του μητρικού υλικού στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του *IS*.



Σχήμα 7.21 Υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος σάρκας με δέρμα και ενός δείγματος σάρκας με δέρμα εμβολιασμένο με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη *ASE/SPE LC-ESI-MS* μέθοδο (5,22 min: SDZ 100 μg kg⁻¹, 5,88 min: TMP 50 μg kg⁻¹, 6,23 min: AcSDZ 100 μg kg⁻¹, 7,38 min: DPS 50 μg kg⁻¹)

7.4 Εφαρμογή της βέλτιστης μεθόδου ASE/SPE σε διάφορες στήλες SPE

Στη συνέχεια εφαρμόστηκε η βέλτιστη ASE/SPE μέθοδος χρησιμοποιώντας τις στήλες SPE που περιγράφησαν στο εδάφιο 6.3.5. Στο σχήμα 7.22 φαίνονται οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του /S που ελήφθησαν. Παρατηρείται ότι καλύτερες τιμές της απόλυτης ανάκτησης ελήφθησαν με τις στήλες Abselut Nexus και Oasis HLB (93 - 102 % για τους αναλύτες και 85 - 91 % για το /S).

Επιπλέον, με τις στήλες Oasis HLB επετεύχθη η καλύτερη επαναληψιμότητα μεταξύ των δοκιμών (τιμές τυπικής απόκλισης 0,95 - 2,1). Οι στήλες Supel-Select HLB έχουν παρόμοιο πληρωτικό υλικό, ωστόσο, οι τιμές της απόλυτης ανάκτησης ήταν χαμηλότερες (53 - 67 % για τους αναλύτες και 45 % για το *IS*). Οι στήλες Strata–X αποτελούνται από πολυμερικό πληρωτικό υλικό, αλλά οι τιμές της απόλυτης ανάκτησης ήταν χαμηλότερες απ'ό,τι οι αντίστοιχες που ελήφθησαν με στήλες Abselut Nexus και Oasis HLB. Οι στήλες ATOLL έδωσαν τις χαμηλότερες τιμές της απόλυτης ανάκτησης, ενώ επίσης, χαμηλές ήταν τιμές που ελήφθησαν με τις στήλες Isolute C_{18} (EC) και DSC-18. Στις δύο τελευταίες περιπτώσεις, το πληρωτικό υλικό αποτελείται από σιλανοποιημένη σίλικα (C_{18}) με καλυμμένες τις ελεύθερες ομάδες σιλανόλης, που επιτρέπουν τη συγκράτηση των αναλυτών μέσω μη-πολικών αλληλεπιδράσεων. Έτσι, η συγκράτηση δεν είναι ικανοποιητική με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη απόδοση της διαδικασίας SPE.

Στο σχήμα 7.23 φαίνονται οι τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών που ελήφθησαν εφαρμόζοντας τη βέλτιστη *ASE/SPE* μέθοδο στις ανωτέρω στήλες. Τα αποτελέσματα για τους τρεις αναλύτες ήταν καλύτερα όταν χρησιμοποιήθηκαν στήλες *Abselut Nexus* και *Oasis HLB* (102 - 118 %). Με τις στήλες *Supel–Select HLB* οι τιμές % σχετικής ανάκτησης ήταν αρκετά υψηλές (119 - 149 %), επειδή η ανάκτηση του *IS* ήταν χαμηλή (45 %). Το ίδιο παρατηρείται με τις στήλες *Strata-X* για την SDZ και την AcSDZ (130 και 157 % αντίστοιχα), με τις στήλες *Isolute C*₁₈ (*EC*) για την AcSDZ και την TMP (117 και 197 %, αντίστοιχα) και με τις στήλες *DSC*-18 για την AcSDZ και την TMP (164 και 139 %, αντίστοιχα).



Σχήμα 7.22 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου που ελήφθησαν εφαρμόζοντας τη βέλτιστη ASE/SPE μέθοδο σε διάφορες στήλες (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων)



Σχήμα 7.23 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών που ελήφθησαν εφαρμόζοντας τη βέλτιστη ASE/SPE μέθοδο σε διάφορες στήλες (μέση τιμή και τυπική απόκλιση από την ανάλυση τριών δειγμάτων)

7.5 Δοκιμή με στήλες SPE κατιονανταλλάκτη

Η διαδικασία SPE με ιονανταλλαγή λαμβάνει χώρα μεταξύ ενός συστατικού που φέρει φορτισμένες ομάδες (κατιονικές ή ανιοντικές) και του στερεού υποστρώματος που φέρει ομάδες αντιθέτου φορτίου από το φορτίο του συστατικού. Οι αλληλεπιδράσεις είναι ηλεκτροστατικής φύσεως και βασικό πλεονέκτημα των έναντι των πολικών και μη πολικών αλληλεπιδρασεων, είναι ότι χαρακτηρίζονται από υψηλότερη εκλεκτικότητα, με αποτέλεσμα να λαμβάνονται καθαρότερα εκχυλίσματα. Τόσο το υπόστρωμα όσο και ο αναλύτης πρέπει να είναι φορτισμένοι για τη συγκράτηση του δεύτερου από το πρώτο. Χρησιμοποιήθηκαν οι στήλες κατιονανταλλαγής *Strata-X-C*, της εταιρείας *Phenomenex*, δεδομένου ότι τόσο η SDZ όσο και η TMP, αλλά και το *IS*, μπορούν να φορτιστούν θετικά. Βασικό πρόβλημα αποτέλεσε η AcSDZ, η οποία δε δύναται να φορτιστεί θετικά (είναι ακετυλιωμένη η αμινομάδα -NH₂). Ωστόσο, οι τιμές της απόλυτης ανάκτησης και για τις υπόλοιπες ουσίες δεν κρίθηκαν ικανοποιητικές.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΟΡΟΥ ΙΧΘΥΟΣ

8.1 Ανάπτυξη της μεθόδου υγρό-υγρό εκχύλισης (*LLE*) σε δείγματα ορού^{305,306}

Κατά την ανάπτυξη της μεθόδου κατεργασίας ενός δείγματος ορού ιχθύος με *LLE* μελετήθηκαν οι εξής παράγοντες:

- ✓ Διαλύτης της εκχύλισης,
- ✓ Επιπρόσθετη εκχύλιση,
- ✓ Διαλύτης της έκπλυσης του δείγματος (υδρογονάνθρακας).

Για κάθε δοκιμή, παρασκευάστηκαν εμβολιασμένα δείγματα ορού με κάθε αναλύτη ξεχωριστά και στη συνέχεια μίγματα αυτών. Ελέγχθηκε η αναπαραγωγιμότητα στην ανάκτηση κάθε αναλύτη σε κάθε περίπτωση.

Ο ορός που χρησιμοποιήθηκε για τις παραπάνω μελέτες ήταν το υπερκείμενο υγρό που ελήφθηκε από το αίμα των ιχθύων, όταν αυτό φυγοκεντρήθηκε σε 8000 rpm, στους 8 °C, για 10 min.

Η γενική πορεία παρασκευής δείγματος που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Σε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετούνται 200 μL ορού αίματος. Προστίθενται 2,0 mL διαλύτη εκχύλισης και 0,3 g άνυδρου Na₂SO₄. Το μίγμα αναδεύεται σε μηχανικό αναδευτήρα και φυγοκεντρείται σε 3000 rpm, για 10 min. Το υπερκείμενο υγρό (οργανική φάση) αποχύνεται σε άλλο δοκιμαστικό σωλήνα και εξατμίζεται μέχρι ξηρού, με τη διοχέτευση ρεύματος N₂ στους 40 °C στη συσκευή *TurboVap*. Το στερεό υπόλειμμα ανασυστάται με 0,5 mL *DS*. Ακολουθεί ανάδευση σε μηχανικό αναδευτήρα. Προστίθεται 1,0 mL διαλύτη έκπλυσης και το μίγμα αναδεύεται εκ νέου. Το διφασικό σύστημα που προκύπτει, ψύχεται σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας χαμηλότερης των 20 °C για 15 min και φυγοκεντρείται σε 3000 rpm, για 15 min. Τέλος, απορρίπτεται η στιβάδα του υδρονάνθρακα (άνω στιβάδα), ενώ η κάτω στιβάδα διηθείται με φίλτρο *PVDF* 0,22 μm και ενίεται στο σύστημα *LC/MS*.

Για την παρασκευή των εμβολιασμένων δειγμάτων ορού, προστίθεται αρχικά ποσότητα (π.χ. 50 μ L) από πρότυπο διάλυμα κατάλληλης συγκέντρωσης, εξατμίζεται με τη διοχέτευση ρεύματος N₂ στους 40 °C στο *TurboVap* και ανασυστάται με 200 μ L ορού. Στη συνέχεια, ακολουθείται η πορεία που περιγράφηκε παραπάνω. Για την παρασκευή των δειγμάτων ορού εμβολιασμένων μετά την εκχύλιση, χρησιμοποιούνται πρότυπα διάλυματα κατάλληλης συγκέντρωσης για την ανασύσταση του στερεού υπολείμματος. Για την παρασκευή άγνωστων δειγμάτων ορού, προστίθεται αρχικά ποσότητα *IS* (DPS) (π.χ. 50 μ L από διάλυμα 1000 ng mL⁻¹ *DS*), εξατμίζεται με τη διοχέτευση ρεύματος N₂ στους 40 °C και ανασυστάται με 200 μ L ορού του αγνώστου δείγματος.

Εύρεση του βέλτιστου διαλύτη εκχύλισης

Για την εκχύλιση των αναλυτών από δείγματα ορού δοκιμάστηκαν οι εξής διαλύτες: EtOAc, αιθυλική αλκοόλη (EtOH), ACN και MeOH.

Δεν πραγματοποιήθηκε επιπρόσθετη εκχύλιση και ως διαλύτης έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε το *n*-επτάνιο.

Για κάθε δοκιμή παρασκευάστηκαν:

- ✓ Τρία πρότυπα διαλύματα σε μίγμα αρχικής κινητής φάσης (DS),
- ✓ Ένα «λευκό» δείγμα ορού για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου,
- ✓ Δύο δείγματα ορού εμβολιασμένα μετά την LLE και πριν την έκπλυση,
- ✓ Τρία δείγματα ορού εμβολιασμένα πριν την LLE.

Οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και δειγμάτων ήταν: 100 ng mL⁻¹ DS (SDZ, AcSDZ), 50 ng mL⁻¹ DS (TMP) και 50 ng mL⁻¹ DS (DPS).

Σύμφωνα με την παρασκευαστική πορεία, ένα δείγμα συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹ DS αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 250 ng mL⁻¹ ορού.

Στο σχήμα 8.1 φαίνονται οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του *IS*, που ελήφθησαν χρησιμοποιώντας κάθε έναν από τους ανωτέρω διαλύτες εκχύλισης, ενώ στο σχήμα 8.2 φαίνονται οι αντίστοιχες τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών.

Παρατηρείται ότι οι βέλτιστες τιμές της % απόλυτης ανάκτησης για τους τρεις αναλύτες και το *IS* ελήφθησαν, όταν ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ο EtOAc (% απόλυτη ανάκτηση 78 - 97 %). Αντίθετα, η χρήση της EtOH και της MeOH οδήγησαν σε χαμηλές τιμές ανάκτησης, τόσο για τους αναλύτες όσο και για το *IS*, με εξαίρεση την AcSDZ, της οποίας η μέση % ανάκτηση που ελήφθηκε με την EtOH ήταν 96 % και με την MeOH ήταν 80 %. Με το ACN οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των τριών αναλυτών ήταν ικανοποιητικές (94 - 117 %), όχι, όμως, για το *IS* (34 %).

Οι τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με τον EtOAc ως διαλύτη εκχύλισης ήταν ικανοποιητικές (110 - 125 %) και για τις τέσσερις ουσίες. Με τους υπόλοιπους τρεις διαλύτες, όμως, η εκχύλιση του /S κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (13 - 34 %), με αποτέλεσμα οι τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών να είναι μη αποδεκτές.

Στο σχήμα 8.3 παρατηρείται ότι η υποβάθμιση του σήματος είναι μεγαλύτερη όταν ως διαλύτης εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε η EtOH (10 - 35 %) και η MeOH (12 - 30 %). Χαμηλότερη υποβάθμιση του σήματος για τους αναλύτες ελήφθηκε με το ACN (8 - 11 %) και λίγο υψηλότερη με τον EtOAc (10 - 20 %) ως διαλύτη εκχύλισης. Για το /S οι τιμές ήταν 28 και 23 %, αντίστοιχα. Τελικά, προτιμήθηκε ο <u>οξικός αιθυλεστέρας</u> ως <u>διαλύτης εκχύλισης</u> επειδή οι τιμές της % ανάκτησης του εσωτερικού προτύπου ήταν υψηλότερες με τον συγκεκριμένο διαλύτη.

Επιπρόσθετη εκχύλιση

Προκειμένου να διαπιστωθεί αν απαιτείται επιπρόσθετη εκχύλιση και αν ναι, με ποιον όγκο EtOAc, έγιναν οι εξής δοκιμές (όγκοι διαλύτη πρώτης + δεύτερης εκχύλισης): 2 mL (χωρίς δεύτερη εκχύλιση), 2 mL + 2 mL, 2 mL + 1 mL, 2 mL + 0,5 mL.

Ως διαλύτης έκπλυσης χρησιμοποιήθηκε το *n*-επτάνιο (σχήματα 8.4 - 8.6). Στο σχήμα 8.4 φαίνεται ότι οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών είναι ικανοποιητικές



Σχήμα 8.1 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη εκχύλισης (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)



Σχήμα 8.2 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη εκχύλισης (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)



Σχήμα 8.3 Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με διαφορετικό διαλύτη εκχύλισης (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)

με και χωρίς επιπλέον στάδιο εκχύλισης. Η % απόλυτη ανάκτηση της DPS βελτιώνεται με επιπλέον εκχύλιση χρησιμοποιώντας 0,5 mL EtOAc, ωστόσο, μεγαλύτερες ποσότητες του διαλύτη (1,0 και 2,0 mL) οδηγούν σε μεγαλύτερη υποβάθμιση του σήματος (σχήμα 8.6). Αυτό, πιθανόν, οφείλεται στην εκχύλιση μεγαλύτερων ποσοτήτων παρεμποδιζουσών ουσιών.



Σχήμα 8.4 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με και χωρίς επιπρόσθετη εκχύλιση (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)



Σχήμα 8.5 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης που ελήφθησαν με και χωρίς επιπρόσθετη εκχύλιση (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)



Σχήμα 8.6 Τιμές της % υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με και χωρίς επιπρόσθετη εκχύλιση (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)

Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι η βέλτιστη εκχύλιση πραγματοποιείται με <u>2</u> + 0,5 mL οξικού αιθυλεστέρα.

Εύρεση του βέλτιστου διαλύτη έκπλυσης

Προκειμένου να καθαριστεί το δείγμα ορού από ουσίες που δύναται να παρεμποδίζουν

την ανάλυση, δοκιμάστηκαν οι εξής διαλύτες: *n*-πεντάνιο, *n*-εξάνιο, *n*-επτάνιο. Κάθε διαλύτης δοκιμάστηκε με όγκο 1,0 mL και 0,5 mL. Η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε με (2,0 + 0,5) mL EtOAc.

Από τη μελέτη παρατηρείται (σχήμα 8.7) ότι όταν χρησιμοποιείται 0,5 mL διαλύτη για τον καθαρισμό του δείγματος, οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης δε διαφοροποιούνται σημαντικά. Με το *n*-πεντάνιο η % απόλυτη ανάκτηση κυμάνθηκε από 73 - 101 %, με το *n*-εξάνιο 73 - 103 % και με το *n*-επτάνιο 73 - 101 %, επίσης. Με χρήση 1,0 mL από τον διαλύτη έκπλυσης, το *n*-εξάνιο έδωσε λίγο καλύτερα αποτελέσματα απόλυτης ανάκτησης (78 - 106 %), σε σχέση με το *n*-πεντάνιο (75 - 104 %) και το *n*-επτάνιο (77 - 90 %). Επιπλέον, οι τιμές της τυπικής απόκλισης ήταν καλύτερες με χρήση 1,0 mL *n*-εξανίου (0,643 - 3,260), ενώ με 1,0 mL *n*-επτανίου οι αντίστοιχες τιμές ήταν σημαντικά υψηλές, τόσο για τους αναλύτες όσο και για το *I*S (11,403 – 19,601).

Στα σχήματα ΠΙΙΙ_1 και ΠΙΙΙ_2 δίνονται οι τιμές της % σχετικής ανάκτησης και το % ποσοστό υποβάθμισης του σήματος για κάθε ουσία. Παρατηρείται ότι η μικρότερη υποβάθμιση του σήματος εμφανίστηκε με το *n*-εξάνιο (1,0 mL).

Έτσι, για τη <u>βέλτιστη έκπλυση</u> του δείγματος επελέχθη το <u>1,0 mL *n*-εξανίου</u>.

8.2 Βέλτιστη μέθοδος LLE σε δείγματα ορού

Στο σχήμα 8.8 δίνεται η βέλτιστη πορεία της *LLE* των αναλυτών από δείγματα ορού ιχθύος και στο σχήμα 8.9 δίνονται τα υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος ορού και ενός δείγματος ορού εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη μέθοδο. Παρατηρούμε ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του *IS*, από ουσίες του μητρικού υλικού.



Σχήμα 8.7 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης που ελήφθησαν με έκπλυση με *n*-πεντάνιο, *n*-εξάνιο και *n*-επτάνιο σε όγκους 1,0 mL και 0,5 mL (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση)



Σχήμα 8.8 Βασικά στάδια της βέλτιστης μεθόδου *LLE* των αναλυτών από δείγμα ορού ιχθύος (ΔΣ=δοκιμαστικός σωλήνας)



Σχήμα 8.9 Υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος ορού και ενός δείγματος ορού εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη μέθοδο (5,18 min: SDZ 250 ng mL⁻¹, 5,58 min: TMP 175 ng mL⁻¹, 6,21 min: AcSDZ 250 ng mL⁻¹, 7,33 min: DPS 175 ng mL⁻¹)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ ΗΠΑΤΟΣ ΙΧΘΥΟΣ

9.1 Ανάπτυξη μεθόδου QuEChERS σε δείγματα ήπατος

Η πορεία QuEChERS είναι μία γρήγορη και αρκετά ευέλικτη πορεία, φθηνή, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής. Στην παρούσα διατριβή, διερευνήθηκε η εφαρμογή της πορείας αυτής στην ανάλυση των δειγμάτων ήπατος ιχθύος, προκειμένου για τον προσδιορισμό των SDZ, AcSDZ και TMP με /S την DPS. Πιο συγκεκριμένα, έγιναν τροποποιήσεις σε δημοσιευμένη μέθοδο για τον προσδιορισμό SAs σε ήπαρ βοδιού με σύστημα *LC/MS/MS*.³⁰⁷ Στο σχήμα 9.1 δίνεται διαγραμματικά η τροποποιημένη μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε.

Αναλύθηκαν:

- ✓ Ένα «λευκό» δείγμα ήπατος για τον έλεγχο της ειδικότητας της μεθόδου,
- ✓ Δύο δείγματα ήπατος εμβολιασμένα μετά την πορεία QuEChERS,
- ✓ Τρία δείγματα ήπατος εμβολιασμένα πριν την πορεία QuEChERS.

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ήταν: 100 ng mL⁻¹ *DS* (SDZ, AcSDZ), 50 ng mL⁻¹ *DS* (TMP) και 50 ng mL⁻¹ *DS* (DPS).

Οι δοκιμές που έγιναν δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα και, έτσι, εγκαταλήφθηκε η μέθοδος αυτή.

9.2 Ανάπτυξη της μεθόδου ASE/SPE σε δείγματα ήπατος

Δοκιμάστηκε, αρχικά, η εφαρμοσιμότητα σε δείγματα ήπατος της μεθόδου ASE/SPE για δείγματα σάρκας με δέρμα, η ανάπτυξη της οποίας περιγράφηκε στα εδάφια 7.1 και 7.2. Κατά τη μελέτη αυτή, παρουσιάζονταν διάφορα προβλήματα, με σημαντικότερο αυτό της μη αποπεράτωσης της εκχυλιστικής διαδικασίας από τη συσκευή ASE λόγω





Σχήμα 9.1 Πορεία QuEChERS που δοκιμάστηκε στην παρούσα διατριβή για τον προσδιορισμό των SDZ, TMP και AcSDZ, με /S DPS, σε ήπαρ ιχθύος, με σύστημα LC/MS της εταιρείας Waters

ατελούς πλήρωσης της κυψελίδας με διαλύτη (H₂O) πριν το στάδιο θέρμανσης και διακοπή της εκτέλεσης της μεθόδου, λόγω ατελούς εκτέλεσης του σταδίου flush και λόγω ατελούς εκτέλεσης του σταδίου purge. Πιθανόν, η υψηλή περιεκτικότητα του ήπατος ιχθύος σε λιπαρές ύλες «βούλωνε» το φίλτρο στην κυψελίδα, γεγονός που διέκοπτε την ροή εκτέλεσης της μεθόδου. Έτσι, έγιναν προσπάθειες τροποποίησης της ανωτέρω μεθόδου.

Αρχικά, δοκιμάστηκαν διαφορετικά φίλτρα στην κυψελίδα του δείγματος (*GF/B*, *MN GF*-1, *RundFilter*), αλλά δε λύθηκε το πρόβλημα. Στη συνέχεια, δοκιμάστηκαν διαφορετικοί διαλύτες εκχύλισης: (α) MeOH και (β) μίγμα ACN/TCA 10⁻³ M *p*H 4 σε αναλογία 2/1 (v/v), με ταυτόχρονη μείωση της ποσότητας του δείγματος *ASE*, από 1 g σε 0,5 g. Και στις δύο περιπτώσεις, τα προβλήματα του *ASE* ξεπεράστηκαν, οι τιμές της % ανάκτησης, όμως, ήταν ιδιαίτερα χαμηλές. Τέλος, έγιναν δύο δοκιμές στον τρόπο έκπλυσης του δείγματος με το *n*-επτάνιο, με ταυτόχρονη περαιτέρω μείωση του δείγματος σε 0,2 g. Στην πρώτη περίπτωση, μετά την εκχύλιση του *ASE*, την ψύξη και τη φυγοκέντρηση του εκχυλίσματος, κλάσμα όγκου 4 mL κατεργάστηκε με 4 mL *n*-επτανίου: το διφασικό σύστημα αναδεύτηκε, ψύχθηκε (παγόνερο) και φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm /15 min /4 °C) και αφού απομακρύνθηκε η πορεία που περιγράφηκε στο εδάφιο 7.3, χωρίς, όμως, το στάδιο έκπλυσης του *n*-επτανίου.

Στη δεύτερη δοκιμή, κλάσμα του εκχυλίσματος *ASE* όγκου 4 mL τοποθετήθηκε στη στήλη *SPE* και ακολουθήθηκε η πορεία του εδαφίου 7.3, χωρίς, όμως, το στάδιο έκπλυσης του *n*-επτανίου. Το μεθανολικό εκχύλισμα από την πορεία *SPE* όγκου 2 mL κατεργάστηκε με 2 mL *n*-επτανίου [αναδεύτηκε, ψύχθηκε (παγόνερο) και φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm /15 min /4 °C)] και αφού απομακρύνθηκε η άνω στιβάδα του *n*-επτανίου, ακολούθησε η εξάτμιση, η ανασύσταση και η διήθηση του δείγματος. Και στις δύο περιπτώσεις (α και β), η ανασύσταση έγινε με 0,2 mL *DS* και τα αποτελέσματα ήταν ικανοποιητικά (η μέση % απόλυτη ανάκτηση των τριών αναλυτών και του *IS* ήταν 85%). Ωστόσο, η αντιστοίχηση της συγκέντρωσης του τελικού διαλύματος του δείγματος και της αρχικής συγκέντρωσης στον ιστό ήπατος δεν ήταν ικανοποιητική (το τελικό διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng SDZ ανά mL *DS*, αντιστοιχούσε σε αρχική συγκέντρωση 500 μg kg⁻¹ ιστού ήπατος) (αντίστοιχες τιμές για AcSDZ, TMP και DPS). Για το λόγο αυτό, δοκιμάστηκε η περίπτωση έκπλυσης β, αλλά με τις διαφοροποιήσεις:

 [✓] εμβολιασμός στο δείγμα μάζας 0,2 g με 20 ng SDZ, AcSDZ και 10 ng TMP, DPS και όχι 100 ng και 50 ng, αντίστοιχα,

✓ τοποθέτηση στη στήλη SPE ολόκληρης της ποσότητας του αραιωμένου εκχυλίσματος ASE (όγκου 20 mL).

Με τον τρόπο αυτό επετεύχθη η αντιστοίχηση της συγκέντρωσης του τελικού διαλύματος 100 ng SDZ ανά mL *DS*, με 100 μg kg⁻¹ ιστού ήπατος (αντίστοιχες τιμές για AcSDZ, TMP και DPS). Δεν παρουσιάστηκε παρεμπόδιση στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του *IS* και οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης κρίθηκαν ικανοποιητικές. Έτσι, η μέθοδος διαμορφώθηκε όπως φαίνεται στο σχήμα 9.2.



Σχήμα 9.2 Βασικά στάδια της πορείας παρασκευής δείγματος ήπατος ιχθύος

Οι τιμές των παραμέτρων του ASE είναι αυτές του πίνακα 7.3 (εδάφιο 7.3) ενώ η πορεία SPE δίνεται στο σχήμα 9.3.

Το έκλουσμα από τη στήλη *SPE* κατεργάστηκε με 2 mL *n*-επτανίου [αναδεύτηκε, ψύχθηκε (παγόνερο) και φυγοκεντρήθηκε (3000 rpm /15 min /4 °C)] και αφού απομακρύνθηκε η άνω στιβάδα του *n*-επτανίου, εξατμίστηκε με ρεύμα N₂ στους 40 °C. Ακολούθως ανασυστάθηκε με 0,2 mL μίγματος H₂O/ACN 90/10 (v/v) που περιείχε 0,05 % FA (v/v), διηθήθηκε με φίλτρο *PVDF* 0,22 μm και ενέθηκε στο σύστημα *LC/MS*. Στα σχήματα 9.4 και 9.5 δίνονται οι τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του *IS* και οι τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών, αντίστοιχα, που ελήφθησαν με τη τροποποιημένη μέθοδο *ASE/SPE*. Υπολογίστηκε το % ποσοστό υποβάθμισης του σήματος (Σχήμα 9.6).

Η μέση % ανάκτηση για την SDZ ήταν 83,0 % και για την AcSDZ 90,4 %. Χαμηλότερη ήταν η % ανάκτηση για την TMP (76,2 %) και για την DPS (78,6 %). Η υποβάθμιση του σήματος στα δείγματα ήπατος κυμάνθηκε σε υψηλότερα επίπεδα από τα αντίστοιχα



Σχήμα 9.3 Πορεία SPE για τον καθαρισμό δείγματος ήπατος ιχθύος



Σχήμα 9.4 Τιμές της % απόλυτης ανάκτησης των αναλυτών και του /S που ελήφθησαν με τη τροποποιημένη μέθοδο ASE/SPE με εμβολιασμένα δείγματα ήπατος ιχθύος (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση, ενώ φαίνεται και η τυπική απόκλιση αυτών)



Σχήμα 9.5 Τιμές της % σχετικής ανάκτησης των αναλυτών που ελήφθησαν με τη τροποποιημένη μέθοδο *ASE/SPE* με εμβολιασμένα δείγματα ήπατος ιχθύος (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση, ενώ φαίνεται και η τυπική απόκλιση αυτών)



Σχήμα 9.6 Τιμές της υποβάθμισης του σήματος που ελήφθησαν με τη τροποποιημένη μέθοδο ASE/SPE με εμβολιασμένα δείγματα ήπατος ιχθύος (τα αποτελέσματα που δίνονται αφορούν τη μέση τιμή τριών δειγμάτων σε κάθε περίπτωση, ενώ φαίνεται και η τυπική απόκλιση αυτών)

δείγματα σάρκας με δέρμα και ορού (20,1 έως 44,8 %). Πιθανότερη αιτία είναι το υψηλότερο ποσοστό λίπους που περιέχεται στο ήπαρ, σε σχέση με τη σάρκα με δέρμα και τον ορό. Έτσι, περισσότερα συνεκχυλιζόμενα συστατικά οδηγούνται στην πηγή *ESI*, με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη υποβάθμιση του σήματος.

Τέλος, στο σχήμα 9.7 δίνονται τα υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος ήπατος και ενός δείγματος ήπατος εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη τροποποιημένη μέθοδο *ASE/SPE*. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει παρεμπόδιση στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του *IS*, από ουσίες του μητρικού υλικού.



Σχήμα 9.7 Υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος ήπατος και ενός δείγματος ήπατος εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη τροποποιημένη μέθοδο *ASE/SPE* (5,27 min: SDZ 100 μ g kg⁻¹, 5,63 min: TMP 50 μ g kg⁻¹, 6,18 min: AcSDZ 100 μ g kg⁻¹, 7,29 min: DPS 50 μ g kg⁻¹)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΣΑΡΚΑΣ ΜΕ ΔΕΡΜΑ ΙΧΘΥΟΣ

10.1 Εισαγωγή

Μετά την έκδοση της κοινοτικής οδηγίας 96/23/ΕΚ, η έννοια των συνήθων μεθόδων και των μεθόδων αναφοράς, έχει αντικατασταθεί από τη προσέγγιση βάσει κριτηρίων, σύμφωνα με την οποία καθορίζονται κριτήρια επίδοσης και διαδικασίες για την επικύρωση των μεθόδων διαλογής και των επιβεβαιωτικών μεθόδων. Με την απόφαση 2002/657/ΕΚ καθορίζονται οι κανόνες για τις αναλυτικές μεθόδους που θα χρησιμοποιηθούν κατά τις δοκιμές ανάλυσης των επίσημων δειγμάτων.

Στην παρούσα εργασία, αξιολογήθηκαν οι μέθοδοι προσδιορισμού των SDZ, TMP και AcSDZ με *IS* την DPS, που αναπτύχθησαν για τους τρεις ιστούς (σάρκα με δέρμα, ήπαρ, ορός), ως προς τα κριτήρια επίδοσης και τις άλλες απαιτήσεις της απόφασης 2002/657/EK. Ταυτόχρονα, όμως, έγινε προσπάθεια να καλυφθούν και οι απαιτήσεις του προτύπου ποιότητας EΛΟT *EN ISO/IEC* 17025. Βασική απαίτηση του προτύπου (τεχνική απαίτηση), προκειμένου να διασφαλίζεται η ποιότητα των αποτελεσμάτων των δοκιμών, είναι η εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων των δοκιμών. Έτσι, ακολουθήθηκαν τα στάδια εκτίμησης της αβεβαιότητας σύμφωνα με το πρότυπο αυτό και τις οδηγίες της *EURACHEM* ("Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement").³⁰⁸

Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που αξιολογήθηκαν προκειμένου να επικυρωθούν οι μέθοδοι για τους τρεις ιστούς, είναι:

- ειδικότητα (specificity) και εκλεκτικότητα (selectivity),
- ✓ παρεμποδίσεις από το μητρικό υλικό (matrix interferences),
- ✓ επιμόλυνση από ένεση σε ένεση (carry over),
- περιοχή γραμμικότητας (linearity range)-καμπύλη βαθμονόμησης (calibration curve),

- ορθότητα εντός της ημέρας (intra-day trueness)-υπολογισμός ανάκτησης (απόλυτης και σχετικής)-εκτίμηση του συστηματικού σφάλματος (bias),
- πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day precision) ή επαναληψιμότητα (repeatability)εκτίμηση του τυχαίου σφάλματος (random error),
- ✓ ορθότητα μεταξύ των ημερών (inter-day trueness)-υπολογισμός ανάκτησης (απόλυτης και σχετικής)-εκτίμηση του συστηματικού σφάλματος (bias),
- πιστότητα μεταξύ των ημερών (inter-day precision) ή ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (intra-laboratory reproducibility)-εκτίμηση του τυχαίου σφάλματος (random error),
- ✓ ανθεκτικότητα (robustness) με μεταβολές στις παραμέτρους του συστήματος LC/MS, αλλά και με μεταβολές κατά την παρασκευαστική πορεία των δειγμάτων,
- σταθερότητα (stability) των διαλυμάτων (neat solutions) των αναλυτών αλλά και των αναλυτών μέσα στο μητρικό υλικό (matrix solutions),
- ✓ όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD),
- ✓ όριο ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ),
- ✓ όριο απόφασης, CC_{α} (*limit of decision*),
- \checkmark ικανότητα ανίχνευσης, *CC_β* (capability of detection),
- ✓ εκτίμηση της αβεβαιότητας (estimation of uncertainty).

Ταυτόχρονα με τα ανωτέρω χαρακτηριστικά ποιότητας, αξιολογήθηκαν το "*matrix effect*" και το "*relative matrix effect*".

Στην αρχή της εργαστηριακής ημέρας πραγματοποιείτο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος.

10.2. Έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος

Ο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος (System Suitability Test, SST)³⁰⁹ επιβεβαιώνει την επαναληψιμότητα του οργάνου και τη διαχωριστότητα (resolution). Η επαναληψιμότητα του οργάνου ελεγχόταν με έξι ενέσεις ενός πρότυπου διαλύματος ελέγχου (ΠΔΕ) με συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*. Υπολογιζόταν ο μέσος όρος των επιφανειών, η τυπική απόκλιση και η % σχετική τυπική απόκλιση (*RSD*, %), η οποία δε πρέπει να ξεπερνά το 2 %. Η διαχωριστότητα ελεγχόταν με τρεις ενέσεις ενός δείγματος ελέγχου (ΔΕ) με συγκεντρώ-

σεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL διαλύματος μητρικού υλικού, που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 100 μg SDZ, 50 μg TMP, 100 μg AcSDZ και 50 μg DPS ανά kg σάρκας με δέρμα. Μελετήθηκε η μορφή της κορυφής, η αποτελεσματικότητα της στήλης και ο παράγοντας ασυμμετρίας.

Στον πίνακα 10.1 δίνονται τα κριτήρια επίδοσης για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος και οι τιμές που λαμβάνονταν στην περίπτωση του ΔΕ.

10.3 Έλεγχος της ειδικότητας, της εκλεκτικότητας και των παρεμποδίσεων από το μητρικό υλικό

Η ειδικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από «λευκά» δείγματα σάρκας με δέρμα (Α, Β), με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από πρότυπα διαλύματα και δείγματα σάρκας με δέρμα εμβολιασμένα με μίγμα αναλυτών και /S σε συγκεντρώσεις LOQ και MRL.

Επαναληψιμότητα	Απαίτηση -	Πρότυπο Διάλυμα Ελέγχου (ΠΔΕ)			
		SDZ	ТМР	AcSDZ	DPS
RT RRT	±5% ±2,5%	5,35 (±0,0084) 0,73 (±0,00090)	5,80 (±0,012) 0,79 (±0,0021)	6,22 (±0,0075) 0,85 (±0,0015)	7,30 (±0,0082)
A RA		(137,9±2,3)×10 ³ 2,671 (±0,074)	(307,4±2,3)×10 ³ 5,96 (±0,12)	(719,7±1,3)×10 ³ 1,39 (±0,025)	(516,0±8,7)×10 ²
Απόδοση/	Δπαίτηση	Δείγμα Ελέγχου (ΔΕ) σάρκας με δέρμα			
Διαχωριστότητα	Anumph -	SDZ	ТМР	AcSDZ	DPS
n A _f R _s	0,8 – 1,2 ≥ 1,5	249,0 (±2,1) 1,181 (±0,052) ≥1,5	381,0 (±3,6) 1,361 (±0,042) ≥ 1,5	439,0 (±5,0) 2,034 (±0,098) ≥ 1,5	596,0 (±8,8) 1,501 (±0,071) ≥ 1,5

Πίνακας 10.1 Κριτήρια επίδοσης για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος

RT: χρόνος συγκράτησης (min), *RRT*: σχετικός χρόνος συγκράτησης (χρόνος συγκράτησης αναλύτη/χρόνος συγκράτησης *IS*), *Α*: επιφάνεια κορυφής, *RA*: σχετική επιφάνεια κορυφής (επιφάνεια κορυφής αναλύτη/επιφάνεια κορυφής *IS*), *n*: αριθμός θεωρητικών πλακών, *A*; παράγοντας ασυμμετρίας, *R*_s: διαχωριστότητα. Στις παρενθέσεις δίνονται οι τιμές τυπικής απόκλισης

Διαπιστώθηκε ότι στον χρόνο που εκλούονται οι αναλύτες και το *IS*, δεν εκλούεται κάποιο συστατικό της σάρκας με το δέρμα (σχήμα 10.1).

Στη συνέχεια, ενέθηκαν δέκα (10) «λευκά» δείγματα σάρκας με δέρμα διαφορετικής προέλευσης, π.χ. διαφορετικά είδη ιχθύων (τσιπούρα, λαβράκι), διαφορετικού σωματικού βάρους, διαφορετικής διατροφής κ.λπ, για να ελεγχθούν περαιτέρω τυχόν υπάρχουσες παρεμποδίσεις από το μητρικό υλικό. Δεν παρατηρήθηκε έκλουση κάποιου συστατικού του μητρικού υλικού στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του εσωτερικού προτύπου /S.

Η χρήση του *MS* ως ανιχνευτή προσδίδει στη μέθοδο εκλεκτικότητα ως προς την ανίχνευση των αναλυτών. Αυτό οφείλεται στην εφαρμογή της τεχνικής *SIM*, με την οποία ανιχνεύονται ιόντα συγκεκριμένου/προκαθορισμένου λόγου *m/z*. Έτσι, η εφαρμογή της τεχνικής αυτής, σε συνδυασμό με τη σύγκριση των χρωματογραφημάτων «λευκού» και εμβολιασμένου δείγματος, προσδίδουν στη μέθοδο ειδικότητα και εκλεκτικότητα.

10.4 Έλεγχος της επιμόλυνσης

Η επιμόλυνση από ένεση σε ένεση είναι βασικό πρόβλημα που μπορεί να επηρεάσει την ορθότητα μιας βιοαναλυτικής μεθόδου, ειδικά αν αυτή περιλαμβάνει την τεχνική *LC/MS* με αρκετά μεγάλη δυναμική περιοχή. Μάλιστα, σε μια τέτοια περίπτωση, η επίδραση του φαινομένου στις χαμηλές συγκεντρώσεις είναι αρκετά συχνή.³¹⁰ Η επιμόλυνση οφείλεται, γενικά, σε υπολείμματα αναλύτη από δείγμα υψηλής συγκέντρωσης της προηγούμενης ένεσης.

Στην παρούσα διατριβή, ο έλεγχος της επιμόλυνσης έγινε παρασκευάζοντας ένα «λευκό» δείγμα και δύο εμβολιασμένα δείγματα συγκέντρωσης δεκαπλάσιας του *MRL* (10×*MRL*).

Δεν παρατηρήθηκε κάποια επιμόλυνση στο «λευκό» δείγμα με κάποιον αναλύτη ή το *IS* από την ένεση κάποιου από τα δείγματα υψηλής συγκέντρωσης. Οι κορυφές που εμφανίστηκαν σε ορισμένες περιπτώσεις ήταν μικρότερες από τα *LOD*s των ουσιών.


Σχήμα 10.1 Υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος σάρκας με δέρμα και ενός δείγματος σάρκας με δέρμα εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών, που ελήφθησαν με τη βέλτιστη *ASE/SPE LC-ESI-MS* μέθοδο (5,22 min: SDZ 100 μ g kg⁻¹, 5,88 min: TMP 50 μ g kg⁻¹, 6,23 min: AcSDZ 100 μ g kg⁻¹, 7,38 min: DPS 50 μ g kg⁻¹)

10.5 Έλεγχος της σταθερότητας

10.5.1 Συνθήκες μελέτης της σταθερότητας

Η χημική σταθερότητα μιας φαρμακευτικής ουσίας είναι συνάρτηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων, των συνθηκών φύλαξης, της ύπαρξης μεταβολιτών, των συστατικών του μητρικού υλικού, αλλά και των συστατικών του δοχείου φύλαξής της. Η αξιολόγηση της σταθερότητας είναι σημαντική κατά τη διάρκεια της επικύρωσης της μεθόδου και πρέπει να αντανακλά στις εκάστοτε συνθήκες χειρισμού και ανάλυσης του δείγματος.³¹⁰ Ακολουθήθηκαν οι γενικές οδηγίες της απόφασης 2002/657/ΕΚ, σε συνδυασμό με οδηγίες άλλων υπηρεσιών όπως του *US FDA*,²²⁷ του *ANVISA*²²⁸ και του *EMA*.²²⁹

Η μελέτη της σταθερότητας (των αναλυτών και του IS) περιελάμβανε:

Α. Αναφορικά με το υπόστρωμα:

- Σταθερότητα σε πρότυπα διαλύματα (standard solutions stability),
- Σταθερότητα στο μητρικό υλικό, δηλαδή σε σάρκα με δέρμα (matrix solutions stability).
- Β. Αναφορικά με τις συνθήκες φύλαξης (θερμοκρασία/παρουσία ή όχι φωτός) :

- ✓ Σταθερότητα σε θερμοκρασία 20 °C (κατάψυξη/σκοτάδι),
- ✓ Σταθερότητα σε θερμοκρασία + 4 °C (ψυγείο/σκοτάδι),
- ✓ Σταθερότητα σε θερμοκρασία +15 °C (θάλαμος αυτόματου δειγματολήπτη/ σκοτάδι).
- Γ. Διαδικασία ψύξης/απόψυξης (freeze-thaw stability).
- Δ. Αναφορικά με τη χρονική διάρκεια μελέτης της σταθερότητας:
 - Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα (short-term stability),
 - Μακροπρόθεσμη σταθερότητα (long-term stability).

10.5.2 Σταθερότητα σε πρότυπα διαλύματα

Μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών και του *IS* σε πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης (ΠΔΠ) (*Standard Stock Solution*, SSS), σε πρότυπο διάλυμα εργασίας (ΠΔΕΡ) (*Standard Working Solution*, SWS) και σε πρότυπο διάλυμα ελέγχου (ΠΔΕ) (*Standard Control Solution*, SCS) (σχήματα 10.2 και 10.3). Οι συγκεντρώσεις των διαλυμάτων δίνονται στον πίνακα 10.2.

Διάλυμα	Αναλύτης	Συγκέντρωση	Διαλύτης/Μίγμα διαλυτών
ПДП	SDZ TMP AcSDZ DPS	0,1 mg mL ⁻¹ 0,1 mg mL ⁻¹ 0,1 mg mL ⁻¹ 0,1 mg mL ⁻¹	MeOH » » »
ΠΔΕΡ	SDZ TMP AcSDZ DPS	1000 ng mL ⁻¹ 500 ng mL ⁻¹ 1000 ng mL ⁻¹ 500 ng mL ⁻¹	Μίγμα H₂O/ACN 90/10 (v/v)
ΠΔΕ	SDZ TMP AcSDZ DPS	100 ng mL ⁻¹ 50 ng mL ⁻¹ 100 ng mL ⁻¹ 50 ng mL ⁻¹	Μίγμα H₂O/ACN 90/10 (v/v) με FA 0,1 % (v/v)

Πίνακας 10.2 Πρότυπα διαλύματα στα οποία ελέγχθηκε η σταθερότητα

Τόσο στο ΠΔΕΡ όσο και στο ΠΔΕ δεν παρατηρήθηκε μείωση της ευρεθείσας ποσότητας των ουσιών κατά τη διάρκεια της ημέρας.



Σχήμα 10.2 Σταθερότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας στο ΠΔΕΡ με συγκεντρώσεις 1000 ng SDZ, 500 ng TMP, 1000 ng AcSDZ και 500 ng DPS ανά mL *DS*

Τα διαγράμματα βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης σταθερότητας των διαλυμάτων ΠΔΕΡ και ΠΔΕ δίνονται στα σχήματα ΠV_3 - ΠV_8 και ΠV_9 - ΠV_12, αντίστοιχα. Από τα διαγράμματα αυτά, παρατηρείται ότι, η SDZ διατηρείται σταθερή στην κατάψυξη μέχρι μία εβδομάδα, τόσο στο ΠΔΕΡ, όσο και στο ΠΔΕ, ενώ στο ψυγείο δε μεταβάλλεται η συγκέντρωσή της για τρεις ημέρες και στα δύο διαλύματα. Η TMP διατηρείται σταθερή στην κατάψυξη μέχρι τρεις εβδομάδες στο ΠΔΕΡ και μέχρι μία εβδομάδες στο ΠΔΕΡ και στη μία εβδομάδα στο ΠΔΕΡ. Σε συνθήκες ψυγείου η σταθερότητά της περιορίζεται σταθερή για τρεις εβδομάδες στο ΠΔΕΡ και στη μία εβδομάδα στο ΠΔΕ. Η AcSDZ διατηρείται σταθερή για τρεις εβδομάδες στους - 20 °C στη συγκέντρωση του ΠΔΕΡ και του ΠΔΕ, ενώ η σταθερότητά της περιορίζεται σε τρεις ημέρες στους + 4 °C και στις δύο συγκεντρώσεις.



Σχήμα 10.3 Σταθερότητα κατά τη διάρκεια της ημέρας στο ΠΔΕ με συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*

Τέλος, η DPS είναι σταθερή για τρεις εβδομάδες στους - 20 °C στο ΠΔΕΡ και για δύο

εβδομάδες στο ΠΔΕ. Στους + 4 °C είναι σταθερή για μία εβδομάδα στο ΠΔΕΡ και για τρεις ημέρες στο ΠΔΕ.

Πίνακας σταθερότη	10.3 Β τα των ΠΔ	ραχυπρόθει ΕΡ και ΠΔΕ	σμη <u>-</u>	και	μακροπρόθεσμη
	<u>Βραχυ</u> (s	πρόθεσμη α hort–term s Ημέρα C » » ÷ » ÷ » ÷ « « « « « «	<u>ταθερι</u> tability) 1 ^η 2 ^η 3 ^η 5 ^η 5 ^η 6 ^η (1 ^η 2 ^η	<u>ότητα</u>)	
	<u>Μακρο</u> (/	* πρόθεσμη c ong–term st Μήνας 1 * 2 * 3 * 4	3'' <u>αταθερ</u> ability) ^{ος} 2 ^{ος} ος	<u>ότητα</u>	

Στον αυτόματο δειγματολήπτη, η σταθερότητα των αναλυτών περιορίζεται στις τρεις ημέρες, τόσο στο ΠΔΕΡ, όσο και στο ΠΔΕ, ενώ η DPS είναι σταθερή για δύο ημέρες στις συγκεντρώσεις του ΠΔΕΡ και μία ημέρα στις αντίστοιχες του ΠΔΕ. Για το λόγο αυτό, δε πραγματοποιήθηκε μελέτη της μακροπρόθεσμης σταθερότητας στις συνθήκες του αυτόματου δειγματολήπτη.

Το ΠΔΠ που φυλασσόταν στην κατάψυξη, χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη (α) της βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης σταθερότητας και (β) της σταθερότητας κατά τη διαδικασία απόψυξης/ψύξης.

Στην περίπτωση (α) ελέγχθηκαν οι χρονικές στιγμές του πίνακα 10.3 με παρασκευή ΠΔΕΡ και ΠΔΕ κάθε φορά. Ο έλεγχος γίνεται με τα ΠΔΕ.

Η σταθερότητα κατά τη διαδικασία απόψυξης/ψύξης έγινε χρησιμοποιώντας το ίδιο φιαλίδιο κάθε φορά, και παρασκευάζοντας ΠΔΕΡ και ΠΔΕ. Ο έλεγχος γίνεται με τα ΠΔΕΡ κατά τις ακόλουθες χρονικές στιγμές του πίνακα 10.4.

<u>Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα</u>					
(short–term f	reeze-thaw stability)				
Ημέρα 0 ^η	0 ^{ος} κύκλος απόψυξης/ψύξης				
» 1 ^η	1 ^{oç} »				
» 2 ^η	2 ^{°ς} »				
» 3 ^η	3 ^{oç} »				
» 4 ^ŋ	4 ^{oç} »				
» 5 ^դ	5 ^{oç} »				
» 6 ^η	6 ^{oç} »				
Εβδομάδα 1 ^η	7 ^{°ς} »				
א 2 ^ק	8 ^{0ς} »				
» 3 ^ŋ	9 ^{oç} »				
Μακροπρόθ	θεσμη σταθερότητα				
(long-term fr	reeze-thaw stability)				
Μήνας 1 ^{ος}	10 ^{ος} κύκλος απόψυξης/ψύξης				
» 2 ^{oς}	11 ^{oc} »				
» 3 ^{°ς}	12 ^{°ς} »				
» 4 ^{ος}	13 ^{oç} »				

Πίνακας 10.4 Βραχυπρόθεσμη και μακροπρόθεσμη σταθερότητα κατά τη διαδικασία απόψυξης/ψύξης του ΠΔΠ

Τα διαγράμματα βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης σταθερότητας του ΠΔΠ παρασκευάζοντας το ΠΔΕ δίνονται στα σχήματα ΠV_13 και ΠV_14.

Τέλος, στα σχήματα 10.4 και 10.5 δίνονται τα διαγράμματα βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης σταθερότητας κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης του ΠΔΠ, σύμφωνα με τον πίνακα 10.4, παρασκευάζοντας το ΠΔΕ.

Από τα διαγράμματα των σχημάτων ΠV_13 και ΠV_14, παρατηρείται ότι στους - 20 °C διατηρούνται σταθερές όλες οι ουσίες στη συγκέντρωση του ΠΔΠ (0,1 mg mL⁻¹) για τρεις μήνες. Από τα διαγράμματα των σχημάτων 10.4 και 10.5 παρατηρείται μετά τον δεύτερο κύκλο ψύξης/απόψυξης, η σταθερότητα της SDZ, της AcSDZ και της DPS μειώνεται, ενώ της TMP επηρεάζεται μετά τον τρίτο κύκλο ψύξης/απόψυξης.

10.5.3 Σταθερότητα σε μητρικό υλικό

Μελετήθηκε η σταθερότητα των αναλυτών και του /S σε διάλυμα μητρικού υλικού με



Σχήμα 10.4 Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα του ΠΔΠ κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης, παρασκευάζοντας το ΠΔΕΡ με συγκεντρώσεις 1000 ng SDZ, 500 ng TMP, 1000 ng AcSDZ και 500 ng DPS ανά mL DS



Σχήμα 10.5 Μακροπρόθεσμη σταθερότητα του ΠΔΠ κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης, παρασκευάζοντας το ΠΔΕΡ με συγκεντρώσεις 1000 ng SDZ, 500 ng TMP, 1000 ng AcSDZ και 500 ng DPS ανά mL DS



Σχήμα 10.6 Σταθερότητα ενός διάλυματος σε μητρικό υλικό κατά τη διάρκεια της ημέρας με συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*

συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL DS. Ένα φιαλίδιο χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθεί η σταθερότητα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης των δειγμάτων, της ημέρας παρασκευής των, και σε χρονικά διαστήματα

τριών ωρών μέσα στη λίστα δειγμάτων (μελέτη της σταθερότητας κατά τη διάρκεια της ημέρας). Το αντίστοιχο διάγραμμα σταθερότητας φαίνεται στο σχήμα 10.6.

Από το διάγραμμα του σχήματος 10.6 παρατηρείται ότι και οι τέσσερις ουσίες διατηρούνται σταθερές μέσα στο ανωτέρω διάλυμα κατά τη διάρκεια των δώδεκα ωρών (θερμοκρασία + 15 °C στον θάλαμο του αυτόματου δειγματολήπτη). Τα υπόλοιπα φιαλίδια αποθηκεύθηκαν στην κατάψυξη, στο ψυγείο και στον αυτόματο δειγματολήπτη, οπότε ελέγχθηκε η σταθερότητα στις χρονικές στιγμές του πίνακα 10.3.

Τα διαγράμματα βραχυπρόθεσμης σταθερότητας του διαλύματος σε μητρικό υλικό δίνονται στα σχήματα ΠV_15 - ΠV_17, ενώ στο σχήμα ΠV_18 δίνεται το διάγραμμα μακροπρόθεσμης σταθερότητας του εν λόγω διαλύματος.

Από τα διαγράμματα αυτά παρατηρείται ότι η SDZ και η AcSDZ είναι σταθερές, στους -20 °C, μέχρι και τη δεύτερη ημέρα, η DPS είναι σταθερή για μία ημέρα, ενώ η TMP διατηρείται σχετικά σταθερή για τρεις εβδομάδες. Στο ψυγείο αλλά και στον θάλαμο του αυτόματου δειγματολήπτη, οι ουσίες είναι σταθερές μέχρι και τη πρώτη ημέρα. Επιλπέον, παρατηρείται η διάσπαση των αναλυτών και του /S σε διάλυμα μητρικού υλικού με την πάροδο των μηνών, σε συνθήκες κατάψυξης. Η αντίστοιχη μελέτη της μακροπρόθεσμης σταθερότητας δε πραγματοποιήθηκε για τις συνθήκες ψυγείου και αυτόματου δειγματολήπτη.

Τέλος, παρασκευάστηκε ένα νέο διάλυμα σε μητρικό υλικό με τις ίδιες συγκεντρώσεις, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη σταθερότητας κατά τη διαδικασία απόψυξης/ψύξης, σύμφωνα με τον πίνακα 10.4.

Στα σχήματα 10.7 και 10.8 δίνονται τα διαγράμματα βραχυπρόθεσμης και μακροπρόθεσμης σταθερότητας του διαλύματος σε μητρικό υλικό, κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης.

Από το διάγραμμα του σχήματος 10.7 παρατηρείται ότι οι αναλύτες παραμένουν σταθεροί στο διάλυμα του μητρικού υλικού μέχρι και τον τρίτο κύκλο ψύξης/απόψυξης, ενώ η DPS είναι σταθερή μέχρι και τον δεύτερο κύκλο.

Στο διάγραμμα του σχήματος 10.8 φαίνεται η διάσπαση των αναλυτών και του /S μέχρι και τον δωδέκατο κύκλο ψύξης/απόψυξης.



Σχήμα 10.7 Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα του διάλυματος σε μητρικό υλικό κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης (συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*)



Σχήμα 10.8 Μακροπρόθεσμη σταθερότητα του διάλυματος σε μητρικό υλικό κατά τη διαδικασία ψύξης/απόψυξης (συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*)

Από ολόκληρη τη μελέτη σταθερότητας εξάγονται τα εξής συμπεράσματα:

- ✓ Τα ΠΔΠ των αναλυτών και του /S σε συγκεντρώσεις 0,1 mg mL⁻¹, είναι σταθερά για τρεις μήνες τουλάχιστον στους 20 °C,
- ✓ Τα ΠΔΠ των SDZ, AcSDZ και DPS μπορούν να αποψυχθούν και επαναψυχθούν μέχρι δύο φορές, ενώ το ΠΔΠ της TMP μέχρι τρεις φορές,
- ✓ Το ΠΔΕΡ της SDZ, συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹, διατηρείται σταθερό μέχρι τρεις ημέρες μέσα στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο και μέχρι μια εβδομάδα στην κατάψυξη. Η ίδια σταθερότητα παρατηρείται και για το ΠΔΕ, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹. Στην περίπτωση ενός διαλύματος μητρικού υλικού, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹, η SDZ είναι σταθερή για μία ημέρα στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο

ψυγείο, για δύο ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι τρεις φορές,

- ✓ Το ΠΔΕΡ της TMP, συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹, διατηρείται σταθερό μέχρι τρεις ημέρες μέσα στον αυτόματο δειγματολήπτη, μέχρι δύο εβδομάδες στο ψυγείο και μέχρι τρεις εβδομάδες στην κατάψυξη. Το ΠΔΕ, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹ είναι σταθερό για τρεις ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και για μία εβδομάδα στο ψυγείο και στην κατάψυξη. Στην περίπτωση ενός διαλύματος μητρικού υλικού, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹, η TMP είναι σταθερή για μία ημέρα στον αυτόματο δειγματολήπτη και στον αυτόματο φυγείο, για τρεις ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι τρεις φορές,
- ✓ Το ΠΔΕΡ της AcSDZ, συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹, διατηρείται σταθερό μέχρι τρεις ημέρες μέσα στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο και μέχρι τρεις εβδομάδες στην κατάψυξη. Η ίδια σταθερότητα παρατηρείται και για το ΠΔΕ, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹. Στην περίπτωση ενός διαλύματος μητρικού υλικού, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹, η AcSDZ είναι σταθερή για μία ημέρα στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για δύο ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι τρεις φορές,
- ✓ Τέλος, το ΠΔΕΡ της DPS, συγκέντρωσης 1000 ng mL⁻¹, διατηρείται σταθερό μέχρι δύο ημέρες μέσα στον αυτόματο δειγματολήπτη, μέχρι μία εβδομάδα στο ψυγείο και μέχρι τρεις εβδομάδες στην κατάψυξη. Στο ΠΔΕ, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹, η DPS είναι σταθερή για μία ημέρα στον αυτόματο δειγματολήπτη, για τρεις στο ψυγείο και για δύο εβδομάδες στην κατάψυξη. Στην περίπτωση ενός διαλύματος μητρικού υλικού, συγκέντρωσης 100 ng mL⁻¹, η DPS είναι σταθερή για μία ημέρα στον αυτόματο δειγματολήπτη, στο ψυγείο και στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι δύο φορές.

10.6 Έλεγχος της ανθεκτικότητας

Μελετήθηκε η επίδραση μικρών, προμελετημένων διαφοροποιήσεων των παραμέτρων της μεθόδου *LC/MS* στην καταλληλότητα του συστήματος, αλλά και παραγόντων της

παρασκευαστικής πορείας στο τελικό αποτέλεσμα.

10.6.1 Ανθεκτικότητα στο σύστημα LC/MS

Οι παράμετροι του τμήματος *LC* που επιλέχθηκαν για να εξεταστούν, ήταν το % ποσοστό του FA στην κινητή φάση και η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Μελετήθηκε η επίδραση των διαφοροποιήσεων των παραμέτρων αυτών στους χρόνους ανάσχεσης των αναλυτών και του *IS*, αλλά και στον λόγο των επιφανειών καθενός από τους αναλύτες προς το *IS*. Επίσης, μελετήθηκε η επίδραση μικρών, προμελετημένων διαφοροποιήσεων του τριχοειδούς και του δυναμικού του κώνου (τμήμα *MS*) στον λόγο των επιφανειών καθενός από τους ανάλυτες προς το *IS*. Επίσης εξετάστηκε σε τρία επίπεδα (-1, 0 και +1). Κάθε φορά μεταβαλλόταν η τιμή ενός μόνο παράγοντα ώστε να καθοριστεί η επίδρασή του στο τελικό αποτέλεσμα.

Παρασκευάστηκε ένα πρότυπο διάλυμα που περιείχε τις SDZ και AcSDZ σε συγκέντρωση 100 ng mL⁻¹ *DS* για κάθε ουσία και τις TMP και DPS σε συγκέντρωση 50 ng mL⁻¹ DS, επίσης, για κάθε ουσία. Σε κάθε μεταβολή των παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν τρεις ενέσεις του διαλύματος.

Στους πίνακες 10.5 και 10.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για τις μεταβολές της μεθόδου στα τμήματα *LC* και *MS*, αντίστοιχα, από όπου φαίνεται ότι οι μικρές διαφοροποιήσεις των παραμέτρων δεν επιφέρουν σημαντική αλλαγή στο αποτέλεσμα.

10.6.2 Ανθεκτικότητα στη μέθοδο παρασκευής ενός δείγματος σάρκας με δέρμα

Για την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην παρασκευαστική πορεία ενός δείγματος σάρκας με δέρμα, ακολουθήθηκε η μέθοδος του μερικού παραγοντικού σχεδιασμού των *Plackett* και *Burman*, δύο επιπέδων με τρεις παράγοντες (*two level partial factorial design*),³¹¹⁻³¹³ (πίνακας ΠV_1). Στον πίνακα 10.7 δίνονται οι τιμές των παραγόντων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε ένα από τα τέσσερα πειράματα, σύμφωνα με τον πίνακα ΠV_1 και οι αντίστοιχες τιμές του λόγου επιφανειών.

Στον πίνακα 10.8 δίνονται οι τιμές των λόγων των επιφανειών κάθε αναλύτη προς το εσωτερικό πρότυπο, οι τιμές των παραστάσεων D_A , D_B και D_Γ και οι τιμές $\sqrt{2} \times SD$ του πρώτου πειράματος.

Παρατηρείται ότι, για κάθε αναλύτη οι απόλυτες τιμές των D_A , D_B και D_{Γ} είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές $\sqrt{2} \times SD$, που σημαίνει ότι και οι τρεις παράγοντες που μελετήθηκαν συνεισφέρουν σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα και δε θα πρέπει οι τιμές των να αποκλίνουν από εκείνες της αναλυτικής πορείας.

10.7 Καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς

10.7.1 Εισαγωγή

Με την καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς της μορφής:

$$y = \alpha + \beta x$$

όπου: y = η επιφάνεια ή ο λόγος επιφανειών χρωματογραφικής κορυφής

x = η συγκέντρωση ή ο λόγος συγκεντρώσεων του πρότυπου διαλύματος ή του διαλύματος δείγματος, ελέγχθηκε:

- (1) Ο συντελεστής συσχέτισης (coefficient of correlation),
- (2) Η γραμμικότητα (linearity) και το εύρος της γραμμικής περιοχής (range),
- (3) Η τυπική απόκλιση (standard deviation) και τα όρια εμπιστοσύνης (confidence interval) των παραμέτρων α (τομή στον άξονα y'y, y-intercept) και β (κλίση της ευθείας, slope ή gradient),
- (4) Το σφάλμα και τα όρια εμπιστοσύνης στην προσδιοριζόμενη συγκέντρωση του αγνώστου που λαμβάνεται με την καμπύλη αναφοράς.

Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς με: (α) πρότυπα διαλύματα (*ccA*), (β) δείγματα εμβολιασμένα με τους αναλύτες και το /S μετά την εκχύλιση (*ccB*) και (γ) δείγματα εμβολιασμένα με τους αναλύτες και το /S πριν από την εκχύλιση (*ccC*).

Για κάθε μία από τις *ccA*, *ccB* και *ccC*, ελέγχθηκαν οι παραπάνω παράμετροι (1 έως 4), αρχικά, σε τρία εύρη συγκεντρώσεων, όπως περιγράφηκαν στο εδάφιο 6.4.2. Στη συνέχεια, κατασκευάστηκε η καμπύλη αναφοράς ενιαίου εύρους για τις *ccA*, *ccB* και

Μεταβολες τμήματος <i>LC</i>		s	SDZ	т	MP	Ad	SDZ	DPS
Παράμετρος	Επίπεδο	RT	RA	RT	RA	RT	RA	RT
A1								
0,04	-1	5,29±0,01	2,635±0,065	5,72±0,01	4,484±0,062	6,22±0,01	1,097±0,028	7,31±0,00
0,05	0	5,29±0,01	2,635±0,030	5,73±0,01	4,50±0,12	6,23±0,01	1,106±0,023	7,31±0,01
0,06	+1	5,28±0,02	2,699±0,050	5,72±0,01	4,740±0,046	6,22±0,01	1,143±0,037	7,32±0,01
Μέση Τιμή±SD		5,29±0,01	2,656±0,037	5,72±0,01	4,57±0,14	6,22±0,01	1,115±0,024	7,31±0,01
A2								
0,19	-1	5,63±0,16	2,12±0,40	5,99±0,13	4,51±0,41	6,48±0,11	0,999±0,091	7,50±0,06
0,20	0	5,29±0,01	2,635±0,030	5,73±0,01	4,50±0,12	6,23±0,01	1,106±0,023	7,31±0,01
0,21	+1	4,97±0,19	2,63±0,11	5,40±0,17	3,09±2,67	5,96±0,11	1,139±0,069	7,11±0,05
Μέση Τιμή±SD		5,30±0,33	2,46±0,30	5,71±0,30	4,03±0,82	6,22±0,26	1,081±0,073	7,30±0,20

Πίνακας 10.5 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας της μεθόδου στο τμήμα LC

RT (Retention Time): χρόνος συγκράτησης (min), RA (Relative Area): σχετική επιφάνεια κορυφής (επιφάνεια κορυφής αναλύτη/επιφάνεια κορυφής IS). Παράγοντας Α1: % ποσοστό FA στην κινητή φάση (v/v), παράγοντας Α2: ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (mL min⁻¹), SD (Standard Deviation): Τυπική Απόκλιση (*n*=3)

Μεταβολες τμήματος <i>M</i> S		SDZ	ТМР	AcSDZ	DPS
Παράμετρος	Επίπεδο	RA	RA	RA	RA
B1: CaV (<i>k</i> V)					
2,90	-1	2.267±0,075	5,10±0,17	1,185±0,024	
3,00	0	2,276±0,049	4,91±0,12	1,184±0,014	
3,10	+1	2,725±0,068	4,885±0,074	1,1760±0,0080	
Μέση Τιμή±SD		2,710±0,020	4,96±0,12	1,1820±0,0050	
B2: CoV (V)					
19	-1	2,676±0,054			
20	0	2,276±0,049			
21	+1	2,897±0,053			
Μέση Τιμή±SD		2,61±0,31			
34	-1		5,13±0,17		
35	0		4,91±0,13		
36	+1		5,27±0,12		
Μέση Τιμή±SD			5,10±0,18		
26	-1			1,192±0,046	
27	0			1,184±0,014	
28	+1			1,183±0,047	
Μέση Τιμή±SD				1,1860±0,0050	
24	-1				
25	0				
26	+1				
Μέση Τιμή±SD					

Πίνακας 10.6 Αξιολόγηση της ανθεκτικότητας της μεθόδου στο τμήμα MS

RA: σχετική επιφάνεια κορυφής (επιφάνεια κορυφής αναλύτη/επιφάνεια κορυφής IS). Παράγοντας B1: CaV (*Capillary Voltage*) δυναμικό τριχοειδούς (*k*V), παράγοντας B2: CoV (*Cone Voltage*) δυναμικό κώνου (V), SD (Standard Deviation): Τυπική Απόκλιση (*n*=3)

Πείραμα	A ASE flush volume (%)	Β <i>SPE</i> 1 [°] στάδιο έκπλυσης (mL <i>n</i> -επτανίου)	Γ SPE 2 [°] στάδιο έκπλυσης (% MeOH σε H ₂ O)	Λόγος Επιφανειών (<i>Relative Abundance,</i> <i>RA</i>)
1	60	2	5	RA. 1 { <i>mean value</i> . (RA 1α-1ν)}
2	50	2	0	RA. 2
3	60	0	0	RA. 3
4	50	0	5	<i>RA</i> . 4

Πίνακας 10.7 Εκτίμηση της ανθεκτικότητας στην παρασκευαστική πορεία

ccC, με τη προϋπόθεση ότι οι κλίσεις των καμπυλών των τριών ευρών δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των. Στο εδάφιο 6.4.2 περιγράφεται και η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων των καμπυλών αναφοράς.

Πείραμα	<i>RA</i> SDZ/DPS	<i>RA</i> TMP/DPS	<i>RA</i> AcSDZ/DPS
	(Μέση Τιμή ± <i>SD</i>)	(Μέση Τιμή ± <i>SD</i>)	(Μέση Τιμή ± <i>SD</i>)
1	2,492±0,074	7,07±0,20	2,716±0,079
2	3,06±0,178	8,33±0,34	2,48±0,12
3	11,75±0,10	30,1±1,2	9,49±0,35
4	7,71±0,39	20,67±0,54	7,43±0,40
Παράγοντας <i>D</i>			
D _A	1,739	4,089	1,151
D _B	6,956	17,715	5,864
D _Γ	2,303	5,342	0,912
SD RA 1	0,074	0,198	0,079
$\sqrt{2} \times SD$ RA 1	0,105	0,280	0,112

Πίνακας 10.8 Αποτελέσματα ανθεκτικότητας στην παρασκευαστική πορεία

Ταυτόχρονα με τις παραμέτρους 1 έως 4, υπολογίστηκαν τα % ME και % RME.

10.7.2 Καμπύλη αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα

Καμπύλη αναφοράς της SDZ σε πρότυπα διαλύματα (ccA) χωρίς IS

Αρχικά, κατασκευάστηκαν πέντε διαφορετικές καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων της SDZ για το εύρος *B* (καμπύλες *BA1-BA5*), τρεις για το εύρος *A* (καμπύλες *AA1-AA3*) και τρεις για το εύρος *C* (καμπύλες *CA1-CA3*), χωρίς *IS*, σε διαφορετικές ημέρες η καθεμία και εξετάστηκε κατά πόσο μεταβλήθηκε η εξίσωση παλινδρόμησης (*regression equation*) και κυρίως η κλίση της καμπύλης αναφοράς. Στον πίνακα ΠV_2 δίνονται οι εξισώσεις παλινδρόμησης, με την τυπική απόκλιση της κλίσης και του σταθερού όρου, οι τιμές για τον συντελεστή συσχετίσεως *R* (*coefficient of correlation*) και τον συντελεστή προσδιορισμού R^2 (*coefficient of determination*) μεταξύ των δύο μεταβλητών, καθώς και το τυπικό σφάλμα (*standard error of estimate*, *S*_{*y*/x}) για κάθε μία από τις παραπάνω καμπύλες. Στον πίνακα ΠV_2 δίνεται η μέση τιμή (*mean*), η τυπική απόκλιση (*SD*) και η % σχετική τυπική απόκλιση (*RSD*, %) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς των τριών ευρών. Η τιμή *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς και των τριών ευρών δεν ξεπερνά το 4 %. Συγκρίνοντας με τη διαδικασία Student ή δοκιμασία t (t-test) τη μικρότερη (1,31) με τη μεγαλύτερη (1,48) από όλες τις κλίσεις των καμπυλών αναφοράς και των τριών ευρών ($t_{\pi \epsilon i \rho} = 1,270 < 2,447 = t_{\Theta \epsilon \omega \rho,95\%}$), παρατηρείται ότι δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των και για το λόγο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα πειραματικά δεδομένα όλων των καμπυλών ώστε να προκύψει μία, «ενιαία» καμπύλη.

Στο σχήμα ΠV_19 δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των «ενιαίων» καμπυλών αναφοράς της SDZ με πρότυπα διαλύματα στα τρία εύρη συγκεντρώσεων, χωρίς *IS*. Οι αντίστοιχες εξισώσεις είναι:

 $A = [0,1374(\pm 0,0027)] \times 10^4 C - [(0,0\pm 3,7) \times 10^2]$ (εύρος A), με R=0,998 και S_{y/x}=5,8×10² $A = [0,1327(\pm 0,0045)] \times 10^4 C - [(0,57\pm 0,38) \times 10^4]$ (εύρος B), με R=0,998 και S_{y/x}=5,5×10³ $A = [0,1361(\pm 0,0032)] \times 10^4 C - [(0,04\pm 0,16) \times 10^6]$ (εύρος C), με R=0,998 και S_{y/x}=2,7×10⁵

Τα αποτελέσματα γραμμικότητας ήταν αρκετά ικανοποιητικά.

<u>Έλεγχος στατιστικά σημαντικής διαφοράς της τομής από το μηδέν (για το εύρος B)</u> Εφαρμόζοντας τη δοκιμασία *Student* υπολογίστηκε η τιμή *t*_{πειρ} από την εξίσωση

$$t_{\pi \epsilon \iota \rho} = \frac{|\alpha|}{|S_a|}$$

και βρέθηκε ίση με 1,500, μικρότερη, δηλαδή, από την *t*_{θεωρ} που είναι ίση με 3,182 (για 95 % στάθμη εμπιστοσύνης και v = 6 - 2 = 4 βαθμούς ελευθερίας). Αυτό σημαίνει ότι ο σταθερός όρος δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μηδέν [η ευθεία παλινδρόμησης διέρχεται από το Ο(0, 0)] και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα.

Οι παραπάνω μελέτες που αναφέρθηκαν για τις καμπύλες *BA1-BA5*, πραγματοποιήθηκαν και για τις καμπύλες *AA1-AA3* και *CA1-CA3*, με τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για τη γραμμικότητα σε πρότυπα διαλύματα της SDZ, χωρίς *IS*.

Καμπύλη αναφοράς της SDZ σε πρότυπα διαλύματα (ccA) με IS

Στη συνέχεια, κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων (καμπύλες *AA1-AA3, BA1-BA5 και CA1-CA3*) της SDZ, με *IS* την DPS και πραγματοποιήθηκε η μελέτη όπως στην περίπτωση της καμπύλης χωρίς *IS*. Στον πίνακα 10.9 παρουσιάζονται οι εξισώσεις παλινδρόμησης με την τυπική απόκλιση της κλίσης και του σταθερού όρου, οι τιμές *R*, μεταξύ των δύο μεταβλητών, δηλαδή της συγκέντρωσης της SDZ και του λόγου της επιφάνειας κορυφής της SDZ προς την επιφάνεια της DPS (*RA*), καθώς και το τυπικό σφάλμα για κάθε μία από τις καμπύλες.

Στον πίνακα 10.10 παρουσιάζεται η μέση τιμή, η SD και η % RSD των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς των τριών ευρών. Παρατηρείται ότι η RSD (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς των τριών ευρών συγκεντρώσεων δεν ξεπερνά το 4 %.

Εφαρμόστηκε το *t*-test και δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική διαφορά των κλίσεων.

Στο σχήμα 10.9 δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς της SDZ με πρότυπα διαλύματα, με *IS*. Οι αντίστοιχες εξισώσεις είναι:

$$RA = [131,2(\pm 5,8)] \times 10^{-4} C + [(5,8 \pm 7,7) \times 10^{-3}]$$
εύρος *A*, με *R*=0,997 και *S*_{y/x}=0,012
$$RA = [129,6(\pm 4,0)] \times 10^{-4} C - [(1,4 \pm 3,4) \times 10^{-2}]$$
εύρος *B*, με *R*=0,998 και *S*_{y/x}=0,049
$$RA = [1320,1(\pm 8,4)] \times 10^{-5} C + [(9,4 \pm 4,0) \times 10^{-1}]$$
εύρος *C*, με *R*=0,9998 και *S*_{y/x}=0,78

Στο σχήμα 10.10 δίνεται το διάγραμμα υπολοίπων.

Με τα διάφορα στατιστικά κριτήρια αποδείχθηκε καλή συσχέτιση και διέλευση της ευθείας παλινδρόμησης από το O(0, 0).

Καμπύλη αναφοράς της AcSDZ σε πρότυπα διαλύματα (ccA) χωρίς IS

Προκειμένου να κατασκευαστούν οι καμπύλες αναφοράς της AcSDZ σε πρότυπα διαλύματα, ακολουθήθηκε η ίδια πορεία, όπως στην περίπτωση της SDZ.

A=(1	Εξίσωση παλινδρόμηση της καμπύλης αναφοράς Κλίση±SD)×C+(Σταθερός όρος±SD)	Συντελεστής συσχετίσεως (<i>R</i>)	Τυπικό σφάλμα καμπύλης (S _{y/x})
AA1	$RA=(130,1\pm5,4)\times10^{-4}C+(6,2\pm7,2)\times10^{-3}$ $RA=(134,5\pm6,8)\times10^{-4}C+(4,4\pm9,0)\times10^{-3}$ $RA=(129,0\pm5,4)\times10^{-4}C+(6,9\pm7,1)\times10^{-3}$	0,995	0,011
AA2		0,996	0,014
AA3		0,997	0,014
BA1	$RA=(127,5\pm8,1)\times10^{-4}C-(1,9\pm7,7)\times10^{-2}$ $RA=(130,0\pm5,0)\times10^{-4}C-(2,6\pm4,7)\times10^{-2}$ $RA=(128,2\pm9,4)\times10^{-4}C-(0,1\pm8,9)\times10^{-2}$ $RA=(135,0\pm7,9)\times10^{-4}C-(4,2\pm8,5)\times10^{-2}$ $RA=(129,4\pm7,4)\times10^{-4}C-(1,4\pm8,0)\times10^{-2}$	0,996	0,078
BA2		0,998	0,048
BA3		0,995	0,090
BA4		0,998	0,056
BA5		0,997	0,053
CA1	$RA=(133,0\pm0,7)\times10^{-4}C+(0,70\pm0,31)$ $RA=(132,2\pm1,2)\times10^{-4}C+(1,10\pm0,56)$ $RA=(130,8\pm1,0)\times10^{-4}C+(1,04\pm0,46)$	0,99995	0,61
CA2		0,9994	1,1
CA3		0,9994	0,90

Πίνακας 10.9 Εξισώσεις παλινδρόμησης, συντελεστές συσχέτισης και τυπικό σφάλμα των καμπυλών της SDZ (με *IS*)

Πίνακας 10.10 Στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής της κλίσης των καμπυλών αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων της SDZ (με *IS*)

Εύρος συγκεντρώσεων	Μέση τιμή κλίσης (<i>mean</i>)	Τυπική απόκλιση κλίσης (<i>SD</i>)	Σχετική τυπική απόκλιση κλίσης, % (<i>RSD, %</i>)
Α	131,0×10 ⁻⁴	0,00030	2,2
В	130,02×10 ⁻²	2,9×10 ⁻²	2,3
С	132,0×10 ⁻⁴	1,1×10 ⁻⁴	0,82

Η RSD (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς δεν ξεπερνά το 3 %.

Συγκρίνοντας, επίσης, με *t*-test διαπιστώθηκε ότι οι κλίσεις δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, επομένως, μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα πειραματικά δεδομένα όλων των καμπυλών ώστε να προκύψει μία, «ενιαία» καμπύλη.

Στο σχήμα ΠV_22 δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς της AcSDZ με πρότυπα διαλύματα στα τρία εύρη συγκεντρώσεων, χωρίς /S. Οι αντίστοιχες εξισώσεις είναι:



Σχήμα 10.9 Γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων της SDZ με *IS*, μία για κάθε εύρος συγκέντρωσης



Σχήμα 10.10 Διάγραμμα υπολοίπων της καμπύλης αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων SDZ με /S (εύρος B)

 $A = [12,41(\pm 0,39)] \times 10^{2} C - [(0,036 \pm 0,052) \times 10^{4}]$ εύρος A, με R=0,998 και S_{y/x}=8,1×10² A = [12,774(\pm 0,033)] × 10^{2} C - [(0,01 \pm 0,02) × 10^{4}]εύρος B, με R=1,000 και S_{y/x}=4,1×10² A = [12,798(\pm 0,039)] × 10^{2} C - [(0,16 \pm 0,18) × 10^{5}]εύρος C, με R=0,9997 και S_{y/x}=3,5×10⁴

Για το εύρος *B* το διάγραμμα υπολοίπων δίνεται στο σχήμα ΠV_23 και το διάγραμμα «λόγου απόκρισης»-συγκέντρωσης δίνεται στο σχήμα ΠV_24.

Στον πίνακα ΠV_7 δίνεται μέρος της ΑΝΟVΑ της καμπύλης αναφοράς για το εύρος Β.

Εφαρμόζοντας τη δοκιμασία Student βρέθηκε ότι ο σταθερός όρος δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μηδέν και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα.

Οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν και για τις καμπύλες AA1-AA3 και CA1-CA3, με τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για τη γραμμικότητα σε πρότυπα διαλύματα της AcSDZ, χωρίς /S.

Καμπύλη αναφοράς της AcSDZ σε πρότυπα διαλύματα (ccA) με IS

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων (καμπύλες *AA1-AA3, BA1-BA5 και CA1-CA3*) της AcSDZ, με /S την DPS και πραγματοποιήθηκε η μελέτη όπως στην περίπτωση της καμπύλης χωρίς /S (πίνακες ΠV_8 και ΠV_9).

Με *t*-test διαπιστώθηκε ότι οι κλίσεις δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, επομένως μπορούν να χρησιμοποιήθούν τα πειραματικά δεδομένα όλων των καμπυλών ώστε να προκύψει μία, «ενιαία» καμπύλη για κάθε εύρος.

Στο σχήμα ΠV_25 δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς της AcSDZ με πρότυπα διαλύματα με *IS*. Οι αντίστοιχες εξισώσεις είναι:

 $RA = [139,4(\pm 2,0)] \times 10^{-4} C + [(2,4 \pm 2,6) \times 10^{-3}]$ εύρος A, με R=0,9996 και S_{y/x}=0,0042 RA = [142,4(\pm 1,1)] \times 10^{-4} C - [(1,52 \pm 0,91) \times 10^{-2}]εύρος B, με R=0,9998 και S_{y/x}=0,013 RA = [139,0(\pm 1,0)] \times 10^{-4} C + [(2,2 \pm 1,3) \times 10^{-3}]εύρος C, με R=0,9998 και S_{y/x}=0,020 Για το εύρος *B* το διάγραμμα υπολοίπων δίνεται στο σχήμα ΠV_26 και το διάγραμμα «λόγου απόκρισης»-συγκέντρωσης δίνεται στο σχήμα ΠV_27.

Στον πίνακα ΠV_10 δίνεται μέρος της ΑΝΟVΑ της καμπύλης αναφοράς για το εύρος Β.

Με τη δοκιμασία Student διαπιστώθηκε ότι ο σταθερός όρος δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μηδέν και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα.

Τέλος, το τυπικό σφάλμα της καμπύλης είναι 0,013, που σημαίνει ότι το τυχαίο σφάλμα είναι στατιστικά μικρό.

Οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν και για τις καμπύλες AA1-AA3 και CA1-CA3, με τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για τη γραμμικότητα σε πρότυπα διαλύματα της AcSDZ, με *I*S.

Καμπύλη αναφοράς της ΤΜΡ σε πρότυπα διαλύματα (ccA) χωρίς /S

Για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων TMP, με *IS* την DPS, ακολουθήθηκε η ίδια πορεία όπως στην περίπτωση των SDZ και AcSDZ και για τα τρία εύρη συγκεντρώσεων (πίνακες ΠV_11 - ΠV_13).

Η *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς είναι μικρή (μέγιστη τιμή το 1,513). Συγκρίθηκαν, επίσης, με *t*-test η μικρότερη (6,64×10³) με τη μεγαλύτερη (6,88×10³) και διαπιστώθηκε ότι οι κλίσεις δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους.

Στο σχήμα ΠV_28 δίνεται η γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς της TMP με πρότυπα διαλύματα, χωρίς /S και για τα τρία εύρη συγκεντρώσεων. Οι εξισώσεις που ελήφθησαν είναι:

 $A = [6,68(\pm 0,17)] \times 10^{3} C - [(0,47 \pm 0,20) \times 10^{4}]$ εύρος A, με R=0,998 και S_{y/x}=3,4×10³ A = [6,70(\pm 0,14)] \times 10^{3} C - [(0,38 \pm 0,58) \times 10^{4}]εύρος B, με R=0,998 και S_{y/x}=8,6×10³

Για το εύρος *B* το διάγραμμα υπολοίπων δίνεται στο σχήμα ΠV_29 και το διάγραμμα «λόγου απόκρισης»-συγκέντρωσης δίνεται στο σχήμα ΠV_30.

Στον πίνακα ΠV_13 δίνεται μέρος της *ANOVA* της καμπύλης αναφοράς για το εύρος *B*. Με τη δοκιμασία *Student* βρέθηκε ότι ο σταθερός όρος δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μηδέν και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα.

Οι παραπάνω μελέτες που αναφέρθηκαν για τις καμπύλες *BA1-BA5*, πραγματοποιήθηκαν και για τις καμπύλες *AA1-AA3* και *CA1-CA3*, με τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για τη γραμμικότητα σε πρότυπα διαλύματα της TMP, χωρίς *IS*.

Καμπύλη αναφοράς της TMP σε πρότυπα διαλύματα (ccA) με IS

Στη συνέχεια κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων (καμπύλες *AA1-AA3, BA1-BA5 και CA1-CA3*) της TMP, με *IS* την DPS και πραγματοποιήθηκε η μελέτη όπως στην περίπτωση της καμπύλης *IS* (πίνακες ΠV_14 και ΠV_15.

Με τη δοκιμασία *t* διαπιστώθηκε ότι δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, επομένως μπορούν να χρησιμοποιηθούν τα πειραματικά δεδομένα όλων των καμπυλών ώστε να προκύψει μία, «ενιαία» καμπύλη.

Στο σχήμα ΠV_31 δίνεται η γραφική παράσταση της καμπύλης αναφοράς της TMP με πρότυπα διαλύματα, με *IS* (DPS), για τα τρία εύρη συγκεντρώσεων. Οι εξισώσεις που ελήφθησαν είναι:

$$RA = [89,0(\pm3,4)] \times 10^{-3} C + [(8,8\pm4,1)\times10^{-2}]$$
εύρος *A*, με *R*=0,996 και *S*_{y/x}=0,069
$$RA = [90,4(\pm2,1)] \times 10^{-3} C - [(8,5\pm8,6)\times10^{-2}]$$
εύρος *B*, με *R*=0,998 και *S*_{y/x}=0,12
$$RA = [8929,8(\pm8,0)] \times 10^{-5} C + [(3,6\pm3,6)\times10^{-1}]$$
εύρος *C*, με *R*=0,9998 και *S*_{y/x}=0,71

Για το εύρος *B* το διάγραμμα υπολοίπων δίνεται στο σχήμα ΠV_32 και το διάγραμμα «λόγου απόκρισης»-συγκέντρωσης της TMP δίνεται στο σχήμα ΠV_33.

Στον πίνακα ΠV_16 δίνεται μέρος της ΑΝΟVΑ της καμπύλης αναφοράς (εύρος Β).

Με τη δοκιμασία *Student* βρέθηκε ότι ο σταθερός όρος δε διαφέρει στατιστικά σημαντικά από το μηδέν και δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα. Τέλος, το τυπικό σφάλμα της καμπύλης είναι 0,12, που σημαίνει ότι το τυχαίο σφάλμα είναι στατιστικά μικρό.

Οι παραπάνω μελέτες πραγματοποιήθηκαν και για τις καμπύλες AA1–AA3 και CA1– CA3, με τα αποτελέσματα να είναι εξίσου ικανοποιητικά για τη γραμμικότητα σε πρότυπα διαλύματα της TMP, με /S.

10.7.3 Καμπύλη αναφοράς σε διαλύματα του μητρικού υλικού. Προσδιορισμός της «επίδρασης του μητρικού υλικού»

Καμπύλη αναφοράς της SDZ σε διαλύματα του μητρικού υλικού (ccB) με και χωρίς IS

Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς της SDZ σε διαλύματα του μητρικού υλικού, πέντε για το εύρος *B* (*BB1-BB5*), τρεις για το εύρος *A* (*AB1-AB3*) και τρεις για το εύρος *C* (*CB1-CB3*), με και χωρίς *IS*, σε διαφορετικές ημέρες η καθεμία, καθώς και οι αντίστοιχες καμπύλες σε πρότυπα διαλύματα (καμπύλες *BA6-BA10*, *AA4-AA6* και *CA4-CA6*). Συγκρίνοντας τις κλίσεις των καμπυλών σε μητρικό υλικό με εκείνες σε πρότυπα διαλύματα, όπως προκύπτουν από το *Excel*, χωρίς τις αντίστοιχες στρογγυλοποιήσεις, μελετήθηκε η «επίδραση του μητρικού υλικού» (σάρκα με δέρμα).

Για την παρασκευή των καμπυλών σε μητρικό υλικό, ο εμβολιασμός πραγματοποιήθηκε μετά τη διαδικασία εκχύλισης και καθαρισμού (στην ανασύσταση).

Ένας ποσοτικός τρόπος προσδιορισμού της «επίδρασης του μητρικού υλικού» (*Matrix Effect, ME* %) είναι αυτός βάσει της εξίσωσης:

$$ME,\% = 100 \times (1 - \frac{\kappa \lambda i \sigma \eta - \kappa \alpha \mu \pi i \lambda \eta \varsigma - B}{\kappa \lambda i \sigma \eta - \kappa \alpha \mu \pi i \lambda \eta \varsigma - A})$$

όπου κλίση καμπύλης *B* είναι η κλίση καμπύλης που παρασκευάζεται με διαλύματα του μητρικού υλικού, ενώ κλίση καμπύλης *A* είναι η κλίση της καμπύλης των πρότυπων διαλυμάτων. Θετική τιμή του *ME* (%) σημαίνει υποβάθμιση του σήματος.

Στα σχήματα ΠV_34 - ΠV_37 και στα σχήματα 10.11 και 10.12 του παρόντος κειμένου δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς της SDZ σε πρότυπα διαλύματα και σε μητρικό υλικό, με και χωρίς *IS*, αντίστοιχα, όπου φαίνεται η «επίδραση του μητρικού υλικού», στα τρία εύρη συγκεντρώσεων.

Στον πίνακα 10.11 δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς και οι τιμές του *ME* (%) που υπολογίζονται με βάση τον παραπάνω τύπο.

Όταν δε χρησιμοποιείται *IS* το *ME* (%) έχει μεγαλύτερες τιμές στις χαμηλές συγκεντρώσεις SDZ (22 - 28 %), ενώ όσο η συγκέντρωση αυξάνει, παρουσιάζει μικρότερες τιμές, γεγονός που οφείλεται στην παρουσία περισσότερων ιόντων SDZ που αντισταθμίζουν το «υπόβαθρο» από το μητρικό υλικό.

Όταν χρησιμοποιείται *IS*, το *ME* (%) λαμβάνει αρνητικές τιμές, δηλαδή η παρουσία του μητρικού υλικού ενισχύει το σήμα της SDZ. Μάλιστα, η ενίσχυση αυτή είναι μεγαλύτερη στις υψηλές συγκεντρώσεις (9 - 12 %) και μικρότερη στις χαμηλές συγκεντρώσεις (2 - 5 %). Ωστόσο, σε κάθε εύρος συγκεντρώσεων, η επίδραση είναι σημαντικά μικρότερη απ'ό,τι στην περίπτωση κατά την οποία δε χρησιμοποιείται *IS*.

Καμπύλη αναφοράς της AcSDZ σε διαλύματα του μητρικού υλικού (ccB) με και χωρίς IS

Στα σχήματα ΠV_38 - ΠV_43, δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς της AcSDZ σε πρότυπα διαλύματα και σε μητρικό υλικό, με και χωρίς *IS*. Στον πίνακα 10.12 δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς και οι τιμές του *ME* (%) για τα τρία εύρη συγκεντρώσεων.

Παρατηρείται ότι οι τιμές του *ME* (%) δεν παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στα τρία εύρη συγκεντρώσεων, κυμαίνονται από 6 - 13 % και, σε αντίθεση με την SDZ, εμφανίζεται ενίσχυση του σήματος, πλην μιας περίπτωσης (καμπύλες *BA7/BB2*). Ωστόσο, με τη χρήση *IS* οι τιμές του *ME* (%) δεν παρουσιάζουν μείωση (5 -16 %).

<u>Καμπύλη αναφοράς της TMP σε διαλύματα του μητρικού υλικού (ccB) με και χωρίς /S</u>

Στα σχήματα ΠV_44 - ΠV_49, δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών



Σχήμα 10.12 Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς ΒΑ6-ΒΑ10 και ΒΒ1-ΒΒ5 της SDZ με *IS* (εύρος *B*)

της SDZ χωρίς /S (εύρος B)

Εξίσωση παλινδρόμησης της καμπύλης αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων	Εξίσωση παλινδρόμησης της καμπύλης αναφοράς διαλυμάτων μητρικού υλικού	ΜΕ, % (χωρίς <i>IS</i>)	ΜΕ, % (με <i>I</i> S)
AA4 A = 1383,6 C + 1169,4	AB1 A = 1031,0 C + 1008,8	25	2
AA5 $A = 1398,9 C + 444,4$ BA = 0.0120 C + 0.0026	AB2 $A = 0.0132 \text{ C} + 0.0074$ AB2 $A = 1009.8 \text{ C} + 829.8$ PA = 0.0132 C + 0.0074	28	-2
AA5 $A = 0.0129 C + 0.0020$ AA5 $A = 1360.7 C + 55.8$ BA = 0.0131 C + 0.0079	AB3 $A = 1067,7 C + 197,6$ RA = 0.00137 C + 0.0073	22	-2
BA6 A = 1330,2 C - 8298,7	BB1 A = 1060,5 C – 1202,4	20	
RA = 0,014 C - 0,1012 BA7 $A = 1329,6 C - 628,59$	RA = 0,0161 C - 0,0569 BB2 A = 1176,5 C + 2398,4	12	-15
BA8 $A = 1431,8 C - 6719,2$ B4 = 0.0164 C - 0.0453	$BB3 A = 0,0161 \ C = 0,0161 \ BB3 A = 1339,9 \ C + 4906,5 \ B4 = 0.0174 \ C \pm 0.0558 \ C = 0.0174 \ C = 0.0174 \ C \pm 0.0558 \ C = 0.0174 $	6	-10
CA4 $A = 13,13 C - 0,22$	CB1 $A = 11,18 C - 0,18$	15	0
RA = 13,79 C + 0,717 CA5 $A = 12,84 C + 0,066$	<i>RA</i> = 15,04 <i>C</i> + 1,93 <i>CB2 A</i> = 11,11 <i>C</i> + 0,19	13	-9
RA = 13,14 C + 0,808 $CA6 A = 13,04 C - 0,0064$	<i>RA</i> = 14,60 <i>C</i> + 1,45 <i>CB3 A</i> = 11,11 <i>C</i> + 0,0081	15	-11
<i>RA</i> = 13,28 <i>C</i> + 0,851	<i>RA</i> = 14,87 <i>C</i> + 1,24		-12

Πίνακας 10.11 Προσδιορισμός της «επίδρασης του μητρικού υλικού» στην SDZ (με και χωρίς /S)

Πίνακας 10.12 Προσδιορισμός της «επίδρασης του μητρικού υλικού» στην AcSDZ (με και χωρίς /S)

Εξίσωση παλινδρόμησης της καμπύλης αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων	Εξίσωση παλινδρόμησης της καμπύλης αναφοράς διαλυμάτων μητρικού υλικού	<i>ΜΕ</i> , % (χωρίς <i>ΙS</i>)	ΜΕ, % (με <i>IS)</i>
AA4 A = 1274,0 C – 294,16	AB1 A = 1356,3 C − 69,8	-6	
<i>RA</i> = 0,0142 <i>C</i> + 0,0026	RA = 0,0158 C + 0,001		-11
AA5 A = 1213,0 C - 802,4	AB2 A = 1341,3 C – 1093,5	-11	
<i>RA</i> = 0,0144 <i>C</i> – 0,0048	<i>R</i> A = 0,0161 <i>C</i> - 0,0076		-12
AA6 A = 1264,8 C – 135,1	AB3 A = 1392,3 C – 273,9	-10	
<i>RA</i> = 0,0154 <i>C</i> – 0,0066	RA = 0,0161 C + 0,0023		-5
BA6 $A = 1205 \ 1 \ C + 3324 \ 6$	BB1 A = 1280 2 C + 3212 4	-6	
RA = 0.0138 C - 0.026	RA = 0.0149 C + 0.1195	Ũ	-8
BA7 $A = 1519.7 C - 1910.3$	BB2 $A = 1480.2 \text{ C} + 3331$	+3	Ũ
RA = 0.0164 C - 0.0579	RA = 0.0178 C + 0.0021		-9
BA8 A = 1413.2 C + 2059.5	BB3 $A = 1511.8 C + 807.19$	-7	Ū
$RA = 0,0141 C + 8,0 \times 10^{-5}$	RA = 0,0151 C + 0,1146		-7
011 1 1 0 005 0 00051	CD4 40,500,0,0,0440	-	
CA4 $A = 12,625 \text{ C} - 0,3051$	CB1 $A = 13,522$ C $-0,9118$	-7	
RA = 13,999 C + 0,6953	RA = 15,034 + 2,1785	4.0	-11
CAS $A = 12,242 \text{ C} - 0,0008$	CBZ $A = 13,803$ C $- 1,1567$	-13	40
RA = 14,357 C + 0,2749	RA = 15,316 C + 2,3557	_	-12
CA6 $A = 12,22 C + 0,0127$	CB3 $A = 13,214 \text{ C} - 0,4075$	-8	_
<i>RA</i> = 14,227 <i>C</i> + 0,285	<i>R</i> A = 15,488 <i>C</i> + 2,1274		-5

αναφοράς της TMP σε πρότυπα διαλύματα και σε μητρικό υλικό, με και χωρίς /S και στον πίνακα 10.13 του παρόντος κειμένου δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς και οι τιμές του *ME* (%) στα τρία εύρη συγκεντρώσεων.

Η μείωση του σήματος της TMP λόγω του μητρικού υλικού είναι παρόμοια και στα τρία εύρη συγκεντρώσεων, η δε χρήση του /S προκαλεί ενίσχυση του σήματος, κυρίως, στις

Εξί της π	σωση παλινδρόμησης ς καμπύλης αναφοράς ρότυπων διαλυμάτων	Ε τ δια	ξίσωση παλινδρόμησης ης καμπύλης αναφοράς λυμάτων μητρικού υλικού	ΜΕ, % (χωρίς ΙS)	ΜΕ, % (με <i>I</i> S)
AA4	A = 6780, 6 C - 6438, 2	AB1	A = 5917,9 C - 8330,7	+13	4.4
AA5	RA = 0,0142 C + 0,0026 A = 6761,7 C - 6329,6	AB2	A = 0,0158 C + 0,001 A = 5933,0 C - 7989,2	+12	-11
AA6	RA = 0.089 C + 0.0726 A = 6638.9 C - 5492 RA = 0.0022 C + 0.0048	AB3	RA = 0.0958 C + 0.0214 $A = 5501.4 C - 4608.5$ $RA = 0.1007 C + 0.0246$	+17	-20
BA6	A = 6678,4 C - 5353,1	BB1	A = 5644 C - 23950	+15	-22
BA7	<i>RA</i> = 0,09332 <i>C</i> +0,2168 <i>A</i> = 6780 <i>C</i> - 2218	BB2	RA = 0,1133 C - 0,2277 A = 5716,1 C - 22641	+16	-11
BA8	RA = 0,101 C - 0,1527 A = 6883,8 C - 21569	BB3	RA = 0,1124 C - 0,186 A = 5430,9 C - 16256	+21	-20
~ ~ ~	RA = 0,1002 C - 0,1734	004	RA = 0,12 C - 0,4425	. 40	-9
CA4	A = 68,048 C + 0,2396 RA = 89,426 C - 0,0107	CB1	A = 61,103 C - 0,8371 RA = 97,346 C + 4,8195	+10	-9
CA5	A = 67,153 C + 0,4465 RA = 90,173 C - 0,2772	CB2	A = 59,804 C - 1,2673 RA = 100,19 C + 3,2476	+11	-11
CA6	A = 67,488 C - 1,7524 RA = 90,277 C + 0,1569	CB3	A = 59,957 C - 5,0634 RA = 100,33 C + 3,5289	+11	-11

Πίνακας 10.13 Προσδιορισμός της «επίδρασης του μητρικού υλικού» στην TMP (με και χωρίς /S)

χαμηλές συγκεντρώσεις (11 - 22 %), ενώ στις υψηλότερες συγκεντρώσεις η επίδραση είναι μικρότερη (9 - 11 %).

10.7.4 Καμπύλη αναφοράς σε δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση. Προσδιορισμός της «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού»

Παρασκευάστηκαν διαφορετικές καμπύλες αναφοράς με δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό στα τρία εύρη συγκεντρώσεων των αναλυτών, με

και χωρίς *I*S, σε διαφορετικές ημέρες, καθώς και οι αντίστοιχες καμπύλες σε πρότυπα διαλύματα. Στο εύρος *A* παρασκευάστηκαν πέντε καμπύλες αναφοράς (*AC1-AC5* και *AA7-AA11*), στο εύρος *B* παρασκευάστηκαν πέντε καμπύλες αναφοράς (*BC1-BC5* και *BA11-BA15*) και, επίσης, πέντε καμπύλες αναφοράς στο εύρος *C* των συγκεντρώσεων (*CC1-CC5* και *CA7-CA11*). Οι καμπύλες αναφοράς *C* παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα σάρκας με δέρμα από διαφορετικές «παρτίδες» ιχθύων, δηλαδή, από ιχθύες διαφορετικού είδους (τσιπούρα, λαβράκι), διαφορετικής διατροφής, διαφορετικού σωματικού βάρους κ.λπ. (πίνακας ΠV_11.17) Επομένως, τα δείγματα είχαν διαφορετική περιεκτικότητα σε συστατικά που συνεισφέρουν στο φαινόμενο «επίδραση του μητρικού υλικού» και επομένως διαφορετική επίδραση στο τελικό αποτέλεσμα. Συγκρίνοντας τις κλίσεις των καμπυλών *C* μεταξύ των, προσδιορίστηκε η «σχετική επίδραση του μητρικού υλικού» (σχήματα ΠV_50 - ΠV_56 και ΠV_57 - ΠV_84 και πίνακες ΠV_18 - ΠV_35).

Στο σχήμα 10.13 δίνονται οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς με δείγματα εμβολιασμένα πριν την πορεία *ASE/SPE*, στα τρία εύρη συγκεντρώσεων της SDZ, καθώς και οι αντίστοιχες καμπύλες με πρότυπα διαλύματα.

Στον πίνακα 10.14 δίνεται η στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *C*, με και χωρίς *IS*, στα τρία εύρη συγκεντρώσεων. Παρατηρείται ότι η *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *C* της SDZ χωρίς *IS* και στα εύρη συγκεντρώσεων είναι μικρή (1,5 - 3,3), ενώ μεγαλύτερη είναι στο εύρος *B* (5,5). Με τη χρήση *IS* παρατηρείται μείωση του *RSD* (%) μόνο στο εύρος *C*, ενώ στο εύρος *B* είναι υψηλή η τιμή του (6,1). Στην περίπτωση της TMP χωρίς *IS* οι τιμές *RSD* (%) είναι σημαντικά χαμηλές (0,29 - 1,8), όπως και με τη χρήση *IS* (0,93 - 2,2) και στα τρία εύρη συγκεντρώσεων. Τέλος, η *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *AC* και *BC* της AcSDZ χωρίς *IS* είναι μικρή (1,6 - 2,0), ενώ στις μεσαίες συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερη (4,1). Η χρήση του *IS* δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τις τιμές του *RSD* (%) παρά μόνο στις υψηλές συγκεντρώσεις όπου η τιμή είναι 1,0.

Ωστόσο, σε κάθε περίπτωση παρατηρείται ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της προέλευσης του μητρικού υλικού (σάρκα με δέρμα) στη κλίση της καμπύλης αναφοράς



Σχήμα 10.13 Γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς *BA11-BA15* και *BC1-BC5* της SDZ με *IS* (εύρος *B*)

Αναλύτης	Εύρος Συγκεντρώσεων	Μέση τιμή κλίσης (<i>mean</i>)	Τυπική απόκλιση κλίσης (<i>SD</i>)	Συντελέστής συσχετίσεως (<i>R</i>)	Σχετική τυπική απόκλιση κλίσης, % (<i>RSD, %</i>)
SDZ	Χωρίς IS				
	A	$0,0802 \times 10^{4}$	$0,12 \times 10^{2}$	0,9986	1,5
	В	0,1086×10 ⁴	$0,0060 \times 10^{2}$	0,9986	5,5
	С	0,1043×10 ⁴	$0,34 \times 10^{2}$	0,9995	3,3
	Mε IS				
	А	129,5×10 ⁻⁴	5,9×10 ⁻⁴	0,9993	4,6
	В	137,0×10 ⁻⁴	8,0×10 ⁻⁴	0,9994	6,1
	С	136,2×10⁻⁴	6,6×10 ⁻⁴	0,998	0,49
AcSDZ	Χωρίς IS				
	A	9.54×10 ²	0.16×10^{2}	0.997	1,6
	В	9,93×10 ²	0.40×10^{2}	0,9993	4,1
	С	9,13×10 ²	$0,18 \times 10^{2}$	0,9992	2,0
	Mε IS				
	А	126,0×10⁻⁴	2,2×10 ⁻⁴	0,998	1,8
	В	125,0×10 ⁻⁴	5,3×10 ⁻⁴	0,9998	4,2
	С	124,2×10 ⁻⁴	1,2×10 ⁻⁴	0,9992	1,0
TMP	Χωρίς IS				
	А	4,778×10 ³	0,085×10 ³	0,995	1,8
	В	4,98×10 ³	0,017×10 ³	0,9997	0,35
	С	4,88×10 ³	0,14×10 ³	0,998	0,29
	Mε IS				
	A	77,7×10 ⁻³	1,7×10 ⁻³	0,9997	2,3
	В	79,5×10 ⁻³	1,6×10⁻³	0,9989	2,0
	С	79,92×10 ⁻³	0,74×10⁻³	0,998	0,93

Πίνακας 10.14 Στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής της κλίσης των καμπυλών αναφοράς των δειγμάτων εμβολιασμένων με τους αναλύτες πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό, με και χωρίς /S, στα τρία εύρη συγκεντρώσεων

που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της SDZ σε σάρκα με δέρμα ιχθύος (*RSD* (%) < 3 – 4 % πλην ελαχίστων εξαιρέσεων).

Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για τη γραμμικότητα των καμπυλών αναφοράς σε κάθε εύρος συγκεντρώσεων των τριών αναλυτών, με και χωρίς /S, τα δε αποτελέσματα κρίθηκαν ικανοποιητικά, ενώ ο έλεγχος στατιστικά σημαντικής διαφοράς της τομής από το μηδέν, έδειξε ότι δεν υπάρχει σταθερό συστηματικό σφάλμα σε όλες τις περιπτώσεις. Από τις παραπάνω μελέτες διαπιστώνεται ότι η γραμμική συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης *C* και της επιφάνειας κορυφής *A* ή της σχετικής επιφάνειας *RA* είναι ικανοποιητική, τόσο χωρίς, όσο και με /S (DPS), ωστόσο, η χρήση /S προτιμάται, διότι στην περίπτωση αυτή η «επίδραση του μητρικού υλικού» είναι μικρότερη.

10.8 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης

10.8.1 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα σάρκας με δέρμα

Στο Παράρτημα V δίνονται οι δύο τρόποι προσδιορισμού του *LOD*.^{309,314} Στον πίνακα 10.15 δίνονται τα *LOD*s των αναλυτών προσδιοριζόμενα και με τους δύο τρόπους σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα σάρκας με δέρμα.

Στο σχήμα 10.14 δίνονται τα χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων με τους αναλύτες στο εκάστοτε *LOD* και στο σχήμα 10.15 δίνονται τα χρωματογραφήματα των δειγμάτων σάρκας με δέρμα εμβολιασμένων με τους αναλύτες στο εκάστοτε *LOD*.

10.8.2 Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα σάρκας με δέρμα

Στο Παράρτημα V δίνονται οι δύο τρόποι προσδιορισμού του LOQ.^{309,314} Στον πίνακα 10.15 δίνονται τα LOQs των αναλυτών προσδιοριζόμενα και με τους δύο τρόπους σε πρότυπα διαλύματα και σε δείγματα σάρκας με δέρμα.

Αναλύτης	Εξίσωση παλινδρόμησης	<i>LOD</i> (ng mL ⁻¹) ^a	LOD (ng mL ⁻¹) [⊳]	<i>LOD</i> (µg kg ⁻¹) ^a	LOD (µg kg⁻¹) ^ь	LOQ (ng mL ⁻¹) ^a	LOQ (ng mL ^{⁻1}) [♭]	LOQ (µg kg⁻¹)ª	LOQ (µg kg⁻¹) ^b
SDZ	$A=[0,1374(\pm0,0027)]\times10^{4}C-$ $[(0,0\pm3,7)\times10^{2}$ $A=[0,0802(\pm0,0030)]\times10^{4}C-$ $[(0,038\pm0,046)\times10^{4}$	0,9	1,5	1,9	3,0	2,7	4,5	5,7	10,0
AcSDZ	$\begin{array}{l} A = [12,41(\pm 0,39)] \times 10^2 C - \\ [(0,036 \pm 0,052) \times 10^4 \\ A = [9,54(\pm 0,53)] \times 10^2 C - \\ [(0,051 \pm 0,082) \times 10^4 \end{array}$	1,4	1,5	2,8	3,0	4,2	4,5	8,6	10,0
ТМР	$A=[6,68(\pm0,17)]\times10^{3}C-$ $[(0,47\pm0,20)\times10^{4}$ $A=[4,78(\pm0,32)]\times10^{3}C-$ $[(0,50\pm0,47)\times10^{4}$	1,0	1,0	3,2	1,5	3,0	3,0	9,8	5,0

Πίνακας 10.15 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού των αναλυτών σε πρότυπα διαλύματα (σε ng mL⁻¹) και σε δείγματα σάρκας με δέρμα (σε *μ*g kg⁻¹)

^a Υπολογισμένο θεωρητικά βάσει της εξίσωσης παλινδρόμησης ^b Καθορισμένο από το χρωματογράφημα με βάση τους λόγους S/N≥ 3 (*LOD*) και S/N≥ 10 (*LOQ*)



Σχήμα 10.14 Χρωματογραφήματα των πρότυπων διαλυμάτων στο LOD του κάθε αναλύτη



Σχήμα 10.15 Χρωματογραφήματα των δειγμάτων σάρκας με δέρμα στο LOD του κάθε αναλύτη

10.9 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης

Όπως προαναφέρθηκε, προτιμήθηκε η χρησιμοποίηση των καμπυλών αναφοράς με *IS*. Προκειμένου να κατασκευαστεί μία «ενιαία» καμπύλη για τα τρία εύρη συγκεντρώσεων (*A*, *B* και *C*), ελέγχθηκε αν οι κλίσεις των επιμέρους περιοχών διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των. Στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν τα δεδομένα από τα τρία εύρη και κατασκευάστηκαν, για κάθε αναλύτη, οι γραφικές παραστάσεις:

- (α) Σε διάλυμα μητρικού υλικού, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό της σχετικής ανάκτησης (ορθότητα),
- (β) Σε δείγματα εμβολιασμένα πριν την εκχύλιση και τον καθαρισμό, προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών.

10.10 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου

10.10.1 Γενικά^{309,315}

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/ΕΚ, τα αποδεκτά όρια ορθότητας μιας ποσοτικής μεθόδου καθορίζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη (πίνακας 10.16).^{63,316} Ο έλεγχος της ορθότητας γίνεται μέσα στην ίδια εργαστηριακή ημέρα και μεταξύ διαφορετικών ημερών.

Πίνακας 10.16 Αποδεκτά ό	ρια ορθότητας
---------------------------------	---------------

Συγκέντρωση αναλύτη	Εύρος		
< 1 <i>µ</i> g kg ⁻¹	-50 % έως +20 %		
≥ 1 µg kg ⁻¹ < 10 µg kg ⁻¹	-40 % έως +20 %		
≥ 10 µg kg⁻¹ < 100 µg kg⁻¹	-30 % έως +10 %		
≥ 100 <i>µ</i> g kg ⁻¹	-20 % έως +10 %		

Τα αποδεκτά όρια πιστότητας μιας ποσοτικής μεθόδου που δίνονται στον πίνακα 10.17,^{63,222} καθορίζονται ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη και προσδιορίζονται με βάση την εξίσωση *Horwitz*:

$$CV = 2^{(1-0,5\log C)}$$

όπου C το κλάσμα μάζας εκφραζόμενο ως δύναμη του 10 (π.χ. 1 μ g kg⁻¹ = 10⁻⁹)

Συγκέντρωση αναλύτη	Αποδεκτή πιστότητα εντός της ημέρας (επαναληψιμότητα) % CV	Αποδεκτή πιστότητα μεταξύ των ημερών (ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα) % CV
< 1 <i>µ</i> g kg⁻¹	30	45
≥ 1 <i>µ</i> g kg ⁻¹ < 10 µg kg ⁻¹	25	32
≥ 10 µg kg ⁻¹ < 100 µg kg ⁻¹	15	23
≥ 100 <i>µ</i> g kg ⁻¹	10	16

Πίνακας 10.17 Αποδεκτά όρια πιστότητας

Σύμφωνα με την Ευρωπαϊκή Οδηγία 2002/657/ΕΚ, προκειμένου για ουσίες με καθορισμένο *MRL*, η ακρίβεια μιας μεθόδου ελέγχεται στα επίπεδα:

0,5× *MRL*, 1× *MRL* και 1,5× *MRL*.

Στην παρούσα διατριβή, η ακρίβεια της μεθόδου ελέγχθηκε στα τρία εύρη συγκεντρώσεων στα οποία ελέγχθηκε η γραμμικότητα (*A*, *B* και *C*).

Επίσης, για την AcSDZ δεν έχει οριστεί *MRL* και η μελέτη έγινε στις ίδιες συγκεντρώσεις με την SDZ.

10.10.2 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου εντός της ημέρας

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου εντός της ημέρας (*intra-day accuracy*), παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν έξι (6) εμβολιασμένα δείγματα σάρκας με δέρμα, σε κάθε μία από τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε κάθε ένα από τα τρία εύρη συγκεντρώσεων *A*, *B* και *C*. Πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) ενέσεις για κάθε δείγμα. Στον πίνακα 10.18 δίνονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου.

Αναλύτης	Συγκέντρωση που	Συγκέντρωση που βρέθηκε	Πιστότητα CV, %	Ορθότητα	
	προστεθηκε (μg kg⁻¹)	(μg kg) Μέση τιμή ± SD (<i>n</i> = 6)		RE, % ± SD ^ª	<i>E</i> _r , % ^b
SDZ	10 (LOQ) 15 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 50 (0,5×MRL) 100 (1×MRL) 150 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$\begin{array}{c} 9,48 \pm 0,45 \\ 15,23 \pm 0,72 \\ 24,06 \pm 0,81 \\ 47,2 \pm 2,2 \\ 99,5 \pm 3,5 \\ 150,5 \pm 5,2 \\ 503,8 \pm 4,8 \\ 4926 \pm 77 \\ 9930 \pm 25 \end{array}$	4,7 4,7 3,3 4,6 3,4 3,4 0,95 1,5 0,25	$94,8 \pm 4,5$ $101,6 \pm 4,8$ $96,2 \pm 3,2$ $94,4 \pm 4,4$ $99,5 \pm 3,5$ $100,3 \pm 3,5$ $100,8 \pm 1,0$ $98,5 \pm 1,5$ $99,3 \pm 0,3$	-5,2 1,6 -3,8 -5,6 -0,5 0,3 0,8 -1,5 -0,7
ТМР	7,5 (LOQ) 12,5 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 25 (0,5×MRL) 50 (1×MRL) 75 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$7,37 \pm 0,50$ $13,05 \pm 0,45$ $24,61 \pm 0,82$ $23,6 \pm 1,1$ $51,1 \pm 2,3$ $75,6 \pm 5,9$ 501 ± 15 5053 ± 19 9922 ± 29	6,7 3,4 3,3 4,6 4,4 2,5 2,9 0,36 2,3	$94,5 \pm 8,1$ $101,6 \pm 2,8$ $100,4 \pm 3,1$ $96,3 \pm 5,6$ $99,3 \pm 5,0$ $102,0 \pm 5,8$ $101,7 \pm 3,9$ $101,1 \pm 0,3$ $99,4 \pm 2,5$	-1,7 4,4 -1,6 -5,8 2,1 0,8 0,2 1,1 -0,8
AcSDZ	10 (LOQ) 15 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 50 100 150 500 1000 1000	$9,42 \pm 0,63$ $14,08 \pm 0,61$ $24,95 \pm 0,95$ $49,5 \pm 3,2$ $101,2 \pm 4,1$ $148,0 \pm 3,9$ $499,5 \pm 8,0$ 4964 ± 43 9939 ± 94	6,7 4,3 3,8 6,3 4,0 2,6 1,6 0,86 0,94	$94,2 \pm 6,3 \\93,9 \pm 4,1 \\99,8 \pm 3,8 \\99,1 \pm 6,3 \\101,2 \pm 4,1 \\98,7 \pm 2,6 \\99,9 \pm 1,6 \\99,3 \pm 0,9 \\99,4 \pm 0,9 \\99,4 \pm 0,9$	-5,8 -6,1 -0,2 -0,9 1,2 -1,3 -0,1 -0,7 -0,6

Πίνακας 10.18 Ορθότητα και πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day inter-batch)

^a Η % σχετική ανάκτηση (*RE*, %) υπολογίζεται με τις καμπύλες αναφοράς παρασκευασμένες σε μητρικό υλικό. Δίνονται και οι τιμές του συντελεστή διακύμανσης για τις τιμές ανάκτησης

^b Το % σχετικό σφάλμα E_r ,% = $\frac{C_{\pi \epsilon i \rho c \mu \alpha \pi i \kappa j} - C_{\theta \epsilon a \rho \eta \pi i \kappa j}}{C_{\theta \epsilon a \rho \eta \pi \kappa j}}$ είναι το συστηματικό σφάλμα (*bias*)

10.10.3 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου μεταξύ των ημερών

Για τον έλεγχο της ακρίβειας της μεθόδου μεταξύ των ημερών (*inter-day accuracy*), παρασκευάστηκαν και αναλύθηκαν τρία (3) εμβολιασμένα δείγματα σάρκας με δέρμα, σε κάθε μία από τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, σε κάθε ένα από τα τρία εύρη συγκεντρώσεων *A*, *B* και *C*. Πραγματοποιήθηκαν τρεις (3) ενέσεις για κάθε δείγμα. Στον

πίνακα 10.19 δίνονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο της ορθότητας και της πιστότητας της μεθόδου, που έγινε σε πέντε (5) διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες.

Αναλύτης	Συγκέντρωση Συγκέντρωση που που βρέθηκε		Πιστότητα CV, %	ια Ορθότητα	
	προστέθηκε (μg kg ⁻¹)	(μg kg ⁻¹) Μέση τιμή ± SD (<i>n</i> = 15)		RE, % ± SD ^a	<i>E</i> _r , % ^b
SDZ	10 (LOQ) 15 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 1) 50 (0,5×MRL) 100 (1×MRL) 150 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$9,72 \pm 0,73$ $15,2 \pm 1,0$ $24,2 \pm 1,0$ $48,1 \pm 3,7$ $99,3 \pm 2,9$ $150,6 \pm 2,5$ $504,5 \pm 5,4$ 4963 ± 44 $(100,2 \pm 1,5) \times 10^{2}$	7,5 6,7 4,1 7,6 2,8 1,6 1,0 0,89 1,55	$97,2 \pm 7,3$ $101,8 \pm 6,9$ $96,7 \pm 4,0$ $96,1 \pm 7,3$ $99,3 \pm 2,9$ $100,4 \pm 1,7$ $100,9 \pm 1,1$ $99,3 \pm 1,3$ $100,2 \pm 1,6$	-2,8 1,8 -3,3 -3,9 -0,7 0,4 0,9 -0,7 0,2
ТМР	7,5 (LOQ) 12,5 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 1) 25 (0,5×MRL) 50 (1×MRL) 75 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$7,45 \pm 0,67$ $12,86 \pm 0,80$ $24,6 \pm 1,1$ $23,4 \pm 1,6$ $49,8 \pm 2,1$ $74,7 \pm 1,5$ $500,9 \pm 8,3$ 4981 ± 85 $(100,2 \pm 1,8) \times 10^{2}$	8,9 6,2 4,7 6,9 4,1 1,9 1,3 0,83 1,0	$99,3 \pm 7,1 \\102,9 \pm 6,4 \\98,6 \pm 4,7 \\93,5 \pm 6,5 \\99,7 \pm 4,4 \\99,7 \pm 2,0 \\100,2 \pm 1,7 \\99,6 \pm 0,9 \\100,2 \pm 1,8$	-0,7 2,9 -1,4 -6,5 -0,3 -0,3 0,2 -0,4 0,2
AcSDZ	10 15 25 50 100 150 500 1000 10000	$10,37 \pm 0,81 \\ 13,79 \pm 0,72 \\ 24,6 \pm 1,3 \\ 49,6 \pm 3,8 \\ 99,7 \pm 2,7 \\ 105,2 \pm 5,0 \\ 501,5 \pm 6,8 \\ 4967 \pm 41 \\ (997,3 \pm 1,0) \times 10^2$	7,8 5,2 5,3 7,5 2,6 3,3 1,3 0,83 1,0	$103,7 \pm 7,8 \\92,0 \pm 4,8 \\98,4 \pm 5,0 \\99,2 \pm 7,5 \\99,7 \pm 2,7 \\100,1 \pm 3,4 \\100,3 \pm 1,4 \\99,4 \pm 0,8 \\99,7 \pm 1,0$	3,7 -8,0 -1,6 -0,8 -0,3 0,1 0,3 -0,6 -0,3

Πίνακας 10.19 Ορθότητα και πιστότητα μεταξύ των ημερών (inter-day inter-batch)

^a Όπως στον Πίνακα 10.18 ^b Όπως στον Πίνακα 10.18

10.11 Προσδιορισμός του ορίου απόφασης και της ικανότητας ανίχνευσης^{63,218,220}

10.11.1 Προσδιορισμός του ορίου απόφασης

Για τον υπολογισμό του CC_α, χρησιμοποιήθηκαν είκοσι (20) δείγματα εμβολιασμένα στο
MRL. Η μέση τιμή των 20 συγκεντρώσεων που προσδιορίστηκαν συν 1,64 φορές (τιμή της παραμέτρου *t* για στάθμη εμπιστοσύνης 90 % και βαθμούς ελευθερίας που τείνουν στο άπειρο) την αντίστοιχη *SD* δίνει το *CC*_α (πίνακας 10.20).

10.11.2 Προσδιορισμός της ικανότητας ανίχνευσης

Για τον υπολογισμό της CC_{β} , χρησιμοποιήθηκαν είκοσι (20) δείγματα εμβολιασμένα με διάλυμα συγκέντρωσης κάθε αναλύτη ίσης με το CC_{α} της κάθε μίας. Η συγκέντρωση CC_{α} συν 1,64 φορές (τιμή της παραμέτρου *t* για στάθμη εμπιστοσύνης 95 % και βαθμούς ελευθερίας που τείνουν στο άπειρο) την *SD* δίνει την CC_{β} . (πίνακας 10.20).

Αναλύτης	MRL (µg kg⁻¹)	Συγκέντρωση που βρέθηκε (μg kg ⁻¹) Μέση τιμή ± SD (n = 20)	Σφάλμα <i>α</i> (1,64× <i>SD</i>)	CC _α (µg kg⁻¹)	Συγκέντρωση που βρέθηκε (μg kg ⁻¹) Μέση τιμή ± SD (n = 20)	Σφάλμα β (1,64× <i>SD</i>)	CC _β (µg kg⁻¹)
SDZ	100	99,4 ± 3,0	4,9	104,3	102,1 ± 3,5	5,7	110,0
ТМР	50	50,2 ± 2,2	3,5	53,7	51,9 ± 3,1	5,1	58,8
AcSDZ	100 [#]	100,2 ± 3,1	5,1	105,3	103,9 ± 2,7	4,4	109,7

Πίνακας 10.20 Όριο απόφασης και ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου για τους τρεις αναλύτες

[#] Δεν έχει οριστεί *MRL* για την AcSDZ, ωστόσο χρησιμοποιήθηκε η ίδια τιμή *MRL* με της SDZ

10.12 Εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων^{221,308}

10.12.1 Εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος

Στο Παράρτημα V περιγράφεται αναλυτικά η πορεία για την εκτίμηση της αβεβαιότητας κατά τον προσδιορισμό των SDZ σε δείγμα σάρκας με δέρμα (πίνακες ΠV_36 και ΠV_37).

Στον πίνακα 10.21 δίνεται το ισοζύγιο αβεβαιότητας (*uncertainty budget*) για τον προσδιορισμό της SDZ σε δείγμα σάρκας με δέρμα, για τα τρία επίπεδα συγκέντρωσης.

10.12.2 Εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό της τριμεθοπρίμης σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος

Ακολουθώντας τα στάδια του Παραρτήματος V, υπολογίστηκε η αβεβαιότητα για τον προσδιορισμό της TMP σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος (πίνακας 10.22).

Παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην αβεβαιότητα έχουν η καμπύλη αναφοράς, τα τυχαία και τα συστηματικά σφάλματα, αλλά και η ζύγιση της πρότυπης ουσίας.

10.12.3 Εκτίμηση της αβεβαιότητας στον προσδιορισμό της ακετυλοσουλφαδιαζίνης σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος

Ακολουθώντας τα στάδια του Παραρτήματος V, υπολογίστηκε η αβεβαιότητα για τον προσδιορισμό της AcSDZ σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος (πίνακας 10.23). Παρατηρείται ότι τη μεγαλύτερη συνεισφορά στην αβεβαιότητα έχουν τα συστηματικά σφάλματα, η ζύγιση της πρότυπης ουσίας, αλλά και η καθαρότητα της πρότυπης ουσίας.

Πίνακας 10.21 Ισοζύγιο αβεβαιότητας για τον προσδιορισμό της SDZ σε σάρκα με δέρμα ιχθύος στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (50, 100 και 150 μg kg⁻¹)

Πηγή	Τιμή	Μονάδα	Uexp	U	RU	RU ²	
Αναπαραγωγιμότητα	48,1	µg kg⁻¹		3,7	0,077	0,0059	
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		1,9	0,019	0,00036	
Καμπύλη αναφοράς	80			1,5	0,019	0,00035	
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,020	0,012	0,00023	0,00000053	
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015	
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043	
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011	
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040	
Καθαρότητα υλικού αναφοράς	99,7	%	0,50	0,25	0,0025	0,0000063	
		Σ(RU²)			1	0,0068	
RU _c							
ŀ	RU _{exp} (k=2, για	στάθμη εμπισ	τοσύνης 95%	6)		0,16	
		RU _{exp} , %				16	
Πηνή	Τιμή	Μονάδα	Uawa	U	RU	RU²	
Αναπαρανωνιμότητα	99.3	<i>u</i> a ka ⁻¹	- exp	2.9	0.029	0.00085	
Συστηματικό σφάλμα	100.0	%		0.74	0.0074	0.000054	
	80			1,5	0,019	0,00035	
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,02	0,012	0,00023	0.00000053	
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015	
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043	
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011	
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040	
Καθαρότητα υλικού	99,7	%	0,50	0,25	0,0025	0,0000063	
		Σ(RU ²)				0,0014	
		RUc				0,038	
F	RU _{exp} (k=2, για	στάθμη εμπισ	τοσύνης 95%	6)		0,075	
		RU _{exp} , %				7,5	
Πηνή	Tiuń	Μονάδα	Uarn	U	RU	RƯ²	
Αναπαραγωγιμότητα	150.6	µg kg ⁻¹	- exp	2.5	0.017	0.00028	
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		0,44	0,0044	0,000019	
Καμπύλη αναφοράς	80			1,5	0,019	0,00035	
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,020	0,012	0,00023	0,00000053	
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015	
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043	
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011	
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040	
Καθαρότητα υλικού αναφοράς	99,7	%	0,50	0,25	0,0025	0,0000063	
		Σ(RU²)				0,00081	
		RUc				0,028	
F	RU _{exp} (k=2 , για	στάθμη εμπισ	τοσύνης 95%	6)		0,057	
		RU _{exp} , %				5,7	

Πίνακας 10.22 Ισοζύγιο αβεβαιότητας για τον προσδιορισμό της TMP σε δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος στα τρία επίπεδα συγκέντρωσης (25, 50 και 75 μg kg⁻¹)

Πηγή	Τιμή	Μονάδα	U _{exp}	U	RU	RU ²
Αναπαραγωγιμότητα	23,4	µg kg⁻¹		1,6	0,068	0,0047
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		1,7	0,017	0,00028
Καμπύλη αναφοράς	40			0,98	0,024	0,00060
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,020	0,012	0,00023	0,00000053
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040
Καθαρότητα υλ αναφοράς	99,5	%	0,50	0,25	0,0025	0,000063
		Σ(RU ²)				0,0057
		RUc				0,076
F	?U _{exp} (k=2 , για	ι στάθμη εμπι	στοσύνης 95	%)		0,15
		RU _{exp} , %				15
Πηγή	Τιμή	Μονάδα	U _{exp}	U	RU	RƯ²
Αναπαραγωγιμότητα	49,8	µg kg⁻¹		2,1	0,042	0,0018
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		1,1	0,011	0,00012
Καμπύλη αναφοράς	40			0,98	0,024	0,00060
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,020	0,012	0,00023	0,00000053
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040
Καθαρότητα υλ αναφοράς	99,5	%	0,50	0,25	0,0025	0,0000063
		Σ(RU ²)				0,0027
		RUc				0,052
R	2U _{exp} (k=2 , για	στάθμη εμπι	στοσύνης 95	%)		0,010
		RU _{exp} , %				10
Πηγή	Τιμή	Μονάδα	U _{exp}	U	RU	RƯ²
Αναπαραγωγιμότητα	74,7	µg kg⁻¹		1,5	0,020	0,00040
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		0,510	0,005	0,0000260
Καμπύλη αναφοράς	40			0,978	0,024	0,0005978
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,02	0,012	0,00023	0,00000053
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,124	0,062	0,012	0,0001539
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,130670	0,065	0,000065	0,000000043
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,210	0,11	0,0011	0,0000011
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,800	0,400	0,00200	0,0000040
Καθαρότητα υλ αναφοράς	99,5	%	0,500	0,250	0,0025	0,0000063
		Σ(RU ²)				0,0012
		RUc				0,035
R	U _{exp} (k=2 , για	στάθμη εμπι	στοσύνης 95%	%)		0,069
		RU _{exp} , %				6,9

Πίνακας 10.23	Ισοζύγιο	αβεβαιότητας	για τον	προσδιορισι	ιό της	AcSDZ (σε σάρκα	με δέρμα
ιχθύος στα τρία	επίπεδα	συγκέντρωσης	; (50, 10	00 και 150 <i>μ</i> g	∣ kg⁻¹)			

Πηγή	Τιμή	Μονάδα	U _{exp}	U	RU	RƯ²
Αναπαραγωγιμότητα	49,6	µg kg⁻¹		3,8	0,077	0,0059
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		1,9	0,019	0,00038
Καμπύλη αναφοράς	80			0,7	0,0093	0,000086
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,012	0,012	0,00023	0,00000053
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040
Καθαρότητα υλ αναφοράς	90	%	12	5,8	0,064	0,0041
		Σ(RU ²)				0,011
		RUc				0,10
R	U _{exp} (k=2, για	στάθμη εμπια	στοσύνης 95%	%)		0,21
		RU _{exp} , %				21
Πηνή	Τιμή	Μονάδα	Uern	U	RU	RƯ²
Αναπαραγωγιμότητα	99,7	µg kg ⁻¹	- 0.0	2,7	0,027	0,00073
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		0,69	0,0069	0.000048
Καμπύλη αναφοράς	80			0.74	0.0093	0.000086
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0.012	0.012	0.00023	0.000000053
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043
Πιπέτα (100 <i>μ</i> L)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011
Πιπέτα (200 <i>μ</i> L)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,000040
Καθαρότητα υλ αναφοράς	90	%	12	5,8	0,064	0,0041
		RUc		•		0,0051
R	U _{exp} (k=2 , για	στάθμη εμπια	ποσύνης 95%	%)		0,072
		Σ(RU ²)				0,14
		RU _{exp} , %				14
Πηγή	Τιμή	Μονάδα	U _{exp}	U	RU	RU ²
Αναπαραγωγιμότητα	150,2	µg kg⁻¹		5,0	0,033	0,0011
Συστηματικό σφάλμα	100,0	%		1,3	0,013	0,00017
Καμπύλη αναφοράς	80			0,74	0,0093	0,000086
Όγκος ογκομ. φιάλης	50	mL	0,012	0,012	0,00023	0,00000053
Ζυγός (πρότυπη ουσία)	5	mg	0,12	0,062	0,012	0,00015
Ζυγός (δείγμα)	1000	mg	0,13	0,065	0,000065	0,000000043
Πιπέτα (100 μL)	100	μL	0,21	0,11	0,0011	0,0000011
Πιπέτα (200 μL)	200	μL	0,80	0,40	0,0020	0,0000040
Καθαρότητα υλ αναφοράς	90	%	12	5,8	0,064	0,0041
		RUc				0,0056
R	J _{exp} (k=2 , για	στάθμη εμπια	ποσύνης 95%	6)		0,075
		Σ(RU ²)				0,15
		RU _{exp} , %				15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΟΡΟΥ ΙΧΘΥΟΣ

11.1 Εισαγωγή

Αξιολογήθηκαν όλα τα χαρακτηριστικά ποιότητας του εδαφίου 10.1, εκτός από το όριο απόφασης *CC_α* και την ικανότητα ανίχνευσης *CC_β*, δεδομένου ότι το *MRL* έχει καθορισθεί μόνο για δείγμα σάρκας με δέρμα ιχθύος, καθώς, επίσης, δεν έγινε εκτίμηση της αβεβαιότητας των μετρήσεων προσδιορισμού των αναλυτών σε δείγμα ορού.

11.2 Έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος

Κατά τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος στην αρχή κάθε εργαστηριακής ημέρας³⁰⁷ χρησιμοποιήθηκαν ένα ΠΔΕ, με συγκεντρώσεις 100 ng SDZ, 50 ng TMP, 100 ng AcSDZ και 50 ng DPS ανά mL *DS*, για τη μελέτη της επαναληψιμότητας και ένα ΔΕ, με συγκεντρώσεις 250 μg SDZ, 125 μg TMP, 250 μg AcSDZ και 125 μg DPS ανά mL ορού, για τη μελέτη της διαχωριστότητας (συγκεντρώσεις "*MRL*" για τον ορό).

Στον πίνακα 11.1 δίνονται τα κριτήρια επίδοσης για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος και οι τιμές που λαμβάνονταν στην περίπτωση του ΔΕ ορού. Στα σχήματα ΠVI_1 και ΠVI_2 δίνονται τα χρωματογραφήματα του ΠΔΕ και του ΔΕ, αντίστοιχα.

11.3 Έλεγχος της ειδικότητας, της εκλεκτικότητας και των παρεμποδίσεων από το μητρικό υλικό

Η ειδικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε συγκρίνοντας τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από «λευκά» δείγματα ορού με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από πρότυπα διαλύματα και εμβολιασμένα δείγματα ορού σε συγκεντρώσεις LOQ και "2,5×MRL". Διαπιστώθηκε ότι, στον χρόνο που εκλούονται οι αναλύτες και το IS, δεν

Διαχωριστότητα	Δπαίτηση	Δείγμα Ελέγχου (ΔΕ) ορού				
	Anampol	SDZ	ТМР	AcSDZ	DPS	
n A _f R _s	0,8 − 1,2 ≥ 1,5	300,0 (±4,4) 1,05 (±0,11) ≥ 1,5	481,0 (±3,6) 1,117 (±0,079) ≥1,5	534,0 (±3,8) 1,047(±0,084) ≥1,5	656,0 (±3,2) 1,152 (±0,042) ≥ 1,5	

Πίνακας 11.1 Κριτήρια επίδοσης για τον έλεγχο της καταλληλότητας του συστήματος

n: αριθμός θεωρητικών πλακών, *A_i*: παράγοντας ασυμμετρίας, *R_s*: διαχωριστότητα.
 Στις παρενθέσεις δίνονται οι τιμές τυπικής απόκλισης (*n*=3)

εκλούεται κάποιο συστατικό προερχόμενο από τον ορό.

Στα σχήματα ΠVI_3 και ΠVI_4 δίνονται τα υπερτιθέμενα χρωματογραφήματα ενός «λευκού» δείγματος ορού και ενός δείγματος ορού εμβολιασμένου με μίγμα αναλυτών και *IS*, όπου φαίνεται η ειδικότητα της μεθόδου.

Στη συνέχεια, ενίονται δέκα «λευκά» δείγματα ορού διαφορετικής προέλευσης, για να ελεγχθούν περαιτέρω τυχόν υπάρχουσες παρεμποδίσεις από το μητρικό υλικό. Δεν παρατηρήθηκε έκλουση κάποιου συστατικού του μητρικού υλικού στους χρόνους έκλουσης των αναλυτών και του /S.

Για την εκλεκτικότητα ισχύει ό,τι και στην περίπτωση των δειγμάτων σάρκας με δέρμα.

11.4 Έλεγχος της επιμόλυνσης

Πραγματοποιήθηκε, παρασκευάζοντας ένα «λευκό» δείγμα και δύο εμβολιασμένα δείγματα συγκέντρωσης δεκαπλάσιας του "*MRL*" (10ד*MRL*").

Δεν παρατηρήθηκε κάποια επιμόλυνση στο «λευκό» δείγμα με αναλύτες ή /S από την ένεση κάποιου από τα δείγματα υψηλής συγκέντρωσης.

11.5 Έλεγχος της σταθερότητας

Πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα εδάφια 10.5.1, 10.5.2 και 10.5.3 και εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

✓ Το διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng SDZ / mL DS σε μητρικό υλικό (ορό), είναι σταθερό για τρεις ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη, για επτά ημέρες στο ψυγείο και για δύο εβδομάδες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι δύο φορές,

- ✓ Το διάλυμα συγκέντρωσης 50 ng TMP / mL DS σε μητρικό υλικό (ορό), είναι σταθερό για τρεις ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για δύο εβδομάδες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι δύο φορές,
- ✓ Το διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng AcSDZ / mL DS σε μητρικό υλικό (ορό), είναι σταθερό για τρεις ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για επτά ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι πέντε φορές,
- ✓ Το διάλυμα συγκέντρωσης 50 ng DPS / mL DS σε μητρικό υλικό (ορό), είναι σταθερό για τρεις ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο για επτά ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι τρεις φορές.

11.6 Έλεγχος της ανθεντικότητας

Πραγματοποιήθηκε όπως περιγράφεται στα εδάφια 10.6.1 και 10.6.2.

Μικρές αποκλίσεις στις τιμές της αναλυτικής πορείας και για τους τρεις παράγοντες, δεν συνεισφέρουν σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα.

11.7 Καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς

11.7.1 Εισαγωγή

Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα και δείγματα εμβολιασμένα με τους αναλύτες και το *IS* σε δύο εύρη συγκεντρώσεων:

- (i) 1,0 200 ng mL⁻¹ (SDZ, AcSDZ) που αντιστοιχεί σε 2,5 500 ng mL⁻¹ ορού και 0,1 200 ng mL⁻¹ (TMP) που αντιστοιχεί σε 0,25 500 ng mL⁻¹ ορού (εύρος *A*),
- (ii) 200 10000 ng mL⁻¹ (SDZ, TMP, AcSDZ) που αντιστοιχεί σε 500 25000 ng mL⁻¹ ορού (εύρος *B*).

Στη συνέχεια κατασκευάστηκε καμπύλη αναφοράς ενιαίου εύρους για τις *ccA*, *ccB* και *ccC*, με την προϋπόθεση ότι οι κλίσεις των καμπυλών των δύο ευρών δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά μεταξύ των. Στο εδάφιο 6.4.2 περιγράφεται η διαδικασία παρασκευής των διαλυμάτων των καμπυλών αναφοράς.

Αξιολογήθηκαν, επίσης, το "matrix effect' και το "relative matrix effect'.

11.7.2 Καμπύλη αναφοράς σε πρότυπα διαλύματα

Οι καμπύλες αναφοράς των αναλυτών SDZ, TMP και AcSDZ σε πρότυπα διαλύματα, με και χωρίς *IS*, είναι ίδιες με εκείνες που κατασκευάστηκαν στην ενότητα 10.7.2.

11.7.3 Καμπύλη αναφοράς σε διαλύματα μητρικού υλικού. Προσδιορισμός της «επίδρασης του μητρικού υλικού»

Στον πίνακα 11.2 δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς, με και χωρίς *IS*, καθώς και οι τιμές του *ME* (%). Το θετικό πρόσημο των τιμών του *ME* (%) δηλώνει υποβάθμιση του σήματος.

Οι τιμές του *ME* (%) στην περίπτωση της SDZ χωρίς *IS* κυμαίνονται από 6 έως 17 %, ενώ με τη χρήση *IS*, οι τιμές κυμαίνονται από 6 έως 12 %. Για την AcSDZ χωρίς *IS* οι τιμές *ME* (%) κυμαίνονται από 17 έως 23 %, ενώ η χρήση *IS* οδηγεί σε μικρή μείωση των τιμών (11 - 17 %). Τέλος, οι τιμές του *ME* (%) για την TMP χωρίς *IS* είναι επίσης, πιο υψηλές και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (13 - 23 %), απ'ότι στην περίπτωση που χρησιμοποιείται *IS*, οπότε οι τιμές μειώνονται (12 - 15 %). Σε κάθε περίπτωση, όμως οι τιμές του *ME* (%) σε δείγματα ορού είναι μικρότερες απ'ό,τι στα δείγματα σάρκας με δέρμα και ήπατος.

11.7.4 Καμπύλη αναφοράς με δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση. Προσδιορισμός της «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού»

Στον πίνακα 11.3 δίνεται η στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *C*, με και χωρίς *IS*. Οι καμπύλες αναφοράς *C*, παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα ορού από διαφορετικούς ιχθύες. Έτσι, οι τιμές της *RSD* (%) των κλίσεων τους δίνουν μία εκτίμηση για τη «σχετική επίδραση του μητρικού υλικού». Από τον πίνακα 11.3 παρατηρείται ότι η *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών

ME. % ME. % Ουσία Εξίσωση παλινδρόμησης Εξίσωση παλινδρόμησης Εξίσωση παλινδρόμησης Εξίσωση των cc AA και BA παλινδρόμησης των cc AB και BB των cc AB και BB των cc ΑΑ και ΒΑ $(\chi \omega \rho i \varsigma IS)$ (χωρίς IS) (με /S) (με /S) (με *IS*) $(\chi \omega \rho i \varsigma IS)$ SDZ **AA6** A=1404.7C-1289.4 AB1 A=1309.2C-5018.3 7 AA6 RA=0.0133C+0.0067 AB1 RA=0.0124C+0.0068 7 **AA7** A=1410,4C-1452,3 AB2 A=1238,1C+7057,8 AA7 RA=0,0127C+0,0170 AB2 RA=0,0115C+0,0033 9 12 **AA8** A=1420,5C-1571,6 **AB3** A=1335.2C-5361.2 6 AA8 RA=0.0133C+0.0299 AB3 RA=0.0117C+0.0339 12 **AA9** A=1426.3C-1689.6 **AB4** A=1297C-3911.9 9 AA9 RA=0.0128C+0.0408 AB4 RA=0.0117C+0.0376 9 **AA10** A=1408,7C-1217,4 AB5 A=1188,7C-2611 AA10 RA=0,0136C+0,0418 8 AB5 RA=0,0125C+0,0338 16 **BA4** $A=13.52 \times 10^{2} C+0.17$ **BB1** $A=11.6560 \times 10^{2} C+0.0018$ 6 14 BA4 RA=0,0137C+0,021 **BB1** RA=0.0129C+0.093 **BA5** A=13.90×10² C+0.68 **BB2** A=11.96×10²C+0.89 7 14 BA5 RA=0.0139C-0.025 **BB2** RA=0.0130C+0.030 **BA6** A=14,40×10² C+1,10 **BB3** A=11,71×10²C+1,64 9 17 **BA6** RA=0.0140C-0.040 BA3 RA=0.0128C+0.050 AcSDZ AA6 A=1268.1C+1581 AB1 A=979.98C+167.06 23 AA6 RA=0,0134C-0,0064 AB1 RA=0,0119C-0,0064 12 17 **AA7** A=1247.6C+1380 AB2 A=981.11C-443.87 21 AA7 RA=0.0141C-0.0132 AB2 RA=0.0123C-0.0358 AA8 A=1224.9C+281.59 AB3 A=971.34C-863.75 21 **AA8** RA=0.0144C-0.022 AB3 RA=0.0119C-0.0277 11 AB4 RA=0.0124C-0.0385 **AA9** A=1229,5C+361,77 AB4 A=1023,4C-657,55 17 **AA9** RA=0,015C-0,0041 17 **AA10** A=1176C+214,88 **AB5** A=981,6C-2219,4 AA10 RA=0,0149C-0,0088 AB5 RA=0,0129C-0,0413 28 17 **BA4** A=1216C-59 **BB1** A=972C+101 20 **BA4** RA=0,0138C-0,0059 **BB1** RA=0,0121-0,0046 27 **BB2** A=937C+92 29 **BA5** A=1191C-77 21 **BA5** RA=0.01408C-0.0062 **BB2** RA=0,0123C-0,0049 33 **BB3** A=952C+105 21 BA6 RA=0,0140C-0,0048 **BB3** RA=0,0124C-0,0054 **BA6** A=1201C-35 TMP **AA6** A=6626,6C-7275,6 AB1 A=5097,5C-5270,6 23 AA6 RA=0,0917C+0,0171 AB1 RA=0.0793C+0.073 14 AA7 A=6266.9C-4246.9 AB2 A=5458C-10310 13 AA7 RA=0.0934C+0.0181 AB2 RA=0.0806C+0.0453 14 AA8 A=6031.7C-1120.8 AB3 A=5089.3C-1622.1 16 AA8 RA=0.094C+0.0365 AB3 RA=0.0803C+0.0973 15 AA9 A=6168.3C+480.87 AB4 A=5134.8C+292.87 17 AA9 RA=0.094C+0.0365 AB4 RA=0.0803C+0.0973 15 **AA10** A=6164.3C+2315.7 AB5 A=5085.6C+660.08 17 AA10 RA=0.0935C+0.0596 AB5 RA=0.0793C+0.1528 15 **BA4** A=6446C+52 BB1 A=5208C-531 19 BA4 RA=0,0913C+0,0123 BB1 RA=0.0799C-0.0370 12 **BA5** A=6481C+77 **BB2** A=5151C-2.05 21 BA5 RA=0.0924C-0.0081 **BB2** RA=0.07937C-0.0714 14 **BA6** A=6432C+49 **BB3** A=5204C-2 19 **BA6** RA=0.09158C-0.0046 **BB3** RA=0.0787C-0.0739 14

Πίνακας 11.2 Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων (cc AA και BA) και των διαλυμάτων του μητρικού υλικού (opóς) (cc AB και BB), με και χωρίς /S και οι αντίστοιχες τιμές της «επίδρασης του μητρικού υλικού»

αναφοράς *C* της SDZ χωρίς *IS* είναι παρόμοια στα δύο εύρη συγκεντρώσεων και δεν υπερβαίνει το 4 %, γεγονός που δηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της προέλευσης του μητρικού υλικού (ορός) στη κλίση της καμπύλης αναφοράς που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της SDZ σε ορό ιχθύος. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της TMP χωρίς *IS*, όπου οι τιμές *RSD* (%) κυμαίνονται μεταξύ 1,5 - 2,1. Στην περίπτωση της AcSDZ χωρίς *IS*, η τιμή *RSD* (%) στο εύρος *A* είναι σχετικά υψηλή (5,7) και χαμηλότερη στο εύρος *B* (1,6).

Η παρουσία του /S δε φαίνεται να μειώνει τη «σχετική επίδραση του μητρικού υλικού». Στην περίπτωση της SDZ με /S, οι τιμές της *RSD* (%) είναι παραπλήσιες (2,5 - 3,9 %). Στην περίπτωση της AcSDZ με /S, οι τιμές της *RSD* (%) είναι υψηλές (4,5 - 5,5 %), ενώ και στην TMP με /S οι τιμές της *RSD* (%) είναι παραπλήσιες στα δύο εύρη συγκεντρώσεων (1,8 - 1,9).

Στον πίνακα 11.4 δίνονται οι εξισώσεις, οι συντελεστές συσχετίσεως και προσδιορισμού, καθώς και το τυπικό σφάλμα των καμπυλών αναφοράς.

11.8 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης

11.8.1 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης σε δείγματα ορού

Στον πίνακα 11.5 δίνονται τα *LOD*s των αναλυτών και στο σχήμα ΠVI_42 δίνονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα.

11.8.2 Προσδιορισμός του ορίου ποσοτικοποίησης σε δείγματα ορού

Στον πίνακα 11.5 δίνονται τα *LOQ*s των αναλυτών προσδιοριζόμενα σε δείγματα ορού. Στο σχήμα ΠVI_43 δίνονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα δειγμάτων ορού.

Αναλύτης	Εύρος Συγκεντρώσεων	Μέση τιμή κλίσης (<i>mean</i>)	Τυπική απόκλιση κλίσης (<i>SD</i>)	Σχετική τυπική απόκλιση κλίσης, % (<i>RSD, %</i>)
SDZ	Χωρίς IS Α Β	0,1100×10 ⁴ 0,1063×10 ⁴	0,0036 0,0037	3,2 3,4
	Με IS Α Β	118,3×10 ⁻⁴ 123,5×10 ⁴	4,6×10 ⁻⁴ 3,1×10 ⁻⁴	3,9 2,5
AcSDZ	Χωρίς IS Α Β	9,10×10 ² 9,16×10 ²	0,52×10 ² 0,15×10 ²	5,7 1,6
	Mε IS A B	106,9×10 ⁻⁴ 106,5×10 ⁻⁴	4,9×10 ⁻⁴ 5,9×10 ⁻⁴	4,5 5,5
TMP	Χωρίς IS Α Β	5,067×10 ³ 4,914×10 ³	0,078×10 ³ 1,1×10 ³	1,5 2,1
	Mε IS A B	77,9×10 ⁻³ 76,5×10 ⁻³	1,5×10 ⁻³ 1,4×10 ⁻³	1,8 1,9

Πίνακας 11.3 Στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής της κλίσης των καμπυλών αναφοράς των δειγμάτων εμβολιασμένων με τους αναλύτες πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό, με και χωρίς *IS*, στα τρία εύρη συγκεντρώσεων

Αναλύτης	Εύρος συγκεντρώσεων	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχετίσεως (<i>R</i>)	Τυπικό σφάλμα καμπύλης (S _{y/x})
SDZ	Χωρίς IS Α Β	A=[0,1100(±0,0026)]×10 ⁴ C-[(0,35±0,26)×10 ⁴] A=[0,1063(±0,0019)]×10 ⁴ C-[(1,12±0,89)×10 ⁴]	0,998 0,9993	5,4×10 ³ 1,7×10 ³
	Με IS Α Β	RA=[118,1(±0,3)]×10 ⁻⁴ C-[(3,3±2,6)×10 ⁻²] RA=[121,5(±0,47)]×10 ⁻⁴ C-[(1,8±2,2)×10 ⁻²]	0,998 0,997	0,055 4,2
AcSDZ	Χωρίς IS Α Β	$A=[9,1(\pm0,13)]\times10^{2}C-[(0,01\pm0,13)\times10^{4}]$ $A=[9,16(\pm0,18)]\times10^{2}C-[(0,46\pm0,83)\times10^{4}]$	0,994 0,9992	2,7×10 ³ 1600
	Με IS Α Β	RA=[106,9(±1,2)]×10 ⁻⁴ C-[(0,3±1,1)×10 ⁻²] RA=[104,9(±6,1)]×10 ⁻⁴ C-[(1,9±2,8)×10 ⁻²]	0,9996 0,993	0,024 5,5
TMP	Χωρίς ΙS Α Β	$\begin{array}{l} A = [5,067(\pm0,068)] \times 10^{3} C - [(0,47\pm0,50) \times 10^{4}] \\ A = [4,91(\pm0,13)] \times 10^{3} C - [(3,7\pm6,2) \times 10^{5}] \end{array}$	0,994 0,998	1,2×10 ⁴ 1,2×10 ⁴
	Με IS Α Β	RA=[77,80(±0,78)]×10 ⁻³ C-[(7,5±5,6)×10 ⁻²] RA=[75,4(±3,9)]×10 ⁻³ C-[(0,20±0,18)×10 ²]	0,9997 0,995	0,14 35

Πίνακας 11.4 Εξισώσεις παλινδρόμησης, συντελεστές συσχετίσεως και τυπικό σφάλμα των καμπυλών αναφοράς που ελήφθησαν με δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό

Αναλύτης	Εξίσωση παλινδρόμησης	<i>LOD</i> (ng mL ⁻¹) ^a	LOD (ng mL ⁻¹) ^b	<i>LOQ</i> (ng mL ⁻¹) ^a	<i>LO</i> Q (ng mL⁻¹) ^ь
SDZ	A=[0,1100(±0,0026)]×10 ⁴ C- [(0.35±0.26)×10 ⁴	7,8	2,0	23,6	6,25
AcSDZ	$A=[9,10(\pm0,13)]\times10^{2}C-$ [(0,01±0,13)×10 ⁴	4,7	0,8	14,3	2,5
ТМР	$A = [5,067(\pm 0,068)] \times 10^{3} C - [(0,47\pm 0,50) \times 10^{4}]$	3,3	2,0	9,9	6,25

Πίνακας 11.5 Όρια ανίχνευσης και ποσοσικού προσδιορισμού των αναλυτών σε δείγμα ορού

^a Υπολογισμένο θεωρητικά βάσει της εξίσωσης παλινδρόμησης
 ^b Καθορισμένο από το χρωματογράφημα με βάση τους λόγους S/N ≥ 3 (LOD) και S/N ≥ 10 (LOQ)

11.9 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης των καμπυλών αναφοράς σε δείγματα ορού εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό

Στον πίνακα 11.6 δίνονται οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών.

Αναλύτης/DPS	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχετίσεως (<i>R</i>)	Τυπικό σφάλμα καμπύλης (S _{y/x})						
SDZ/DPS	$RA = [120,1(\pm 2,8)] \times 10^{-4} C - (0,70\pm 0,90)$ $(v = 0.012 x - 0.6953)$	0,997	12						
AcSDZ/DPS	$RA = [103,4(\pm 3,6)] \times 10^4 C - (0,7\pm 1,2)$ (y = 0,0103 x - 0,7266)	0,995	12						
TMP/DPS	$RA = [74,1(\pm 2,2)] \times 10^{-3} C - (5,0\pm 6,8)$ (y = 0.0741 x - 4.9887)	0,995	13						

Πίνακας 11.6 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης των καμπυλών αναφοράς C (στις παρενθέσεις δίνονται οι εξισώσεις όπως προκύπτουν από το EXCEL)

11.10 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου

Στους πίνακες 11.7 και 11.8 δίνονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο που έγινε εντός της ίδιας εργαστηριακής ημέρας και σε πέντε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες, αντίστοιχα.

	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	- /	Αληθότητα		
Αναλυτης	που προστέθηκε (ng mL ⁻¹ ορού)	που βρεθηκε (ng mL ⁻¹ ορού) Μέση τιμή ± <i>SD</i> (<i>n</i> = 6)	Πιστοτητα CV, %	RE, % ± SD ^a	<i>E</i> _r , % ^b	
SDZ	6,25 (LOQ) 250 (<i>"MRL"</i>) 500 (<i>ULRA</i>) 1250 12500 25000	$5,83 \pm 0,31$ 228 ± 11 506 ± 19 1164 ± 51 $(128,3 \pm 6,6) \times 10^{2}$ $(254,9 \pm 4,9) \times 10^{2}$	5,34 4,7 3,7 4,4 5,2 1,9	$93,3 \pm 5,0 \\91,3 \pm 4,3 \\101,3 \pm 3,8 \\93,2 \pm 4,1 \\102,7 \pm 5,3 \\101,9 \pm 2,0$	-6,7 -8,7 1,3 -6,8 2,7 1,9	
ТМР	2,5 (<i>LOQ</i>) 125 (<i>"MRL"</i>) 500 (<i>ULRA</i>) 1250 12500 25000	$1,992 \pm 0,091$ $133,7 \pm 2,6$ $498,9 \pm 9,9$ 1235 ± 58 $(122,6 \pm 1,1) \times 10^{2}$ $(255,9 \pm 5,8) \times 10^{2}$	4,5 1,9 1,9 4,7 0,91 2,2	$79,5 \pm 3,6$ $105,4 \pm 1,2$ $98,27 \pm 0,50$ $101,6 \pm 1,9$ $98,6 \pm 1,0$ $104,3 \pm 1,0$	-20,3 7,0 -0,2 -1,2 -1,9 2,4	
AcSDZ	6,25 (<i>LOQ</i>) 250 (<i>"MRL"</i>) 500 (<i>ULRA</i>) 1250 12500 25000	$5,86 \pm 0,47$ 241 ± 19 510 ± 22 1288 ± 67 $(118,6 \pm 7,3) \times 10^{2}$ $(252,4 \pm 7,9) \times 10^{2}$	8,1 7,9 4,4 5,2 6,2 3,1	$\begin{array}{c} 93,8 \pm 7,6 \\ 96,5 \pm 7,6 \\ 102,1 \pm 4,5 \\ 103,1 \pm 5,4 \\ 94,9 \pm 5,8 \\ 100,9 \pm 3,1 \end{array}$	-6,2 -3,5 2,1 3,1 -5,1 0,9	

Πίνακας 11.7 Ορθότητα και πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day inter-batch)

^{a, b} Όπως στον πίνακα 10.18.

Πίνακας 11.8 Ορθότητα κα	ι πιστότητα	μεταξύ των	ημερών ((inter-da	γ inter-batch)
---------------------------------	-------------	------------	----------	-----------	---------------	---

	Συγκέντρωση	Συγκέντρωση	-	Αληθότη	τα
Αναλυτης	που προστέθηκε (ng mL ⁻¹ ορού)	που βρεθηκε (ng mL ⁻¹ ορού) Μέση τιμή ± <i>SD</i> (<i>n</i> = 15)	Πιστοτητα CV, %	RE, % ± SD ^ª	<i>E</i> ,, % ^b
SDZ	6,25 (LOQ) 250 ("MRL") 500 (ULRA) 1250 12500 25000	$6,23 \pm 0,68$ 230 ± 12 501 ± 16 1178 ± 50 $(126,0 \pm 4,8) \times 10^{2}$ $(250,8 \pm 6,3) \times 10^{2}$	10 5,1 3,2 4,2 3,8 2,5	$100 \pm 11 92,1 \pm 4,7 100,2 \pm 3,2 94,3 \pm 4,0 100,8 \pm 3,8 100,3 \pm 2,5 $	-0,2 -7,9 -0,2 -5,7 0,8 0,3
ТМР	2,5 (<i>LOQ</i>) 125 (<i>"MRL"</i>) 500 (<i>ULRA</i>) 1250 12500 25000	$2,135 \pm 0,071$ $129,6 \pm 2,1$ $498,7 \pm 7,5$ 1236 ± 18 $(123,6 \pm 1,5) \times 10^{2}$ $(252,4 \pm 6,4) \times 10^{2}$	3,3 1,6 1,5 1,4 1,2 2,5	$85,4 \pm 2,7$ 103,7 ± 1,6 99,7 ± 1,5 98,9 ± 1,4 98,9 ± 0,8 100,9 ± 2,6	-14,6 -3,7 -0,3 -1,1 -1,1 0,9
AcSDZ	6,25 (<i>LOQ</i>) 250 (<i>"MRL"</i>) 500 (<i>ULRA</i>) 1250 12500 25000	$\begin{array}{c} 6,01 \pm 0,28 \\ 237 \pm 15 \\ 501 \pm 13 \\ 1263 \pm 84 \\ (121,4 \pm 5,8) \times 10^2 \\ (251,4 \pm 5,5) \times 10^2 \end{array}$	4,7 6,3 2,6 6,7 4,8 2,2	$96,1 \pm 4,1 95,0 \pm 6,0 100,2 \pm 2,4 101,1 \pm 6,8 97,1 \pm 4,7 100,6 \pm 2,2$	-3,9 -5,0 -0,2 1,1 -2,9 0,6

^{а, ь} Όπως στον πίνακα 10.18.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑ ΗΠΑΤΟΣ ΙΧΘΥΟΣ

12.1 Έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος

Ο έλεγχος της καταλληλότητας του συστήματος³⁰⁹ πραγματοποιείτο στην αρχή της εργαστηριακής ημέρας χρησιμοποιώντας ένα ΠΔΕ και ένα ΔΕ, αντίστοιχα με εκείνα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την επικύρωση της μεθόδου για δείγμα σάρκας με δέρμα (πίνακας 12.1). Στα σχήματα ΠVII_1 και ΠVII_2 δίνονται τα χρωματογραφήματα των ΠΔΕ και ΔΕ σε ήπαρ, αντίστοιχα.

Πίνακας 12.1	Κριτήρια επίδοσ	ης για τον έλεγχο	καταλληλότητας	του συστήματος
--------------	-----------------	-------------------	----------------	----------------

A.m.(.)0107677770	Amaiman	Δείγμα Ελέγχου (ΔΕ) ήπατος			
Διαχωριστοτητα	Andinjon	SDZ	ТМР	AcSDZ	DPS
n A _f Rs	0,8−1,2 ≥1,5	224 (±9,9) 1,431 (±0,048) ≥ 1,5	371 (±3,6) 1,650 (±0,041) ≥ 1,5	414 (±5,2) 1,764(±0,039) ≥ 1,5	562 (±9,3) 1,461 (±0,065) ≥ 1,5

n: αριθμός θεωρητικών πλακών, *A*_i: παράγοντας ασυμμετρίας, *R*_s: διαχωριστότητα. Στις παρενθέσεις δίνονται οι τιμές τυπικής απόκλισης (*n*=3)

12.2 Έλεγχος της ειδικότητας, της εκλεκτικότητας και των παρεμποδίσεων από το μητρικό υλικό

Η ειδικότητα της μεθόδου ελέγχθηκε συγκρίνοντας το χρωματογράφημα που ελήφθηκε από ένα «λευκό» δείγμα ήπατος, με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από πρότυπα διαλύματα και εμβολιασμένα δείγματα ήπατος. Δεν παρατηρήθηκαν παρεμποδίσεις.

12.3 Έλεγχος της επιμόλυνσης

Δεν παρατηρήθηκε κάποια επιμόλυνση στο «λευκό» δείγμα με αναλύτες ή το *IS*, από την ένεση κάποιου από τα δείγματα υψηλής συγκέντρωσης.

12.4 Έλεγχος της σταθερότητας

Εξήχθησαν τα εξής συμπεράσματα:

- Το διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng SDZ / mL μητρικού υλικού, είναι σταθερό για δύο ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για επτά ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι δύο φορές,
- Το διάλυμα συγκέντρωσης 50 ng TMP / mL μητρικού υλικού, είναι σταθερό για τρεις ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για τρεις εβδομάδες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι τρεις φορές,
- ✓ Το διάλυμα συγκέντρωσης 100 ng AcSDZ / mL μητρικού υλικού, είναι σταθερό για δύο ημέρες στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για επτά ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι δύο φορές,
- ✓ Το διάλυμα συγκέντρωσης 50 ng DPS / mL μητρικού υλικού, είναι σταθερό για μία ημέρα στον αυτόματο δειγματολήπτη και στο ψυγείο, για επτά ημέρες στον καταψύκτη, ενώ το διάλυμα μπορεί αποψυχθεί και επαναψυχθεί μέχρι δύο φορές.

12.5 Έλεγχος της ανθεκτικότητας

Η μελέτη της ανθεκτικότητας στο σύστημα *LC/MS* περιγράφηκε στο εδάφιο 10.6.1. Από την αξιολόγηση της ανθεκτικότητας στην παρασκευαστική πορεία ενός δείγματος ήπατος συγκέντρωσης "*MRL*" ως προς τους αναλύτες (πίνακες ΠVII_1 και ΠVII_2) παρατηρείται ότι για κάθε αναλύτη οι απόλυτες τιμές των D_A , D_B και D_{Γ} είναι μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες τιμές $\sqrt{2} \times SD$, που σημαίνει ότι και οι τρεις παράγοντες που μελετήθηκαν (*ASE flush volume* %, mL *n*-επτανίου στο 1° στάδιο έκπλυσης της *SPE*, % MeOH σε H₂O στο 2° στάδιο έκπλυσης της *SPE*) συνεισφέρουν σημαντικά στο τελικό αποτέλεσμα και δε θα πρέπει οι τιμές των vα αποκλίνουν από εκείνες της αναλυτικής πορείας. Εξαίρεση αποτελεί ο παράγοντας D_A για την SDZ, δηλαδή μικρή μεταβολή του % ASE *flush volume*, δεν επηρεάζει σημαντικά την εκχύλιση της SDZ από δείγμα ήπατος.

12.6 Καμπύλη βαθμονόμησης ή αναφοράς

12.6.1 Καμπύλη αναφοράς σε διαλύματα του μητρικού υλικού. Προσδιορισμός της «επίδρασης του μητρικού υλικού»

Κατασκευάστηκαν διαφορετικές καμπύλες αναφοράς σε διαλύματα του μητρικού υλικού, με και χωρίς *IS*, σε διαφορετικές ημέρες, καθώς και οι αντίστοιχες καμπύλες σε πρότυπα διαλύματα. Οι γραφικές παραστάσεις των καμπυλών αναφοράς δίνονται στο Παράρτημα VII (σχήματα ΠVII_9 - ΠVII_26).

Στον πίνακα 12.2 δίνονται οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων και των διαλυμάτων του μητρικού υλικού των αναλυτών, με και χωρίς *IS*, καθώς και οι τιμές του *ME* (%). Το θετικό πρόσημο των τιμών του *ME* (%) δηλώνει υποβάθμιση του σήματος. Γενικά, οι τιμές αυτές είναι μεγαλύτερες στα δείγματα ήπατος σε σχέση με τα δείγματα σάρκας με δέρμα, γεγονός που οφείλεται στη μεγαλύτερη περιεκτικότητα του ήπατος σε συστατικά όπως τα λιπίδια, τα οποία δεν απομακρύνονται αποτελεσματικά κατά τη διαδικασία καθαρισμού του δείγματος και συνεκλούονται με τους αναλύτες.

Οι τιμές *ME* (%) στην περίπτωση της SDZ χωρίς *IS* κυμαίνονται από 29 έως 54 %, ενώ με τη χρήση *IS*, οι τιμές είναι παραπλήσιες και στα τρία εύρη συγκεντρώσεων (14 - 29 %), αλλά είναι αισθητά μικρότερες απ'ό,τι στην περίπτωση που δεν χρησιμοποιείται *IS*. Για την AcSDZ χωρίς *IS* οι τιμές *ME* (%) κυμαίνονται από 15 έως 35 %, ωστόσο, η χρήση *IS* δεν οδηγεί σε μείωση των τιμών (11 - 33 %). Τέλος, οι τιμές του *ME* (%) για την TMP χωρίς *IS* είναι υψηλές και στα τρία επίπεδα συγκεντρώσεων (29 - 35 %), αλλά η χρήση *IS* τις μειώνει σημαντικά (6 - 18 %).

12.6.2 Καμπύλη αναφοράς σε δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση. Προσδιορισμός της «σχετικής επίδρασης του μητρικού υλικού»

Στον πίνακα 12.3 δίνεται η στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *C*, με και χωρίς *IS*. Οι καμπύλες αναφοράς *C* παρασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας δείγματα ήπατος από διαφορετικούς ιχθύες.

Από τον πίνακα 12.3 παρατηρείται ότι η *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *C* της SDZ χωρίς *IS* και στα τρία εύρη συγκεντρώσεων είναι μικρή (0,851 - 2,112), γεγονός που δηλώνει ότι δεν υπάρχει σημαντική επίδραση της προέλευσης του μητρικού υλικού στη κλίση της καμπύλης αναφοράς που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για τον ποσοτικό προσδιορισμό της SDZ σε ήπαρ ιχθύος. Το ίδιο συμβαίνει και στην περίπτωση της TMP χωρίς *IS*, όπου οι τιμές *RSD* (%) κυμαίνονται μεταξύ 0,90 - 1,8). Η *RSD* (%) των κλίσεων των καμπυλών αναφοράς *AC* της AcSDZ χωρίς *IS* είναι μικρή (0,62), ενώ στις μεσαίες και υψηλές συγκεντρώσεις η επίδραση είναι μεγαλύτερη, αφού οι αντίστοιχες τιμές της *RSD* (%) είναι 4,3 και 5,7. Σημειώνεται, επίσης η σημαντική διαφοροποίηση στην τιμή της κλίσης της καμπύλης στις υψηλές συγκεντρώσεις (*C*) σε σχέση με τις μικρές και μεσαίες συγκεντρώσεις (*A* και *B*).

Η παρουσία του /S δε φαίνεται να μειώνει τη «σχετική επίδραση του μητρικού υλικού». Στην περίπτωση της SDZ με /S, οι τιμές της RSD (%) είναι υψηλότερες, ωστόσο, είναι παραπλήσιες και στα τρία εύρη συγκεντρώσεων (3,0 - 4,5 %). Στην περίπτωση της AcSDZ με /S, οι τιμές της RSD (%) κυμαίνονται μεταξύ 1,0 - 3,3 %, ενώ και στην TMP με /S οι καμπύλες AC παρουσιάζουν μέγιστη τιμή RSD (%) την 3,3 %.

Στον πίνακα 12.4 δίνονται οι εξισώσεις, οι συντελεστές συσχετίσεως και προσδιορισμού, καθώς και το τυπικό σφάλμα των καμπυλών αναφοράς.

12.7 Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και και του ορίου ποσοτικοποίησης σε δείγματα ήπατος

Στον πίνακα 12.5 δίνονται τα LOQs των αναλυτών που προσδιορίστηκαν σε δείγματα ήπατος.

Πίνακας 12.2 Εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς των πρότυπων διαλυμάτων (cc AA, BA και CA) και των διαλυμάτων του μητρικού υλικού (ήπαρ) (cc AB, BB και CB), με και χωρίς /S και οι αντίστοιχες τιμές του ME (%)

Ουσία	Εξίσωση παλινδρόμησης των cc. 44, Β4 και C4	Εξίσωση παλινδρόμησης	<i>ME</i> , %	Εξίσωση παλινδρόμησης	Εξίσωση παλινδρόμησης των cc. ΑΒ. ΒΒ και CB	<i>ME</i> , %
	(χωρίς <i>IS</i>)	(χωρίς <i>IS</i>)	(χωρίς <i>IS</i>)	(με <i>IS</i>)	(με /S)	(με <i>IS</i>)
SDZ	AA4 A=1217,6C+241,4	AB1 A=740,1C+203,2	39	AA4 RA=0,0123C-0,0071	AB1 RA=0,0102C-0,01	17
	AA5 A=1189,6C+372,6	AB2 A=814,6C-573,4	32	AA5 RA=0,0122C-0,0009	AB2 RA=0,009C+0,0015	26
	AA6 A=1234,3 <i>C</i> -108,8	AB3 A=870,9C–521,9	29	AA6 RA=0,0125C-0,0011	AB3 RA=0,01 <i>C</i> -0,0038	20
	BA6 <i>A</i> =1280,5 <i>C</i> -4164,3	BB1 A=670,47 <i>C</i> +1516,8	48	BA6 RA=0,0141 <i>C</i> -0,0695	BB1 RA=0,011 <i>C</i> -0,0749	22
	BA7 <i>A</i> =1278,1 <i>C</i> -2006,1	BB2 A=631,11C+1269,7	51	BA7 RA=0,0138C-0,036	BB2 RA=0,0106C-0,0602	23
	BA8 A=1421,7C+697,57	BB3 A=660,42C+2204,1	54	BA8 RA=0,0142C-0,0215	BB3 RA=0,0102C-0,0571	28
	BA9 A=1411,3C+6091,1	BB4 A=648,71 C+5604,4	54			
	BA10 A=1328C+3142	BB5 A=632,72C+2850,5	52			
	CA4 A=1232C–54	CB1 A=728C–59	41	CA4 RA=0,0142C+0,0016	CB1 RA=0,0111C+0,0012	21
	CA5 A=1217C-300	CB2 A=772C-95	37	CA5 RA=0,0142C+0,0021	CB2 RA=0,011C+0,0012	23
	CA6 A=1252C+36	CB3 A=803C-90	34	CA6 RA=0,01416C-0,0013	CB3 RA=0,0106C+0,0015	25
AcSDZ	AA4 A=1232,1 <i>C</i> -212,1	AB1 A=919,5C+45,28	25	AA4 RA=0,0129C+0,0021	AB1 RA=0,0113C-0,0038	12
	AA5 A=1197,6C–530,8	AB2 A=981,9C-898,3	18	AA5 RA=0.0133C-0,0046	AB2 RA=0,011C+0,0025	17
	AA6	AB3 A=952,4C-963,1	15	AA6 RA=0,0129C+0,0025	AB3 RA=0,0115C-0,0072	11
	BA6 A=1207,5C+1015,4	BB1 A=849,9C–2353,2	30	BA6 RA=0,0133C-0,0111	BB1 RA=0,0111C+0,0149	17
	BA7 <i>A</i> =1256,4 <i>C</i> +734,8	BB2 A=878,2C–5559,2	30	BA7 RA=0,0141C-0,0333	BB2 RA=0,0102C-0,0014	28
	BA8 A=1290,3C+2124,1	BB3 A=860,7 <i>C</i> -4853,5	33	BA8 RA=0,014C-0,0395	BB3 RA=0,0102C-0,0111	27
	BA9 <i>A</i> =1263,3 <i>C</i> +4290,7	BB4 A=835,0 C-6969,6	34	BA9 RA=0,0141C-0,0339	BB4 RA=0,010C-0,0248	29
	BA10 A=1266,8C+2409,6	BB5 A=827,3C-7760,1	35	BA10 RA=0,0144C-0,0386	BB5 RA=0,0097C-0,0276	33
	CA4 A=1211,3C–120,0	CB1 A=882,8C-0,22,3	27	CA4 RA=0,0131C-0,0072	CB1 RA=0,0110–0,0089	16
	CA5 A=1207,8C–119,8	CB2 A=887,3C–16,5	27	CA5 RA=0,0132C+0,077	CB2 RA=0,0111C-0,0013	16
	CA6 A=1209,1C-6720	CB3 A=917,4C-81,2	24	CA6 RA=0,0130C+0,052	CB3 RA=0,0110 <i>C</i> -0,0091	15
TMP	AA4 A=6490,2 <i>C</i> -6238	AB1 A=4506,4 <i>C</i> -2500,7	31	AA4 RA=0,0898C+0,08	AB1 RA=0,0803C+0,0001	11
	AA5 A=6407,8C-4926	AB2 A=4535,5 <i>C</i> -1568,3	29	AA5 RA=0,089C+0,0726	AB2 RA=0,0834C-0,0255	6
	AA6 A=6487,7 <i>C</i> -4995,4	AB3 A=4587,5 <i>C</i> –538,0	29	AA6 RA=0,09C+0,0616	AB3 RA=0,0764C-0,0139	15
	BA6 <i>A</i> =6427,1 <i>C</i> -1956,8	BB1 A=4240C-6766,7	34	BA6 RA=0,0913C+0,0699	BB1 RA=0,0783C+0,0358	14
	BA7 <i>A</i> =6561,9 <i>C</i> -1650,6	BB2 A=4470C-8104,8	31	BA7 RA=0,0921C+0,02	BB2 RA=0,0775C+0,1053	16
	BA8 A=6597,6C-4593,1	BB3 A=4632,9C-8542,7	30	BA8 RA=0,0928C+0,0643	BB3 RA=0,0801C-0,0314	14
	BA9 A=6563,3C-3704,2	BB4 A=4549,7C-8054,9	31	BA9 RA=0,0935C+0,0703	BB4 RA=0,0769C-0,0316	18
	BA10 A=6498,1C-3829,2	BB5 A=4497C–9175,5	30	BA10 RA=0,0931C+0,0337	BB5 RA=0,0786C-0,0898	16
	CA4 A=6401C–198	CB1 A=4178C+91	35	CA4 RA=0,0917C-0,0099	CB1 RA=0,0790C+0,128	14
	CA5 A=6380C+2	CB2 A=4203C+163	34	CA5 RA=0,0919C-0,129	CB2 RA=0,0790C+0,208	14
	CA6 A=6411C+71	CB3 A=4256C-212	34	CA6 RA=0,09116C-0,081	CB3 RA=0,0783C+0,066	14

ική ης, %

Πίνακας 12.3 Στατιστική αξιολόγηση της μεταβολής της κλίσης των καμπυλών αναφοράς των δειγμάτων εμβολιασμένων με τους αναλύτες πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό, με και χωρίς *IS*, στα τρία εύρη συγκεντρώσεων

Αναλύτης	Εύρος συγκεντρώσεων	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχετίσεως (<i>R</i>)	Τυπικό σφάλμα καμπύλης (S _{y/x})
SDZ	Χωρίς IS			
	A	$A = [0.0620(\pm 0.0048)] \times 10^{4} C - [(0.037 \pm 0.085) \times 10^{4}]$	0.993	9.0×10^{2}
	В	$A = [0,0657(\pm 0,0017)] \times 10^{4} C - [(0,14\pm 0,14) \times 10^{4}]$	0,9990	$2,0 \times 10^{2}$
	С	$A = [0,0718(\pm 0,0030)] \times 10^4 C - [(0,0020\pm 0,014) \times 10^4]$	0,997	2,7×10 ²
	Mε IS			
	А	RA=[82,6(±4,9)]×10 ⁻⁴ C-[(2,8±8,7)×10 ⁻³]	0,996	0,0092
	В	$RA = [126, 4(\pm 3, 4)] \times 10^{-4} C - [(5, 6 \pm 2, 8) \times 10^{-2}]$	0,9985	0,041
	С	RA=[11,38(±0,68)]×10 ⁻³ C-[(2,5±3,1)×10 ⁻²]	0,993	6,1
AcSDZ	Χωρίς IS			
	А	$A = [6,29(\pm 0,42)] \times 10^2 C - [(0,037 \pm 0,075) \times 10^4]$	0,995	7.9×10^{2}
	В	$A = [6,98(\pm0,27)] \times 10^2 C \cdot [(0,30\pm0,22) \times 10^4]$	0,997	$3,2 \times 10^{3}$
	С	$A = [8, 13(\pm 0, 15)] \times 10^2 C - [(0, 59 \pm 0, 67) \times 10^4]$	0,9994	1,3×10 ³
	Mε IS			
	А	RA=[99,5(±8,1)]×10 ⁻⁴ C-[(0,6±1,4)×10 ⁻²]	0,993	0,015
	В	$RA = [92, 2(\pm 4, 1)] \times 10^{-4} C - [(2, 2 \pm 3, 4) \times 10^{-2}]$	0,996	0,050
	С	RA=[9,929(±0,064)]×10 ⁻³ C-[(0,06±0,29)×10 ⁻¹]	0,99992	0,057
TMP	Χωρίς IS			
	А	A=[3,88(±0,28)]×10 ³ C-[(0,26±0,49)×10 ⁴]	0,995	$5,3 \times 10^{3}$
	В	$A = [3,75(\pm 0,18)] \times 10^{3} C - [(1,18\pm 0,73) \times 10^{4}]$	0,996	1,1×10 ⁴
	С	$A = [3,7(\pm 1,3)] \times 10^{3} C - [(4,1\pm 6,1) \times 10^{4}]$	0,997	12×10 ⁴
	Mε IS			
	A	$RA = [72,7(\pm 4,2)] \times 10^{-3} C - [(2,2\pm 7,2) \times 10^{-2}]$	0,997	0,079
	В	RA=[75,2(±2,4)]×10 ⁻³ C-[(1,9±1,0)×10 ⁻¹]	0,998	0,15
	С	$RA = [71,9(\pm 3,8)] \times 10^{-3} C - [(0,13\pm 0,17) \times 10^{2}]$	0,994	34

Πίνακας 12.4 Εξισώσεις παλινδρόμησης, συντελεστές συσχετίσεως και τυπικό σφάλμα των καμπυλών αναφοράς που ελήφθησαν με δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό

Αναλύτης	Εξίσωση παλινδρόμησης	<i>LOD</i> (µgkg ⁻¹) ^a	LOD (µgkg⁻¹) ^ь	LOQ (µgkg ⁻¹) ^a	LOQ (µgkg ⁻¹) ^b
SDZ	A=[0,0620(±0,0048)]×10 ⁴ C- [(0.037±0.085)×10 ⁴	2,0	5	6,0	15
AcSDZ	$A = [6,29(\pm 0,42)] \times 10^{2} C - [(0,037 \pm 0,075) \times 10^{4}]$	1,9	5	5,9	15
ТМР	A=[3,88(±0,28)]×10 ³ C- [(0,26±0,49)×10 ⁴	2,2	4	6,7	12,5

Πίνακας 12.5 Όρια ανίχνευσης και ποσοσικού προσδιορισμού των αναλυτών σε δείγμα ήπατος

^a Υπολογισμένο θεωρητικά βάσει της εξίσωσης παλινδρόμησης ^b Καθορισμένο από το χρωματογράφημα με βάση τους λόγους *S/N* ≥ 3 (*LOD*) και *S/N* ≥ 10 (*LOQ*)

12.8 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης των καμπυλών αναφοράς σε δείγματα εμβολιασμένα πριν από την εκχύλιση και τον καθαρισμό

Στον πίνακα 12.6 δίνονται οι εξισώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των αναλυτών.

Αναλύτης/DPS	Εξίσωση παλινδρόμησης	Συντελεστής συσχετίσεως (<i>R</i>)	Τυπικό σφάλμα καμπύλης
SDZ/DPS	$RA = [111,7(\pm 4,0)] \times 10^{-4} C - (1,0\pm 1,3)$	0,995	4,1
AcSDZ/DPS	$RA = [99,32(\pm 0,34)] \times 10^{-4} C + (0,03\pm 0,11)$ (v = 0,0099 x + 0,0346)	0,9995	0,34
TMP/DPS	$RA = [70,9(\pm 2,2)] \times 10^{-3} C - (5,2\pm7,2)$ (y = 0,0709 x - 5,1544)	0,995	22

Πίνακας 12.6 Συνδυασμένες εξισώσεις παλινδρόμησης (στις παρενθέσεις δίνονται οι εξισώσεις όπως προκύπτουν από το EXCEL)

12.9 Έλεγχος της ακρίβειας της μεθόδου

Στους πίνακες 12.7 και 12.8 δίνονται τα αποτελέσματα από τον έλεγχο που έγινε εντός της ίδιας εργαστηριακής ημέρας και σε πέντε διαφορετικές εργαστηριακές ημέρες, αντίστοιχα.

Αναλύτης	Συγκέντρωση που ποοστέθρκε	Συγκέντρωση που βρέθηκε Πιστότητα Αληθότητο (μα κα- ¹)		τα	
	(µg kg- ¹)	(μ9 κ9⁻) Μέση τιμή ± SD (<i>n</i> = 6)	07, 70	RE, % ± SD ^a	<i>E</i> , % ^b
SDZ	15 (LOQ) 20 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 50 (0,5×MRL) 100 (1×MRL) 150 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$14,61 \pm 0,90$ $19,37 \pm 0,70$ $23,6 \pm 1,3$ $48,0 \pm 0,9$ $97,2 \pm 2,1$ $147,7 \pm 2,0$ 488 ± 12 4987 ± 94 $(101,4 \pm 3,8) \times 10^{2}$	6,1 3,6 5,7 1,8 2,1 1,4 2,4 1,9 3,8	$97,4 \pm 6,0$ $96,8 \pm 3,5$ $94,3 \pm 5,4$ $96,1 \pm 1,8$ $97,2 \pm 2,1$ $98,5 \pm 1,4$ $97,6 \pm 2,4$ $99,7 \pm 1,9$ $101,4 \pm 3,8$	-2,6 -3,2 -5,7 -3,9 -2,8 -1,5 -2,4 -0,3 1,4
ТМР	12,5 (LOQ) 20 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 25 (0,5×MRL) 50 (1×MRL) 75 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$11,42 \pm 0,39$ $18,6 \pm 1,1$ $24,64 \pm 0,87$ $24,1 \pm 0,4$ $51,0 \pm 1,7$ $75,2 \pm 1,0$ 486 ± 12 $(48,2 \pm 1,2) \times 10^{2}$ $(101,2 \pm 3,6) \times 10^{2}$	3,4 5,7 3,5 1,5 3,4 1,4 2,3 2,5 3,5	$90,5 \pm 4,5$ $94,1 \pm 4,0$ $96,3 \pm 2,7$ $95,2 \pm 1,1$ $101,8 \pm 5,0$ $101,2 \pm 1,0$ $97,1 \pm 2,9$ $95,1 \pm 3,0$ $104,0 \pm 0,8$	-8,6 -7,0 -1,4 -3,8 2,0 0,3 -2,7 -3,6 1,2
AcSDZ	15 (LOQ) 20 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 50 100 150 500 5000 10000	$14,24 \pm 0,47$ $18,38 \pm 0,85$ $24,31 \pm 0,88$ $50,0 \pm 2,5$ $103,0 \pm 4,2$ $149,8 \pm 2,8$ 494 ± 25 5035 ± 64 $(99,1 \pm 4,1) \times 10^{2}$	3,3 4,6 3,6 4,9 4,1 1,8 4,9 1,3 4,1	$94,9 \pm 3,1 \\91,9 \pm 4,2 \\97,2 \pm 3,5 \\100,1 \pm 4,9 \\103,0 \pm 4,2 \\99,9 \pm 1,8 \\98,8 \pm 4,9 \\100,7 \pm 1,3 \\99,1 \pm 4,1$	-5,1 -8,1 -2,8 0,1 3,0 -0,1 -1,2 0,7 -0,9

Πίνακας 12.7 Ορθότητα και πιστότητα εντός της ημέρας (intra-day inter-batch)

^{а, ь} Όπως στον πίνακα 10.18.

Αναλύτης	Συγκέντρωση Συγκέντρωση ύτης που πουβρέθηκε Πιστότητα ποοστέθηκε (μα kα ¹)		Πιστότητα	Αληθότη	Γα
	(µg kg- ¹)	(μg κg²) Μέση τιμή ± SD (n = 15)	CV, 70	RE, % ± SD ^a	<i>E</i> ,, % ^b
SDZ	15 (LOQ) 20 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 50 (0,5×MRL) 100 (1×MRL) 150 (1 5×MRI)	$14,92 \pm 0,95 \\19,7 \pm 0,67 \\23,1 \pm 2,1 \\49,2 \pm 1,7 \\99,1 \pm 2,1 \\150 \ 1 \pm 2,9$	6,3 3,5 8,9 3,4 2,1 1,9	$99,5 \pm 6,3 \\95,3 \pm 3,4 \\92,4 \pm 8,3 \\98,4 \pm 3,3 \\99,1 \pm 2,1 \\100,1 \pm 2,0$	-0,5 -4,7 -7,6 -1,6 -0,9 0 1
	500 5000 10000	$476,3 \pm 8,9$ 5064 ± 96 $(101,1 \pm 1,6) \times 10^{2}$	1,9 1,9 1,6	95,3 ± 1,8 101,3 ± 1,9 101,1 ± 1,7	-4,7 1,3 1,1
TMP	12,5 (LOQ) 20 (ULOQ 1) 25 (ULOQ 2) 25 (0,5×MRL) 50 (1×MRL) 75 (1,5×MRL) 500 5000 10000	$11,50 \pm 0,38$ $19,0 \pm 1,1$ $24,4 \pm 1,1$ $24,5 \pm 0,5$ $51,0 \pm 1,0$ $74,90 \pm 0,70$ 467 ± 14 $(52,6 \pm 3,0) \times 10^{2}$ $(99,0 \pm 2,4) \times 10^{2}$	3,3 6,0 4,4 2,2 1,9 0,91 3,1 5,6 2,4	$92,0 \pm 2,6 \\94,6 \pm 5,7 \\97,7 \pm 4,3 \\98,2 \pm 2,2 \\103,1 \pm 1,6 \\99,9 \pm 0,9 \\93,4 \pm 2,9 \\105,2 \pm 0,9 \\99,1 \pm 2,4$	-8,0 -5,4 -2,3 -1,8 3,1 -0,1 -6,6 5,2 -0,9
AcSDZ	15 (<i>LOQ</i>) 20 (<i>ULOQ</i> 1) 25 (<i>ULOQ</i> 2) 50 100 150 500 5000 10000	$14,03 \pm 0,69 \\18,56 \pm 0,86 \\23,80 \pm 0,70 \\49,9 \pm 2,2 \\99,9 \pm 2,6 \\150,7 \pm 2,2 \\484,9 \pm 8,3 \\5064 \pm 50 \\(99,5 \pm 3,6) \times 10^2$	4,9 4,6 3,1 4,4 2,6 1,5 1,7 0,98 3,6	$\begin{array}{c} 93,6 \pm 3,7 \\ 92,8 \pm 4,3 \\ 95,1 \pm 2,3 \\ 99,7 \pm 4,4 \\ 99,9 \pm 2,6 \\ 100,5 \pm 1,5 \\ 97,0 \pm 1,0 \\ 101,3 \pm 1,0 \\ 99,5 \pm 3,6 \end{array}$	-6,4 -7,2 -4,9 -0,3 -0,1 0,5 -3,0 1,3 -0,5

Πίνακας 12.8 Ορθότητα και πιστότητα μεταξύ των ημερών (inter-day inter-batch)

^{a, b} Όπως στον πίνακα 10.18.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ, ΤΡΙΜΕΘΟΠΡΙΜΗΣ ΚΑΙ ΑΚΕΤΥΛΟ-ΣΟΥΛΦΑΔΙΑΖΙΝΗΣ ΣΕ ΙΣΤΟΥΣ ΙΧΘΥΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΒΙΟΛΟΓΙΚΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟ. ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΧΡΟΝΩΝ ΑΠΟΔΡΟΜΗΣ

13.1 Βιολογικοί πειραματισμοί

13.1.1 Εισαγωγή

Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν για τον προσδιορισμό των SDZ, TMP και AcSDZ σε σάρκα με δέρμα, ήπαρ και ορό, εφαρμόστηκαν για τον προσδιορισμό καταλοίπων των ουσιών αυτών σε δείγματα βιολογικών πειραματισμών, οι οποίοι πραγματοποιήθηκαν με σκοπό:

- (α) τη μελέτη της φαρμακοκινητικής της SDZ, της TMP και της AcSDZ στην τσιπούρα, αλλά και της κατανομής των ουσιών αυτών στους ιστούς (σάρκα με δέρμα, ήπαρ, ορό),
- (β) τον προσδιορισμό των χρόνων αποδρομής των ουσιών από την τσιπούρα,
- (γ) την ταυτοποίηση πιθανών μεταβολιτών της SDZ και της TMP.

Για τους βιολογικούς πειραματισμούς χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές ιχθυοτροφές και μελετήθηκαν τυχόν διαφοροποιήσεις στη φαρμακοκινητική, στους χρόνους αποδρομής και στο μεταβολισμό των υπό εξέταση ουσιών στις δύο περιπτώσεις. Οι πειραματισμοί αυτοί έγιναν στα πλαίσια του ευρωπαϊκού προγράμματος "AQUAMAX" με τίτλο "Sustainable aquafeeds to maximise the health benefits of farmed fish for consumers" (6th Framework-Programme EU).

Ο σχεδιασμός και η υλοποίηση της μελέτης καταλοίπων των SDZ, TMP και AcSDZ στην τσιπούρα, έγινε σύμφωνα με όσα προβλέπονται στις κατευθυντήριες οδηγίες της Ε.Ε. (*EMEA/CVMP*/036/95)³¹⁷ και του *FDA*. Ακολουθώντας τις οδηγίες της *EMEA* και του *FDA* ο αριθμός των ιχθύων ανά σημείο δειγματοληψίας ορίσθηκε σε δέκα (10) ιχθύες,

ωστόσο οι βιολογικοί πειραματισμοί έγιναν σε μία θερμοκρασία (24 - 26 °C) και όχι σε δύο (π.χ. 18 και 25 °C), όπως ορίζουν οι παραπάνω οργανισμοί.

13.1.2 Εξοπλισμός

Οι εγκαταστάσεις και ο εξοπλισμός της πειραματικής εκτροφής που χρησιμοποιήθηκαν, περιελάμβαναν:

- ✓ Επτά (7) εξωτερικές κυλινδροκωνικές δεξαμενές από συμπαγή υαλοβάμβακα χωρητικότητας περίπου 850 L η κάθε μία,
- ✓ Σύστημα άντλησης του θαλασσινού νερού με παροχή 2,5 L min⁻¹ από βάθος 3 5 m από την παράπλευρη θαλάσσια περιοχή της ακτής του Αγίου Κοσμά Αττικής,
- Σύστημα φίλτρων άμμου για τη διήθηση του θαλασσινού ύδατος,
- ✓ Σύστημα συνεχούς οξυγόνου (αερισμός) στο νερό κάθε δεξαμενής.

Οι μετρήσεις των παραμέτρων του θαλασσινού ύδατος γίνονταν καθημερινά χρησιμοποιώντας ψηφιακή συσκευή μέτρησης του διαλυμένου οξυγόνου, ψηφιακή συσκευή μέτρησης του *p*H και ψηφιακή συσκευή μέτρησης της αλατότητας, της θερμοκρασίας και της αγωγιμότητας του νερού.

Για την παρασκευή της φαρμακούχου ιχθυοτροφής, οι δύο τυποποιημένες ιχθυοτροφές κονιοποιήθηκαν και μετατράπηκαν πάλι σε μορφή σύμπηκτων (*pellets*) μετά την ενσωμάτωση του φαρμακούχου προμίγματος SDZ/TMP. Χρησιμοποιήθηκαν οι συσκευές:

- ✓ Συσκευή κονιοποίησης των σύμπηκτων των δύο αρχικών τυποποιημένων ιχθυοτροφών,
- ✓ Συσκευή ανάμιξης και ομογενοποίησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής και της μετατροπής της σε σύμπηκτη μορφή,
- ✓ Συσκευή με κυκλοφορία αέρα για την απομάκρυνση της υγρασίας της ιχθυοτροφής.

13.1.3 Αντιβακτηριακός παράγοντας

Για τους βιολογικούς πειραματισμούς χρησιμοποιήθηκε το φαρμακούχο πρόμιγμα TRIMETHOPRIM-SULPHADIAZINE 50 %, με σύνθεση 83,3 g TMP και 416,7 g SDZ ανά kg προϊόντος, το οποίο συνιστάται για τη θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων στους εκτρεφόμενους ιχθύες. Ειδικότερα, συνιστάται για τη θεραπεία και τον έλεγχο της δοθιήνωσης, που προκαλείται από την Aeromonas salmonicida, και της δονακίωσης που οφείλεται στο Vibrio anguillarum και σε άλλα συγγενικά είδη. Έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, με επιτυχία, στη θεραπεία της στηλώδους νόσου και της ερυθροστοματίτιδας (ERD), νοσήματα που προκαλούνται από το Flexibacter Columnaris και την Yersinia Ruckeri.

Για τον έλεγχο του φαρμακούχου προμίγματος, παρασκευάστηκε διάλυμα που περιείχε 100 ng SDZ, 50 ng TMP και 50 ng ανά mL *DS*, του οποίου το χρωματογράφημα δίνεται στο σχήμα ΠVIII_1.

13.1.4 Πειραματόζωα

Χρησιμοποιήθηκαν πεντακόσιες (500) τσιπούρες μέσου σωματικού βάρους (230 ± 45) g, οι οποίες προέρχονταν από γνωστή μονάδα της ευρύτερης περιοχής της Αττικής. Μετά την άφιξή τους, τοποθετήθηκαν στις δεξαμενές και παρέμειναν προς εγκλιματισμό για περίπου δύο μήνες, πριν την έναρξη των πειραματισμών.

13.1.5 Διατροφή των ιχθύων

Χρησιμοποιήθηκαν δύο είδη ιχθυοτροφών, μία συμβατική που βασίζεται σε ιχθυέλαια (*Fish Oil-based diet, FO*) και μία στην οποία το 10 % του ιχθυελαίου είχε αντικατασταθεί από φυτικά έλαια (*Plant Oil-based diet, PO*) (πίνακας 13.1). Η διάμετρος των σύμπηκτων των δύο ιχθυοτροφών ήταν 3,8 - 4,2 mm και το ποσοστό διατροφής ορίσθηκε σε 2,0 % στη βιομάζα για τους 24 °C.

13.1.6 Φαρμακούχος ιχθυοτροφή

Η παρασκευή της φαρμακούχου ιχθυοτροφής έγινε ως εξής: ποσότητα ιχθυοτροφής κονιοποιήθηκε στη συσκευή κονιοποίησης και προστέθηκε τμηματικά το φαρμακούχο πρόμιγμα σε συγκεκριμένη αναλογία. Μεταφέρθηκε στην τελική συσκευή ανάμιξης και

με τη προσθήκη ύδατος σε μικροποσότητες, απέκτησε τέτοια υφή, ώστε να μπορεί να μετατραπεί σε συμπαγή τεμαχίδια.

Συστατικό (%)	Ιχθυοτροφή <i>FO</i>	Ιχθυοτροφή <i>ΡΟ</i>
Ιχθυάλευρο	15	15
Συμπυκνωμένη πρωτεΐνη ψαριού (CPSP 902)	5	5
Γλουτένη καλαμποκιού	40	40
Άλευρο σόγιας	14	14
Κατεργασμένα άλευρα	4	4
Ιχθυέλαιο	15	5
Έλαιο ελαιοκράμβης	0	1,7
Λινέλαιο	0	5,8
Φοινικέλαιο	0	2,5
Binder	1	1
Λεκιθίνη σόγιας	1	1
Μέταλλα	1	1
Βιταμίνες	1	1
Φωσφόρος	2	2
<i>L</i> –λυσίνη	0,55	0,55

Πίνακας 13.1 Σύσταση των πειραματικών ιχθυοτροφών

Ακολουθεί αφυδάτωση για δώδεκα περίπου ώρες στη συσκευή αφυδάτωσης με ρεύμα αέρα θερμοκρασίας 30 °C. Η αφυδατωμένη ιχθυοτροφή τεμαχίστηκε σε μικρά κομμάτια, συσκευάστηκε σε σκοτεινόχρωμο περιέκτη και συντηρήθηκε σε ψυχρό, στεγνό και σκοτεινό χώρο μέχρι τη χρησιμοποίησή τους στους πειραματισμούς.

Πριν από την έναρξη του βιολογικού πειραματισμού, τα πειραματόζωα και οι δύο ιχθυοτροφές ελέγχθηκαν προκειμένου να διαπιστωθεί η απουσία καταλοίπων των υπό εξέταση αναλυτών και του *IS*.

Μετά την παρασκευή των δύο φαρμακούχων ιχθυοτροφών (FO και PO), έξι δείγματα από κάθε μία, αναλύθηκαν προκειμένου να ελεγχθεί η ποσότητα των SDZ και TMP η οποία ενσωματώθηκε σε αυτές. Από τις αναλύσεις διαπιστώθηκε ότι το 85 - 92 % της ποσότητας των δύο ουσιών που προστέθηκε ενσωματώθηκε σε αυτές.

Σε όλη τη διάρκεια του βιολογικού πειραματισμού οι ιχθύες διατρέφονται μία φορά την ημέρα. Καμία επιπλέον ποσότητα τροφής δε προσφέρεται στα πειραματόζωα κατά την

περίοδο της χορήγησης των φαρμακούχων ιχθυοτροφών.

13.1.7 Συνθήκες πειραματισμών

Σε όλη τη διάρκεια των πειραματισμών οι τσιπούρες διατρέφονταν με τις δύο ιχθυοτροφές, μία φορά την ημέρα, με το χέρι, στη 13:00 το μεσημέρι και σε ποσοστό 2 % στη βιομάζα. Η χορηγούμενη δόση που επιλέχθηκε ήταν 25 mg SDZ και 5 mg TMP ανά kg σωματικού βάρους, την ημέρα, για πέντε συνεχόμενες ημέρες.

Για το βιολογικό πειραματισμό χρησιμοποιήθηκαν 3 δεξαμενές, με 35 τσιπούρες μέσου σωματικού βάρους (230 ± 45) g στην κάθε δεξαμενή, οι οποίες ελάμβαναν τη συνιστώμενη δόση SDZ/TMP για πέντε ημέρες. Μετά το πέρας των ημερών αυτών, διατρέφονταν με μη φαρμακούχες ιχθυοτροφές *FO* και *PO*. Ο πειραματισμός ολοκληρώθηκε σε χρονικό διάστημα δέκα ημερών, κατά τη διάρκεια των οποίων οι παράμετροι του θαλασσινού ύδατος είχαν τις εξής μέσες τιμές:

- θερμοκρασία 24,5 ± 1,2 °C,
- *p*H 8,0 ± 0,2,
- διαλυμένο οξυγόνο 7,3 ± 0,2 mg L⁻¹,
- αλατότητα 38,9 ± 0,2 ‰.

13.1.8 Δειγματοληψία

Η δειγματοληψία πραγματοποιόταν με αναισθησία των ιχθύων χρησιμοποιώντας 2φαινοξυ-αιθανόλη (2 mL L⁻¹). Αλιεύονταν δέκα τσιπούρες (4, 3 και 3 από κάθε δεξαμενή εναλλάξ) στις 10:00 το πρωί, κατά τις ημέρες 1, 3 και 5 (τελευταία ημέρα χορήγησης φαρμακούχων ιχθυοτροφών) και 6, 8 και 9 (ημέρες δειγματοληψίας μετά τη χορήγηση). Αρχικά, καταγραφόταν το σωματικό βάρος του κάθε ιχθύος και στη συνέχεια λαμβανόταν δείγμα αίματος (εικόνες 13.1 και 13.2). Τέλος, λαμβάνονταν δείγματα σάρκας με δέρμα και ήπατος (εικόνες 13.3 και 13.4). Το βάρος του ήπατος καταγραφόταν επίσης. Ως ημέρα 1 ορίστηκε η ημέρα 24 ώρες μετά τη πρώτη ημέρα χορήγησης των φαρμακούχων ιχθυοτροφών. Τα δείγματα αίματος τοποθετούνταν στο ψυγείο (+ 4 °C) για 24 ώρες και μετά από φυγοκέντρηση στις 8000 rpm για 10 min, λαμβάνονταν τα δείγματα ορού. Όλα τα δείγματα τοποθετούνταν σε πλαστικό περιέκτη με κλείστρο ασφαλείας με λεπτομερή καταγραφή της προέλευσης των (εικόνα 13.5) και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία - 80 °C μέχρι την ημέρα ανάλυσης των.

13.2 Υπολογισμός των χρόνων αποδρομής

13.2.1 Εισαγωγή

Η μελέτη των επιπέδων μιας αντιμικροβιακής ουσίας στους ιστούς των ιχθύων έχει εξαιρετική σημασία για την κατανόηση των μηχανισμών που επιδρούν, αλλά και τη χάραξη αποτελεσματικών θεραπευτικών σχημάτων στη κλινική πράξη. Σημαντικό, επίσης, είναι το ενδιαφέρον για την τύχη του αντιβιοτικού στους ιστούς των ιχθύων, από τη πλευρά της διασφάλισης της υγείας και της προστασίας του καταναλωτή.

Κύριος στόχος ήταν η μελέτη των επιπέδων των δραστικών ουσιών στους διάφορους ιστούς και η μελέτη της δυναμικής της αποδρομής των ουσιών αυτών και του κατάλληλου χρόνου αναμονής για τη διάθεση του προϊόντος στην κατανάλωση.

Στο τμήμα αυτό της διατριβής, παρατίθενται τα αποτελέσματα του βιολογικού πειραματισμού με τσιπούρες εντατικής εκτροφής, στις οποίες χορηγήθηκαν οι φαρμακούχες ιχθυοτροφές *FO* και *PO*, με ενσωματωμένες τις δραστικές ουσίες SDZ και TMP. Αρχικά, δίνονται οι τιμές συγκέντρωσης των αναλυτών στους ιστούς καθώς και τα αντίστοιχα διαγράμματα συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο (ημέρες δειγματοληψίας). Στη συνέχεια, παρατίθεται η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων με τελικό σκοπό τον υπολογισμό των χρόνων αποδρομής (*Wt*) των SDZ και TMP (στην περίπτωση των δειγμάτων σάρκας με δέρμα). Για τη στατιστική επεξεργασία χρησιμοποιήθηκε το πρόγραμμα *WT*1.4.

Για τον προσδιορισμό του *Wt* πρέπει να λαμβάνουμε υπόψη ότι ο *Wt* επηρεάζεται από:

- τη θερμοκρασία του ύδατος,
- το είδος του ιχθύος και για τον λόγο αυτό ο Wt ισχύει μόνο για ένα είδος ιχθύος και όχι για άλλο,
- από άλλους παράγοντες, όπως η ηλικία του ιχθύος, το φύλλο, από τις συνθήκες εκτροφής και διατροφής.



Εικόνα 13.1. Δειγματοληψία του αίματος από τσιπούρα



Εικόνα 13.2. Τα δείγματα αίματος τοποθετούνται σε ειδικά σωληνάρια και μετά από 24 ώρες στο ψυγείο, φυγοκεντρούνται οπότε λαμβάνονται τα δείγματα ορού του αίματος





Εικόνες 13.3 και 13.4 Λήψη δείγματος ήπατος από τσιπούρα



Εικόνα 13.5 Καταγραφή της προέλευσης των δειγμάτων που ελήφθησαν

Σε μία μελέτη καταλοίπων, κατά την ανάλυση της γραμμικής παλινδρόμησης με τη μέθοδο των «ελαχίστων τετραγώνων», όλες οι μέσες τιμές μιας ομάδας παρατηρήσεων πρέπει ν'ακολουθούν ευθεία γραμμή. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο οι τιμές οι οποίες ήταν πάνω από το *LOD* της μεθόδου, όπως αυτό προβλέπεται από τις κατευθυντήριες οδηγίες για την εναρμόνιση των χρόνων απομάκρυνσης.³¹⁷ Ως ημέρα 1 ορίστηκε η ημέρα 24 ώρες μετά τη χορήγηση της τελευταίας δόσης (ημέρα δειγματοληψίας 6).

Υπολογίσθηκε η μέση τιμή (mean value) και το τυπικό σφάλμα του μέσου (standard error of the mean, SEM). Επίσης, για τον έλεγχο της ομοιογένειας της διασποράς, έγινε λογαριθμική μετατροπή της μέσης τιμής των δεδομένων, τα οποία αναλύθηκαν με την ANOVA. Έγιναν ακόμα οι δοκιμές Bartlett's test και Cohran's test (homogeneity of variances), από τις οποίες η δεύτερη θεωρείται ότι είναι πάντα η καταλληλότερη δοκιμή σε μελέτες καταλοίπων.³¹⁸ Για τον έλεγχο της κανονικότητας των διασπορών χρησιμοποιήθηκε η δοκιμή Kolmogorov-Smirnov (normality of calculated residuals).

13.2.2 Βιολογικός πειραματισμός με την ιχθυοτροφή FO

Στον πίνακα 13.2 δίνονται οι τιμές της συγκέντρωσης της SDZ στα δείγματα των τριών ιστών για τον βιολογικό πειραματισμό με την ιχθυοτροφή *FO*.

Στους πίνακες 13.3 και 13.4 δίνονται οι τιμές για την TMP και την AcSDZ, αντίστοιχα. Ακολουθούν τα διαγράμματα συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο (ημέρες δειγματοληψίας) (σχήματα 13.1 - 13.3).

Τα αποτελέσματα του πειράματος στους 24 °C με χορήγηση της ιχθυοτροφής *FO*, έδειξαν τα εξής για την απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από τους ιστούς της τσιπούρας:

<u>Σάρκα με δέρμα</u>: Η συγκέντρωση της SDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της 24 ώρες μετά την έναρξη χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (ημέρα 1) και ήταν 1794 μg kg⁻¹, ενώ μετά τη διακοπή της χορήγησής της, η συγκέντρωσή της μειώθηκε τάχιστα φτάνοντας την τιμή 27,7 μg kg⁻¹ την ημέρα 8 και έπεσε κάτω από το *LOQ* (και το *LOD*) την 9^η ημέρα. Η συγκέντρωση της TMP απέκτησε, τη μέγιστη τιμή της την 1^η ημέρα (697 μg kg⁻¹) και έπεσε σε μη ανιχνεύσιμη τιμή 72 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της

Πίνακας 13.2 Συγκεντρώσεις της SDZ (σε μg kg⁻¹ ή ng mL⁻¹) στους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (δίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από δέκα ιχθύες ενώ μέσα σε παρένθεση δίνεται το εύρος των συγκεντρώσεων)

Χρόνος (ημέρες)	Σάρκα με δέρμα	΄Ήπαρ	Ορός
	C, μg kg ⁻¹	C, μg kg ⁻¹	C, ng mL ⁻¹
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± <i>SD</i>
	(εύρος)	(εύρος)	(εύρος)
Χορήγηση φαρμάκου			
0	0	0	0
1	$(1,79 \pm 0,86) \times 10^{3}$	248 ± 140	131 ± 31,3
	$(1,0 - 3,9) \times 10^{3}$	(99 – 438)	63,3 – 171
3	403 ± 483	144 ± 89	460 ± 300
	(62,4 - 1,6×10 ³)	(40 – 295)	117 - 846
5	498 ± 239	99,7 ± 43,9	658 ± 337
	(192 - 839)	(49,4 - 180,0)	$(0,2 - 1,1) \times 10^3$
Απομάκρυνση φαρμάκου			
6	39,0 ± 27,2	45,9 ± 36,0	$28,0 \pm 13,4$
(1 μετά τη τελευταία δόση)	(< <i>LOQ</i> - 94,5)	(< LOQ - 97,5)	(8,0 - 54,9)
8	27,7 ± 10,3	39,2 ± 11,0	10,4 ± 2,9
(3 μετά τη τελευταία δόση)	(< LOQ - 36,9)	(< LOQ - 46,9)	(8,6 - 17,2)
9 (4 μετά τη τελευταία δόση)	< <i>LOQ</i> – 14,6	< LOQ, LOD	< LOQ, LOD

[#] Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ο αριθμός των ιχθύων ήταν δέκα (n = 10), με εξαίρεση στο σημείο μηδέν («λευκό» δείγμα) στο οποίο ο αριθμός των ιχθύων ήταν τρία (n = 3)

φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Τέλος, η συγκέντρωση της AcSDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της την 1^η ημέρα (814 μg kg⁻¹), γεγονός που φανερώνει το γρήγορο μεταβολισμό της SDZ σε AcSDZ, ενώ απομακρύνθηκε τάχιστα αφού δεν ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής (ημέρα 6).

<u>Ήπαρ</u>: Η συγκέντρωση της SDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της 24 ώρες μετά την έναρξη χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (ημέρα 1) και ήταν 248 μg kg⁻¹, ενώ μετά τη διακοπή της χορήγησής της, η συγκέντρωσή της μειώθηκε τάχιστα φτάνοντας την τιμή 39,2 μg kg⁻¹ την ημέρα 8 και έπεσε κάτω από το *LOQ* (και το *LOD*)

Πίνακας 13.3 Συγκεντρώσεις της TMP (σε μg kg⁻¹ ή ng mL⁻¹) στους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (δίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από δέκα ιχθύες ενώ μέσα σε παρένθεση δίνεται το εύρος των συγκεντρώσεων)

Χρόνος (ημέρες)	Σάρκα με δέρμα	΄Ήπαρ	Ορός
	<i>C</i> , μg kg ⁻¹	C, μg kg⁻¹	C, ng mL ⁻¹
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD
	(εύρος)	(εύρος)	(εύρος)
Χορήγηση φαρμάκου			
0	0	0	0
1	697 ± 372	$(1,38 \pm 0,92) \times 10^{3}$	6,8 ± 4,0
	(349 - 1607)	$(0,4 - 2,5) \times 10^{3}$	(2,9 - 16,1)
3	224 ± 164	301 ± 184	7,5 ± 3,1
	(69,7 - 621)	(105 - 587)	(4,0 - 13,1)
5	297 ± 130	111 ± 65,0	10,2 ± 3,9
	(164 - 555)	(19,5 - 201)	(4,2 - 14,7)
Απομάκρυνση φαρμάκου			
6	121 ± 79,6	45,8 ± 10,2	2,0 ± 1,1
(1 μετά τη τελευταία δόση)	(21,6 - 284)	(32,8 - 59,0)	(< LOQ - 2,7)
8	66,5 ± 30,4	34,3 ± 21,9	1,9 ± 1,1
(3 μετά τη τελευταία δόση)	(< LOQ - 93,3)	(< LOQ - 80,8)	(< LOQ - 2,6)
9 (4 μετά τη τελευταία δόση)	< LOQ - 12,4	< LOQ	< LOQ

[#] Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ο αριθμός των ιχθύων ήταν δέκα (*n* = 10), με εξαίρεση στο σημείο μηδέν («λευκό» δείγμα) στο οποίο ο αριθμός των ιχθύων ήταν τρία (*n* = 3)

την 9^η ημέρα. Η συγκέντρωση της TMP απέκτησε, επίσης, τη μέγιστη τιμή της την 1^η ημέρα (1386 μg kg⁻¹) και έπεσε σε μη ανιχνεύσιμη τιμή την 9^η ημέρα. Τέλος, η συγκέντρωση της AcSDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της την 1^η ημέρα (118 μg kg⁻¹), ενώ μειώθηκε τάχιστα και δεν ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής (ημέρα 6).

<u>Ορός</u>: Η συγκέντρωση της SDZ στον ορό αυξήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής από 131 ng mL⁻¹ (ημέρα 1) στη μέγιστη τιμή της 658 ng mL⁻¹ ορού (ημέρα 5). Μετά τη διακοπή της χορήγησής της, η συγκέντρωσή
Πίνακας	13.4	Συγκεντρώσεις	της AcSDZ	(σε μ	<i>ı</i> g kg⁻¹ ή	ng mL ⁻¹	¹) στους	ιστούς τ	σιπούρας με	ετά αι	τό τη
χορήγηση	ι της	φαρμακούχου	ιχθυοτροφής	ς FO	(δίνεται	η μέση	τιμή κα	ι η τυπικ	ιή απόκλιση	από	δέκα
ιχθύες ενα	ώ μές	σα σε παρένθεσ	η δίνεται το ε	εύρος	των συν	γκεντρώα	σεων)				

Χρόνος (ημέρες)	Σάρκα με δέρμα C, μg kg ⁻¹ Μέση τιμή ± SD (εύρος)	Ήπαρ C, μg kg ⁻¹ Μέση τιμή ± SD (εύρος)	Ορός C, ng mL ⁻¹ Μέση τιμή ± <i>SD</i> (εύρος)
Χορήγηση φαρμάκου			
0	0	0	0
1	814 ± 303 (0,4 - 1,4)×10 ³	118 ± 55,4 (48,4 - 201)	312 ± 144 (179 - 600)
3	221 ± 178 (55,8 - 635)	85,2 ± 35,0 (28,7 - 146)	386 ± 161 (160 - 686)
5	364 ± 209 (214 - 869)	54,8 ± 31,2 (32,8 - 122)	483 ± 188 (296 - 939)
Απομάκρυνση φαρμάκου			
6 (1 μετά τη τελευταία δόση)	< LOQ	< LOQ	7,9 ± 0,6 (< LOQ - 8,4)
8 (3 μετά τη τελευταία δόση)	< LOQ	< LOQ	< LOQ
9 (4 μετά τη τελευταία δόση)	< LOQ	< LOQ	< LOQ

[#] Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ο αριθμός των ιχθύων ήταν δέκα (*n* = 10), με εξαίρεση στο σημείο μηδέν («λευκό» δείγμα) στο οποίο ο αριθμός των ιχθύων ήταν τρία (*n* = 3)

της μειώθηκε τάχιστα φτάνοντας την τιμή 10,4 ng mL⁻¹ την 8ⁿ ημέρα. Η συγκέντρωση της TMP ήταν 6,8 ng mL⁻¹ την 1ⁿ ημέρα και 10,2 ng mL⁻¹ (μέγιστη τιμή) την 5ⁿ ημέρα. Μειώθηκε πολύ γρήγορα μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Τέλος, η συγκέντρωση της AcSDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή την 5ⁿ ημέρα (483 ng mL⁻¹), γεγονός που φανερώνει τον μεταβολισμό της SDZ σε AcSDZ, ενώ απομακρύνθηκε τάχιστα αφού έπεσε στα 7,9 ng mL⁻¹ 24 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής (ημέρα 6).



Σχήμα 13.1 Απομάκρυνση της SDZ από τους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.2 Απομάκρυνση της TMP από τους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)

Στη συνέχεια δίνονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης-χρόνου για τις τρεις ουσίες ανά ιστό. Στα διαγράμματα αυτά (σχήματα 13.4 - 13.6) φαίνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία η συγκέντρωση των δύο δραστικών ουσιών (SDZ και TMP) λαμβάνει την μέγιστη τιμή, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη διαδικασία εύρεσης του βέλτιστου

θεραπευτικού δοσολογικού σχήματος.

Στους πίνακες ΠVΙΙΙ_1 και ΠVΙΙΙ_2 δίνονται τα στατιστικά αποτελέσματα της καμπύλης



Σχήμα 13.3 Απομάκρυνση της AcSDZ από τους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)

απομάκρυνσης των SDZ και TMP από τη σάρκα με δέρμα της τσιπούρας σύμφωνα με όσα απαιτούνται από την *EMEA*.

Στα σχήματα 13.7 και 13.8 δίνεται η ημιλογαριθμική ανάλυση των συγκεντρώσεων των SDZ και TMP στη σάρκα με δέρμα της τσιπούρας από το βιολογικό πειραματισμό στους 24 °C με χορήγηση της ιχθυοτροφής *FO*. Πιο συγκεκριμένα, απεικονίζονται, η γραμμή παλινδρόμησης της απομάκρυνσης των ουσιών αυτών από τη σάρκα με δέρμα και το άνω όριο εμπιστοσύνης 95 % της μέσης τιμής των μετρήσεων ανά δειγματοληψία, αντίστοιχα, μετά τη διακοπή της χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* μέχρι και την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας κατά την οποία ανιχνεύτηκαν οι ουσίες (8^η ημέρα). Παρατηρείται, επίσης, η κατανομή των μέσων τιμών όλων των μετρήσεων των SDZ και TMP, η γραμμή η οποία καθορίζει το *MRL* των 100 και 50 μg kg⁻¹ και οι γραμμές οι οποίες οριοθετούν τον υπολογισμένο χρόνο απομάκρυνσης των SDZ και TMP από τη σάρκα με δέρμα της εκτρεφόμενης τσιπούρας.



Σχήμα 13.4 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από τη σάρκα με δέρμα τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.5 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από το ήπαρ τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής FO (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.6 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από τον ορό αίματος τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *FO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.7 Ημιλογαριθμική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της SDZ σε σχέση με τον χρόνο. Οι κόκκινοι κύκλοι ορίζουν τις μέσες τιμές των μετρήσεων ανά δειγματοληψία [0000], οι δύο μαύρες κυμματιστές γραμμές ορίζουν (από κάτω προς τα πάνω) τη γραμμή παλινδρόμησης της απομάκρυνσης της SDZ από τη σάρκα με δέρμα και το όριο εμπιστοσύνης στο 95 % [~~~~]. Η οριζόντια διακεκομμένη μαύρη γραμμή [----] ορίζει το νομοθετημένο *MRL* (100 μg kg⁻¹) και η κόκκινη, κάθετη και διακεκομμένη γραμμή [-----]



Σχήμα 13.8 Ημιλογαριθμική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της TMP σε σχέση με τον χρόνο. Οι κόκκινοι κύκλοι ορίζουν τις μέσες τιμές των μετρήσεων ανά δειγματοληψία [0000], οι δύο μαύρες κυμματιστές γραμμές ορίζουν (από κάτω προς τα πάνω) τη γραμμή παλινδρόμησης της απομάκρυνσης της TMP από τη σάρκα με δέρμα και το όριο εμπιστοσύνης στο 95 % [~~~~]. Η οριζόντια διακεκομμένη μαύρη γραμμή [----] ορίζει το νομοθετημένο MRL (50 μg kg⁻¹) και οι δύο κόκκινες, κάθετες, παράλληλες και διακεκομμένες γραμμές [-----] οριοθετούν το εύρος του υπολογισμένου χρόνου

Σύμφωνα με το πρόγραμμα *WT*1.4, για τους 24 °C με χορήγηση της ιχθυοτροφής *FO*, ο χρόνος αποδρομής του φαρμακευτικού προμίγματος TRIMETHOPRIM-SULPHADIAZINE 50 % βρέθηκε:

Wt (TMP-SDZ,*FO*) = 5 ημέρες

13.2.3 Βιολογικός πειραματισμός με την ιχθυοτροφή ΡΟ

Στον πίνακα 13.5 δίνονται οι τιμές της συγκέντρωσης της SDZ στα δείγματα της σάρκας με δέρμα, του ήπατος και του ορού του αίματος για το βιολογικό πειραματισμό με την ιχθυοτροφή *PO*. Στους πίνακες 13.6 και 13.7 δίνονται οι τιμές για την TMP και την AcSDZ, αντίστοιχα. Ακολουθούν τα διαγράμματα συγκέντρωσης σε συνάρτηση με τον χρόνο (ημέρες δειγματοληψίας) (σχήματα 13.9 - 13.11).

Τα αποτελέσματα του πειράματος στους 24 °C με χορήγηση της ιχθυοτροφής *PO*, έδειξαν τα εξής για την απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από τους ιστούς της τσιπούρας:

<u>Σάρκα με δέρμα</u>: Η συγκέντρωση της SDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της 24 ώρες μετά την έναρξη χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (ημέρα 1) και ήταν 954 μg kg⁻¹, ενώ μετά τη διακοπή της χορήγησής της, μειώθηκε τάχιστα φτάνοντας την τιμή 19,8 μg kg⁻¹ την ημέρα 8 και έπεσε κάτω από το *LOQ* (και το *LOD*) την 9^η ημέρα. Η συγκέντρωση της TMP απέκτησε, επίσης, τη μέγιστη τιμή της την 1^η ημέρα (269 μg kg⁻¹) και έπεσε σε μη ανιχνεύσιμη τιμή 72 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Τέλος, η συγκέντρωση της AcSDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της την 1^η ημέρα (527 μg kg⁻¹), γεγονός που φανερώνει τον γρήγορο μεταβολισμό της SDZ σε AcSDZ, ενώ απομακρύνθηκε τάχιστα αφού δεν ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής της φαρμακούχου ιχθυοτροφής.

<u>Ήπαρ</u>: Η συγκέντρωση της SDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της 24 ώρες μετά την έναρξη χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (ημέρα 1) και ήταν 432 μg kg⁻¹, ενώ μετά τη διακοπή της χορήγησής της, η συγκέντρωση της SDZ μειώθηκε τάχιστα φτάνοντας την τιμή 76,6 μg kg⁻¹ την ημέρα 8 και έπεσε κάτω από το LOQ (και το LOD)

την 9^η ημέρα. Η συγκέντρωση της TMP απέκτησε τη μέγιστη τιμή της την 3^η ημέρα (664 μg kg⁻¹) και έπεσε σε μη ανιχνεύσιμη τιμή την 9^η ημέρα.

Χρόνος (ημέρες)	Σάρκα με δέρμα	΄Ηπαρ	Ορός
	<i>C</i> , μg kg ⁻¹	C, μg kg ⁻¹	C, ng mL ⁻¹
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD
	(εύρος)	(εύρος)	(εύρος)
Χορήγηση φαρμάκου			
0	0	0	0
1	954 ± 497	432 ± 403	138 ± 61,5
	(0,2 - 1,6)×10 ³	(80,2 - 1386)	(76,5 - 242)
3	439 ± 199	168 ± 98,5	398 ± 235
	(162 - 802)	(88,9 - 389)	(86,2 - 797)
5	475 ± 273	92,1 ± 55,6	479 ± 259
	(128 - 886)	(< <i>L</i> OQ - 166)	(103 - 896)
Απομάκρυνση φαρμάκου			
6	35,1 ± 32,1	77,5 ± 62,9	24,3 ± 16,8
(1 μετά τη τελευταία δόση)	(< <i>LO</i> Q - 111,3)	(< LOQ - 220,4)	(10,4 - 64,0)
8	19,8± 5,3	76,6 ± 32,0	28,8 ± 18,9
(3 μετά τη τελευταία δόση)	(< LOQ - 28,2)	(< LOQ - 139,2)	(11,0 - 71,9)
9 (4 μετά τη τελευταία δόση)	< LOQ , LOD	< LOQ, LOD	< LOQ, LOD

Πίνακας 13.5 Συγκεντρώσεις της SDZ (σε μg kg⁻¹ ή ng mL⁻¹) στους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (δίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από δέκα ιχθύες ενώ μέσα σε παρένθεση δίνεται το εύρος των συγκεντρώσεων)

[#] Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ο αριθμός των ιχθύων ήταν δέκα (n=10), με εξαίρεση στο σημείο μηδέν («λευκό» δείγμα) στο οποίο ο αριθμός των ιχθύων ήταν τρία (n=3)

Τέλος, η συγκέντρωση της AcSDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή την 1^η ημέρα (104 μg kg⁻¹), ενώ μειώθηκε τάχιστα και δεν ανιχνεύθηκε 24 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής (ημέρα 6).

Πίνακας 13.6 Συγκεντρώσεις της TMP (σε μg kg⁻¹ ή ng mL⁻¹) στους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (δίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από δέκα ψάρια ενώ μέσα σε παρένθεση δίνεται το εύρος των συγκεντρώσεων)

Χρόνος (ημέρες)	Σάρκα με δέρμα	΄Ήπαρ	Ορός
	C, μg kg ⁻¹	C, μg kg ⁻¹	C, ng mL ⁻¹
	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± SD	Μέση τιμή ± <i>SD</i>
	(εύρος)	(εύρος)	(εύρος)
Χορήγηση φαρμάκου			
0	0	0	0
1	269 ± 157	503 ± 263	30,6 ± 15,9
	(57,3 - 558)	(167 - 892)	(7,7 - 55,4)
3	233 ± 92	664 ± 294	10,8 ± 6,5
	(106 - 450)	(400 - 1363)	(5,8 - 22,3)
5	262 ± 95	160 ± 74	7,4 ± 2,5
	(120 - 390)	(33,9 - 283)	(5,1 - 13,5)
Απομάκρυνση φαρμάκου			
6	134 ± 99	204 ± 118	2,4 ± 1,4
(1 μετά τη τελευταία δόση)	(26,7 - 349)	(82,4 - 421)	(< LOQ - 3,8)
8	74,9 ± 19,2	56,0 ± 34,7	2,7 ± 1,6
(3 μετά τη τελευταία δόση)	51,6 - 115,9)	(16,8 - 116,0)	(< LOQ - 4,3)
9 (4 μετά τη τελευταία δόση)	< LOQ	< LOQ	< LOQ

[#] Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ο αριθμός των ιχθύων ήταν δέκα (*n*=10), με εξαίρεση στο σημείο μηδέν («λευκό» δείγμα) στο οποίο ο αριθμός των ιχθύων ήταν τρία (*n*=3)

<u>Ορός</u>: Η συγκέντρωση της SDZ στον ορό του αίματος αυξήθηκε σταδιακά κατά τη διάρκεια χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής από 138 ng mL⁻¹ (ημέρα 1) στη μέγιστη τιμή της 479 ng mL⁻¹ ορού (ημέρα 5). Μετά τη διακοπή της χορήγησής της, η συγκέντρωση της SDZ μειώθηκε τάχιστα φτάνοντας την τιμή 28,8 ng mL⁻¹ την 8ⁿ ημέρα. Η συγκέντρωση της TMP ήταν 30,6 ng mL⁻¹ την 1ⁿ ημέρα (μέγιστη τιμή) και 7,4 ng mL⁻¹ την 5ⁿ ημέρα. Μειώθηκε πολύ γρήγορα μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Τέλος, η συγκέντρωση της AcSDZ απέκτησε τη μέγιστη τιμή της την 5ⁿ ημέρα (480 ng mL⁻¹), γεγονός που φανερώνει το μεταβολισμό της SDZ σε AcSDZ, ενώ

απομακρύνθηκε τάχιστα αφού έπεσε στα 21,1 ng mL⁻¹ 24 ώρες μετά τη διακοπή χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής (ημέρα 6).

Χρόνος (ημέρες)	Σάρκα με δέρμα <i>C</i> , μg kg ⁻¹ Μέση τιμή ± SD (εύρος)	΄Ηπαρ C, μg kg ⁻¹ Μέση τιμή ± SD (εύρος)	Ορός C, ng mL ⁻¹ Μέση τιμή ± SD (εύρος)
Χορήγηση φαρμάκου			
0	0	0	0
1	527 ± 227 (225 - 850)	104 ± 43 (52,4 - 175)	401 ± 149 (175 - 669)
3	356 ± 172 (99,6 - 673)	58,1 ± 35,4 (12,2 - 117)	370 ± 95,5 (263 - 568)
5	332 ± 130 (175 - 558)	30,7 ± 14 (< LOQ - 57)	480 ± 162 (254 - 781)
Απομάκρυνση φαρμάκου			
6	< LOQ	< LOQ	21,1 ± 22,5 (5,9 - 62,0)
8	< LOQ	< LOQ	< LOQ
9	< LOQ	< LOQ	< LOQ

Πίνακας 13.7 Συγκεντρώσεις της AcSDZ (σε μg kg⁻¹ ή ng mL⁻¹) στους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (δίνεται η μέση τιμή και η τυπική απόκλιση από δέκα ιχθύες ενώ μέσα σε παρένθεση δίνεται το εύρος των συγκεντρώσεων)

[#] Σε κάθε σημείο δειγματοληψίας ο αριθμός των ιχθύων ήταν δέκα (n=10), με εξαίρεση στο σημείο μηδέν («λευκό» δείγμα) στο οποίο ο αριθμός των ιχθύων ήταν τρία (n=3)

Στη συνέχεια δίνονται τα διαγράμματα συγκέντρωσης-χρόνου για τις τρεις ουσίες ανά ιστό (σάρκα με δέρμα, ήπαρ, ορός). Στα διαγράμματα αυτά (σχήματα 13.12, 13.13 και 13.14) φαίνεται η χρονική στιγμή κατά την οποία η συγκέντρωση των δύο δραστικών ουσιών (SDZ και TMP) λαμβάνει τη μέγιστη τιμή σε κάθε ιστό-στόχο, οπότε μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατά τη διαδικασία της εύρεσης του βέλτιστου θεραπευτικού δοσολογικού σχήματος.

Στους πίνακες ΠVIII_3 και ΠVIII_4 δίνονται τα στατιστικά αποτελέσματα της καμπύλης απομάκρυνσης των SDZ και TMP από τη σάρκα με δέρμα της τσιπούρας σύμφωνα με όσα απαιτούνται από την *EMEA*.

Στα σχήματα 13.15 και 13.16 δίνεται η ημιλογαριθμική ανάλυση των συγκεντρώσεων των SDZ και TMP στη σάρκα με δέρμα της τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της ιχθυοτροφής *PO*. Πιο συγκεκριμένα, απεικονίζονται, η γραμμή παλινδρόμησης της απο-



Σχήμα 13.9 Απομάκρυνση της SDZ από τους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)

μάκρυνσης των SDZ και TMP και το άνω όριο εμπιστοσύνης 95 % της μέσης τιμής των μετρήσεων ανά δειγματοληψία, αντίστοιχα, από τη στιγμή της διακοπής της χορήγησης της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* μέχρι και την τελευταία ημέρα δειγματοληψίας κατά την οποία ανιχνεύτηκαν οι ουσίες (8^η ημέρα). Παρατηρείται, επίσης, η κατανομή των μέσων τιμών όλων των μετρήσεων των αναλυτών, η γραμμή η οποία καθορίζει το *MRL* των 100 και 50 μg kg⁻¹ και οι γραμμές οι οποίες οριοθετούν τον υπολογισμένο χρόνο απομάκρυνσης των SDZ και TMP από τη σάρκα με δέρμα της εκτρεφόμενης τσιπούρας.



Σχήμα 13.10 Απομάκρυνση της TMP από τους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.11 Απομάκρυνση της AcSDZ από τους ιστούς τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.12 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από τη σάρκα με δέρμα τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.13 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από το ήπαρ τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.14 Απομάκρυνση των SDZ, TMP και AcSDZ από τον ορό του αίματος τσιπούρας μετά από τη χορήγηση της φαρμακούχου ιχθυοτροφής *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)



Σχήμα 13.15 Ημιλογαριθμική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της SDZ σε σχέση με τον χρόνο. Οι κόκκινοι κύκλοι ορίζουν τις μέσες τιμές των μετρήσεων ανά δειγματοληψία [0000], οι δύο μαύρες κυμματιστές γραμμές ορίζουν (από κάτω προς τα πάνω) τη γραμμή παλινδρόμησης της απομάκρυνσης της SDZ από τη σάρκα με δέρμα της τσιπούρας και το όριο εμπιστοσύνης στο 95% [~~~~]. Η οριζόντια διακεκομμένη μαύρη γραμμή [-----] ορίζει το νομοθετημένο *MRL* (100 μg kg⁻¹)



Σχήμα 13.16 Ημιλογαριθμική απεικόνιση των συγκεντρώσεων της TMP σε σχέση με τον χρόνο. Οι κόκκινοι κύκλοι ορίζουν τις μέσες τιμές των μετρήσεων ανά δειγματοληψία [0000], οι δύο μαύρες κυμματιστές γραμμές ορίζουν (από κάτω προς τα πάνω) τη γραμμή παλινδρόμησης της απομάκρυνσης της TMP από τη σάρκα με δέρμα της τσιπούρας και το όριο εμπιστοσύνης στο 95% [~~~~]. Η οριζόντια διακεκομμένη μαύρη γραμμή [-----] ορίζει το νομοθετημένο *MRL* (50 μg kg⁻¹) και οι δύο κόκκινες, κάθετες, παράλληλες και διακεκομμένες γραμμές [-----] οριοθετούν το εύρος του υπολογισμένου χρόνου

Σύμφωνα με το πρόγραμμα *WT*1.4, για τους 24 °C με χορήγηση της ιχθυοτροφής *PO*, ο χρόνος αποδρομής του φαρμακευτικού προμίγματος TRIMETHOPRIM-SULPHADIAZINE 50 % βρέθηκε:

Wt (TMP-SDZ,*PO*) = 6 ημέρες

13.2.4 Συζήτηση επί των αποτελεσμάτων των βιολογικών πειραματισμών με τις δύο ιχθυοτροφές *FO* και *PO*

Οι βιολογικοί πειραματισμοί που πραγματοποιήθηκαν, επιτρέπουν την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την παραμονή των SDZ και TMP στους ιστούς των ιχθύων, κατά τη χορήγηση του φαρμακευτικού σκευάσματος με τη συμβατική ιχθυοτροφή (*FO*) αλλά και την εναλλακτική ιχθυοτροφή (*PO*).

Στο σχήμα 13.17 δίνεται το διάγραμμα συγκέντρωσης της SDZ με τον χρόνο (ημέρες δειγματοληψίας) μετά από τη χορήγηση των δύο ιχθυοτροφών.



Σχήμα 13.17 Απομάκρυνση της SDZ από τη σάρκα με δέρμα τσιπούρας μετά από τη χορήγηση των φαρμακούχων ιχθυοτροφών *FO* και *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)

Παρατηρείται ότι και με τις δύο ιχθυοτροφές, η συγκέντρωση της SDZ έλαβε τη μέγιστη τιμή την 1^η ημέρα (24 ώρες μετά την έναρξη του πειραματισμού), αλλά αυτή διαφέρει σημαντικά στις δύο περιπτώσεις, αφού έλαβε την τιμή 1794 μg kg⁻¹ με την ιχθυοτροφή *FO* και 954 μg kg⁻¹ με την ιχθυοτροφή *PO*. Ωστόσο, η απομάκρυνση της SDZ από τον ιχθύ έγινε με παρόμοιο ρυθμό.

Στο σχήμα 13.18 δίνεται το διάγραμμα συγκέντρωσης της TMP με τον χρόνο (ημέρες δειγματοληψίας) μετά από χορήγηση των δύο ιχθυοτροφών.



Σχήμα 13.18 Απομάκρυνση της TMP από τη σάρκα με δέρμα τσιπούρας μετά από τη χορήγηση των φαρμακούχων ιχθυοτροφών *FO* και *PO* (*n*=10 ιχθύες/δειγματοληψία)

Στην περίπτωση της TMP παρατηρείται κάτι αντίστοιχο με την SDZ, αφού η μέγιστη τιμή της συγκέντρωσης της TMP βρέθηκε την 1^η ημέρα και με τις δύο ιχθυοτροφές, αλλά και πάλι αυτή διαφέρει σημαντικά στις δύο περιπτώσεις, αφού έλαβε την τιμή 697 μg kg⁻¹ με την ιχθυοτροφή *FO* και 269 μg kg⁻¹ με την ιχθυοτροφή *PO*. Η απομάκρυνση της, όμως, από τον ιχθύ έγινε με παρόμοιο ρυθμό.

Συμπερασματικά, η χορήγηση της ιχθυοτροφής *PO* αντί της *FO*, δε μεταβάλλει σημαντικά τον χρόνο αποδρομής του συγκεκριμένου φαρμακευτικού προμίγματος SDZ/TMP.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 13

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα διατριβή έγινε η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων για τον προσδιορισμό σουλφαδιαζίνης, τριμεθοπρίμης και ακετυλο-σουλφαδιαζίνης σε ιστούς ιχθύων (σάρκα με δέρμα, ήπαρ, ορός) με την τεχνική *LC/MS*. Τα αποτελέσματα της αξιολόγησης των μεθόδων ήταν αρκετά ικανοποιητικά. Στην περίπτωση, μάλιστα, των δειγμάτων σάρκας με δέρμα και ήπατος, τα αποτελέσματα πιστότητας ήταν εξαιρετικά εξαιτίας, κυρίως, της αυτοματοποιημένης τεχνικής *ASE* που χρησιμοποιήθηκε.

Η μέθοδος προσδιορισμού των αναλυτών σε δείγματα σάρκας με δέρμα, δύναται να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση δειγμάτων προκειμένου να προσδιοριστούν κατάλοιπα των ουσιών αυτών. Μάλιστα, η επικύρωση της συγκεκριμένης μεθόδου πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας δείγματα από διαφορετικές «παρτίδες» ιχθύων, δηλαδή, από ιχθύες διαφορετικού είδους (τσιπούρα, λαβράκι), διαφορετικής διατροφής, διαφορετικού σωματικού βάρους κ.λπ. και τα αποτελέσματα από τον υπολογισμό της «σχετικής επίδρασης μητρικού υλικού» έδειξαν ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διάφορα δείγματα ιχθύων.

Οι μέθοδοι που αναπτύχθηκαν και επικυρώθηκαν, χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των αναλυτών, σε δείγματα από βιολογικούς πειραματισμούς που πραγματοποιήθηκαν σε εκτρεφόμενες τσιπούρες μετά από χορήγηση φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Τα αποτελέσματα χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του χρόνου αποδρομής της φαρμακούχου ιχθυοτροφής. Η γνώση του χρόνου αποδρομής είναι σημαντική προκειμένου να αποφεύγεται η κατανάλωση από τον άνθρωπο προϊόντων με κατάλοιπα των ουσιών άνω του μέγιστου επιτρεπόμενου ορίου.

Τα δείγματα των βιολογικών πειραματισμών χρησιμοποιήθηκαν, επίσης, για την ταυτοποίηση περισσότερων μεταβολιτών της σουλφαδιαζίνης και τριμεθοπρίμης με χρήση της τεχνικής *Q/TOF,* ωστόσο, τα αποτελέσματα δεν παρουσιάστηκαν στη διατριβή, λόγω της μεγάλης έκτασης των δεδομένων.

269

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Ξενόγλωσσος όρος

Ελληνικός όρος

Accuracy Accurate mass	Ακρίβεια Ακριβής μάζα
Analyte recovery	Ανάκτηση του αναλύτη
Bactericidal	Βακτηριοκτόνο
Bacteriostatic	Βακτηριοστατικό
Bias	Συστηματικό σφάλμα
Blank sample	«Λευκό» δείγμα
Capacity factor	Παράγοντας χωρητικότητας
Capillary Voltage	Δυναμικό τριχοειδούς
Carry over	Επιμόλυνση από ένεση σε ένεση
Codex Alimentarius	Κώδικας Τροφίμων
Coefficient of correlation	Συντελεστής συσχετίσεως
Coefficient of determination	Συντελεστής προσδιορισμού
Combined standard uncertainty	Συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα
Cone Gas Flow	Παροχή αερίου στον κώνο
Cone voltage	Δυναμικό κώνου
Confirmatory method	Μέθοδος επιβεβαίωσης
Constant neutral-loss scan	Σάρωση με σταθερή απώλεια ουδέτερου
	μορίου
Decision limit	Όριο απόφασης
Desolvation Gas Flow	Παροχή αερίου αποδιαλύτωσης
Desolvation Temperature	Θερμοκρασία αποδιαλύτωσης
Detection capability	Ικανότητα ανίχνευσης
Dynamic extraction	Δυναμική εκχύλιση
Efficiency characteristics	Χαρακτηριστικά επίδοσης
Electrospray	Ηλεκτροδιάχυση
Expanded uncertainty	Διευρυμενή αβεβαιοτήτα
Extractor Voltage	
	Απεκκριση/απομακρυνση
Credient/ locaratic elution	2 αθεροτητά κατά την ψυςη/αποψυςη
	Διαγωριστότοτα μιμολών/ναμολών μαζών
Hybrid Particle Technology	Διαχωριστοτητά σφηλων/χαμηλών μαςών
Identification criteria	Κοιτήρια ταυτοποίησης
Intra-day-/ Inter-day-	Εντός της ημέρας/Μεταξύ των ημερών
Ion Energy	Ιοντική ενέονεια
Linearity range	Εύρος γραμμικότητας
Loop	Βρόχος εισαγωγής δείγματος
•	

Ξενόγλωσσος όρος

Ελληνικός όρος

Marker residue	Κατάλοιπο δείκτης
Matrix Effect	Επίδραση Μητρικού Υλικού
Matrix-matched standards	Εμβολιασμένα εκχυλισμάτα με πρότυπα
	διαλύματα
Multi-class methods	Πολυ-υπολειμματικές μέθοδοι
Myxobacteriosis	Μυξοβακτηριδίαση
Normality of calculated residuals	Κανονικότητα των υπολοίπων
Pasteurellosis	Παστεριδίαση
Pharmacokinetic/Pharmacodynamic	Φαρμακοκινητική/Φαρμακοδυναμική Συσχέτιση
Correlation ή Integration	ή Ολοκλήρωση
Positive ion mode	Επιλογή θετικών ιόντων
Precision	Πιστότητα
Precursor-ion scan	Σάρωση μητρικού ιόντος
Quality characteristics	Χαρακτηριστικά ποιότητας
Quaternary pump	Αντλία βαθμιαίας έκλουσης τεσσάρων διαλυτών
	με ανάμιξη χαμηλής πίεσης
Random error	Τυχαίο σφάλμα
Regression equation	Εξίσωση παλινδρόμησης
Repeatability	Επαναληψιμότητα
Reproducibility	Αναπαραγωγιμότητα
Residuals plot	Διάγραμμα υπολοίπων
Residue File	Μελέτη καταλοίπων
RF Lens	Φακοί RF
Ruggedness	Ανθεκτικότητα
Screening method	Μέθοδος διαλογής
Selectivity	Εκλεκτικότητα
Short-term stability	Βραχυπρόθεσμη σταθερότητα
Signal enhancement/suppression	Ενίσχυση/Υποβάθμιση σήματος
Signal to noise ratio	Λόγος σήμα προς θόρυβο
Sorbent	Μέσο διασποράς, υπόστρωμα
Specificity	Ειδικότητα
Spiked sample	Δείγμα εμβολιασμένο
Standard error of estimate	Τυπικό σφάλμα
Standard error of the mean	Τυπικό σφάλμα του μέσου
Standard uncertainty	Τυπική αβεβαιότητα
Static extraction	Στατική εκχύλιση
Thermal degradation	Θερμική διάσπαση
Traceability	Ιχνηλασιμότητα
Trueness	Ορθότητα
Uncertainty budget	Ισοζύγιο αβεβαιότητας
Vibriosis	Δονακίωση
Within-laboratory reproducibility	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμιο	Πλήρης αγγλικός όρος	Ελληνική απόδοση
ACN	Acetonitrile	Ακετονιτρίλιο
AcOEt	Ethyl Acetate	Οξικός Αιθυλεστέρας
ADI	Acceptable Daily Intake	Αποδεκτή Ημερήσια Πρόσληψη
AMA	Amoxilic Acid	Αμοξικιλικό Οξύ
AMP	Ampiciline	Αμπικιλίνη
AMX	Amoxiciline	Αμοξικιλίνη
ANVISA	National Health Surveillance Agency	Εθνική Αρχή Επιτήρησης της Υγείας της Βραζιλίας
APA	Ampicilic Acid	Αμπικιλικό Οξύ
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization	Χημικός ιονισμός Υπό Ατμοσφαιρική Πίεση
API	Atmospheric Pressure Ionization	Ιονισμός Υπό Ατμοσφαιρική Πίεση
ASE	Accelerated Solvent Extraction	Επιταχυνόμενη Εκχύλιση Διαλύτη
ATP	Antitoprim	Αντιτοπρίμη
AUC	Area Under the Concentration-Time	Εμβαδόν Περιοχής κάτω από την
7.00	Curve	Καμπύλη Συγκέντρωσης-Χρόνου
β-LCs	β-Lactams	Β-λακτάμες
BGD	Bacterial Gills Disease	Βακτηριακή Ασθένεια Βραγχίων
CID	In-source Collision-Induced	Διάσταση Προκαλούμενη με
	Dissociation	Πρόσκρουση Εντός της Πηγής
	Ciprofloxacine	<u>Σιπροφλοξακινη</u>
	Confirmation Limit	Οριο Επιβεβαιωσης
	Chloramphenicol	Χλωραμφαινικολη
		Χλωροτετρακυκλινη
	Coefficient of Variation (%)	Συντελεστης Διακυμανσης (%)
	Defined Daily Dose	καθορισμένη Ημερησία Δοση
DIF	Difloxacine	Διφλοξακινη
	Demeciocycline	Δεμεκλοκυκλινη
DOX	Doxycycline	Δοξυκυκλινη
DPS	Diaminopyridines	Διαμινόπυριμιοινες
dSPE	dispersive Solid Phase Extraction	Εκχυλισης Στερεάς Φάσης διασποράς
DV	Diaverin	Διαβερίνη
EFSA	European Food Safety Authority	Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων
EMA	European Medicines Agency	Ευρωπαϊκός Οργανισμός Φαρμάκων
EMEA	European Agency for the Evaluation of Medicinal Products	Ευρωπαϊκός Οργανισμός για την Αξιολόγηση των Φαρμακευτικών Προϊόντων

Ακρωνύμιο	Πλήρης αγγλικός όρος	Ελληνική απόδοση
ΕΟΦ	-	Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων
ESAC	European Surveillance Antimicrobials	Ευρωπαϊκό Δικτύο Επιτήρησης
	Consumption	της Κατανάλωσης των
		Αντιμικροβιακών Ουσιών
FA	Formic Acid	Μυρμηκικό Οξύ
FAO	Food and Agriculture Organization	Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας
FLD	Fluoresence Detector	Ανιχνευτής Φθορισμού
FLU	Flumequine	Φλουμεκίνη
FO	Fish Oil	Ιχθυέλαιο
FQs	Fluoroquinolones	Φθοροκινολόνες
GCB	Graphitised Carbon Black	Γραφιτοποιημένος Άνθρακας
HRMS	High Resolution Mass Spectrometer	Φασματόμετρο Μαζών Υψηλής Διακριτικής Ικανότητας
IPs	Identification Points	Μονάδες Ταυτοποίησης
IT	Ion Trap	Παγίδα Ιόντων
КΦ	-	Κινητή Φάση
LC-MS	Liquid Chromatography-Mass Spectrometry	Υγροχρωματογραφία- Φασματομετρία Μαζών
LCs	Lincosamides	Λινκοσαμίδια
LLE	Liquid-Liquid Extraction	Υγρό-Υγρό Εκχύλιση
LMG	Leucomalachite Green	Πράσινο Λευκομαλαχίτη
LOD	Limit Of Detection	Όριο Ανίχνευσης
LOI	Limit of Identification	Όριο Ταυτοποίησης
LOQ	Limit Of Quantitation	Όριο Ποσοτικοποίησης
MAE	Microwave-Assisted Extraction	Εκχύλιση Υποβοηθούμενη από Μικροκύματα
MAR	Marbofloxacine	Μαρμποφλοξακίνη
MBC	Minimal Bactericidal Concentration	Ελάχιστη Βακτηριοκτόνος Συγκέντρωση
MCs	Macrolides	Μακρολίδες
MeOH	Methanol	Μεθανόλη
MG	Malachite Green	Πράσινο Μαλαχίτη
MIC	Minimal Inhibitory Concentration	Ελάχιστη Ανασταλτική Συνκέντρωση
MLX	Miloxacine	Μιλοξακίνη
MMS	Matrix-Matched Standards	Εμβολιασμένα Εκχυλίσματα Μητρικού Υλικού
MRL	Maximum Residue Limit	Μένιστο Όριο Καταλοίπου
MRT	Mean Residence Time	Μέσος Χρόνος Παραμονής του
		Φαρμάκου στον Οργανισμό
MS	Mass Spectrometer	Φασματόμετοο Μαζών
MSPD	Matrix Solid Phase Dispersion	Διασπορά Μητρικού Υλικού
		Στερεάς Φάσης
MTP	Methoprim	Μεθοπρίμη

Ακρωνύμιο	Πλήρης αγγλικός όρος	Ελληνική απόδοση
N ⁴ –AcSDZ	N ⁴ -Acetyl-sulfadiazine	Ν ⁴ ακετυλοσουλφαδιαζίνη
NAL	Nalidixic Acid	Ναλιδιξικό Οξύ
NOR	Norfloxacine	Νορφλοξακίνη
OTC	Oxytetracycline	Οξυτετρακυκλίνη
OTM	Ormetoprim	Ορμετοπρίμη
OXO	Oxolinic Acid	Οξολινικό Οξύ
PABA	p-Aminobenzoic Acid	π-Αμινοβενζοϊκό Οξύ
PCs	Penicillines	Πενικιλλίνες
PD	Pharmacodynamics	Φαρμακοδυναμική
PDA	Photo Diode Array	Σειρά Φωτοδιόδων
PE	Process Efficiency (%)	Απόδοση Διαδικασίας (%)
PIR	Piromidic Acid	Πιρομιδικό Οξύ
PK	Pharmacokinetics	Φαρμακοκινητική
PLE	Pressurized Liquid Extraction	Υγρό Εκχύλιση Υπό Πίεση
PM	Pyrimethamine	Πυριμεθαμίνη
PO	Plant Oil	Φυτικό Έλαιο
PPB	Plasma Protein Binding	Δέσμευση με Πρωτεΐνες του Πλάσματος
PSA	Primary–Secondary Amine	Πρωτοταγής-Δευτεροταγής Αμίνη
QqIT	Quadrupole Ion Trap	Τετραπολική Παγίδα Ιόντων
QqQ	Triple Quadrupole	Τριπλό Τετράπολο
QuECHERS	Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	Γρήγορη, Εύκολη, Φθηνή, Αποτελεσματική, Ανθεκτική, Ασφαλής
RA	Relative Area	Σχετική Επιφάνεια Κορυφής
PΔ	-	Ρυθμιστικό Διάλυμα
RE	Recovery (%)	Ανάκτηση (%)
RRT	Relative Retention Time	Σχετικός Χρόνος Συγκράτησης
RSD (%)	Relative Standard Deviation	Σχετική Τυπική Απόκλιση (%)
RT	Retention Time	Χρόνος Συγκράτησης
RUc	Combined Relative Standard Uncertainty	Συνδυασμένη Σχετική Τυπική Αβεβαιότητα
SAR	Sarafloxacine	Σαραφλοξακίνη
SAs	Sulfonamides	Σουλφοναμίδια
SD	Sulfadoxine	Σουλφαδοξίνη
SDM	Sulfadimidine	Σουλφαδιμιδίνη
SDMX	Sulfadimethoxine	Σουλφαδιμεθοξίνη
SDZ	Sulfadiazine	Σουλφαδιαζίνη
SFE	Supercritical Fluid Extraction	Εκχύλιση Υπερκρίσιμου Υγρού
SHS	Sodium Heptane Sulphonate	Επτανοσουλφονικό Νάτριο
SIM	Single Ion Monitoring	Τεχνική Παρακολούθησης Επιλεγμένου Ιόντος
SMMX	Sulfamonomethoxine	Σουλφαμονομεθοξίνη
SMPZ	Sulfamethoxypyridazine	Σουλφαμεθοξυπυριδαζίνη
SMR	Soulfamerazine	Σουλφαμεραζίνη

Ακρωνύμιο	Πλήρης αγγλικός όρος	Ελληνική απόδοση	
SPE	Solid Phase Extraction	Εκχύλιση Στερεάς Φάσης	
SQX	Sulfaquinoxaline	Σουλφακινοξαλίνη	
SSE	Simple Solvent Extraction	Απλή Εκχύλιση Διαλύτη	
SSS	Standard Stock Solution	Πρότυπο Διάλυμα	
		Παρακαταθήκης	
SSZ	Sulfisozole	Σουλφισοζόλη	
STZ	Sulfadiazole	Σουλφαθειαζόλη	
SWS	Standard Working Solution	Πρότυπο Διάλυμα Εργασίας	
TC	Tetracycline	Τετρακυκλίνη	
TCA	Trichloroacetic Acid	Τριχλωροξικό Οξύ	
TFA	Trifluoroacetic Acid	Τριφθοροξικό Οξύ	
THF	Tetrahydrofurane	Τετραϋδροφουράνιο	
TIF	Thiamphenicol	Θειαμφαινικόλη	
TMP	Trimethoprim	Τριμεθοπρίμη	
ToF	Time Of Flight	Χρόνου Πτήσης	
UPLC	Ultra-Performance Liquid	Υγροχρωματογραφία	
	Chromatography	Υπερυψηλής Απόδοσης	
US FDA	United States Food and Drug	Αμερικανικός Οργανισμός	
	Administration	Τροφίμων και Φαρμάκων	
UV-Vis	Ultra violet-visible	Υπεριώδες-ορατό	
VCP	Vaciloprim	Βακιλοπρίμη	
VMPs	Veterinary Medicinal Products	Κτηνιατρικά Φαρμακευτικά	
		Προϊόντα	
VNN	Viral Nervous Necrosis	Ιογενής Νευρική Νέκρωση	
WHO	World Health Organization	Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας	
Wt	Withdrawal time	Χρόνος Αποδρομής	

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- Martin RE, Flick GJ, "The Seafood Industry", Van Nastrand Reinhold (Ed.), NY, USA, 1990.
- FAO (Food Agriculture Organization), "The state of world fisheries and aquaculture", Rome, 2008a, pp. 10, 17-18.
- Allsopp M, Page R, Johnston P & Santillo D, "State of the world's oceans" *Environ* Sci & Pollut Res 2009;16:605-606.
- Eurostat «Η Κ.Α.Π. σε αριθμούς-Βασικά στοιχεία σχετικά με την Κοινή Αλιευτική Πολιτική», Ευρωπαϊκές Κοινότητες, 2006, σ. 46.
- 5. *IUCN*, "Mediterranean marine aquaculture and environment. Identification of issues", *IUCN Centre for Mediterranean Cooperation*, Barcelona, **2004** p. 34.
- ΣΕΘ (Σύνδεσμος Ελληνικών Θαλασσοκαλλιεργειών), «Θαλάσσιες ιχθυοκαλλιέργειες στην Ελλάδα», 2000.
- Michelakakis A, and Tzoumas AS, "Integrated fish farming in the Mediterranean: Case study of NIREUS, Chios aquaculture in Greece", Charting the Future of Ocean Farming, **1998**, pp. 251-256.
- Stephanis J, "Economic viability of production systems seabass/seabream in Greece (industrial scale)", *In: Aquaculture Production economics*, Cahiers Optios Mediterraneennes, CIHEAM, Zaragosa (Spain) **1995**;14:65-77.
- www.aquamedia.org/productiondata/productionreport2005%2D2014web.pdf (Φεβρουάριος 2015).
- 10. Whitehead PJ, Bauchot JC, Hureau J, and Tortonese E, "Fishes of the North-Eastern Atlantic and the Mediterranean", *UNESCO* **1986**;1:1-510.
- 11. Olesan J, "Will sea bass and giltheads share turbot's potential?" *Fishfarmer* **1986**;9:18-20.

- Παπουτσόγλου ΣΕ, «Εκτροφές Υδρόβιων Οργανισμών», Εκδόσεις Γεργικού Πανεπιστημίου Αθηνών, Αθήνα, **1994**, σ. 195.
- New MB, "Aquaculture diets of postlarval marine fish of the super family percoidae, with special reference to sea bass, sea breams, groupers and yellowtail: A Review" *Kuwait Bull of Mari Sci* 1986;7:75-148.
- Χώτος Γ και Ρογδάκης Ι, «Υδατοκαλλιέργειες Ευρύαλων Ψαριών, Λαβράκι & Τσιπούρα, Τεχνικές της Αναπαραγωγής και Πάχυνσης», Εκδόσεις «ΙΩΝ», 1992.
- 15. Coves D, Dewavrin G, Breuil G, Devauchelle N, "Culture of Seabass (*Dicentrarchus labrax*)", *In*: Mc Vey (editor) CRC *Handbook of Mariculture*, **1991**, pp. 3-21.
- 16. Brett JR, "Environmental factors and growth" *Fish physiology*, **1979**, vol. VIII, pp. 599-600.
- Παπουτσόγλου ΣΕ, «Εισαγωγή Στις Υδατοκαλλιέργειες», Εκδόσεις
 Καραμπερόπουλος, Αθήνα, **1985**, σ. 595.
- Person-Le Ruyet G, Menu B, Cadena-Roa M, Metallier R, "Use of expanded pellets supplemented woth attractive chemical substances for the weaning of turbot (*Scophthalmus maximus*)" *J World Marin Soc* **1983**;14:676-678.
- 19. Claireaux G, and Lagardere JP, "Influence of temperature, oxygen and salinity on the metabolism of the European sea bass" *J Sea Res* **1999**;42:157-168.
- 20. Hepher B, "Growth", Nutrition of Pond Fishes, Cambridge University Press, **1988**, pp. 147-156.
- 21. Schreck C, "Immunomodulation: Endogenous factos". The Fish Immune System, Iwama G, Nakanishi T (ed.), Academic Press, San Diego, **1996**, pp. 311-337.
- 22. Jacobsen P, and Berglind L, "Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms" *Aquaculture* **1988**;70:365-370.
- Samuelsen OB, Lunestad BT, Thorsen B, Eriksen V, Ervik A, and Soheim, *In*: Haagsma N, Ruiter A, Czedik-Eysenberg PB (eds), *Proceedings of the EuroResidue II Conference*, Veldhoven, The Netherlands, **1993**, pp. 606-610.

- Ruitter A, Scherpenisse P, and Hajee CAJ, "Analysis of Drug Residues in Fish", *In*: Haagsma N, Ruiter A, Czedik-Eysenberg PB (eds), *Proceedings of the EuroResidue III Conference*, Veldhoven, The Netherlands, **1996**, pp.87-98.
- Brown AW, Hoppe HG, and Rosenthal H, "Changes in bacterial abundance and community structure in cage fish–culture caused by water turbulence during feeding" *J of Appl Ichth* 2000;16: 27-31.
- 26. Φώτης Γ, «Υδάτινο Περιβάλλον, Στοιχεία Ιχθυολογίας, Ιχθυοτροφία και Ιχθυολογία» Τόμος Α', Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων, Εκδόσεις «Σύγχρονη Παιδεία», Θεσσαλονίκη, 1999.
- 27. Arnold D, "Importance of pharmacokinetics in the determination of withdrawal times" *Ann Resh Vet* **1990**;21(1):93-105.
- 28. Reilly A, and Käferstein F, "Food safety hazards and the application of the principles of the hazard analysis and critical control point (*HACCP*) system for their control in aquaculture production" *Aquaculture Res* **1997**;28:735-752.
- 29. Bowser PR, "Diseases of Fish" Cornell University, USA, 1999.
- 30. Moeler RB, "Diseases of fish" University of California, USA, 2002.
- Christofilogiannis P, "The Veterinary Approach to Sea Bass and Sea Bream", *In*: Brown L *Aquaculture for Veteriarians* Pergamon Press, Chicago, USA, **1993**, pp. 378-393.
- Alvarez-Pellitero P, Sitia-Bodadilla A, Franco-Sierra A, Pelenzuela O, "Protozoan parasites of gilthead sea bream, *Sparus aurata* L, from different culture systems in Spain" *J of Fish Dis* **1995**;18:105-115.
- 33. Rodgers CJ, Furones MD, "Disease problems in cultured marine fish in the Mediterranean" *Fish Pathol* **1998**;33:157-164.
- 34. Φώτης Γ και Αγγελίδης Π, «Εκτροφή και Παθολογία Ιχθύων», Τόμος Α' Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη, 2001.

- Zonula L, Chabrillon M, Arijo S, Diaz-Rosales P, Martinez-Manzanares E, Balebona MC, Morinigo MA, "Bacteria recovered from diseased cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) in southwestern Spain" *Aquaculture* 2003;218:11-20.
- 36. Βαγιάνου Στ, Αθανασοπούλου Φ, Ράγιας Β, Di Cave D, Γκολομάζου Ε, «Συχνότητα προσβολής και παθολογία μεταζώων εξωπαρασίτων μεσογειακών ψαριών, εκτρεφόμενων σε τρία διαφορετικά συστήματα εκτροφής και περιβάλλοντος στην Ελλάδα», Περιοδικό της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρίας 2004;55(3): 203-216.
- 37. Le-Breton A, "Mediterranean finfish pathologies: present status and new developments in prophylactic methods" *Bull Eur Ass Fish Pathol* **1999**;7:20-22.
- Volmer DA, Mansoori B, and Locke SJ, "Study of 4-quinolone antibiotics in biological samples by short-column liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry" *Anal Chem* **1997**;69:4143-4155.
- 39. Stephen C, and Iwama G, Salmon Aquaculture Review, Fish Health Discussion Paper, Part C, Environmental Assessment Office (EAO), University of British Columbia, Canada, **1998**.
- 40. Schneider J, "Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture–a review" *Quim Anal* **1994**;Suppl.1:S34-S42.
- 41. Gingerich WH, Stehly GR, Clark KJ, and Hayton WL, "Crop grouping: a proposal for public aquaculture" *Vet and Human Toxicol* **1998**;40(2):24-31.
- 42. Anonymous, "Establishment of Maximum Residue Limits (*MRLs*) for Residues of Veterinary Medicinal Products in Foodstuffs of Animal Origin", Volume 8, Notice to Applicants and note for Guidance, *European Commission* Enterpise Directorate– General, F2/AW D (2001)-Final.
- Sanders P, "Antibiotic Use in Animals-Policies and Control Measures Around Europe", *In: Antibiotic Policies*, edited by Ian Gould and Jos Meer, **2005**, pp. 649-672, Springer US.
- 44. Alderman DJ, "Control of the Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Aquaculture in the European Union", *In: The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in*

Mediterranean Aquaculture, edited by Basurco Rogers CJ, B. Zaragosa: CIHEAM-IAMZ, **2009**.

- 45. Rodgers CJ, and Furones MD, "Antimicrobial Agents in Aquaculture Practice, Needs and Issues", *In: The Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Meditteranean Aquaculture*, edited by Basurco Rogers CJ, B. Zaragosa: CIHEAM-IAMZ, **2009**.
- FDA (Food and Administration), "Aquaculture Drugs", In: Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance, 2011, pp. 183-208, Rockville, USA: Center for Food Safety and Applied Nutrition.
- Prescott JF, "Antimicrobial use in food and companion animals" Anim Health Res Rev 2008;9 (Special Issue 02):127-133.
- Daniel P, "Drugs and Chemicals in Aquafeeds: The problems and solutions", *In: The* Use of Veterinary Drugs and Vaccines in Mediterranean Aquaculture, edited by Basurco Rogers CJ, B. Zaragosa: CIHEAM-IAMZ, **2009**.
- 50. Noga EJ, "Fish Disease Diagnose and treatment", 2nd edition, Iowa, USA: Wiley– Blackwell, **2010**.
- Alderman DJ, and Hastings TS, "Antibiotic Use in Aquaculture: Development of Antibiotic Resistance-Potential for Consumer Health Risks" *Int J Food Sci Technol* 1998;33:139-155.
- Regulation (*EC*) No 37/2010 of the European Parliament and of the Council of December 2009 "on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin" OJ L 15, 20.1.2010.
- 53. ΕΟΦ (Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων) "Φάρμακα Νοσημάτων των Ιχθύων",
 Κεφάλαιο 14, Κτηνιατρικό Συνταγολόγιο, Pharmametrica Printshop, 2001, σσ. 281-282.

- 54. Regulation (*EC*) No 178/2002 of the European Parliament and of the Council of January 2002 "laying down the general principles and requirements of food law, establishing the European Food Safety Authority and laying down procedures in matters of food safety" O J L 031, **1.2.2002**, p. 1.
- 55. Council Regulation (*EEC*) No 2377/90 of 26 June 1990 "laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin" *O J* L67, **1997**, 1-8.
- 56. Council Directive 90/167/EEC of 26 March 1990 "laying down the conditions governing the preparation, placing on the market and use of medicated feedingstuffs in the Community" O J L 92, 7.4.1990, p. 42.
- 57. Council Directive 96/22/EC of 29 April 1996 "concerning the prohibition in stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists" O J L 125, 23.5.1996, p. 3.
- 58. Council Directive 96/23/EC of 29 April 1996 "on measures to monitor certain substances and residues thereof in the live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and 86/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC" O J L125, 1996, pp. 10-32.
- Commission Decision 97/747/EC of 27 October 1997 "fixing the levels and frequencies of sampling provided for by Council Directive 96/23/EC for the monitoring of certain substances and residues thereof in certain animal products" O *J* L 303, 6.11.1997, p. 12.
- Council Directive 97/78/EC of 18 December 1997 "laying down the principles governing the organization of veterinary checks on products entering the Community from third countries and repealing Directive 90/675/EC" O J L 24, 30.1.1998, p. 9.
- Commission Decision 98/179/EC of 23 February 1998 "laying down detailed rules of official sampling for the monitoring of certain substances and residues thereof in live animals and animal products" O J L 65, 5.3.1998, p. 31.

- Directive 2001/82/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 "on the Community code relating to veterinary medicinal products" O J L 311, 28.11.2001, p. 1.
- 63. Commission Decision 2002/657/EC implementing Council Directive 96/23/EC "concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results" O J L 221, 2002, pp. 8-36.
- 64. Directive 2003/74/EC of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 "amending Council Directive 96/22/EC concerning the prohibition on the use of stockfarming of certain substances having a hormonal or thyrostatic action and of beta-agonists" O J L 262, **14.10.2003**, p. 17.
- 65. Regulation (*EC*) No 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 "on additives for use in animal nutrition" *O J* L 268, **18.10.2003**, p. 29.
- Commission Decision 2003/181/EC of 13 March 2003 "amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin" O J L 71, 15.3.2003, p. 17.
- Council Regulation (*EEC*) No 726/2004 of 31 March 2004 "laying down Community procedures for the authorization and supervision of medicinal products for human and veterinary use and establishing a European Medicinal Agency" O J L 136, 30.4.2004, p. 1.
- Commission Decision 2004/25/EC of 22 December 2003 "amending Decision 2002/657/EC as regards the setting of minimum required performance limits (MRPLs) for certain residues in food of animal origin" O J L 6, 10.1.2004, p. 38.
- Regulation (*EC*) No 882/2004 of the European Parliament and of the Council of 29 April 2004 "on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules" O J L 165, 30.4.2004, p. 1.
- Regulation (*EC*) No 183/2005 of the European Parliament and of the Council of 12 January 2005 "laying down requirements for food hygiene" O J L 35, 8.2.2005, p. 1.

- Commission Decision 2005/34/EC of 11 January 2005 "laying down harmonized standards for the testing for certain residues in products of animal origin imported from third countries" O J L16, 20.1.2005, p. 61.
- Regulation (*EC*) No 766/2006 of the European Parliament and of the Council of 19 May 2006 "establishing the standard import values for determining the entry price of certain fruit and vegetables" O J L 136, 24.5.2006, p. 3.
- Commission Decision 2006/130/EC of 10 February 2006 "amending Decision 98/536/EC establishing the list of national reference laboratories for the detection of residues" O J L 52, 23.2.2006, p. 25.
- 74. EFSA (European Food Safety Authority)

http://www.efsa.europa.eu/EFSA /efsa_locale-1178620753812_home.htm (Μάρτιος **2009**).

- WHO (World Health Organization), FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), Understanding the Codex Alimentarius, 3rd edition, 2006. ftp://ftp.fao.org/codex/Publications/understanding/Understanding_EN.pdf (Μάρτιος 2009).
- CAC (Codex Alimentarius Commission), "Codex Guidelines for the Establishment of a regulatory Programme for Control of Veterinary Drug Residues in Foods", CAC/GL 16-1993.

http://www.codexalimentarius.net/web/standard_list.do?lang=en (Μάρτιος 2009).

- CAC (Codex Alimentarius Commission), Procedural Manual, 17th edition, 2007. http://www.codexalimentarius.net/web/procedural_manual.jsp (Μάρτιος 2009).
- 78. Mycek MJ, Harvey RA, Champe PC, "Φαρμακολογία", εκδ. Παρισιανού, 2^η έκδ., Αθήνα, **1997**.
- Martinez-Carbalo E, Gonzalez-Barreiro C, Scharf S, Gans O, "Environmental monitoring study of selected veterinary antibiotics in animal manure and soils in Austria" *Environ Pollut* 2007;148:570-579.

- FEDESA (European Federation of Animals Health), "Antibiotics Use in Farm Animals does not threaten Human Health" FEDESA/FEFANA Press, Release, 13 Jul 2001 Brussels Belgium.
- 81. http://wikipedia.org/wiki/Antibiotic (Ιανουάριος 2014).
- Zuccato E, Calamari D, Natangelo M, and Fanelli R, "Presence of therapeutic drugs in the environment" *The Lancet*, **2000**;355:1789-1790.
- 83. Boxall ABA, Fogg LA, Blackwell PA, Kay P, Pemberton EJ, Croxford A, "Veterinary medicines in the environment" *Rev Env Contamin Toxicol* **2004**;180:1-91.
- 84. Jacobsen P, and Berglind L, "Persistence of oxytetracycline in sediments from fish farms" *Aquaculture* **1988**;70:365-370.
- Mc Dougall N, and Black KD, "Determining sediment properties around a marine cage farm using acoustic ground discrimination: RoxAnn[™] (the late)" Aquacul Res 1999;30:451-458.
- AMDUCA, "Fluoroquinolone and glykopeptide analysis of comments", Animal Medicinal Drug Use Clarification Act, Food and Drug Administration (FDA), USA, 1999.
- 87. Hutsvedt SO, Salte R, Benjaminsen T, "Rapid high-performance liquid chromatographic method for the determination of oxolinic acid in fish serum employing solid-phase extraction" *J Chromatogr* **1989**;494:335-339.
- Ikai Y, Oka H, Kawamura N, Yamada M, Harada K-I Suzuki M, Nakazaka H, "Improvement of chemical analysis of antibiotics XVI. Simple and rapid determination of residual pyridonecarboxylic acid antibacterials in fish using a prepacked amino cartridge" *J Chromatogr* 1989;477:397-406.
- Vega M, Rios G, Saelzer R, Herlitz E, "Analysis of quinolonic antibiotics by HPLTLC. Oxolinic acid residue analysis in fish tissue" *J Planar Chromatogr-Modern TLC* 1995;8(5):378-381.

- 90. Roudaut B, Yorke J-C, "High-performance liquid chromatographic method with fluorescence detector for the screening and quantification of oxolinic acid, flumequine and sarafoxacin in fish" *J Chromatogr B* 2002;780:481-485.
- Johnston L, Mackay L, Croft M, "Determination of quinolones and fluoroquinolones in fish tissue and seafood by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometric detection" *J Chromatogr A* 2002;982:97-109.
- Tyrpenou AE, Iossifidou EG, Psomas IE, Fotis GD, "Tissue distribution and depletion of sarafloxacin hydrochloride after in feed administration in gilthead seabream (*Sparus aurata* L)" Aquaculture 2003;215:291-300.
- 93. Rigos G, Nengas I, Alexis M, Tyrpenou AE, Troisi GM, "Tissue distribution and residue depletion of oxolinic acid in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and snarpsnout sea bream (*Diplodus puntazzo*) following multiple in-feed dosing" *Aquaculture* 2003;224:245-256.
- 94. Ramos M, Aranda A, Garcia E, Reuvers T, Hooghuis H, "Simple and sensitive determination of five quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection" *J Chromatogr B* 2003:789;373-381.
- Della Rocca G, Di Salvo A, Malvisi J, Sello M, "The disposition of enrofloxacin in sea bream (*Sparua aurata* L.) after single intravenous injection or from medicated feed administration" *Aquaculture* 2004;232:53-62.
- 96. Tyrpenou AE, Rigos G, "Determination of oxolinic acid residues in gilthead seabream (*Sparus aurata*) muscle tissue and plasma by high-performance liquid chromatography" *Chromatographia* **2004**;60:657-661.
- 97. Van Hoof N, De Wasch K, Okerman L, Reybroeck W, Poelmans S, Noppe H, De Brabander H, "Validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometric method for the quantification of eight quinolones in bovine muscle, milk and aquacultured products" *Anal Chim Acta* 2005;529:265-272.

- 98. Samanidou V, Evaggelopoulou E, Trötzmüller M, Guo X, Lankmayr E, "Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J Chromatogr A* **2008**;1203:115-123.
- Paschoal JAR, Reyes FGR, Rath S, "Quantitation and identity confirmation of residues of quinolones in tilapia fillets by LC-ESI-MS-MS QToF" Anal Bioanal Chem 2009;394(8):2213-2221.
- 100. Dordević V, Baltić M, Ćirković M, Kilibarda N, Glamoćlija N, Stefanović S, and Miścević M, "Quantitative and qualitative determination of enrofloxacin residues in fish tissue" Acta Veterinaria (Beograd) 2009;59(5–6);579-589.
- 101. Paschoal JAR, Reyes FGR, and Rath S, "Determination of quinolone residues ini tilapias (*Orechromis niloticus*) by HPLC-FLD and LC-MS/MS QToF" *Food Add & Contamin: Part A* 2009;26(10):1331-1340.
- 102. Pearce JN, Burns BG, van de Riet JM, Casey MD & Potter RA "Determination fo fluorquinolones in aquaculture products by ultra-performance liquid chromatographytandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS)" Food Add & Contamin: Part A 2009;26(1):39-46.
- 103. Danyi S, Widart J, Douny C, Dang PK, Baiwir D, Wang N, Tu HT, Tung VT, Phuong N-T, Kestemont P, Scippo M-L "Determination and kinetics of enrofloxacin and ciprofloxacin in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*) and giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) using a liquid chromatography/mass spectrometry method" *J Vet Pharmacol Therap* 2011;14(2):142-152.
- 104. Evaggelopoulou EN, Samanidou VF, Michaelidis B, Papadoyannis I "Development and validation of an LC-DAD method for the routine analysis of residual quinolones in fish edible tissues and fish feed. Application to farmed gilthead sea bream following dietary administration" *J Liq Chromatogr & Rel Technol* 2014;37(15):2142-2161.
- 105. Paschoal JAR, Quesada SP, Gonçalves LU, Cyrino JEP, and Reyes FGR, "Depletion study and estimation of the withdrawal period for enrofloxacin in pacu (*Piaractus mesopotamicus*)" J Vet Pharmacol Therap **2013**;36(6):594-602.

- 106. Quesada SP, Paschoal JAR, and Reyes FGR, "A simple method for the determination of fluoroquinolone residues in tilapia (*Orechromis niloticus*) and pacu (*Piaractus mesopotamicus*) employing LC-MS/MS QToF" Food Add & Contamin: Part A 2013;30(5):813-825.
- 107. Stoilova NA, Surleva AR, and Stoev G, "Simultaneous determination od nine quinolones in food by liquid chromatography with fluorescence detection" *Food Anal Methods* **2013**;6:803-813.
- 108. Agasöster T, Rasmussen KE, "On-line dialysis, liquid chromatography and postcolumn reaction detection of oxytetracycline in salmon muscle extracts" *J Pharm Biomed Anal* **1992**;10:349-354.
- 109. Iwaki K, Okumura N, Yamazaki M, "Determination of oxytetracycline antibiotics by reversed-phase high performance liquid chromatography with fluorescence detection" *J Chromatogr* **1992**;623:155-158.
- 110. Malvisi J, Della Rocca G, Anfossi P, Giorgetti G, "Tissue distribution and residue depletion of oxytetracycline in sea bream (*Sparus aurata*) and sea bass (Dicentrarchus labrax) after oral administration" *Aquaculture* **1996**;147:159-168.
- 111. Cooper AD, Stubbings GWF, Kelly M, Tarbin JA, Farrington WHH, Shearer G, "Improved method for the on-line metal chelate affinity chromatography-high performance liquid chromatographic determination of tetracycline antibiotics in animal products" *J Chromatogr A* **1998**;812:321-326.
- Meinertz JR, Stehly GR, Gengerich WH, "Liquid chromatographic determination of oxytetracycline in edible fish fillets from six species of fish" *J AOAC Int* **1998**;81:702-708.
- 113. Nakazawa H, Ino S, Kato K, Watanabe T, Ito Y, Oka H, "Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry" *J Chromatogr B* 1999;732:55-64.
- 114. Bebak-Williams J, Bullock G, Carson MC, "Oxytetracycline residues in a freshwater recirculating system" *Aquaculture* **2002**;205:221-230.
- 115. Pena AL, Lino CM, and Silveira MIN, "Determination of tetracycline antibiotics in salmon muscle by liquid chromatography using post-column derivatization with fluorescence detection" *J AOAC Int* **2003**;86:925-929.
- 116. Rupp HS, Anderson CR, "Determination of oxytetracycline in salmon by liquid chromatography with metal-chelate fluorescence detection" *J AOAC Int* **2005**;88;505-510.
- 117. Wen Y, Wang Y, Feng Y-Q, "Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography" *Talanta* **2006**;70:153-159.
- 118. Miller RA, Reimschuessel R, Carson MC, "Determination of oxytetracycline levels in rainbow trout serum on a biphenyl column using high-performance liquid chromatography" J Chromatogr B 2007;852:655-658.
- 119. Ikai Y, Oka H, Kawamura N, Hayakawa J, Yamada M, Harada K, Suzuki K, Nakazawa H, "Improvement of chemical analysis of antibiotics XVII. Application of an amino cartridge to the determination of residual sulphonamide antibacterials in meat, fish and egg" *J Chromatogr* **1991**;541:393-400.
- 120. Pleasance S, Blay P, Quilliam MA, O'Hara G, "Determination of sulfonamides by liquid chromatography, ultraviolet diode array detection and ion-spray tandem mass spectrometry with application to cultured salmon flesh" *J Chromatogr* **1991**;558:155– 173.
- 121. Hormazabal V, Rogstad A, "Simultaneous determination of sulphadiazine and trimethoprim in plasma and tissues of cultured fish for residual and pharmacokinetic studies" *J Chromatogr* **1992**;583:201-207.
- 122. Zheng M, Liu HY, Hall SF, Kitts DD, McErlane KM, "High-performance liquid chromatographic analysis of Romet-30 in Chinook salmon (Oncorhynhus tshawytscha): wash-out time, tissue distribution in muscle, liver and skin, and metabolism of sulfadimethoxine" *J Chromatogr A* **1994**;670:77-88.
- 123. Gehring TA, Rushing LG, Churchwell MI, Doerge DR, McErlane KM, Thompson HC, "HPLC determination of sulfadiazine residues in coho salmon (*Oncorhynhus kisutch*)

with confirmation by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry" *J Agric and Food Chem* **1996**;44:3164-3169.

- 124. Ueno R, Sangrungruang K, Miyakawa M, "A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography" *Food Res Int* **1999**;32:629-633.
- 125. Papapanagiotou EP, Iossifidou EG, Psomas IE, Photis G, "Simultaneous HPLC determination of sulfadiazine and trimethoprim in cultured gilthead sea bream (*Sparus aurata* L) tissues" *J Liq Chromatogr and Rel Technol* **2000**;23:2839-2849.
- 126. Bogialli S, Curini R, Di Corcia A, Nazzari M, and Samperi R, "A liquid chromatography-mass spectrometry assay for analyzing sulfonamide antibacterials in cattle and fish tissues" *Anal Chem* **2003**;75:1798-1804.
- 127. Gehring TA, Griffin B, Williams R, Geiseker C, Rushing LG, Siitonen PH, "Multiresidue determination of sulfonamides in edible catfish, shrimp and salmon tissues by high-performance liquid chromatography with post column derivatization and fluorescence detection" *J Chromatogr B* 2006;840:132-138.
- 128. Ueno R, Sangrungruang K, Miyakawa M, "A simplified method for the determination of several fish drugs in edible fish and shrimp by high-performance liquid chromatography" *Food Res Int* **1999**;32:629-633.
- 129. Hernando MD, Mezcua M, Suárez-Barcena JM, Fernández-Alba AR, "Liquid chromatography with time-of-flight mass spectrometry for simultaneous determination of chemotherapeutant resdues in salmon" *Anal Chim Acta* 2006;562:176-184.
- 130. Romero-González R, López-Martínez JC, Gómez-Milán E, Garrido-Frenich A, Martínez-Vidal JL, "Simultaneous determination of selected veterinary antibiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*) by liquid chromatography-mass spectrometry" *J Chromatogr B* 2007;857:142-148.
- 131. Schneider MJ, Darwish AM, Freeman DW, "Simultaneous multiresidue determination of tetracyclines and fluoroquinolones in catfish muscle using high performance liquid chromatography with fluorescence detection" *Anal Chim Acta* **2007**;586:269-274.

- 132. Smith S, Gieseker C, Reimschuessel R, Decker C-S, Carson M, "Simultaneous screening and confirmation of multiple classes of drug residues in fish by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry" *J Chromatogr A* **2009**;1216:8224-8232.
- 133. Peters RJB, Bolck YJC, Rutgers P, Stolker AAM, Nielen MWF, "Multi-residue screening of veterinary drugs in egg, fish and meat using high-resolution liquid chromatography accurate mass time-of-flight mass spectrometry" *J Chromatogr A* 2009;1216:8206-8216.
- 134. Fernandez-Torres R, Bello-Lopez MA, Consentino MO, Mochon MC, Perez-Bernal JL, "Application of enzymatic probe sonication extraction for the determination of selected veterinary antibiotics and their main metabolites in fish and mussel samples" Anal Chim Acta 2010;675:156-164.
- 135. Cháfer-Pericás C, Maquieira Á, Puchades R, Company B, Miralles J, Moreno A, "Multi residue determination of antibiotics in aquaculture fish samples by HPLC-MS/MS" Aquaculture Research 2010;41:e217-e225.
- 136. Dasenaki ME, Thomaidis NS, "Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques" *Anal Chim Acta* 2010;672:93-102.
- 137. Fernandez-Torres R, Bello-Lopez MA, Consentino MO, Mochon MC, Payan MR, "Enzymatic-microwave assisted extraction and high-performance liquid chromatography–mass spectrometry for the determination of selected veterinary antibiotics in fish and mussel samples" *J Pharm Biomed Anal* **2011**;54:1146-1156.
- 138. Tsai C-W, Lin C-S, Wang W-H, "Multi-residue determination of sulfonamide and quinolone residues in fish tissues by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)" *J Food Drug Anal* **2012**;20:674680.
- 139. Tang YY, Lu HF, Lin HY, Shin YC, Hwang DF "Development of a quantitative multiclass method for 18 antibiotics in chicken, pig, and fish muscle using UPLC-MS/MS" *Food Anal Methods* **2012**;5:1459-1468.

- 140. Fedorova G, Nebesky V, Randak T, Grabic R, "Simultaneous determination of 32 antibiotics in aquaculture products using LC-MS/MS" *Chem Papers* 2014;68(1):29-36.
- 141. Kinsella B, O'Mahony J, Malone E, Moloney M, Cantwell H, Furey A, Danaher M,
 "Current trends in sample preparation for growth promoter and veterinary drug residue analysis" (*REVIEW*) J Chromatogr A 2009;1216:7977-8015.
- 142. Kaufmann A, Butcher P, Maden K, Widmer M, "Quantitative multi-residue method for about 100 veterinary drugs in different meat matrices by sub 2-μm particulate highperformance liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry" J Chromatogr A 2008;1194:66-79.
- 143. Barker SA, Long AL, Short CR, "Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion" *J Chromatogr* **1989**;475:353-361.
- 144. Camel V, "Recent extraction techniques for solid matrices–Supercritical fluid extraction, pressurized fluid extraction and microwave-assisted extraction: Their potential and pitfalls" *Analyst* **2001**;126:1182-1193.
- 145. Zougagh M, Valcarcel M, Rios A, "Supercritical fluid extraction: A critical review of its analytical usefulness" *Trend Anal Chem* **2004**;23:399-405.
- 146. Hedrick JL, Mulcahey LJ, Taylor LT, "Supercritical fluid extraction" *Mikrochim Acta* **1992**;108:115-132.
- 147. Anastassiades M, Lehotay SJ, Stajnbaher D, Schenck FJ, "Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce" J AOAC Int 2003;86:412-431.
- 148. Kinsella B, Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, Furey A, Danaher M, "New method for the analysis of flukicide and other anthelmintic residues in bovine milk and liver using liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Anal Chim Acta* **2009**;637:196-207.
- 149. Stubbings G, Bigwood T, "The development and validation of a multiclass liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) procedure for the

determination of veterinary drug residues in animal tissue using a QuECHERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) approach" *Anal Chim Acta* **2009**;637:68-78.

- 150. Posyniak A, Zmudzki J, Mitrowska K, 25th International Symposium on *Chromatography*, Paris, France, **2004**, p. 259.
- 151. Lehotay SJ, Mastovska K, Yun SJ, "Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices" *J AOAC Int* **2005**;88:630-638.
- 152. Fagerquist CK, Lightfield AR, Lehotay SJ, "Confirmatory and quantitative analysis of β-lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *Anal Chem* **2005**;77:1473-1482.
- 153. Mastovska K, Lehotay SJ, "Rapid sample preparation method for LC-MS/MS or GC-MS analysis of acrylamide in various food matrices" *J Agric Food Chem* 2006;54:7001-7008.
- 154. Plössl F, Giera M, Bracher F, "Multiresidue analytical method using dispersive solidphase extraction and gas/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood" *J Chromatogr A* **2006**;1135:19-26.
- 155. Pan C, Zhang H, Chen S, Xu Y, Jiang S, "Determination of chloramphenicol residues in honey by monolithic column liquid chroamtography-mass spectrometry after use of quechers clean-up" *Acta Chromatogr* **2006**;17:320-327.
- 156. Lehotay SJ, O'Neil M, Tully J, García AV, Contreras M, Mol H, Heinke V, Anspach T, Lach G, Fussel R, Mastovska K, Poulsen ME, Brown A, Hammack , Cook JM, Alder L, Lindtner K, Vila MG, Hopper M, De Kok A, Hiemstra M, Schenck F, Williams A, Parker A, "Determination of pesticide residues in foods by acetonitrile extraction and partitioning with magnesium sulfate: Collaborative stydy" *J AOAC Int* **2007**;90:485-520.
- 157. Nguyen TD, Lee BS, Lee BR, Lee DM, Lee GH "Multiresidue method for the determination of 109 pesticides in rice using the quick easy cheap effective rugged and safe (QuEChERS) sample preparation method and gas chromatography/mass

spectrometry with temperature control and vacuum concentration" *Rapid Commun Mass Spectrom* **2007**;21:3115-3122.

- 158. Paya P, Anastassiades M, Mack D, Sigalova I, Tasdelen B, Oliva J, Barba A, "Analysis of pesticide residues using the Quick Easy Cheap Effective Rugged and Safe (QuECHERS) pesticide multiresidue method in combination with gas and liquid chromatography and tandem mass spectrometric detection" *Anal Bioanal Chem* **2007**;389:1697-1714.
- 159. Thompson TS, van der Heever JP, Noot DK *Proceedings of the EuroResidue VI Conference*, Egmond van Zee, The Netherlands, **2008**, p. 549.
- 160. Anguilera-Luiz MM, Vidal JLM, Romero-González, Frenrich AG, "Multi-residue determination of veterinary drugs in milk by ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J Chromatogr A* **2008**;1205:10-16.
- 161. Plössl F, Giera M, Bracher F, "Multiresidue analytical method using dispersive solidphase extraction and gas/ion trap mass spectrometry to determine pharmaceuticals in whole blood" *J Chromatogr A* **2006**;1135:19-26.
- 162. Zhao Limian, Stevens J, "Determination of sulfonamide antibiotics in bovine liver using Agilent sampliQ QuEChERS EN Kits by LC/MS/MS", Agilent Application Note, 5990-4975EN.
- 163. Lehotay SJ, Mastovska K, Lightfield AR, "Evaluation of two fast and easy methods for pesticide residue analysis in fatty food matrices" *J AOAC Int* **2005**;88:615-629.
- 164. European Committee for Standardization/Technical Committee CEN/TC 275, "Foods of plant origin: Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS-MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dirpersive SPE– QuEChERS method" *European Committee for Standardization*, Brussels, **2007**.
- 165. Kou D, Mitra S, "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry", Department of Chemistry and Environmental Science, New Jersey Institute of Technology, WILEY-INTERSCIENCE, A JOHN WILEY & SONS, INC, PUBLICATION, p.140-163, Chapter 3, 2003.

- 166. Pawliszyn J "Theory of solid-phase microextraction" *J Chromatogr Sci* **2000**;38(7):270-278.
- 167. Carabias-Martinez R, Rodriguez-Gonzalo E, Revilla-Ruiz P, Hernandez–Mendez J, "Pressurized liquid extraction in the analysis of food and biological samples" J Chromatogr A 2005;1089:1-17.
- 168. EPA (Environmental Protection Agency) publication SW-846, "Test Methods for Evaluating Solid Waste: Physical/Chemical Methods"

www.epa.gov/epaoswer/hazwaste/test/sw846.htm (Φεβρουάριος 2010).

- 169. ASE 200 Accelerated Solvent Extractor Operator's Manual, Dionex Corporation, **1999**.
- 170. "Extraction of Drugs from Animal Feeds Using Accelerated Solvent Extraction A (ASE)", *Application Note 326*, Dionex Corporation, **2000**.
- 171. "Methods Optimization in Accelerated Solvent Extraction (ASE)", *Application Note 208*, Dionex Corporation, **2004**.
- 172. Richter BE, Jones BA, Ezell JL, and Porter NL, "Accelerated solvent extraction: A technique for sample preparation" *Anal Chem* **1996**;68:1033-1039.
- 173. Richter BE, "The extraction of analytes from solid samples using accelerated solvent extraction" *LC-GC* **1999**;17:S22-S28.
- 174. Schafer K, "Accelerated solvent extraction of lipids for determining the fatty acid composition of biological material" *Anal Chim Acta* **1998**;358(1):67-77.
- 175. Toschi TG, Bendini A, Ricci A, Lercker G, "Pressurized solvent extraction of total lipids in poultry meat" *Food Chem* **2003**;83:551-555.
- 176. Ullah SMR, Murphy B, Dorich B, Richter B, Srinivasan K, "Fat extraction from acidand base- hydrolyzed food samples using Accelerated Solvent Extraction" J Agric Food Chem 2011;59:2169-2174.
- 177. Nieto A, Borrull F, Marcé RM, Pocurull E, "Selective extraction of sulfonamides, macrolides and other pharmaceuticals from sewage sludge by pressurized liquid extraction" *J Chromatogr A* 2007;1174:125-131.

- 178. Göbel A, Thomsen A, McArdell CS, Alder AC, Giger W, Theiβ N, Löffler D, Ternes TA, "Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge" *J Chromatogr A* **2005**;1085:179-189.
- 179. Díaz-Cruz MS, de Alda MJ López, Barceló D, "Determination of antimicrobials in sludge from infiltration basins at two artificial recharge plants by pressurized liquid extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J Chromatogr A* 2006;1130:72-82.
- 180. Barron L, Tobin J, Paull B, "Multi-residue determination of pharmaceuticals in sludge and sludge enriched soils using pressurized liquid extraction, solid phase extraction and liquid chromatography with tandem mass spectrometry" *J Environ Monit* 2008;10:353-361.
- 181. Jacobsen AM, Halling-Sørensen B, Ingerslev F, Hansen SH, "Simultaneous extraction of tetracycline, macrolide and sulfonamide antibiotics from agricultural soils using pressurized liquid extraction, followed by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J Chromatogr A* 2004;1038:157-170.
- 182. Stoob K, Singer HP, Stettler S, Hartmann N, Mueller SR, Stamm CH, "Exhaustive extraction of sulfonamide antibiotics from aged agricultural soils using pressurized liquid extraction" *J Chromatogr* A **2006**;1128:1-9.
- 183. Lillenberg M, Yurchenko S, Kipper K, Herodes K, Pihl V, Sepp K, Lõhmus R, Nei L, "Simultaneous determination of fluoroquinolones, sulfonamides and tetracyclines in sewage sludge by pressurized liquid extraction and liquid chromatography electrospray ionization-mass spectrometry" *J Chromatogr A* **2009**;1216:5949-5954.
- 184. Jelić A, Petrović M, Barceló D, "Multi-residue method for trace level determination of pharmaceuticals in solid samples using pressurized liquid extraction followed by liquid chromatography/quadrupole-linear ion trap mass spectrometry" *Talanta* 2009;80:363-371.
- 185. Higgins HC, McEvoy JDG, "Accelerated solvent extraction of animal feedingstuffs for microbial growth inhibition screening for the presence of antimicrobial feed additives" *Food Addit Contam* **2002**;19:819-828.

- 186. Pecorelli I, Galarini R, Bibi R, Floridi A, Casciarri E, Floridi A, "Simultaneous determination of 13 quinolones from feeds using accelerated solvent extraction and liquid chromatography" *Anal Chim Acta* **2003**;483:81-89.
- 187. Gentili A, Perret D, Marchese S, Sergi M, Olmi C, Curini R, "Accelerated Solvent Extraction and confirmatory analysis of sulfonamide residues in raw meat and infant foods by liquid-chromatography electrospray tandem mass spectrometry" *J Agric Food Chem* **2004**;52:4614-4624.
- 188. Font G, Juan-Garcia A, Pico Y, "Pressurized liquid extraction combined with capillary electrophoresis-mass spectrometry as an improved methodology for the determination of sulfonamide residues in meat" J Chromatogr A 2007;1159:233-241
- 189. Blasco C, Corcia AD, Picó Y, "Determination of tetracyclines in multie-specie animal tissues by pressurized liquid extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry" *Food Chem* **2009**;116:1005-1012.
- 190. Herranz S, Moreno-Bondi MC, Marazuela MD, "Development of a new sample pretreatment procedure based on pressurized liquid extraction for the determination of fluoroquinolone residues in table eggs" *J Chromatogr A* **2007**;1140:63-70.
- 191. Berrada H, Borrull F, Font G, Marcé RM, "Determination of macrolide antibiotics in meat and fish using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry" J Chromatogr A 2008;1208:162-173.
- 192. Carretero V, Blasco C, Pico Y, "Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry" *J Chromatogr A* 2008;1209:162-173.
- 193. Kebarle P, Tang L, "From ions in solution to ions in the gas phase: The mechanism of electrospray mass spectrometry" *Anal Chem* **1993**;65:972A-986A.
- 194. Clarke SD, Hill HM, Noctor TAG, Thomas D, "Matrix-related modification of ionization in bioanalytical liquid chromatography-atmospheric pressure ionization tandem mass spectrometry" *Pharm Sci* **1996**;2:203-207.

- 195. Buhrman D, Price P, Rudewicz P, "Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography-tandem mass spectrometry: A study of ion suppression" *J Am Soc Mass Spectrom* **1996**;7:1099-1105.
- 196. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM, "Matrix effects in quantitative LC-MS-MS analysis of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at pg/nl concentrations" *Anal Chem* 70 **1998**;5:882-889.
- 197. Fu I, Woolf EJ, Matuszewski BK, "Effect of the sample matrix on the determination of indinavir in human urine by HPLC with turbo ion spray tandem mass spectrometric detection" *J Pharm Biom Anal* **1998**;18:347-357.
- 198. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng, "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS-MS" Anal Chem 2003;75:3019-3030.
- 199. FDA (Food and Drug Administration), "Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation", Federal Register, **2001**;66(100), p. 285.
- 200. Shah VP, Midha KK, Findlay JWA, Hill HM, Hulse JD, McGilveray IJ, McKay G, Miller KJ, Patnaik RN, Poewll ML, Tonelli A, Viswanathan CT, Yacobi A, "Bioanalytical method validation-A revisit with a decade of progress" *Pharm Res* 2000;17(12):1551-1557.
- 201. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T, "Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization" *J Am Soc Mass Spectrom* **2000**;11:942-950.
- 202. Reilly PTA, Lazar AC, Gieray RA, Whitten WB, Ramsey JM, "The elucidation of charge-transferred-induced matrix effects in environmental aerosols via real-time aerosol mass spectral analysis of individual airborne particles" *Aerosol Sci Tech* 2000;33:135-152.
- 203. Antignac JP, de Wasch K, Monteau F, de Brabander H, Andre F, Le Bizec B, "The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis" *Anal Chim Acta* **2005**;529:129-136.

- 204. Kruve A, Künnapas A, Herodes K, Leito I, "Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid-chromatography-mass spectrometry" *J Chromatogr A* **2008**;1187:58-66.
- 205. Annesley TM, "Ion suppression in mass spectrometry" *Clin Chem* **2003**;49:1041-1044.
- 206. Pucci V, Di Palma S, Alfieri A, Bonelli F, Monteagudo E, "A novel strategy for reducing phospholipids-based matrix effect in LC-ESI-MS bioanalysis by means of HybridSPE" *J Pharmac Biomed Anal* **2009**;50:867-871.
- 207. Mei H, Hsieh Y, Nardo C, Xu X, Wang S, Ng K, Korfmacher WA, "Investigation of matrix effects in bio-analytical high performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: Application to drug discovery" *Rapid Commun Mass Spectrom* 2003;17:97-103.
- 208. Gustavsson SA, Samskog J, Markides LE, Langström B, "Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents" *J Chromatogr A* **2001**;937:41-47.
- 209. Holcapek M, Volna K, Jandera P, Kolarova L, Lemr K, Exner M, Cirkva A, "Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermadiates" *J Mass Spectrom* 2004;39:43-50.
- 210. Mallet CR, Lu Z, Mazzeo JR, "A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts" *Rapid Commum Mass Spectrom* **2004**;18:49-58.
- 211. Eshraghi J, Chowdhury SK, "Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry" *Anal Chem* **1993**;65:3528-3533.
- 212. Apffel A, Fischer S, Goldberg G, Gooley PC, Kuhlmann FE, "Enhanced sensitivity for peptide mapping with electrospray liquid chromatography-mass spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases" *J Chromatogr A* **1995**;712:177-190.

- 213. van Eeckhaut A, Lanckmans K, Sarre S, Smolders I, Michotte Y, "Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects" *REVIEW J Chromatogr B* 2009;877:2198-2207.
- 214. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ, "The effect of signal suppression and mobile phase composition on the simultaneous analysis of multiple classes of acidic/neutral pharmaceuticals and personal care products in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-negative electrospray tandem mass spectrometry" *Talanta* **2008**;74:1299-1312.
- 215. Marchi I, Rudaz S, Veuthey JL, "Sample preparation development and matrix effects evaluation for multi-analyte determination in urine" *J Pharmac Biomed Anal* **2009**;49:459-467.
- 216. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL, "Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures" *J Chromatogr A* **2004**;1058:61-66.
- 217. Matuszewski BK, "Standard line slopes as a measure of a relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis" *J Chromatogr B* **2006**;830:293-300.
- 218. Verdon E, Hurtaud-Pessel D, Sanders P, "Comparability and reliability in chemical measurement" *Accred Qual Assur J for Qual* **2006**;11:58-62.
- 219. ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/007/w8420e/w8420e00.pdf (Σεπτέμβριος 2009).
- 220. Desimoni E, "About CC_{α} and CC_{β} as introduced by the Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC" Accred Qual Assur **2004**;9:724-725.
- 221. *ISO* 17025: **2005 (2nd ed.)** "General Requirement for the Competence of Calibration and Testing Laboratories".
- 222. ISO 5725:1994 Accuracy (Trueness and Precision) of Measurement Methods and Results-Part 1: "General Principles and Definitions"; ISO 5725-2 Part 2: "Basic Method for the Determination of Repeatability and Reproducibility of a Standard Measurement Method"; Part 4: "Basic Methods for the Determination of the Trueness of a Standard Measurement Method".

- 223. Antignac JP, Le Bizec B, Monteau F, Andre F, "Validation of analytical methods based on mass spectrometric detection according to the 2002/657/EC European decision: guideline and application" *Anal Chim Acta* **2002**;224(145):1-10.
- 224. Verdon E, Hurtaud-Pessel, Sanders P, "Evaluation of the limit of performance of an analytical method based on a statistical calculation of its critical concentrations according to ISO standard 11843: Application to routine control of banned veterinary drug residues in food according to European Decision 657/2002/EC" *Accred Qual Assur* **2006**;11:58-62.
- 225. /SO 11843, "Capability of Detection-Part 1: Terms and definitions", 1997.
- 226. ISO 11843-2, "Capability of Detection-Part 2: Methodology in the Linear Calibration Case", **2000**.
- 227. FDA (Food and Drug Administration), "Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation", US Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research, Rockville, **2001**.
- 228. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, "Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods", Resolution-RE n. 899, **2003**.
- 229. *EMA* (*European Medicines Agency*), "Guideline on Validation of Bioanalytical Methods", Committee for Medicinal Products for Human Use, London, **2009**.
- 230. Παππάς Ι, "Κτηνιατρική Φαρμακολογία", Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Θεσσαλίας,2004, σ. 332.
- 231. Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA, "A global perspective on the sales exposures pathways, occurrence, fate and effect of veterinary antibiotics in the environment" *Chemosphere* **2006**;65:725-759.
- 232. Sukul P, and Spiteller M, "Sulfonamides in the environment as veterinary drugs" *Rev Environ Contam Toxicol* **2006**;187:67-101.
- 233. Bryskier A, "Antimicrobial Agents Antibacterial and Antifungals", edited by ASM, USA, **2005**, pp. 13-35.

- 234. Hela W, Brandtner M, Widek R, and Schuh R, "Determination of sulfonamides in animal tissues using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection" *Food Chemistry* **2003**;83:601-608.
- 235. Boxall ABA, Blackwell P, Cavallo R, Kay P, and Tolls J, "The sorption and transport of a sulfonamide antibiotic in soil systems" *Toxicol Let* **2002**;131:19-28.
- 236. Collins-Thompson DL, Wood DS, and Thompson IQ "Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North America using the Charm test II procedure" *J Food Protect* **1988**;8:632-650.
- 237. Connor EE, "Sulfonamides Antibiotics", Honorable mention paper, Primary Care Update for OB/GYNS 5:32-35, **1998**.
- 238. Vree TB and Hekster YA, "Clinical pharmacokinetics of sulfonamides and their metabolites", *In: Antibiotics and Chemotherapy*, Vol. 37, Karger, **1987**.
- 239. Nouws JFM, Mevius D, Vree TB, and Degen M, "Pharmacokinetics and renal clearance of sulphadimidine, sulphamerazine and sulphadiazine and their N4-acetyl and hydroxyl metabolites in pigs" *Vet Quart* **1989**;11:78-86.
- 240. Sakurai H, Ishimitsu T, "Microionization constants of sulphonamides" *Talanta* **1980**;27:293-298.
- 241. Thiele-Brun and Aust M-O, "Effects of pig slurry on the sorption of sulfonamide antibiotics in soil" *Arch Environ Con Tox* **2004**;47:31-39.
- 242. Martínez F, and Gómez A, "Thermodynamics of partitioning of some sulfonamides in 1-octanol-buffer and liposome systems" *J Phys Org Chem* **2002**;15:874-880.
- 243. Moffat AC (editor), "Clarke's Isolation and Identification of Drugs", The Pharmaceutical Press, 2nd edition, **1986**.
- 244. Winckler C and Grafe A, "Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtrigung verschiedener Böden. Umweltbundesamt", Berlin, 2000.
- 245. Krüger-Thiemer E and Bünger P, "Evaluation of the risk of crystalluria with sulpha drugs" *Proc Eur Soc Study Drug Toxic* **1965**;6:185-207.

- 246. Brown SA, "Pharmacokinetics", *In* Adams HR (editor), "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Iowa State Press, 8th edition, **2001**.
- 247. Holford NHG, and Benet LZ, "Pharmacokinetics & Pharmacodynamics: Rarional Cose Selection & the Time Course of Drug Action", *In*: Katzung BG (ed.) Basic and Clinical Pharmacology, Prentice-Hall International, Inc, USA, **1995**, pp. 33-47.
- 248. Brown SA, "Pharmacokinetics", *In* Adams HR (editor), "Veterinary Pharmacology and Therapeutics" Iowa State Press, 8th edition, **2001**.
- 249. Benet LZ, Kroetz DL, and Sheiner LB, "Pharmakokinetik", *In* Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A, Molinoff PB, and Ruddon RW (editors) *Goodman & Gilman:*"Pharmakologische Grundlagen der Arzneimitteltherapie" McGraw-Hill International, 9th edition, **1998**.
- 250. Frey H-H, "Allgemeine Pharmakologie", *In* Frey H-H and Löscher W (editors)
 "Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie", Enke Verlag, Stuttgart, 2nd edition,
 2002.
- 251. EMEA, Sulphonamides, Summary Report (2), Committee for Veterinary Medicinal Products/The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products, EMEA/MRL/026/95, **1995b**.
- 252. EMEA, Trimethoprim, Summary Report (2), Committee for Veterinary Medicinal Products/The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products, Committee for Veterinary Medicinal Products, EMEA/MRL/255/97FINAL, **1997**.
- 253. Baggot JD, "Principles of Drug Disposition in Domestic Animals", Saunders, 1977.
- 254. Ingebrigsten K, "Factors Affecting Drug Disposition in Fish", *In*: Christian F, Gyrdhansen N, Nielsen N, Rasmussen F (editors) *Proceedings of the 5th Congress of the European Association for Veterinary Pharmacology and Toxicology, ACTA Veterinaria Scandinavica*, Copenhagen, Denmark, **1991**.
- 255. Schneider J, "Problems related to the usage of veterinary drugs in aquaculture-a review" Quim Anal **1994**;Suppl. 1: S34-S42.

- 256. Schwedler TE, and Johnson SK, "Animal Welfare Issues: Responsible care and health maintenance of fish in commercial aquaculture", *In*: Reynnells RD & Eastwood BR (eds), Animal Welfare Issues Compendium, A Collection of 14 Discussion Papers, Cooperative State Research, US Department of Agriculture, **1997**.
- 257. Rowland M & Tozer TN, "Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications", 3rd edition, Williams & Wilkins, Baltimore, MD, USA, **1995**.
- 258. Toutain PL, and Bousquet-Mélou A, "Plasma clearance" *J Vet Pharm Therap*, **2004a**;27(6):415-425.
- 259. Toutain PL, and Bousquet-Mélou A, "Volumes of distribution" *J Vet Pharm Therap*, **2004c**;27(6):441-453.
- 260. Toutain PL, and Bousquet-Mélou A, "Plasma terminal half-life" *J Vet Pharm Therap*, **2004b**;27(6):427-439.
- 261. Nightingale CH, and Murakawa T, "Microbiology and Pharmacokinetics", *In*: "Antimicrobial Pharmacodynamics in Theory and Clinical Practice", 1st edition, Nightingale CH, Murakawa T, and Ambrose PG (eds), **2002**, pp. 23-39, Marcel Dekker AG, Basel, Switzerland.
- 262. Bedenić B, Beader N, and Žagar Ž, "Effect of inoculums size on the antibacterial activity of cefpirome and cefepime against *Klebsiella pneumonia* strains producing SHV extended-spectrum β-lactamases" *Clin Microbiol Infect* **2001**;7(11):626-635.
- 263. Boswell FJ, Ashby JP, Andrews JM, and Wise R, "Effect of protein binding on the *in vivo* activity and pharmacodynamics of faropenem" *J Antimicrobiol Chemother* 2002;50(4):525-532.
- 264. Craig WA, "Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: Rationale for antibacterial dosing of mice and men" *Clin Inf Dis* **1998**;26(1):1-12.
- 265. Costello MJ, Grant A, Davies IM, Cecchini S, Papoutsoglou S, Quingley D, and Saroglia M, "The control of chemicals used in aquaculture in Europe" *J Appl Icthyol* 2001;17:173-180.

- 266. Horsberg E, Martinsen B, Sandersen K, and Zernichow L, "Potentiated sulfonamides: *in vitro* inhibitory effect and pharmacokinetic properties in Atlantic salmon in seawater" *J Aqua Anim Health* **1997**;9:20-210.
- 267. Gibson GG, and Skett P, "Introduction to Drug Metabolism", London New York, Chapman and Hall.
- 268. Vree TB, Schoondermark-van de Ven E, Verwey-van Wissen CPWGM, Baars AM, Swolfs A, Van Galen PM, Amatdjais-Groenen H, "Isolation, identification and determination of sulfadiazine and its hydroxy metabolites and conjugates from man and Rhesus monkey by high-performance liquid chromatography" *J Chromatogr B* **1995**;670:111-123.
- 269. Vree TB, Kolmer E, Martea M, Bosch R, Shimoda M, "High-performance liquid chromatography of sulphadimethoxine and its N^1 -glucuronide, N^4 -acetyl and N^4 -acetyl- N^1 -glucuronide metabolites in human plasma and urine" *J Chromatogr B* **1990**;526:119-128.
- 270. Vree TM and Hekster YA, "Pharmacokinetics of sulfonamides revisited", *In Antibiotics and Chemotherapy*, Vol. 34 Karger, **1985**.
- 271. Lamshöft M, Sukul P, Zühlke S, Spiteller M, "Metabolism of ¹⁴C-labeled and nonlabeled sulfadiazine after administration to pigs" *Anal Bioanal Chem* **2007**;388:1733-1745.
- 272. Woolley JL, Sigel CW, "Metabolism and disposition by the rat of ³⁵S-sulfadiazine alone and in the presence of trimethoprim" *Drug Metab Dispos* **1979**;7(2):94-99.
- 273. Woolley JL, Sigel CW, Wels CM, "Novel deaminated sulfadiazine metabolites in neonatal calf tissue, plasma, and urine following oral treatment with ¹⁴C-sulfadiazine" *Life Sci* **1980**;27:1819-1826.
- 274. van't Klooster GAE, Kolker HJ, Woutersen-van Nijnanten FMA, Noordhock J, and van Miert ASJPAM, "Determination of trimethoprim and its oxidative metabolites in cell culture media and microsomal incubation mixtures by high-performance liquid chromatography" *J Chromatogr* (*Biomedical Applications*) **1992**;579:355-360.

- 275. Nordholm L, and Dalgaard L, "Determination of trimethoprim metabolites including conjugates in urine using high-performance liquid chromatography with combined ultraviolet and electrochemical detection" *J Chromatogr* (*Biomedical Applications*) **1984**;305:391-399.
- 276. Lai WG Zahid N, and Uetrecht JP, "Metabolism of trimethoprim to a reactive iminoquinone methide by activated human neutrophils and hepatic microsomes" *J Pharmacol Exp Ther* **1999**;291:292-299.
- 277. Damsten MC de Vlieger JSB, Niessen WMA, Irth H, Vermeulen NPE, and Commandeur JNM, "Trimehtoprim: novel reactive intermediates and bioactivation pathways by cytochrome *P*450s" *Chem Res Toxicol* **2008**;21:2181-2187.
- 278. Qiao JP, Abliz Z, Chu FM, Hou PL, Liang F, Chang Y, Guo ZR, "Application of a novel quadrupole linear ion trap mass spectrometer to study the metabolism of 6-aminobutylphthalide in rat brains" *Rapid Commun Mass Spectrom* **2004**;18:3142-3147.
- 279. Díaz-Cruz MS, García-Galán MJ, Barceló D, "Highly sensitive simultaneous determination of sulfonamide antibiotics and one metabolite in environmental waters by liquid chromatography-quadrupole linear ion-trap mass spectrometry" J Chromatogr A 2008;1193:50-59.
- 280. Croubels S, Wassink D, De Backer P, "Simultaneous determination of sulfadiazine and trimethoprim in animal feed by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection" *Anal Chim Acta* **2002**;473:183-194.
- 281. *EMEA/CVMP*/080/95-*FINAL*, "Additional quality requirements for products intended for incorporation into animal feedingstuffs (medicated premixes)", **1996**.
- 282. http://www.waters.com/waters/en_GR/XTerra_Columns/nav.htm?locale=en_GR& cid=513769 (Φεβρουάριος 2014).
- 283. Méndez A, Bosch E, Róses M, Neue UD, "Comparison of the acidity of residual silanol groups in several liquid chromatography columns" *J Chromatogr A* 2003;986:33-44.

- 284. Siuzdak G, "Mass Spectrometry For Biotechnology" The Scripps Research Institute, La Jolla, California, Academic Press, **1996**.
- 285. Van Bramer SE, "An Introduction to Mass Spectrometry" Department of Chemistry, One University Place, Chester, **1998**.
- 286. Ikonomou MG, Blades AT, Kebarle P, "Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry" *Anal Chem* **1990**;62:957-967.
- 287. Smith RD, Loo JA, Edmons CG, Barinaga CJ, Udseth HR, "Sensitivity considerations for large molecule detection by capillary electrophoresis-electrospray ionization mass spectrometry" *Anal Chem* **1990**;62:882-899.
- 288. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM, "Electrospray ionizationprinciples and practice" *Mass Spectrom Rev* **1990**;9(1):37-70.
- 289. Ewing GW, "Instrumental Methods of Chemical Analysis", 5th edition, McGraw-Hill International Editions, **1985**.
- 290. De Hoffmann E, Charette J, Stroobant V, "Mass Spectrometry: Principles and Applications" Université catholique de Louvain, Belgium, **1996**.
- 291. Παρίση-Πούλου Μαρία, «Τεχνικές Διαχωρισμού στη Φαρμακευτική Ανάλυση», Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Χημείας, Αθήνα **1997**.
- 292. Babić S, Mutavdžić Pavlović D, Ašperger D, Periša M, Zrnčić M, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M "Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)" *Anal Bioanal Chem* **2010**;398:1185-1194.
- 293. Pavlović MD, Babić S, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M "Sample preparation in analysis of pharmaceuticals" *Trends Anal Chem* **2007**;26:1062-1075.
- 294. Weigel S, Kallenborn R, Huhnerfuss H "Simultaneous solid-phase extraction of acidic, neutral and basic pharmaceuticals from aqueous samples at ambient (neutral) *p*H and their determination by gas chromatography-mass spectrometry *J Chromatogr A* **2004**;1023:183-195.

- 295. Babić S, Horvat AJM, Mutavdžić Pavlović D, Kaštelan-Macan M "Determination of *p*K_a values of active pharmaceutical ingredients" *Trends Anal Chem* **2007**;26:1043-1061.
- 296. Scior T, Raddatz G, Figueroa R, Roth HJ, Bisswanger HA, "Molecular modeling study on dapsone and sulfonamides comparing structures and properties with respect to anti-leprosy activity" *J Mol Model*, **1997**;3:332-337.
- 297. http://www.epa.gov/oppt/exposure/pubs/episuitedl.htm (Φεβρουάριος 2010).
- 298. Renew JE, Huang CH "Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry" *J Chromatogr A* **2004**;1042:113-121.
- 299. Zarfl C, "Chemical Fate of Sulfadiazine in Soil: Mechanisms and Modelling Approaches", Department of Mathematics & Computer Science of the University of Osnabrück, Published by Shaker Verlag, Aachen, **2008**.
- 300. Zotou A, Vasiliadou C, "Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection" *Chromatographia* **2006**;64:307-311.
- 301. Winckler C, Grafe A, "Charakterisierung und Verwertung von Abfällen aus der Massentierhaltung unter Berücksichtigung verschiedener Böden" Umweltbundesamt, Berlin, 2000.
- 302. http://sitem.herts.ac.uk/aeru/vsdb/Reports/1745.htm (Απρίλιος 2014).
- 303. Marazuella MD, Bogialli S, "A review of novel strategies of sample preparation for the determination of antibacterial residues in foodstuffs using liquid chromatographybased analytical methods" *REVIEW Anal Chim Acta* **2009**;645:5-17.
- 304. Rodriguez E, Villoslada FN, Moreno-Bondi MC, Marazuela MD, "Optimization of a pressurized liquid extraction method by experimental design methodologies for the determination of fluoroquinolone residues in infant foods by liquid chromatography" *J Chromatogr A* **2010**;1217:605-613.

- 305. "Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, Chemical Analysis: A Series of Monographs on Analytical Chemistry and its Applications", edited by Somenath Mitra, Department of Chemistry & Environmental Science, New Jersey Institute of Technology John Wiley & Sons, Inc, New York (USA) Vol. 162, Chapter 2, 2003.
- 306. Tessier PM, Velev OD, Kalambur AT, Rabolt JF Lenhoff AM and Kaler EW "Assembly of gold nanostructured films template by colloidal crystals and use in surface-enhanced Raman spectroscopy" *J Am Chem Soc* **2000**;122:9554-9555.
- 307. Zhao L, Stevens J, "Determination of sulfonamide antibiotics in bovine liver using Agilent SampliQ QuEChERS EN Kits by LC/MS/MS", *Agilent Application Note*, 5990 - 4975EN.
- 308. *EURACHEM/CITAC* Guide, "Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", 2nd edition, **2000**.
- 309. Miller JC and Miller JN, "Statistics for Analytical Chemistry", Ellis Horwood, Chichester, 3rd edition, **1993**.
- 310. Kollipara S, Bende G, Agarwal N, Varshney B, Paliwal J, "International guidelines for bioanalytical method validation: A comparison and discussion on current scenario" *Chromatographia* **2011**;73:201-217.
- 311. Plackett RL and Burman JP "The design of optimum multifactorial experiments", *Biometrika*, **1946**;33(4):305-325.
- 312. Youden WJ and Steiner EH, "Statistical Manual of the *AOAC*", Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC, **1975**.
- 313. Massart DL, Vandeginste BGM, Deming SN, Michotte Y, and Kaufman L, "Chemometrics: a Textbook", Elsevier, pp. 101-106, **1988**.
- 314. *ICH Topic* Q2b "Guidelines for validation of analytical procedures", *Pharmaeuropa* **1996**;8:108-111.
- 315. Κουππάρη ΜΑ «Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων», *Χημικά Χρονικά* (Γενική Έκδοση) **2003**;65:22-37.

- 316. VICH "International Cooperation on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Veterinary Medicinal Products", VICH GL49: "Studies to evaluate the metabolism and residue kinetics of veterinary drugs in food-producing animals: validation of analytical methods used in residue depletion studies", EMA/CVMP/VICH/466302/2009, European Medicines Agency, 2011.
- 317. *EMEA/CVMP*/036/95 *FINAL* Note for Guidance: "Approach towards harmonization of withdrawal periods", *The European Agency for the Evaluation of Medicinal Products*, *Veterinary Medicines Evaluation Unit*, **1996**.
- 318. FDA, "Guidance for Industry: General principles for evaluating the safety of compounds used in food-producing animals". U.S. Department of Health & Human Services, Food and Drug Administration Center for Veterinary Medicine, Rockville, MD, USA, July 25, 2006.