



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»

ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ  
ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟ ΨΑΡΙΟΥ ΜΕ  
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ  
ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ UV ΚΑΙ MS/MS**

ΑΡΓΥΡΑΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ  
ΧΗΜΙΚΟΣ

ΑΘΗΝΑ  
ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ 2011



## **ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ  
ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟ ΨΑΡΙΟΥ ΜΕ  
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ  
ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ UV ΚΑΙ MS/MS**

**ΑΡΓΥΡΑΚΗ ΑΛΕΞΑΝΔΡΑ**

**ΧΗΜΙΚΟΣ**

### **ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:**

- ΘΩΜΑΪΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

### **ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:**

ΘΩΜΑΪΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ  
ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, ΕΠΙΚΟΥΡΟΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

**ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ 5/12/11**



## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

### ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΙΣΤΟ ΨΑΡΙΟΥ ΜΕ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ ΚΑΙ ΑΝΙΧΝΕΥΤΕΣ UV ΚΑΙ MS/MS

Οι τετρακυκλίνες (TCAs) είναι ευρέως φάσματος αντιβιοτικά που ενεργούν έναντι ενός μεγάλου αριθμού gram + και gram – βακτηρίων. Έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε παγκόσμια κλίμακα τόσο στην κτηνιατρική όσο και στην ιατρική. Αυτά τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως κτηνιατρικά φάρμακα σε ζώα που πρόκειται να καταναλωθούν λόγω της μεγάλης αντιμικροβιακής τους δράσης και του χαμηλού κόστους. Οι συνηθέστερα χρησιμοποιούμενες τετρακυκλίνες στην κτηνιατρική είναι η τετρακυκλίνη (TC), η οξυτετρακυκλίνη (OTC), η χλωροτετρακυκλίνη (CTC) και η δοξυκυκλίνη (DC). Οι τετρακυκλίνες έχουν την τάση να μετατρέπονται στα αντίστοιχα επιμερή τους. Αυτή η μετατροπή συνήθως λαμβάνει χώρα σε υδατικά διαλύματα καθώς και σε βιολογικές μήτρες κατά τη διάρκεια προκατεργασίας των δειγμάτων. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θέσει ανώτατο επιτρεπόμενο όριο (MRL) , με σκοπό να εξασφαλίσει τους καταναλωτές από την έκθεσή τους σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης που περιέχουν κατάλοιπα τετρακυκλινών. Συγκεκριμένα το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο για τις TC, OTC, CTC,DC και των αντίστοιχων επιμερών τους σε ιστό ψαριών είναι 0,1 µg/g (100 ng/g).

Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια μέθοδος προσδιορισμού των τεσσάρων τετρακυκλινών και τριών επιμερών σε ιστό ψαριού με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτές UV – MS/MS. Αρχικά δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές αναλυτικές στήλες και βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι του χρωματογραφικού συστήματος HPLC - UV, όπως η σύσταση, η ταχύτητα ροής και το pH της κινητής φάσης καθώς και επιλέχθηκε το κατάλληλο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης έτσι ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός των τετρακυκλινών και των αντίστοιχων επιμερών τους. Στη συνέχεια έγινε μελέτη για την εκχύλιση των τετρακυκλινών

και των επιμερών τους, χρησιμοποιώντας δυο διαφορετικά εκχυλιστικά μέσα, το διάλυμα McIlvaine/EDTA (pH 4) και το ρυθμιστικό διάλυμα CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>COOH/EDTA (pH 4). Επίσης για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος δοκιμάστηκαν η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE: C<sub>18</sub>, 101, HLB) και η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE με C<sub>18</sub> και PSA) επιλέγοντας τη δεύτερη ως καταλληλότερη διότι αποδείχτηκε ταχύτερη και σταθερότερη και η μέθοδος μεταφέρθηκε στο σύστημα HPLC – MS/MS.

Τελικά, η μέθοδος επικυρώθηκε και οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν η γραμμικότητα, η πιστότητα (ανακτήσεις > 66,9%), η ακρίβεια (RSD<sub>R</sub> < 15%) και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης τόσο του οργάνου όσο και της μεθόδου (LOD: 0,03 – 1,24 ng/g και LOQ: 0,09 – 3,72 ng/g). Η ποσοτικοποίηση γίνεται με την χρήση καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων και στην περίπτωση της DC, λόγω της χαμηλής ανάκτησης (45,0%), η ποσοτικοποίηση γίνεται με την χρήση καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων και χρήση εσωτερικού προτύπου.

**ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ:** τετρακυκλίνες, επιμερή, SPE, dSPE, LC-MS/MS

## ABSTRACT

### DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE RESIDUES IN FISH TISSUES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY - UV DETECTION / TANDEM MASS SPECTROMETRY

Tetracycline antibiotics (TCAs) are broad-spectrum medicinal drug compounds active against a number of gram-positive and gram-negative bacteria. TCAs have been successfully used worldwide in both veterinary and human medicine. These antibiotics are widely used as veterinary drugs for food-producing animals because of their broad-spectrum activity and cost effectiveness. The commonly used TCAs in veterinary medicine are tetracycline (TC), oxytetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC) and doxycycline (DC). TCAs are susceptible to conformational degradation to their 4-epimers. This degradation can occur in aqueous solutions, but also in biological matrices during sample preparation. In order to protect the consumer for exposure to residues of TCAs in edible tissues of animal origin, maximum residue limit (MRL) values were laid down by the EU. The tolerable MRL values for TC, OTC, CTC and DC and their epimers in fish tissues has been established at 0.1 µg/g (100 ng/g).

In the present study, a LC – UV-MS/MS method for the determination of four tetracycline residues and three epimers in fish tissues has been developed. Initially, different analytical columns were tested and parameters of the LC system such as composition, flow rate and pH of mobile phase and the timetable for gradient elution were carefully selected to achieve satisfactory resolution of the analytes and their epimers. Subsequently, the extraction of the tetracyclines and the three epimers was studied, using two different extraction solutions, McIlvaine/EDTA (pH 4) and CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub>-CH<sub>3</sub>COOH/EDTA (pH 4). Moreover, the effect of different clean-up procedures of the extract, such as solid phase extraction (C<sub>18</sub> or polymeric SPE) and dispersive solid phase extraction (C<sub>18</sub> and PSA dSPE) were

investigated, choosing the latter as the faster and more robust and the method was transferred to HPLC – MS/MS system.

The final method was validated and the estimated parameters were linearity, trueness (recoveries were > 66,9%), precision ( $RSD_R < 15\%$ ) and instrumental and method limits of detection (LOD: 0.03 – 1.24 ng/g and LOQ: 0.09 – 3.72 ng/g). Quantification was performed by the standard addition method to blank tissue samples and especially for DC, due to low recoveries (45,0%) the quantification was performed coupled with an internal standard method.

**KEYWORDS:** tetracyclines, epimers, SPE, dSPE, LC-MS/MS





# ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ</b> .....	21
1.1 Εισαγωγή.....	21
1.2 Αντιβιοτικά.....	22
1.3 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες τετρακυκλινών .....	25
1.4 Χρήση τετρακυκλινών στην ιατρική.....	30
1.5 Χρήση των τετρακυκλινών στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία .....	31
1.6 Μηχανισμός δράσης των τετρακυκλινών και αντίσταση των βακτηρίων ..	32
1.7 Τοξικότητα.....	34
1.8 Κατάλοιπα τετρακυκλινών σε κτηνοτροφικά προϊόντα και δημόσια υγεία	35
1.8.1 Γενικά.....	35
1.8.2 Κατάλοιπα τετρακυκλινών στα ψάρια.....	37
1.9 Νομοθεσία.....	38

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ

<b>ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ</b> .....	40
2.1 Τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού τετρακυκλινών.....	40
2.1.1 Εκχύλιση στερεών με υγρό και υγρό – υγρό εκχύλιση.....	40
2.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).....	41
2.1.3 QuEChERS και εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dispersive Solid Phase Extraction, dSPE) .....	43
2.2 Τεχνικές διαχωρισμού και ανίχνευσης των τετρακυκλινών.....	45
2.2.1 Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC) .....	46
2.2.1.1 Κινητή φάση.....	46
2.2.1.2 Προστήλη – αναλυτική στήλη.....	47
2.2.2 Ανιχνευτές.....	48
2.2.2.1 Ανιχνευτής απορρόφησης υπεριώδους – ορατού (UV – Vis).....	48
2.2.2.2 Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (MS).....	49
2.2.3 Χρωματογραφικές παράμετροι.....	54
2.2.4 Εσωτερικό πρότυπο.....	57

2.3 Προσδιορισμός τετρακυκλινών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης .....	58
2.3.1 Εισαγωγή .....	58
2.3.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	58

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ .....</b>	<b>63</b>
--	-----------

## **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

<b>ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ .....</b>	<b>64</b>
--	-----------

4.1 Συσκευές και βοηθητικά μέσα .....	64
4.2 Αντιδραστήρια και πρότυπα.....	65
4.2.1 Αντιδραστήρια.....	65
4.2.2 Διαλύματα .....	66
4.2.3 Πρότυπα .....	67
4.2.3.1 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης τετρακυκλινών συγκεντρώσεως 1000 µg/ml σε μεθανόλη.....	67
4.2.3.2 Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης τετρακυκλινών συγκεντρώσεως 10 µg/ml σε μεθανόλη .....	67
4.2.3.3 Πρότυπα διαλύματα εργασίας τετρακυκλινών στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,002 – 5,0 µg/ml σε νερό .....	67

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΗ**

<b>ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ .....</b>	<b>68</b>
---	-----------

5.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση υδροχρωματογραφίας στο σύστημα HPLC - UV.....	68
5.1.1 Επιλογή βέλτιστου μήκους κύματος.....	68
5.1.2 Επιλογή στήλης και κινητής φάσης.....	68
5.2 Βελτιστοποιήσεις κατά την προκατεργασία του δείγματος στο σύστημα HPLC – UV .....	69
5.2.1 Παραλαβή τετρακυκλινών από ιστό ψαριών .....	69
5.2.2 Βελτιστοποίηση καθαρισμού εκχυλίσματος.....	70
5.3 Βελτιστοποίηση συστήματος MS/MS .....	71

5.4 Βελτιστοποιήσεις κατά την προκατεργασία του δείγματος στο σύστημα LC – MS/MS .....	73
5.5 Επικύρωση .....	73
5.5.1 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC – UV .....	74
5.5.1.1 Γραμμικότητα – καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων.....	74
5.5.1.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου .....	75
5.5.1.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου .....	76
5.5.1.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης .....	76
5.5.2 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα LC – MS/MS.....	77
5.5.2.1 Γραμμικότητα – καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων.....	77
5.5.2.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου .....	77
5.5.2.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου .....	77
5.5.2.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης .....	78
5.5.3 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού τετρακυκλικών σε ιστό ψαριών με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE) στο σύστημα HPLC – MS/MS .	78
5.5.3.1 Καμπύλη εμβολιασμένων δειγμάτων .....	79
5.5.3.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου .....	80
5.5.3.3 Ακρίβεια .....	81

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....**

6.1 Επιλογή βέλτιστου μήκους κύματος στο UV .....	84
6.2 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών παραμέτρων (HPLC - UV).....	86
6.2.1 Βελτιστοποίηση για τη στήλη Waters Symmetry C <sub>18</sub> .....	86
6.2.2 Βελτιστοποίηση για τη στήλη Supelco Ascentis C <sub>18</sub> .....	92
6.2.3 Βελτιστοποίηση για τη στήλη Waters Xterra C <sub>18</sub> .....	94
6.3 Βελτιστοποίηση και επιλογή μεθόδων καθαρισμού.....	100
6.4 Βελτιστοποίηση παραμέτρων στο σύστημα HPLC – MS/MS.....	103
6.5 Βελτιστοποιήσεις κατά την προκατεργασία του δείγματος στο σύστημα LC – MS/MS .....	105
6.6 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC - UV .....	106
6.6.1 Γραμμικότητα – καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων.....	106
6.6.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου.....	111
6.6.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου.....	112

6.6.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης.....	113
6.7 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC – MS/MS.....	114
6.7.1 Γραμμικότητα – καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων.....	114
6.7.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου .....	118
6.7.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου .....	119
6.7.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης .....	120
6.8 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού τετρακυκλινών σε ιστό ψαριού με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE) .....	121
6.8.1 Υπολογισμός μέσης και ολικής ανάκτησης .....	121
6.8.2 Καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων .....	123
6.8.3 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου .....	127
6.8.4 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου .....	128
6.9 Συμπεράσματα.....	130
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 .....	132
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 .....	133
Βιβλιογραφία.....	134



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

<b>Σχήμα 5.1:</b> Διάγραμμα ροής μεθόδου προσδιορισμού τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE) .....	79
<b>Σχήμα 6.1:</b> Φάσματα των τετρακυκλινών σε κινητή φάση .....	84
<b>Σχήμα 6.2:</b> Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 0,5 µg/ml.....	99
<b>Σχήμα 6.3:</b> Χρωματογραφήματα λευκών και εμβολιασμένων δειγμάτων ιστού ψαριού με μείγμα TCs μετά από καθαρισμό με SPE α) C <sub>18</sub> ,β) 101, γ) HLB 100	
<b>Σχήμα 6.4:</b> Χρωματογραφήματα λευκού και εμβολιασμένου δείγματος ιστού ψαριού με μείγμα TCs μετά από καθαρισμό με dSPE .....	101
<b>Σχήμα 6.5:</b> Χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων ιστού ψαριού με μείγμα TCs μετά από καθαρισμό με dSPE και προσυγκέντρωση με LLE με διαλύτες εκχύλισης α) οξικός αιθυλεστέρας, β) οξικός αιθυλεστέρας-NaCl, γ) διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα-ισοπροπανόλης σε αναλογία 12/1 και δ) διχλωρομεθάνιο .....	102
<b>Σχήμα 6.6:</b> Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 20 ng/ml.....	105
<b>Σχήμα 6.7:</b> Καμπύλες αναφοράς τετρακυκλινών στο σύστημα HPLC-UV..	109
<b>Σχήμα 6.8:</b> Καμπύλες αναφοράς τετρακυκλινών στο σύστημα HPLC-MS/ ..	116
<b>Σχήμα 6.9:</b> Καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων τετρακυκλινών στο σύστημα HPLC-MS/MS .....	125

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

<b>Εικόνα 1.1:</b> Σκελετοί των δύο βασικών δομών των τετρακυκλικών μορίων.....	26
<b>Εικόνα 1.2:</b> Επιμερισμός τετρακυκλίνης (TC) και σχηματισμός επι-τετρακυκλίνης.....	30
<b>Εικόνα 1.3:</b> Μηχανισμός αναστολής της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης από τις TCs.....	33
<b>Εικόνα 1.4:</b> Δομή τιγκεκυκλίνης .....	34
<b>Εικόνα 2.1:</b> Στάδια SPE .....	42
<b>Εικόνα 2.2:</b> Δοχεία Quechers.....	44
<b>Εικόνα 2.3:</b> Διαδικασία dSPE .....	45
<b>Εικόνα 2.4:</b> Τετράπολο.....	50
<b>Εικόνα 2.5:</b> Τριπλό τετράπολο .....	51
<b>Εικόνα 2.6:</b> Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό.....	53



## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

<b>Πίνακας 1.1:</b> Ομάδες αντιβιοτικών .....	24
<b>Πίνακας 1.2:</b> Ανάλογα των τετρακυκλικών μορίων .....	26
<b>Πίνακας 1.3:</b> Σταθερές διάστασης των OTC, TC, CTC και DC.....	27
<b>Πίνακας 1.4:</b> Συσχέτιση του φορτίου με τις τιμές του pH.....	27
<b>Πίνακας 2.1:</b> Λειτουργίες τριπλού τετράπολου.....	52
<b>Πίνακας 2.2:</b> Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	60
<b>Πίνακας 6.1:</b> Μέγιστα απορρόφησης και αντίστοιχα μήκη κύματος.....	84
<b>Πίνακας 6.2:</b> Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή του pH για σύσταση κινητής φάσης ACN-MeOH 50:50 και ταχύτητα ροής 0,8 ml/min για τη στήλη Waters Symmetry C <sub>18</sub> .....	87
<b>Πίνακας 6.3:</b> Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της ταχύτητας ροής για σύσταση κινητής φάσης ACN-MeOH 50:50 και pH 3 για τη στήλη Waters Symmetry C <sub>18</sub> .....	89
<b>Πίνακας 6.4:</b> Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της αναλογίας ακετονιτριλίου-μεθανόλης στην κινητή φάση για pH 3 και ταχύτητα ροής 1 ml/min για τη στήλη Waters Symmetry C <sub>18</sub> .....	91
<b>Πίνακας 6.5:</b> Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της αναλογίας ακετονιτριλίου-μεθανόλης στην κινητή φάση για pH 3 και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min για τη στήλη Supelco Ascentis C <sub>18</sub> .....	93
<b>Πίνακας 6.6:</b> Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της αναλογίας ακετονιτριλίου-μεθανόλης στην κινητή φάση για pH 3 και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min για τη στήλη Waters Xterra C <sub>18</sub> .....	95
<b>Πίνακας 6.7:</b> Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή του pH για σύσταση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο-μεθανόλη 60:40 και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min για τη στήλη Waters Xterra C <sub>18</sub> .....	97
<b>Πίνακας 6.8:</b> Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, όπου A: ακετονιτρίλιο/μεθανόλη σε αναλογία 60:40 και B: διάλυμα φορμικού οξέος 1%v/v (pH 2) .....	98
<b>Πίνακας 6.9:</b> Χρόνοι ανάσχεσης και χρωματογραφικές παράμετροι των τετρακυκλινών.....	99

<b>Πίνακας 6.10:</b> Ανακτήσεις τετρακυκλινών με και χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου για εμβολιασμένο δείγμα ιστού ψαριού μετά από καθαρισμό με dSPE.....	101
<b>Πίνακας 6.11:</b> Οι κυριότερες παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών .....	103
<b>Πίνακας 6.12:</b> Αναλυτικές παράμετροι στο LC-MS/MS για τις τετρακυκλίνες .....	104
<b>Πίνακας 6.13:</b> Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης όπου A: ακετονιτρίλιο/μεθανόλη σε αναλογία 60/40 και B: διάλυμα φορμικού οξέος 1 % v/v (pH 2) .....	104
<b>Πίνακας 6.14:</b> Ανακτήσεις τετρακυκλινών μετά από προκατεργασία με διαφορετικά είδη dSPE .....	106
<b>Πίνακας 6.15:</b> Δεδομένα καμπυλών αναφοράς.....	107
<b>Πίνακας 6.16:</b> Έλεγχος διέλευσης καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων.....	110
<b>Πίνακας 6.17:</b> Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου.....	111
<b>Πίνακας 6.18:</b> Επαναληψιμότητα οργάνου.....	112
<b>Πίνακας 6.19:</b> Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης .....	113
<b>Πίνακας 6.20:</b> Δεδομένα καμπυλών αναφοράς.....	114
<b>Πίνακας 6.21:</b> Έλεγχος διέλευσης καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων.....	117
<b>Πίνακας 6.22:</b> Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου.....	118
<b>Πίνακας 6.23:</b> Επαναληψιμότητα οργάνου.....	119
<b>Πίνακας 6.24:</b> Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης .....	120
<b>Πίνακας 6.25:</b> Μέσες ανακτήσεις τετρακυκλινών σε χαμηλό (10,0 ng/g), μεσαίο (100 ng/g) και υψηλό (1000 ng/g) επίπεδο συγκέντρωσης .....	121
<b>Πίνακας 6.26:</b> Συγκεντρτικός πίνακας ανακτήσεων.....	122
<b>Πίνακας 6.27:</b> Δεδομένα καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων .....	123
<b>Πίνακας 6.28:</b> Έλεγχος διέλευσης καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων από την αρχή των αξόνων.....	126
<b>Πίνακας 6.29:</b> Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου.....	127
<b>Πίνακας 6.30:</b> Επαναληψιμότητα της μεθόδου στο MRL (100 ng/g) .....	128

<b>Πίνακας 6.31:</b> Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου στο MRL (100 ng/g) .....	129
---	-----

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στα πλαίσια του Μεταπτυχιακού Προγράμματος «Χημική Ανάλυση – Έλεγχος Ποιότητας» και το αντικείμενό της ήταν ο προσδιορισμός των τετρακυκλινών και των επιμερών τους σε ιστό ψαριού με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτές UV-MS/MS, καθώς και η επικύρωση της μεθόδου αυτής. Η εργασία εκπονήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, στο εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας.

Η ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος έγινε από τον κ. Νικόλαο Θωμαΐδη, Επίκουρο Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών, προς τον οποίο εκφράζω θερμές ευχαριστίες για την μετάδοση των επιστημονικών του γνώσεων και τη πολύτιμη βοήθειά του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης και της συγγραφής αυτής της εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τους καθηγητές της εξεταστικής επιτροπής για τη συμμετοχή τους αλλά και τη συμβολή τους στην τελειοποίηση του κειμένου.

Τέλος ευχαριστώ όλους τους συναδέλφους που συνέβαλαν στην περάτωση αυτής της εργασίας και ιδιαιτέρως την Δασενάκη Μαριλλένα και τον Γεωργουλόπουλο Γεώργιο για την πρόθυμη διάθεση του χρόνου τους και τη συμπαράστασή τους σε όλη μου την προσπάθεια.

Αργυράκη Αλεξάνδρα  
Αθήνα, Ιούνιος 2011

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

### 1.1 Εισαγωγή

Οι τετρακυκλίνες (TCAs) είναι αντιβιοτικά ευρέως φάσματος που παράγονται από το γένος των στρεπτομυκήτων. Ως αντιβιοτικά έχουν την ιδιότητα να επιβραδύνουν την ανάπτυξη διαφόρων βακτηρίων (βακτηριοστατική δράση) δρώντας ως αναστολείς της πρωτεϊνοσύνθεσης. Χρησιμοποιούνται στην ιατρική και την κτηνιατρική για την πρόληψη και τη θεραπεία διαφόρων μολυσματικών ασθενειών που προκαλούνται από gram θετικά και αρνητικά βακτήρια καθώς και από μικροοργανισμούς όπως οι Ακτινομύκητες, η Βρουκέλλα, οι Ψευδομονάδες, ο Στρεπτόκοκκος, ο Σταφυλόκοκκος, ο Γονόκοκκος, τα Χλαμύδια και το Μυκόπλασμα.<sup>[1, 2]</sup>

Το πρώτο μέλος της ομάδας των τετρακυκλινών που ανακαλύφθηκε, ήταν η χλωροτετρακυκλίνη το 1945 από τον Δρ. Benjamin Duggar, η οποία απομονώθηκε από δείγμα λυματολάσπης. Λίγα χρόνια αργότερα, απομονώθηκε από παρόμοιας φύσης δείγμα και η οξυτετρακυκλίνη από τον AC Finlay και τους συνεργάτες του. Αφότου λοιπόν προσδιορίστηκε η δομή των ενώσεων αυτών, ο Lloyd H. Conover παρασκεύασε την τετρακυκλίνη, δίνοντας το έναυσμα για την παραγωγή νέων αντιβιοτικών ενώσεων της ομάδας αυτής που προέκυψαν από τροποποιήσεις των λειτουργικών ομάδων της αρχικής ένωσης.

Σήμερα λοιπόν είναι εμπορικώς διαθέσιμες η τετρακυκλίνη (TC), η χλωροτετρακυκλίνη (CTC), η οξυτετρακυκλίνη (OTC), η δοξυκυκλίνη (DC), η μινοκυκλίνη (MINO), η μεθακυκλίνη (MTC), η δεμεκλοκυκλίνη (DMTC) και η ρολιτετρακυκλίνη (PRMTC) εκ των οποίων οι τέσσερις πρώτες χρησιμοποιούνται με μεγαλύτερη συχνότητα στην κτηνιατρική για την πρόληψη και τη θεραπεία μολυσματικών ασθενειών.<sup>[3]</sup>

Παρά το πλήθος των αντιβιοτικών που έχουν παραχθεί τα τελευταία χρόνια, η αλόγιστη χρήση τους έχει οδηγήσει στη δημιουργία ανθεκτικών στελεχών κάποιων βακτηρίων. Γι' αυτό το λόγο είναι έντονες οι προσπάθειες για τον περιορισμό της χρήσης των αντιβιοτικών αλλά είναι και επιτακτική

ανάγκη η παρασκευή νέων με τροποποιημένη σύνθεση στα οποία να μην παρουσιάζεται ανθεκτικότητα.

## 1.2 Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι χημικές ουσίες που παράγονται από μικροοργανισμούς (κυρίως μύκητες, αλλά και βακτήρια) και έχουν την ιδιότητα να επιβραδύνουν και να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών (βακτήρια, ρικέτσιες, χλαμύδια) ή και να τους σκοτώνουν. Τα περισσότερα αντιβιοτικά προσφέρουν προστασία κυρίως εναντίον βακτηριακών λοιμώξεων και όχι ιικών, προσβάλλοντας μόνο τα κύτταρα των βακτηρίων, χωρίς ωστόσο, τα ίδια να προκαλούν βλάβη στα ανθρώπινα κύτταρα. Αν και ο όρος αντιβιοτικά χρησιμοποιήθηκε αρχικά για οποιοδήποτε μέσο με βιολογική δράση ενάντια στους μικροοργανισμούς, εντούτοις, σήμερα αναφέρεται στην περιγραφή ουσιών με αντιβακτηριακή, αντιμυκητιακή ή αντιπαρασιτική δράση.

Παρ' ότι αντιβιοτικές ουσίες για τη θεραπεία των ανθρώπινων ασθενειών που προκαλούνται από βακτήρια όπως η φυματίωση, η βουβωνική πανούκλα και η λέπρα, δεν ήταν απομονωμένες και προσδιορισμένες μέχρι τον εικοστό αιώνα, η πρώτη γνωστή χρήση αντιβιοτικών γινόταν από τους αρχαίους Κινέζους πριν από 2.500 έτη. Πολλοί άλλοι αρχαίοι πολιτισμοί συμπεριλαμβανομένων των αρχαίων Αιγυπτίων και των αρχαίων Ελλήνων, στηρίζονταν στη χρήση μυκήτων και φυτών για να θεραπεύουν μολύνσεις εξαιτίας της παραγωγής αντιβιοτικών ουσιών από τους οργανισμούς αυτούς, αν και οι ενώσεις που ανέπτυσαν την αντιβιοτική δράση ήταν ουσιαστικά άγνωστες.

Οι αντιβιοτικές ιδιότητες του *Penicillium* sp. περιγράφηκαν για πρώτη φορά στη Γαλλία από τον Ernest Duchesne το 1897. Η εργασία του όμως δεν κέντρισε το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας μέχρι την ανακάλυψη και απομόνωση της πενικιλίνης από το *Penicillium notatum* από τον Αλεξάντερ Φλέμινγκ το 1928. Η σύγχρονη έρευνα για την αντιβιοτική θεραπεία είχε ήδη όμως αρχίσει στη Γερμανία με την ανάπτυξη του στενού-φάσματος αντιβιοτικού Salvarsan από τον Paul Ehrlich το 1909, επιτρέποντας για πρώτη φορά μια αποδοτική θεραπεία της διαδεδομένης σύφιλης. Τα αντιβιοτικά αναπτύχθηκαν περαιτέρω στη Μεγάλη Βρετανία, όταν δέκα έτη μετά την

ανακάλυψη της πενικιλίνης από τον Φλέμινγκ ο Ernst Chain και ο Howard Florey έδειξαν ενδιαφέρον στην εργασία του και βρήκαν την καθαρισμένη μορφή της πενικιλίνης.

Η χρήση των αντιβιοτικών προκάλεσε επανάσταση στη σύγχρονη ιατρική. Ασθένειες όπως η φυματίωση, η σύφιλη, η γονοκκοκική ουρηθρίτιδα και ο τυφοειδής πυρετός βρήκαν θεραπεία. Οι εγχειρήσεις μπορούσαν πλέον να γίνονται χωρίς τον κίνδυνο μολύνσεων. Ο τοκετός έγινε πολύ πιο ασφαλής για τις γυναίκες ενώ βρεφικές ασθένειες μπορούσαν να αντιμετωπιστούν περιορίζοντας τη βρεφική θνησιμότητα. Περισσότερα από 3.500 αντιβιοτικά έχουν απομονωθεί από τη ανακάλυψη της πενικιλίνης μέχρι σήμερα, πολλά από τα οποία παράγονται πλέον σε βιομηχανική κλίμακα. Αν και ο όρος αντιβιοτικό χρησιμοποιήθηκε αρχικά για να αναφερθεί μόνο στις ουσίες που εξάγονται από ένα μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό, σήμερα χάρη στην αλματώδη πρόοδο περιλαμβάνει επίσης πολλές αντιβακτηριακές φαρμακευτικές ουσίες που παράγονται ημισυνθετικά ή συνθετικά σε εργαστήρια.<sup>[4]</sup>

Υπάρχουν πολλοί τρόποι ταξινόμησης της πληθώρας των αντιβιοτικών που κυκλοφορούν σήμερα στην αγορά, ανάλογα με το κριτήριο το οποίο θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε βακτηριοστατικά και βακτηριοκτόνα, ανάλογα με το αν με τη δράση τους μειώνουν το ρυθμό ανάπτυξης των βακτηρίων (τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, χλωραμφαινικόλη) ή αν τα θανατώνουν (πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες, αμινογλυκοσίδες). Βασικό κριτήριο διαχωρισμού των αντιβιοτικών είναι το αντιμικροβιακό τους φάσμα, δηλαδή το πόσα διαφορετικά είδη μικροβίων επηρεάζονται από την παρουσία τους. Έτσι τα αντιβιοτικά ταξινομούνται σε στενού ή περιορισμένου φάσματος αν δρουν εναντίον ενός μόνο βακτηρίου ή μιας ομάδας ομοειδών βακτηρίων και σε ευρέως ή εκτεταμένου φάσματος εάν δρουν έναντι πολλών ειδών βακτηρίων (πενικιλίνες, τετρακυκλίνες, χλωραμφαινικόλη).

Ανάλογα με τη χημική τους σύσταση τα αντιβιοτικά διακρίνονται σε προϊόντα αμινοξέων (πενικιλίνες), πολυπεπτιδίων (βακιτρακίνη), σακχάρων (αμινογλυκοσίδες), αλειφατικών οξέων (τετρακυκλίνες), πολυενίων (αμφοτερικίνη), κ.α. Τέλος, ως κριτήριο για την κατάταξη των αντιβιοτικών χρησιμοποιείται και ο μηχανισμός δράσης τους. Έτσι έχουμε αντιβιοτικά που δρουν αναστέλλοντας τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος των βακτηρίων

(πενικιλίνες, κεφαλοσπορίνες), αντιβιοτικά που παρεμποδίζουν την πρωτεϊνοσύνθεση των βακτηρίων (τετρακυκλίνες, μακρολίδια) και αντιβιοτικά που αναστέλλουν τη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων των βακτηρίων (σουλφοναμίδια, κινολόνες).<sup>[5]</sup> Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι διαφορετικές ομάδες αντιβιοτικών, η κλινική τους χρήση καθώς και οι παρενέργειες που αυτά προκαλούν.

**Πίνακας 1.1:** Ομάδες αντιβιοτικών<sup>[6, 7]</sup>

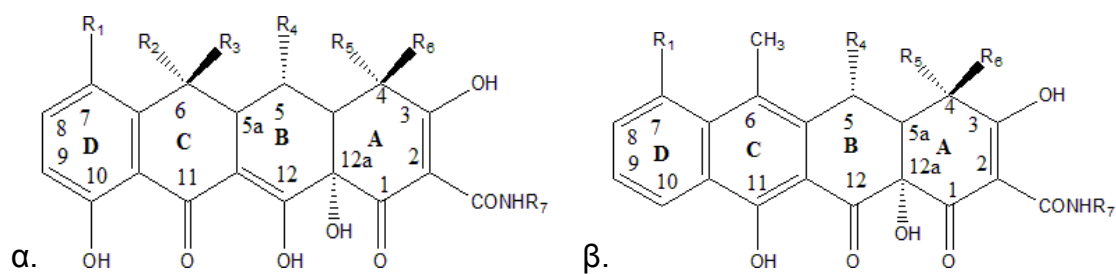
<b>Αντιβιοτικά</b>	<b>Παραδείγματα</b>	<b>Κλινική χρήση</b>	<b>Παρενέργειες</b>
Αμινογλυκοσίδες	γενταμικίνη, αμικασίνη	πνευμονία, μικροβιακή ενδοκαρδίτιδα, σηψαιμία	νεφροτοξικότητα, ωτοτοξικότητα, νευρομυϊκή παράλυση
β-λακταμικά • πενικιλίνες • κεφαλοσπορίνες • μονομπακτάμες • καρβαπενέμες	πενικιλίνη G, κεφοταξίμη, αζτρεονάμη, μεροπενέμη	λοιμώξεις αναπνευστικού, ουροποιητικού, οστών και δέρματος	αλλεργίες, γαστρεντερικές διαταραχές, ηπατοτοξικότητα, νευροτοξικότητα
Κινολόνες	νορφλοξασίνη, οφλοξασίνη	προστατίτιδα, σαλμονέλα, λοιμώξεις δέρματος	ταχυκαρδία, λευκοπενία, υπόταση, ηπατοτοξικότητα
Γλυκοπεπτιδία	βανκομυκίνη	σταφυλόκοκκος, ψευδομεμβρανώδης εντεροκολίτιδα	εξανθήματα, θρομβοφλεβίτιδα, νεφροτοξικότητα
Κετολίδες	τελιθρομυκίνη	πνευμονία, εντερόκοκκος	γαστρεντερικές διαταραχές, θρομβοφλεβίτιδα
Λινκοσαμίδες	λινκομυκίνη	σταφυλόκοκκος, στρεπτόκοκκος, οστεομυελίτιδα	αλλεργίες, ηπατοτοξικότητα, ερεθισμός του γαστρεντερικού
Μακρολίδες	κλαριθρομυκίνη	πνευμονία, χρόνια βρογχίτιδα, φαρυγγοαμυγδαλίτιδα	γαστρεντερικές διαταραχές, θρομβοφλεβίτιδα



Οξαζολιδίνες	linezolid	πνευμονία, λοίμωξη από εντερόκοκκο	αλλεργίες, νεφροτοξικότητα, ηπατοτοξικότητα
Στρεπτογραμμίνες	dalfopristine	πνευμονία, λοιμώξεις δέρματος	νεφροτοξικότητα, αλλεργίες
Τετρακυκλίνες	τετρακυκλίνη, δοξυκυκλίνη	βρουκέλλωση, βλεννόρροια, χολέρα, χλαμύδια, ρικετσιώσεις	μόνιμη κίτρινη χρώση στα δόντια, καθυστέρηση ανάπτυξης οστών, γαστρεντερικές διαταραχές
Σουλφοναμίδες	σουλφαμεθαζόλη, σουλφαδιμεθοξίνη	ουρολοιμώξεις, οφθαλμικές λοιμώξεις, εγκαύματα	ναυτία, εξανθήματα, ίκτερος, πολύμορφο ερύθημα
Χλωραμφενικόλη	χλωραμφενικόλη	βακτηριδιακή μηνιγγίτιδα	μη αντιστρεπτή απλαστική αναιμία
Νιτροφουράνια	furoline	γαστρεντερικές λοιμώξεις	νευρικές διαταραχές, καταστολή της σπερματογένεσης

### 1.3 Δομή και φυσικοχημικές ιδιότητες τετρακυκλινών

Όπως φανερώνει το όνομά τους, τα αντιβιοτικά που ανήκουν στην ομάδα των τετρακυκλινών περιλαμβάνουν έναν οκταϋδروαφθακενικό κυκλικό σκελετό που αποτελείται από τέσσερις συμπυκνωμένους εξαμελείς δακτυλίους.<sup>[8]</sup> Τα διάφορα ανάλογα διαφέρουν μεταξύ τους κυρίως ως προς την υποκατάσταση στις θέσεις 5, 6 και 7 του βασικού σκελετού. Στην εικόνα που ακολουθεί απεικονίζονται οι δύο βασικές δομές των τετρακυκλινικών μορίων, ενώ οι διάφορες ομάδες-υποκαταστάτες και τα αντίστοιχα παράγωγα παρουσιάζονται στον πίνακα 1.2.



Εικόνα 1.1: Σκελετοί των δύο βασικών δομών των τετρακυκλικών μορίων

Πίνακας 1.2: Ανάλογα των τετρακυκλικών μορίων<sup>[9]</sup>

Ένωση	Δομή	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
Τετρακυκλίνη (TC)	α	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Οξυτετρακυκλίνη (OTC)	α	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Χλωροτετρακυκλίνη (CTC)	α	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Δοξυκυκλίνη (DC)	α	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Μινοκυκλίνη (MINO)	α	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Μεθακυκλίνη (MTC)	α	H	=CH <sub>2</sub>	=CH <sub>2</sub>	OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Δεμεκλοκυκλίνη (DMCTC)	α	Cl	H	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
Ρολιτετρακυκλίνη (PRMTC)	α	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	—CH <sub>2</sub> —N <sub>5</sub>
4-Επιοξυτετρακυκλίνη (EOTC)	α	H	CH <sub>3</sub>	OH	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
Ανυδροοξυτετρακυκλίνη (AOTC)	β	H	-	-	OH	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
4-Επιτετρακυκλίνη (ETC)	α	H	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
Ανυδροτετρακυκλίνη (ATC)	β	H	-	-	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H	H
4-Επιανυδροτετρακυκλίνη (EATC)	β	H	-	-	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
4-Επιχλωροτετρακυκλίνη (ECTC)	α	Cl	CH <sub>3</sub>	OH	H	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H
4-Επιδοξυκυκλίνη (EDC)	α	H	CH <sub>3</sub>	H	OH	H	N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H

Είναι ενώσεις στερεές κρυσταλλικές με χρώμα κίτρινο έως υποκίτρινο, σταθερές στον αέρα, αλλά με τη έκθεσή τους στο ηλιακό φως ή σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (πάνω από 180 °C) αποσυντίθενται και το χρώμα τους γίνεται πιο σκούρο. Συνήθως κυκλοφορούν ως άλατα του υδροχλωρικού οξέος.

Τα διάφορα μέλη της οικογένειας των τετρακυκλινών εμφανίζουν μεταξύ τους παρόμοιες φυσικοχημικές ιδιότητες. Πρόκειται για επαμφοτερίζουσες ενώσεις οι οποίες σχηματίζουν κρυσταλλικά άλατα, τόσο με ισχυρά οξέα όσο και με ισχυρές βάσεις και χαρακτηρίζονται από τρεις σταθερές διάστασης. Η πρώτη από αυτές αφορά στην αποπρωτονίωση του -OH στον C3, ενώ η απώλεια πρωτονίων από το O στη θέση C12 και από τη θέση C4 εκφράζονται από τη δεύτερη και την τρίτη σταθερά διάστασης αντίστοιχα. Στους πίνακες 1.3 και 1.4 δίνονται οι τιμές των σταθερών διάστασης για τις OTC, TC, CTC και DC εκφρασμένες ως οι αρνητικοί λογάριθμοί τους ( $pK_a$ ), καθώς και το είδος του φορτίου που φέρουν, σε περιοχές τιμών pH εκατέρωθεν των  $pK_a$ .

**Πίνακας 1.3:** Σταθερές διάστασης των OTC, TC, CTC και DC<sup>[10]</sup>

	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
<b>OTC</b>	3,2	7,5	8,9
<b>TC</b>	3,3	7,8	9,6
<b>CTC</b>	3,3	7,6	9,3
<b>DC</b>	3,0	8,0	9,2

**Πίνακας 1.4:** Συσχέτιση του φορτίου με τις τιμές του pH<sup>[10]</sup>

	pH < $pK_{a1}$	$pK_{a1}$ < pH < $pK_{a2}$	$pK_{a2}$ < pH < $pK_{a3}$	$pK_{a3}$ < pH
<b>Φορτίο -O στον C3</b>	0	-	-	-
<b>Φορτίο -O στους C11 και C12</b>	0	0	-	-
<b>Φορτίο -N στον C4</b>	+	+	+	0
<b>Συνολικό φορτίο</b>	+	0	-	2-

Σε αλκαλικές συνθήκες, οι τετρακυκλίνες έχουν διάταξη η οποία επιτρέπει δεσμό υδρογόνου μεταξύ του -N στη θέση C4 και του -OH στη θέση C12a. Σε ουδέτερες και όξινες συνθήκες το -N στη θέση C4 πρωτονιώνεται, διασπώντας την προηγούμενη διάταξη και ένας δεσμός υδρογόνου δημιουργείται με το -O στη θέση C3.

Οι τετρακυκλίνες είναι διαλυτές σε οξέα, βάσεις, αλκοόλες και πολικούς οργανικούς διαλύτες. Η διαλυτότητά τους είναι μεγαλύτερη στις αλκοόλες (μεθανόλη και αιθανόλη), ενώ εκχυλίζονται σε οργανικούς διαλύτες όπως ο οξικός αιθυλεστέρας, η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο. Αντιθέτως οι τετρακυκλίνες είναι αδιάλυτες σε κορεσμένους υδρογονανθρακικούς διαλύτες όπως το εξάνιο.

Σε ουδέτερα και όξινα διαλύματά τους οι τετρακυκλίνες εμφανίζουν έντονη απορρόφηση στην υπεριώδη-ορατή περιοχή και μάλιστα σε μήκη κύματος 270 και 360 nm.<sup>[1]</sup>

Μια άλλη χαρακτηριστική ιδιότητά τους είναι η ικανότητα που έχουν να συμπλέκονται με δισθενή και τρισθενή μεταλλικά ιόντα, όπως  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Zn^{2+}$  και  $Al^{3+}$ . Η συμπλοκοποίηση μπορεί να συμβεί είτε στον δακτύλιο A είτε στον δακτύλιο BCD. Η επιβεβαίωση του μηχανισμού συμπλοκοποίησης παρέχεται από φασματικά δεδομένα και συγκεκριμένα από τις αλλαγές στη θέση των φασματικών ζωνών των δύο χρωμοφόρων περιοχών, που παρατηρούνται κατά την αντίδραση με τα συμπλεκτικά αντιδραστήρια. Πολλαπλά είδη συμπλεγμένων τετρακυκλινών μπορούν να συνυπάρχουν σε ένα διάλυμα. Ο αριθμός και ο τύπος των ειδών μπορεί να αλλάξει ανάλογα με το pH και τη φύση του υπάρχοντος μετάλλου και διαφορετικές τετρακυκλικές ενώσεις δύναται να παρουσιάσουν διαφορετική δράση κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

Ο σχηματισμός συμπλόκων αυξάνει σημαντικά την ικανότητα φθορισμού των τετρακυκλινών, οι οποίες από μόνες τους ελάχιστα θα φθόριζαν σε αλκαλικές συνθήκες. Η ένταση του φθορισμού εξαρτάται από το είδος του διαλύτη και από τη φύση του μετάλλου σύμπλεξης. Για παράδειγμα, στους οργανικούς διαλύτες και συγκεκριμένα στο διμεθυλοφορμαμίδιο εμφανίζεται εντονότερα το φαινόμενο του φθορισμού, ενώ μεταξύ των μεταλλικών ιόντων  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  και  $Zn^{2+}$  ισχυρότερη σύμπλεξη και κατά

συνέπεια εντονότερος φθορισμός παρατηρείται με το  $Mg^{2+}$ , εξαιτίας της μικρότερης ειδικής ακτίνας του.<sup>[9, 11, 12]</sup>

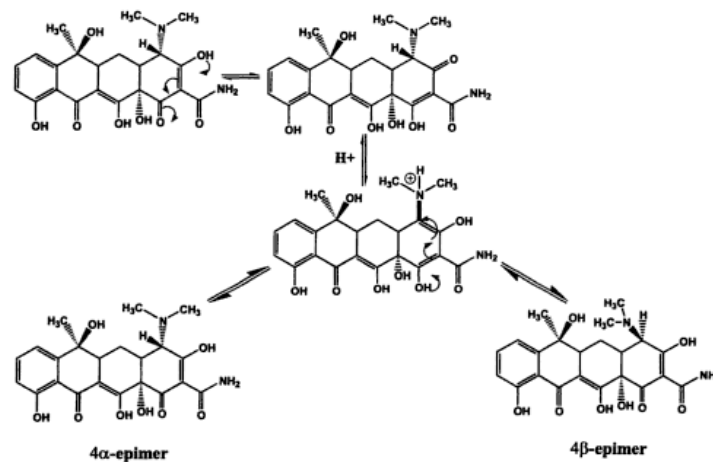
Οι τετρακυκλίνες παράγονται βιοσυνθετικά και για τον λόγο αυτό περιέχουν μικρό ποσοστό προσμίξεων. Επιπλέον, ανάλογα με τις συνθήκες απομόνωσης και ανάλυσής τους είναι δυνατόν να σχηματιστούν προϊόντα αποικοδόμησης τα οποία αποτελούν πηγή επιμόλυνσης των αρχικών ενώσεων. Συγκεκριμένα, έχουν διαπιστωθεί επι-, ισο- και ανυδρο- ανάλογα, καθένα από τα οποία σχηματίζεται υπό την επίδραση διαφόρων συνθηκών στις αρχικές ενώσεις.

Σε ασθενώς όξινες συνθήκες (τιμές pH από 2 μέχρι 6) λαμβάνει χώρα το φαινόμενο του επιμερισμού στις θέσεις 4 και 6 (Εικόνα 1.2). Η διατήρηση της στερεοχημείας στη θέση C-4 είναι ζωτικής σημασίας για την αντιμικροβιακή δράση των τετρακυκλινών, καθώς δραστική είναι μόνο η α-μορφή τους με το -H να βγαίνει μπροστά από το επίπεδο και τη διμεθυλαμινο-ομάδα προς τα πίσω, ενώ η αντίστροφη β-μορφή είναι ανενεργή. Η επαναδιευθέτηση αυτή της στερεοχημείας λέγεται επιμερισμός, οπότε σχηματίζονται τα λεγόμενα επιμερή προϊόντα (ETC, EOTC, ECTC, EDC). Το φαινόμενο του επιμερισμού λαμβάνει χώρα και στη θέση C-6, όπου στην ενεργή μορφή ο υποκαταστάτης R3 βρίσκεται μπροστά από το επίπεδο και ο R2 πίσω.<sup>[13]</sup>

Οι ανυδροτετρακυκλίνες σχηματίζονται με θέρμανση σε ισχυρά όξινες συνθήκες με απώλεια ενός μορίου ύδατος (-H από C5a και -OH από C6) και μεταφορά πρωτονίου (από -O στις θέσεις C11 και C12) επεκτείνοντας έτσι την αρωματικότητα του D δακτυλίου στον C. Ενώ οι περισσότερες ανυδροτετρακυκλίνες είναι σταθερές, η ανυδροοξυτετρακυκλίνη είναι ασταθής λόγω του -OH στη θέση C5 και σχηματίζει ταχύτατα α- και β-οξυτετρακυκλίνη μέσω μιας ενδομοριακής αντίδρασης στον B δακτύλιο.<sup>[14, 15]</sup>

Οι ισοτετρακυκλίνες προκύπτουν κατά την κατεργασία με αλκαλικά μέσα των τετρακυκλινών που έχουν -OH στη θέση C6. Το φαινόμενο αυτό ευνοείται ιδιαίτερα στην περίπτωση της χλωροτετρακυκλίνης.<sup>[15]</sup>

Τέλος, οι τετρακυκλίνες είναι φωτοευαίσθητες και παρουσία φωτός διασπώνται και μετατρέπονται σε ενώσεις που έχουν χάσει εντελώς την αρχική τετρακυκλινική δομή τους.



**Εικόνα 1.2:** Επιμερισμός τετρακυκλίνης (TC) και σχηματισμός επι-τετρακυκλίνης (ETC)

#### 1.4 Χρήση τετρακυκλινών στην ιατρική

Οι τετρακυκλίνες (TCs) αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ευρέως φάσματος αντιβιοτικών λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, τόσο gram-θετικών (staphylococcus, streptococcus, pneumococcus, enterococcus), όσο και gram-αρνητικών (gonococcus, cholera, dysentery bacillus, brucella), μικροοργανισμών (chlamydiae, mycoplasmas, rickettsiae), καθώς και έναντι πρωτόζωων παρασίτων. Το ευρύ πεδίο της αντιμικροβιακής δράσης των τετρακυκλινών αλλά και η απουσία σημαντικών παρενεργειών, έχουν ως αποτέλεσμα τη χρήση τους τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική. Επιπλέον βρίσκουν εφαρμογή και ως αυξητικά πρόσθετα σε ζωτροφές στους τομείς της κτηνοτροφίας και ιχθυοτροφίας με στόχο την ταχεία αύξηση της παραγωγής.<sup>[16]</sup>

Στην ιατρική οι τετρακυκλίνες χορηγούνται για την αντιμετώπιση διαφόρων μολυσματικών ασθενειών όπως βρουκέλλωση, χλαμυδιακές λοιμώξεις, ρικετσιώσεις, πυρετός Q, μυκοπλασματικές λοιμώξεις, χρόνια προστατίτιδα, χολέρα, πανώλη, χρόνια ιγμορίτιδα καθώς και για την εξάλειψη της ακμής (κυρίως η μινοκυκλίνη).

Οι τετρακυκλίνες χορηγούνται συνήθως από το στόμα, αλλά μπορούν να χορηγηθούν και παρεντερικά. Η απορρόφησή τους λαμβάνει χώρα κυρίως στο στομάχι και επηρεάζεται από την παρουσία τροφών και κυρίως γαλακτοκομικών προϊόντων που είναι πλούσια σε ασβέστιο. Λόγω της λιποφιλικότητάς τους κατανέμονται ικανοποιητικά σε όλα τα βιολογικά υγρά και στους ιστούς και αποβάλλονται χωρίς προηγουμένως να μεταβολιστούν μέσω των ούρων.

### **1.5 Χρήση των τετρακυκλινών στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία**

Το ευρύ πεδίο δραστηριότητας των τετρακυκλινών, η καλή απορροφητικότητά τους, η μικρή τοξικότητά τους σε υψηλές συγκεντρώσεις, καθώς και το σχετικά χαμηλό κόστος τους, έχουν ως αποτέλεσμα την ευρύτατα διαδεδομένη χρήση τους στην κτηνιατρική για την αντιμετώπιση βακτηριακών και μη λοιμώξεων των ζώων, αλλά και στην κτηνοτροφία για προληπτικούς λόγους και ως αυξητικά πρόσθετα στις ζωοτροφές, ανελλιπώς από τη δεκαετία του 1950 μέχρι σήμερα. Η παγκόσμια παραγωγή τετρακυκλινών υπολογίζεται σε χιλιάδες τόνους κάθε χρόνο, ενώ οι τετρακυκλίνες καταλαμβάνουν την πρώτη θέση στον κατάλογο των αντιβιοτικών που χορηγούνται στην κτηνιατρική και την κτηνοτροφία. Σύμφωνα με τους υπολογισμούς του FEDESA μόνο στην Ευρωπαϊκή Ένωση το 1998 χρησιμοποιήθηκαν στη κτηνιατρική 2.294 τόνοι τετρακυκλινών αντιπροσωπεύοντας το 66% της συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών στον τομέα αυτό.<sup>[17]</sup>

Χρησιμοποιούνται κυρίως για την πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του αναπνευστικού, του πεπτικού και του ουρογεννητικού συστήματος των ζώων.<sup>[18]</sup> Έχει αναφερθεί η χορήγηση τετρακυκλινών σε βοοειδή, αιγοπρόβατα, πουλερικά, χοιρινά, ψάρια αλλά και στη μελισσοκομία.<sup>[19]</sup> Μεγαλύτερη συχνότητα χρήσης παρατηρείται για την οξυτετρακυκλίνη, την τετρακυκλίνη, τη χλωροτετρακυκλίνη και τη δοξυκυκλίνη ενώ υπάρχει η δυνατότητα χρήσης και άλλων τετρακυκλινών λόγω της αυξημένης σταθερότητάς τους (ρολιτετρακυκλίνη, δεμεκλοκυκλίνη).

## 1.6 Μηχανισμός δράσης των τετρακυκλινών και αντίσταση των βακτηρίων

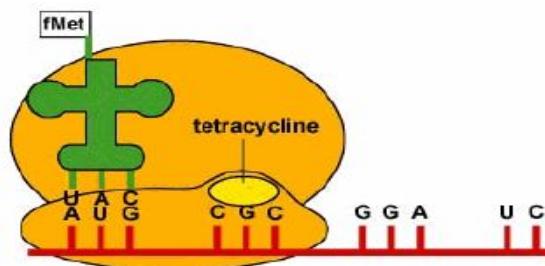
Τα περισσότερα αντιβιοτικά σταματούν την ανάπτυξη των βακτηρίων παρεμποδίζοντας τη λειτουργία διαφόρων μορίων στόχων, είτε στο εσωτερικό του βακτηριακού κυττάρου, είτε στην επιφάνεια της κυτταρικής μεμβράνης. Οι τετρακυκλίνες παρεμποδίζουν την ομαλή διεξαγωγή πολλών ενζυμικών βιοχημικών αντιδράσεων που είναι απαραίτητες για την ομαλή λειτουργία, τόσο των βακτηριακών κυττάρων, όσο και των κυττάρων των θηλαστικών, όπως η οξειδωτική φωσφορυλίωση και οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων. Η έκταση της παρεμπόδισης αυτών των βιοχημικών διεργασιών από την παρουσία των τετρακυκλινών δεν είναι ικανή να εξηγήσει τη βακτηριοστατική τους δράση, αλλά είναι σημαντική για την κατανόηση των παρενεργειών που εμφανίζονται, είτε κατά τη χορήγηση τετρακυκλινών είτε σε περίπτωση υπερδοσολογίας.

Η σημαντικότερη βιοχημική διεργασία στην οποία παρεμβαίνουν οι τετρακυκλίνες και στην οποία μπορεί να αποδοθεί η βακτηριοστατική τους δράση είναι η βακτηριακή πρωτεϊνσύνθεση. Για να εισαχθούν στο βακτηριακό κύτταρο και να φτάσουν τα μόρια-στόχο, οι τετρακυκλίνες πρέπει να περάσουν από διάφορα μεμβρανικά συστήματα ανάλογα με τον τύπο του βακτηρίου. Έτσι διαπερνούν την εξωτερική κυτταρική μεμβράνη των gram-αρνητικών βακτηρίων μέσω παθητικής μεταφοράς μέσα από ειδικούς πόρους-κανάλια με τη μορφή θετικά φορτισμένων συμπλόκων με κάποιο μέταλλο. Το σύμπλοκο τετρακυκλίνης-μετάλλου στη συνέχεια διασπάται και το ελεύθερο σχετικά λιπόφιλο μόριο της τετρακυκλίνης περνά την εσωτερική (κυτοπλασματική μεμβράνη) με διάχυση. Στην περίπτωση των gram-θετικών βακτηρίων, η είσοδος των τετρακυκλινών από την κυτοπλασματική μεμβράνη πραγματοποιείται μέσω ενεργητικής μεταφοράς, με τις τετρακυκλίνες να βρίσκονται σε ελεύθερη και όχι συμπλοκοποιημένη μορφή.

Στο εσωτερικό του κυτοπλάσματος λόγω της τιμής του pH, αλλά και λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης κατιόντων, τα μόρια των τετρακυκλινών επανασυμπλοκοποιούνται και το σύμπλοκο τετρακυκλίνης-μετάλλου είναι αυτό που συνδέεται στην 30S υπομονάδα του συμπλέγματος ριβοσώματος-16S rRNA, παρεμποδίζοντας το αμινοάκυλο t-RNA να πλησιάσει, οπότε



διακόπτεται η πρωτεϊνοσύνθεση (εικόνα 1.2). Ακόμα διαπιστώθηκε ότι οι τετρακυκλίνες σταματούν και τη μιτοχονδριακή πρωτεϊνοσύνθεση, συνδεόμενες με το ριβόσωμα 70S των μιτοχονδρίων. Η αντιπαρασιτική δράση των τετρακυκλινών αποδίδεται εν πολλοίς στη διακοπή της μιτοχονδριακής πρωτεϊνοσύνθεσης, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι πολλά πρωτόζωα διαθέτουν μιτοχόνδρια.<sup>[20, 21]</sup>



**Εικόνα 1.3:** Μηχανισμός αναστολής της βακτηριακής πρωτεϊνοσύνθεσης από τις TCs<sup>[22]</sup>

Με βάση τον παραπάνω μηχανισμό οι τετρακυκλίνες άρχισαν να χρησιμοποιούνται για την αντιμετώπιση πληθώρας βακτηριακών λοιμώξεων. Τις τελευταίες δεκαετίες όμως έχει περιοριστεί η χρήση τους σε ασθένειες για τις οποίες παλαιότερα θα αποτελούσαν πρώτη επιλογή, λόγω της διαρκούς αύξησης των βακτηριακών στελεχών που έχουν αναπτύξει μηχανισμούς αντίστασης στις τετρακυκλίνες. Το φαινόμενο αυτό, που εμφανίζεται σε όλες τις ομάδες αντιβιοτικών, οφείλεται στην υπερβολικά διαδεδομένη χρήση της ομάδας αυτής, τόσο στην ιατρική όσο και στην κτηνιατρική όλες τις προηγούμενες δεκαετίες.

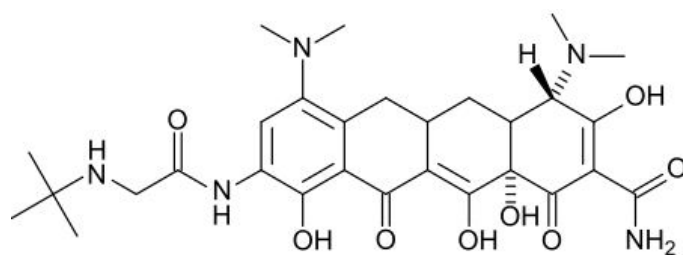
Τρεις είναι οι μηχανισμοί που έχουν αναπτυχθεί από βακτηριακούς οργανισμούς:

1. η αποβολή των τετρακυκλινών από το κύτταρο
2. η προστασία του ριβοσώματος
3. η ενζυματική απενεργοποίηση των τετρακυκλινών

Η ανάπτυξη των μηχανισμών αυτών είναι το αποτέλεσμα είτε της απόκτησης γενετικής τροποποιημένων ανθεκτικών στις τετρακυκλίνες γονιδίων από τα βακτήρια, είτε μεταλλάξεων στη δομή του rRNA τους.

Καθώς το φαινόμενο της αυξημένης με την πάροδο του χρόνου αντίστασης των μικροοργανισμών στα αντιβιοτικά είναι ένα καθολικό φαινόμενο που πλήττει όλες τις ομάδες, έχουν γίνει και γίνονται επισταμένες

προσπάθειες για την αντιμετώπισή του. Αυτές οι προσπάθειες επικεντρώνονται κυρίως στην επέκταση των μελών της κάθε ομάδας αντιβιοτικών με τη σύνθεση νέων, τα οποία αντιπαρέρχονται τους μηχανισμούς αντίστασης που έχουν αναπτυχθεί. Μια τέτοια προσπάθεια έγινε το 1990 και για τις τετρακυκλίνες και οδήγησε στην ανακάλυψη μιας νέας γενιάς τετρακυκλινών, των γλυκοκυκλινών. Οι γλυκοκυκλίνες είναι 9-ακυλάμιδο παράγωγα της μινοκυκλίνης. Συγκεκριμένα η τιγκεκυκλίνη έχει μελετηθεί για την ικανότητά της να αντιμετωπίζει τα ανθεκτικά στις συμβατικές τετρακυκλίνες βακτήρια. Πρόκειται για ένα ημισυνθετικό παράγωγο το οποίο προκύπτει με εισαγωγή της t-βουτυλ-γλυκυλ-αμιδο ομάδας στη θέση 9 του σκελετού της μινοκυκλίνης (εικόνα 1.3). Η υποκατάσταση αυτή έχει ως αποτέλεσμα ισχυρότερη κατά πέντε φορές σύνδεση στο ριβόσωμα άρα μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι του φαινομένου της αποβολής της τετρακυκλίνης από το κύτταρο.<sup>[23]</sup>



**Εικόνα 1.4:** Δομή τιγκεκυκλίνης<sup>[24]</sup>

## 1.7 Τοξικότητα

Οι τετρακυκλίνες όπως και όλα τα αντιβιοτικά, προσφέρουν προστασία προσβάλλοντας μόνο τα κύτταρα των βακτηρίων, χωρίς τα ίδια να προκαλούν βλάβη στα ανθρώπινα ή ζωικά κύτταρα. Γενικά, θεωρούνται μη τοξικές και σχετικές μελέτες έδειξαν ότι δεν υπάρχει σαφής κίνδυνος γονοτοξικότητας ή καρκινογένεσης. Παρ' όλα αυτά θεωρούνται υπεύθυνες για την εκδήλωση ενός σχετικά μεγάλου αριθμού ανεπιθύμητων ενεργειών.<sup>[25]</sup>

Η χρήση τετρακυκλινών μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις ιδιαίτερα σε υπερευαίσθητους οργανισμούς. Όταν χορηγούνται δια του στόματος επηρεάζουν τη μικροχλωρίδα του πεπτικού συστήματος με αποτέλεσμα την εκδήλωση γαστρικών ενοχλήσεων, ενώ η ενδοφλέβια χορήγηση είναι οδυνηρή και πιθανόν να δημιουργήσει θρομβοφλεβίτιδα.

Οι τετρακυκλίνες εναποτίθενται σε ιστούς που περιέχουν ασβέστιο όπως οστά και δόντια προκαλώντας καφέ-κίτρινη χρώση. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα έντονο κατά τη διάρκεια της εγκυμοσύνης και κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των νεαρών οργανισμών, με συνέπεια τη δημιουργία προβλημάτων στην επιμετάλλωση των δοντιών και τη φυσιολογική ανάπτυξη των οστών.

Εξαιτίας της αυξημένης διάσπασης των πρωτεϊνών που παρατηρείται κατά τη διάρκεια της θεραπείας με τετρακυκλίνες, μπορεί να παρατηρηθεί επιδείνωση της ουραιμίας σε καταστάσεις νεφρικής ανεπάρκειας καθώς και εμφάνιση του φαινομένου της αζωταιμίας.

Ενώ τα περισσότερα φάρμακα μετά την πάροδο του χρόνου ζωής τους χάνουν τη δραστηριότητά τους, οι τετρακυκλίνες μετατρέπονται σε ιδιαίτερα επικίνδυνες ενώσεις και μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές βλάβες στα νεφρά όπως το σύνδρομο Falconi.<sup>[26]</sup>

Τέλος, η εμφάνιση δερματοπαθειών αποτελεί αρκετά σύνηθες φαινόμενο το οποίο οφείλεται στη φωτοευαισθησία των τετρακυκλινών. Με εξίσου μεγάλη συχνότητα εμφανίζονται μυκητιάσεις όπως καντινίαση μετά από θεραπεία με τετρακυκλίνες.

## **1.8 Κατάλοιπα τετρακυκλινών σε κτηνοτροφικά προϊόντα και δημόσια υγεία**

### **1.8.1 Γενικά**

Τα κτηνοτροφικά προϊόντα, (εδώδιμοι ιστοί, γαλακτοκομικά, αυγά) αφενός μεν καταλαμβάνουν ένα πολύ μεγάλο τμήμα του σύγχρονου τρόπου διατροφής, αφετέρου έχουν μεγάλη σημασία για τη σωστή θρέψη και ανάπτυξη του ανθρώπου. Ελλοχεύουν όμως πολλοί κίνδυνοι κατά την

κατανάλωση αυτών των προϊόντων που αφορούν παθογόνους μικροοργανισμούς (βακτήρια και παράσιτα), κατάλοιπα φαρμάκων-αντιβιοτικών αλλά και χημικές ουσίες.

Ο όρος κατάλοιπα αναφέρεται σε ότι παραμένει στα κτηνοτροφικά προϊόντα από φάρμακα που χορηγήθηκαν άμεσα στα ζώα (είτε για θεραπεία, είτε για πρόληψη ασθενειών, είτε ως αυξητικοί παράγοντες) ή έλαβαν έμμεσα τα ζώα (όταν βόσκουν στους αγρούς ή όταν τρώνε τροφές επιβαρημένες με φυτοφάρμακα και βιοκτόνα). Μια μεγάλη ποικιλία αντιβιοτικών, μεταξύ των οποίων εξέχουσα θέση κατέχουν οι τετρακυκλίνες, χρησιμοποιείται για θεραπευτικούς, προληπτικούς και αυξητικούς σκοπούς στην εκτροφή των παραγωγικών ζώων. Ως αποτέλεσμα ο κίνδυνος ποσότητες αυτών των φαρμάκων να υφίστανται στα τελικά προϊόντα και μέσω της κατανάλωσης να περνούν στον άνθρωπο είναι σημαντικός.

Συγκεκριμένα, οι τετρακυκλίνες έχουν την ιδιότητα να συγκεντρώνονται σε διάφορους ιστούς (συκώτι, μυς, σπλήνα, νεφρά) και να παραμένουν στο αίμα μετά την απορρόφηση σε πολύ μεγαλύτερο ποσοστό από άλλα αντιβιοτικά, με αποτέλεσμα ακόμα και μετά από την πάροδο ημερών από τη χορήγησή τους να ανιχνεύονται στα ζωικά προϊόντα. Επίσης, σημαντικό ποσοστό καταλοίπων τετρακυκλινών απελευθερώνεται στο περιβάλλον λόγω της παραγωγικής διαδικασίας καθώς και μέσω της διαδικασίας απέκκρισης.<sup>[27]</sup> Αν και κατά τη διαδρομή τους μέσα από τα υδάτινα, εναέρια και χερσαία συστήματα πιθανόν να μετατρέπονται σε διάφορες μορφές λιγότερο δραστικές, όπως για παράδειγμα τα σύμπλοκά τους με δισθενή και τρισθενή μέταλλα, εν τούτοις είναι πιθανόν να εισέλθουν και πάλι στην τροφική αλυσίδα με βλαπτικές συνέπειες για τον άνθρωπο.

Στο πλαίσιο της προσπάθειας περιορισμού του φαινομένου αυτού και προστασίας της υγείας των καταναλωτών, καταβάλλονται προσπάθειες περιορισμού της χορήγησης αντιβιοτικών ως αυξητικών παραγόντων σε παραγωγικά ζώα σε παγκόσμιο επίπεδο. Παράλληλα πραγματοποιούνται έλεγχοι με στόχο τόσο την ανίχνευση, όσο και τον ποσοτικό προσδιορισμό καταλοίπων αντιβιοτικών σε κτηνοτροφικά προϊόντα.

### 1.8.2 Κατάλοιπα τετρακυκλινών στα ψάρια

Η πρόληψη και εξάλειψη των νοσημάτων που πλήττουν τις ιχθυοκαλλιέργειες αποτελεί θέμα μείζονος σημασίας δεδομένων των οικονομικών επιπτώσεών τους στην παραγωγή. Οι ιχθυοκαλλιεργητές καταφεύγουν στη χρήση φαρμάκων προκειμένου να μειώσουν τη θνησιμότητα των ψαριών και κατ' επέκταση το κόστος στην παραγωγή από τις απώλειες. Οι χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως για το σκοπό αυτό ανήκουν στην κατηγορία των αντιβιοτικών και σημαντική θέση κατέχουν οι τετρακυκλίνες λόγω του χαμηλού τους κόστους και του μεγάλου φάσματος δράσης τους. Η χορήγηση των τετρακυκλινών στα ψάρια γίνεται είτε με ένεση, είτε με φαρμακευτικά λουτρά είτε με φαρμακούχο ιχθυοτροφή που αποτελεί και το συνηθέστερο τρόπο χορήγησης.

Η απορρόφηση, η κατανομή, ο μεταβολισμός και η αποβολή συνιστούν τα στάδια από τα οποία διέρχεται η αντιβιοτική ουσία κατά τη διαδρομή της στον οργανισμό του ψαριού και επηρεάζονται από αβιοτικούς (θερμοκρασία νερού, συγκέντρωση οξυγόνου, pKa φαρμάκου κ.α.) και βιοτικούς παράγοντες (είδος και ηλικία ψαριού). Η όλη αυτή διαδικασία έχει μεγάλη σημασία για τον καθορισμό της κατάλληλης χρονικής στιγμής για τη διάθεσή τους προς κατανάλωση με ασφάλεια.<sup>[28 - 31]</sup>

Λόγω των παραπάνω είναι αναπόφευκτη η παρουσία καταλοίπων τετρακυκλινών στα ψάρια και η ρύπανση του περιβάλλοντος από την απελευθέρωσή τους σε αυτό. Με τον τρόπο αυτό οι τετρακυκλίνες εισέρχονται στην τροφική αλυσίδα και για αυτό είναι απαραίτητος ο έλεγχος και η ύπαρξη μέγιστων επιτρεπτών ορίων για τις ουσίες αυτές.

## 1.9 Νομοθεσία

Η ασφάλεια των τροφίμων και η προστασία της υγείας των καταναλωτών αποτελούν βασική επιδίωξη και στόχο της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία την τελευταία δεκαετία κλονίσθηκε από διάφορα διατροφικά σκάνδαλα, πολλά από τα οποία είχαν ως επίκεντρο την κτηνοτροφία και τα προϊόντα της. Έτσι την τελευταία δεκαετία η Ευρωπαϊκή Επιτροπή αλλά και τα επιμέρους κράτη-μέλη έχουν αρχίσει να επανεξετάζουν τον τρόπο με τον οποίο χειρίζονται τη διατροφική αλυσίδα. Αυτή τη στιγμή βρίσκονται σε ισχύ διάφορες κοινοτικές οδηγίες που έχουν ως αντικείμενο την ασφάλεια των τροφίμων, ορισμένες από τις οποίες ρυθμίζουν θέματα που σχετίζονται με τη χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και την ανίχνευση καταλοίπων τους σε τρόφιμα.

Το 1970 η Ευρωπαϊκή Ένωση με τη οδηγία 70/524/EEC, απαγόρευσε τη χορήγηση των περισσότερων αντιβιοτικών (μεταξύ των οποίων και των τετρακυκλινών), αλλά και φαρμάκων τα οποία χρησιμοποιούνταν στην κτηνιατρική για θεραπευτικούς σκοπούς ως αυξητικά πρόσθετα στην κτηνοτροφία. Η προσπάθεια αυτή ολοκληρώθηκε με την οδηγία 96/51/EC η οποία απαγορεύει ρητά τη χρησιμοποίηση οποιουδήποτε φαρμακευτικού προϊόντος για θεραπευτικούς και αυξητικούς σκοπούς ταυτόχρονα.<sup>[32-34]</sup> Σήμερα η παραγωγή, πώληση, προμήθεια και χρήση των κτηνιατρικών φαρμάκων ρυθμίζεται από την οδηγία 2001/82/EC. Απαραίτητη προϋπόθεση για την αδειοδότηση οποιουδήποτε κτηνιατρικού φαρμάκου είναι η ύπαρξη καθορισμένων ανώτατων ορίων καταλοίπων (Maximum Residue Limits, MRLs) στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Ο καθορισμός των MRLs γίνεται σύμφωνα με τον κανονισμό 2377/90/EC.

Οι τετρακυκλίνες υπάγονται στο παράρτημα εκείνο του κανονισμού που περιλαμβάνει ουσίες για τις οποίες έχουν καθοριστεί συγκεκριμένα όρια καταλοίπων. Συγκεκριμένα έχει θεσπιστεί το όριο των 100 µg/kg για το κρέας και το γάλα για όλες τις τετρακυκλίνες, ενώ για τα αυγά, το ήπαρ και τους νεφρούς έχουν θεσπιστεί τα 200, 300 και 600 µg/kg αντίστοιχα. Στο όριο των 100, 200, 300 ή 600 µg/kg περιλαμβάνεται το άθροισμα της ποσότητας της μητρικής τετρακυκλίνης και του αντίστοιχου επιμερούς της. Στα ψάρια η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει ως τιμή MRL αυτή των 100 µg/kg βάρους ιστού

όπου η τιμή αυτή αφορά στο άθροισμα της μητρικής τετρακυκλίνης και του επιμερούς της για την περίπτωση της οξυτετρακυκλίνης, της τετρακυκλίνης και της χλωροτετρακυκλίνης, ενώ για τη δοξυκυκλίνη το όριο αφορά μόνο στη μητρική ουσία.<sup>[35-37]</sup>

Αναφορικά με τις χρησιμοποιούμενες μεθόδους προσδιορισμού των τετρακυκλινών η Ευρωπαϊκή Επιτροπή με την απόφαση 2002/657/EC, προβλέπει κανόνες για τις αναλυτικές μεθόδους προσδιορισμού οργανικών καταλοίπων, που χρησιμοποιούνται κατά τις δοκιμές ανάλυσης δειγμάτων και καθορίζει κριτήρια για την ερμηνεία των αναλυτικών αποτελεσμάτων.<sup>[38]</sup> Με τον τρόπο αυτό ελέγχονται τα χαρακτηριστικά επίδοσης των χρησιμοποιούμενων μεθόδων όπως η ορθότητα, η πιστότητα, η ευαισθησία έτσι ώστε να εξασφαλίζεται η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2**

### **ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ**

#### **2.1 Τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού τετρακυκλινών**

Η προκατεργασία του εκάστοτε αναλυτικού δείγματος αποτελεί το δυσκολότερο και ταυτόχρονα το πλέον σημαντικό μέρος της αναλυτικής πορείας. Συνήθως το δείγμα αποτελεί μείγμα διαφόρων συστατικών συμπεριλαμβανομένης και της προσδιοριζόμενης ουσίας, της οποίας η απομόνωση είναι πολλές φορές δύσκολη έως και αδύνατη, λόγω της παρεμποδιστικής δράσης των υπολοίπων ουσιών τόσο στον διαχωρισμό όσο και στην ανίχνευση. Επιβάλλεται λοιπόν η πειραματική εύρεση των καλύτερων συνθηκών και μεθόδων ώστε η απομόνωση των επιθυμητών συστατικών να είναι ποσοτική. Στη συνέχεια γίνεται αναφορά στις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές απομόνωσης και καθαρισμού των τετρακυκλινών.

##### **2.1.1 Εκχύλιση στερεών με υγρό και υγρό-υγρό εκχύλιση**

Η εκχύλιση είναι μια από τις πιο συνηθισμένες τεχνικές απομόνωσης και βασίζεται στην ισορροπία κατανομής μιας ουσίας μεταξύ δυο φάσεων, που αναμιγνύονται ελάχιστα μεταξύ τους. Η απλούστερη περίπτωση διαχωρισμού με εκχύλιση είναι η διαλυτοποίηση ενός ή περισσότερων συστατικών μείγματος στερεών με κατάλληλο διαλύτη (εκχύλιση στερεών με υγρό). Σε πολλές περιπτώσεις αρκεί η ανακίνηση μιας ζυγισμένης ποσότητας του στερεού δείγματος με το διαλύτη και μετά το τέλος της εκχύλισης το στερεό που παραμένει απομακρύνεται είτε με διήθηση είτε με φυγοκέντρηση. Αν ο αναλύτης είναι ήδη στην υγρή φάση μπορεί να μεταφερθεί σε άλλον διαλύτη με χρήση της υγρό-υγρό εκχύλισης. Σε αυτήν χρησιμοποιείται ένας δεύτερος διαλύτης, ο οποίος πρέπει να μην αναμιγνύεται με τον αρχικό, αλλά να διαλύει ικανοποιητικά την εκχυλιζόμενη ουσία. Η επιλογή του διαλύτη είναι πολύ σημαντική για την ανάκτηση της προσδιοριζόμενης ουσίας. Ανάλογα λοιπόν με τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του αναλύτη επιλέγονται



είτε οργανικοί διαλύτες, όπως ακετονιτρίλιο, μεθανόλη, είτε υδατικά διαλύματα ηλεκτρολυτών, είτε μείγματα διαλυτών.<sup>[39]</sup>

### 2.1.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE)

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE), αποτελεί μια από τις συχνότερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων. Η απομόνωση των επιθυμητών ενώσεων από το δείγμα στο οποίο περιέχονται, πραγματοποιείται με την κατακράτησή τους σε προσροφητικό υλικό που έχει τη μορφή στήλης, φίλτρου ή δισκίου και στη συνέχεια με την εκρόφησή τους με τη χρήση κατάλληλου διαλύτη ή μείγματος διαλυτών. Η διαβίβαση διαλυτών και διαλυμάτων από τη στερεά φάση μπορεί να γίνει υπό κενό, με φυγοκέντρηση ή με μηχανική άσκηση πίεσης. Η SPE αποτελεί ταυτόχρονα μέθοδο καθαρισμού και προσυγκέντρωσης.

Τα στάδια που ακολουθούνται κατά τη διαδικασία εκχύλισης στερεάς φάσης είναι τα εξής:

#### 1. *Ενεργοποίηση – εξισορρόπηση του προσροφητικού υλικού (conditioning)*

Το προσροφητικό υλικό προετοιμάζεται για την προσθήκη του δείγματος με τη διαβίβαση κατάλληλων διαλυτών για την ενεργοποίηση των δραστικών ομάδων του, έτσι ώστε να διασφαλίζεται η επαναληψιμότητα στην κατακράτηση των προσδιοριζόμενων ουσιών. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται διαλύτες όσο το δυνατόν παρόμοιας πολικότητας και pH με το δείγμα, ενώ δίνεται προσοχή για να μη στεγνώσει το υπόστρωμα κατά τη φάση αυτή.

#### 2. *Διέλευση δείγματος και κατακράτηση ουσιών (loading – retention)*

Κατά τη διαβίβαση του δείγματος από το φυσίγγιο ή το δισκίο στερεάς φάσης πραγματοποιείται η κατακράτηση των προσδιοριζόμενων ουσιών, ενώ η ροή πρέπει να είναι ελεγχόμενη για τη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Υπερφόρτωση του προσροφητή, πάνω από τη δυνατότητα

κατακράτησής του (χωρητικότητα), μπορεί να ευθύνεται για την απώλεια (breakthrough) των προς ανάλυση ουσιών.

### 3. Έκπλυση (*washing*)

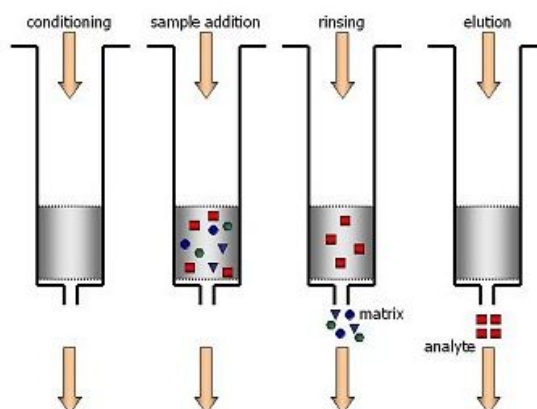
Επειδή κατά τη διέλευση του δείγματος από τη στερεά φάση είναι δυνατόν εκτός από τις προσδιοριζόμενες ουσίες, να κατακρατήθηκαν και ανεπιθύμητες ουσίες, είναι απαραίτητη η έκπλυση με κατάλληλο διαλύτη που διαλύει τις προσμίξεις αλλά όχι τους αναλύτες.

### 4. Ξήρανση του προσροφητικού υλικού (*drying*)

Ο διαλύτης έκπλυσης εμποδίζει το στάδιο της έκλουσης που ακολουθεί και γι' αυτό το λόγο πρέπει να απομακρύνεται με ξήρανση του προσροφητικού υλικού, είτε με αέριο άζωτο ή με κενό.

### 5. Έκλουση των προσδιοριζόμενων ουσιών (*elution*)

Επιλέγεται ο κατάλληλος διαλύτης ή συνδυασμός διαλυτών έτσι ώστε να υπερνικηθούν οι δυνάμεις με τις οποίες οι επιθυμητές ουσίες κατακρατούνται στη στερεά φάση και να εκλουσθούν. Το έκλουσμα που λαμβάνεται, περιέχει την επιθυμητή ουσία συνήθως σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από το αρχικό δείγμα, εάν επιλεγούν κατάλληλα οι όγκοι των διαλυμάτων του δείγματος και του υγρού έκλουσης.<sup>[39]</sup>



Εικόνα 2.1: Στάδια SPE<sup>[40]</sup>

Οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για την εξισορρόπηση, έκπλυση και έκλουση των ουσιών από τη στήλη, εξαρτώνται από το είδος του προσροφητικού υλικού και της προς απομόνωση ουσίας και δίνονται από τους κατασκευαστές των στηλών ή επιλέγονται πειραματικά για την αποδοτικότερη και εκλεκτικότερη εκχύλιση. Συνήθως χρησιμοποιούνται ακετονιτρίλιο, νερό καθώς και μεθανόλη.

Η δομή και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του προσροφητικού υλικού καθορίζουν το είδος της αλληλεπίδρασής του με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις και κατά συνέπεια τον μηχανισμό του διαχωρισμού. Η κυριότερη στατική φάση που χρησιμοποιείται στην SPE είναι η πυριτία SiO<sub>2</sub> (Silica), στην επιφάνεια της οποίας προσδένονται διάφορες ομάδες, πολικές, άπολες ή ιονανταλλακτικές. Επίσης χρησιμοποιούνται πολυμερή προσροφητικά υλικά, όπως για παράδειγμα το συμπολυμερές στυρολίου-διβινυλοβενζολίου τα οποία είναι ανθεκτικότερα σε ακραίες τιμές pH.

Η SPE πλεονεκτεί έναντι πολλών τεχνικών απομόνωσης ως προς την απλότητα στον χειρισμό, τη χρήση μικρότερων όγκων διαλυτών, τον μικρό χρόνο ανάλυσης, τη δυνατότητα προσυγκέντρωσης, την αποφυγή σχηματισμού γαλακτωμάτων και την αποτελεσματική απομάκρυνση παρεμποδιζόντων συστατικών του δείγματος.

### **2.1.3 QuEChERS και εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dispersive Solid Phase Extraction, dSPE)**

Η τεχνική QuEChERS είναι μια νέα τεχνική προκατεργασίας δειγμάτων που τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο μιας και συνδυάζει πολλά επιθυμητά χαρακτηριστικά. Η διαδικασία είναι γρήγορη, εύκολη, χαμηλού κόστους, αποτελεσματική και ασφαλής (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe).



**Εικόνα 2.2:** Δοχεία Quechers<sup>[41]</sup>

Περιλαμβάνει δύο στάδια:

1. Αρχικά το ομογενοποιημένο δείγμα ζυγίζεται σε φυγοκεντρικό σωλήνα που περιέχει προζυγισμένη ποσότητα αλάτων. Προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα οργανικού διαλύτη και ακολουθεί ανάδευση. Στο στάδιο αυτό γίνεται η εκχύλιση της προς προσδιορισμό ουσίας στο οργανικό μέσο. Ακολουθεί φυγοκέντρηση και το υπερκείμενο διάλυμα διαχωρίζεται από το μητρικό υλικό.
2. Το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα, ο οποίος περιέχει ακριβείς ποσότητες ξηραντικών αλάτων και προσροφητικών υλικών για την απομάκρυνση του νερού και των παρεμποδιζόντων ουσιών, αντίστοιχα. Αυτή η διαδικασία καθαρισμού ονομάζεται εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dispersive Solid Phase Extraction, dSPE) και μπορεί να εφαρμοστεί και ανεξάρτητα από το προηγούμενο στάδιο.<sup>[42]</sup>

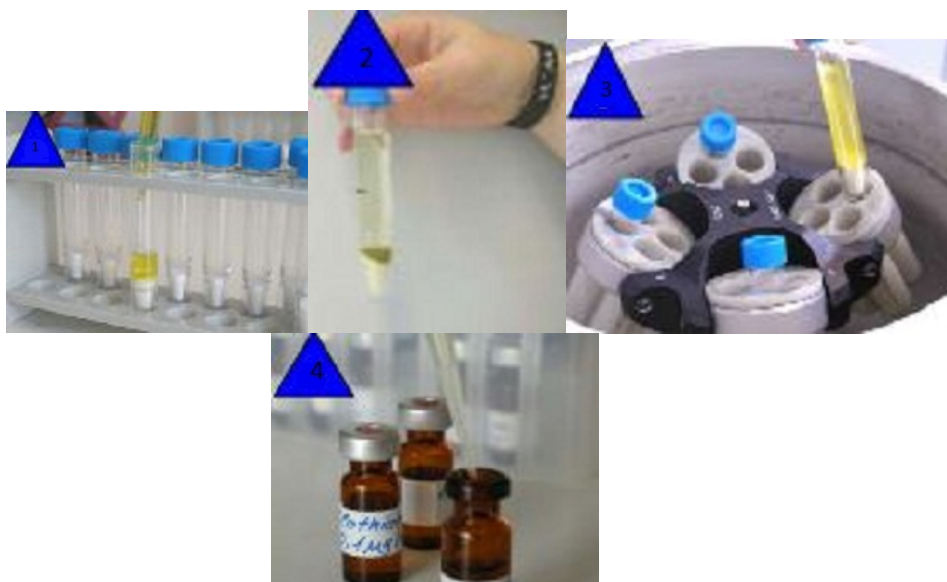
Όπως προαναφέρθηκε η dSPE είναι μια τεχνική καθαρισμού δειγμάτων η οποία πραγματοποιείται μετά την εκχύλιση της προσδιοριζόμενης ουσίας, είτε αυτή έχει γίνει με υγρό-υγρό εκχύλιση, είτε με στερεό-υγρό εκχύλιση, είτε με εκχύλιση στερεάς φάσης.

Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες της dSPE ανάλογα με τον αναλύτη που επιθυμούμε να απομονώσουμε διαφοροποιούνται ως προς το είδος αλλά και την ποσότητα των ουσιών που περιέχουν. Τα κύρια συστατικά τους είναι το θειικό μαγνήσιο, το οποίο απομακρύνει το νερό από τον οργανικό διαλύτη και οι πρωτοταγείς-δευτεροταγείς αμίνες (PSA) που απομακρύνουν τα σάκχαρα

και τα λιπαρά οξέα. Αυτοί οι φυγοκεντρικοί σωλήνες είναι διαθέσιμοι με ή χωρίς ενεργό άνθρακα, για την απομάκρυνση των χρωστικών και με ή χωρίς C<sub>18</sub> για την απομάκρυνση μη πολικών συστατικών.

Η διαδικασία dSPE περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Μεταφορά του εκχυλίσματος στο φυγοκεντρικό σωλήνα dSPE.
2. Έντονη ανάδευση για 30 s έως 2 min.
3. Φυγοκέντρηση στις 4.000 rpm για 10 min.
4. Παραλαβή του υπερκείμενου υγρού για περαιτέρω ανάλυση.<sup>[43]</sup>



**Εικόνα 2.3:** Διαδικασία dSPE<sup>[43]</sup>

## 2.2 Τεχνικές διαχωρισμού και ανίχνευσης των τετρακυκλινών

Αρκετές είναι οι μέθοδοι οι οποίες έχουν δημοσιευθεί μέχρι σήμερα για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης. Η τεχνική που χρησιμοποιείται μέχρι τώρα είναι η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) σε συνδυασμό με διάφορα είδη ανιχνευτών. Στη συνέχεια παρουσιάζεται η αρχή εφαρμογής της HPLC καθώς και των ανιχνευτών που χρησιμοποιούνται στον προσδιορισμό των τετρακυκλινών.

## **2.2.1 Υγροχρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC)**

Ο γενικός όρος χρωματογραφία αναφέρεται στο σύνολο των μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό ουσιών με παραπλήσιες χημικές ιδιότητες.<sup>[44]</sup> Ο διαχωρισμός των συστατικών ενός μίγματος βασίζεται στη διαφορετική κατανομή τους μεταξύ κινητής και στατικής φάσης. Οι χρωματογραφικές τεχνικές μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με το είδος της κινητής φάσης σε υγροχρωματογραφία, αεριοχρωματογραφία και χρωματογραφία υπερκρίσιμου ρευστού.

Η υγροχρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης (HPLC) εμφανίστηκε τη δεκαετία του 1960 και αποτελεί την εξέλιξη της υγροχρωματογραφίας καθώς παρέχει τη δυνατότητα λειτουργίας σε υψηλές πιέσεις και τη χρήση πληρωτικών υλικών με σωματίδια διαμέτρου 3 έως 10 μm, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται καλύτερος διαχωρισμός και μεγαλύτερη ευαισθησία σε πολύ μικρό χρόνο ανάλυσης. Οι τέσσερις βασικοί τύποι της HPLC είναι: η χρωματογραφία κατανομής, η χρωματογραφία προσρόφησης, η χρωματογραφία υγρής-στερεής φάσης, η χρωματογραφία ιονανταλλαγής και η χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού.<sup>[45]</sup>

### **2.2.1.1 Κινητή φάση**

Στην HPLC η κινητή φάση είναι υγρό μείγμα διαλυτών ή συνδυασμός διαλυτών και ρυθμιστικών διαλυμάτων. Το ποσοστό του νερού στην κινητή φάση εξαρτάται από τη σχετική πολικότητα των προσδιοριζόμενων ενώσεων και της στατικής φάσης και επιλέγεται κατάλληλα έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η επιθυμητή έκλουση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Ανάλογα με το αν το ποσοστό των διαλυτών ή διαλυμάτων στην κινητή φάση παραμένει σταθερό ή μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της έκλουσης, διακρίνεται σε ισοκρατική ή βαθμιδωτή έκλουση. Η τελευταία προτιμάται σε περιπτώσεις που απαιτείται μείωση του χρόνου ανάλυσης, χωρίς να μεταβληθεί η διαχωριστική ικανότητα. Η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης επιλέγεται με γνώμονα την επίτευξη ικανοποιητικού διαχωρισμού, την αποφυγή διευρυμένων κορυφών και την ελαχιστοποίηση του χρόνου ανάλυσης.

### 2.2.1.2 Προστήλη – αναλυτική στήλη

Οι προστήλες συνήθως τοποθετούνται πριν την αναλυτική στήλη για να απομακρύνουν διάφορες προσμίξεις της κινητής φάσης αλλά και συστατικά του μείγματος που πιθανό να έχουν ανεπιθύμητη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση, αυξάνοντας έτσι το χρόνο ζωής της αναλυτικής στήλης. Η σύσταση του υλικού της προστήλης επιδιώκεται να είναι παρόμοια με εκείνου της αναλυτικής στήλης.

Οι στήλες της υδροχρωματογραφίας συνήθως κατασκευάζονται από ανοξείδωτο χάλυβα, είναι ευθύγραμμες, με μήκος 5-30 cm, εσωτερική διάμετρο 2-10 mm και μέγεθος σωματιδίων υλικού πλήρωσης 3-10  $\mu\text{m}$ . Το υλικό πλήρωσης των στηλών αποτελείται από πορώδη μικροσωματίδια τα οποία μπορεί να αποτελούνται από διοξείδιο του πυριτίου ( $\text{SiO}_2$ , Silica), οξείδιο του αργιλίου ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ , Alumina), συμπολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου ή ανιονανταλλακτική ρητίνη. Η στατική φάση που κατακρατείται από αυτά τα σωματίδια του πληρωτικού υλικού είναι είτε ένα λεπτό υμένιο υγρού συγκρατούμενο με φυσική προσρόφηση ή υλικό επίστρωσης που περιέχει χημικά συνδεδεμένες ομάδες. Οι χημικά διασυνδεδεμένες φάσεις προκύπτουν μέσω αντίδρασης των αρχικά ελεύθερων σιλανολικών ομάδων με κατάλληλα σιλανιούχα αντιδραστήρια. Οι οργανοπυριτικές ενώσεις (σιλοξάνια) που σχηματίζονται κατ' αυτό τον τρόπο μπορεί να περιέχουν αλυσίδες αλκυλίων  $\text{C}_1$ ,  $\text{C}_2$ ,  $\text{C}_4$ ,  $\text{C}_6$ ,  $\text{C}_8$ ,  $\text{C}_{18}$ , κυανομάδες, διόλες, φαινυλομάδες, αμινομάδες προσδίδοντας ανάλογα είτε λιγότερο είτε περισσότερο πολικό χαρακτήρα στη στατική φάση. Συνεπώς προκύπτουν αντίστροφες στατικές φάσεις και κανονικές στατικές φάσεις αντίστοιχα.

Η ανθεκτικότητα της χημικά τροποποιημένης επιφάνειας  $\text{SiO}_2$  σε ακραίες τιμές pH είναι χαμηλή. Συγκεκριμένα, θα πρέπει να αποφεύγονται τιμές pH μικρότερες από 2 και μεγαλύτερες από 8, διότι σε αυτές τις τιμές ευνοείται η υδρόλυση του σιλοξανίου και κατ' επέκταση η αποικοδόμηση και καταστροφή του υλικού πλήρωσης της στήλης. Αντιθέτως υπάρχουν υλικά πλήρωσης, όπως ο άνθρακας με δομή γραφίτη και τα cpg's (controlled pore glass) που είναι ανθεκτικά σε πιο ακραίες τιμές.<sup>[46]</sup>

## 2.2.2 Ανιχνευτές

Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι φασματοφωτομετρικοί ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους και υπερύθρου, φθορισμομετρικοί, ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, ηλεκτροχημικοί, αγωγιμομετρικοί, ανιχνευτές σκέδασης φωτός και ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών.

Ένας ιδανικός ανιχνευτής πρέπει να πληροί τις εξής προϋποθέσεις:<sup>[47]</sup>

- Μεγάλη ευαισθησία
- Μεγάλη εκλεκτικότητα και ειδικότητα
- Μεγάλη περιοχή γραμμικότητας
- Μικρή ολίσθηση και μειωμένο θόρυβο
- Ευκολία στο χειρισμό και χαμηλό κόστος
- Να μην επηρεάζεται από αλλαγές της θερμοκρασίας, της ροής και του διαλύτη έκλουσης
- Η κυψελίδα ανίχνευσης να είναι μικρή
- Ταχεία απόκριση

Στη συνέχεια δίνεται έμφαση στους ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται συχνότερα στον προσδιορισμό των τετρακυκλινών.

### 2.2.2.1 Ανιχνευτής απορρόφησης υπεριώδους – ορατού (UV – Vis)

Είναι ο συνηθέστερα χρησιμοποιούμενος ανιχνευτής, εύκολος στη χρήση και με απλή οργανολογία. Διακρίνονται σε απλής και διπλής δέσμης, με τους διπλής δέσμης να πλεονεκτούν στη διατήρηση του θορύβου σε χαμηλά επίπεδα. Η ακτινοβολία που διέρχεται από την κυψελίδα επιλέγεται από φίλτρο ή μονοχρωμάτορα. Η ένταση της ακτινοβολίας μειώνεται κατά τη διαδρομή της μέσω της κυψελίδας και αυτή η μεταβολή μετράται μέσω κατάλληλου ανιχνευτή που βρίσκεται σε σειρά με την υπόλοιπη διάταξη, συνήθως συστοιχία φωτοδιόδων. Παρουσιάζουν καλή ευαισθησία με όριο ανίχνευσης στην περιοχή 100 pg - 1 ng.<sup>[45]</sup>



### 2.2.2.2 Ανιχνευτής φασματομετρίας μαζών (MS)

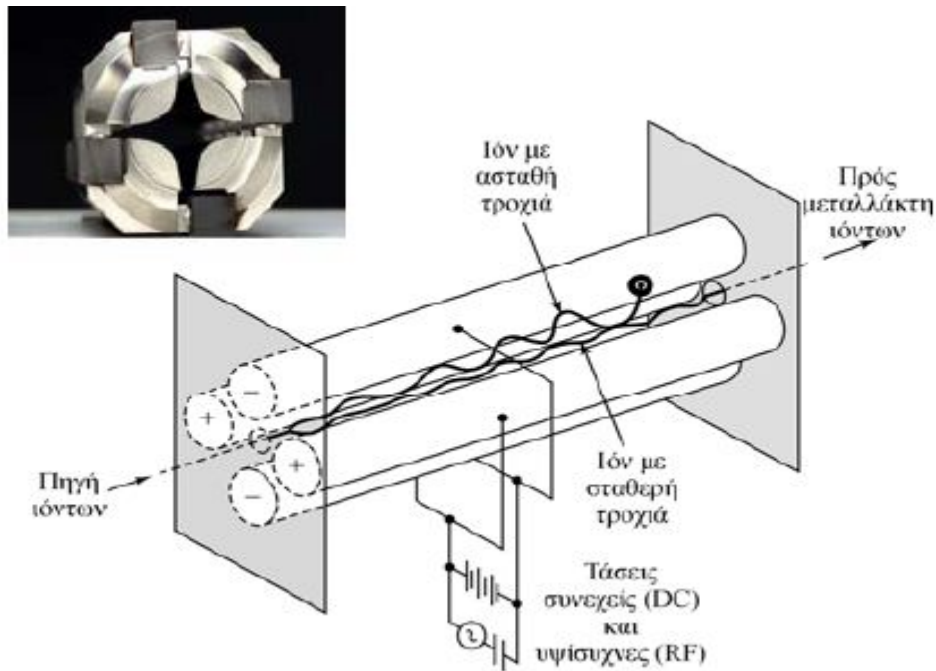
Φασματομετρία μαζών είναι μια οικογένεια μεθόδων προσδιορισμού δομής και ποσοτικού προσδιορισμού ενώσεων και στοιχείων, οι οποίες βασίζονται στον ιονισμό ατόμων ή μορίων ή την παραγωγή ιοντικών θραυσμάτων μορίων και την καταγραφή της σχέσης έντασης του ιοντικού ρεύματος που αντιστοιχεί σε κάθε λόγο μάζας προς φορτίο.

Ο αναλυτής μαζών διαχωρίζει ιόντα με βάση το λόγο μάζα/φορτίο ( $m/z$ ) που είναι χαρακτηριστικός για κάθε μόριο. Οι ανιχνευτές αυτοί χαρακτηρίζονται από εξαιρετική ευαισθησία και εκλεκτικότητα. Τα βασικά μέρη ενός φασματομέτρου μαζών είναι η πηγή ιόντων (EI, ESI, CI, APCI, MALDI, FAB, API), ο αναλυτής μαζών (τετράπολο, τριπλό τετράπολο, τετραπολική παγίδα ιόντων, μαγνητικού τομέα, χρόνου πτήσης, κυκλοτρονιακού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier) και ο μεταλλάκτης (ηλεκτρονιοπολλαπλασιαστής διακριτών δυνόδων).

Το δείγμα εισέρχεται στο σύστημα της υγροχρωματογραφίας, γίνεται διαχωρισμός στην αναλυτική στήλη και οδηγείται στον ανιχνευτή MS. Γίνεται ιοντισμός του δείγματος στην πηγή ιόντων, με συνθήκες τέτοιες ώστε να παράγεται το μοριακό ιόν του εκάστοτε αναλύτη και στη συνέχεια γίνεται απομόνωση των επιθυμητών ιόντων στον αναλυτή μαζών (ή και δημιουργία θυγατρικών ιόντων από το μητρικό) και τέλος μέτρηση των  $m/z$  που καταλήγουν στον μεταλλάκτη.

#### *Τετράπολο – τριπλό τετράπολο*

Το τετράπολο είναι ο πιο απλός αναλυτής μαζών. Αποτελείται από τέσσερα στελέχη. Τα γειτονικά στελέχη έχουν αντίθετο φορτίο και το δυναμικό τους αυξάνεται συνεχώς, διατηρώντας όμως σταθερό λόγο. Τα ιόντα που δημιουργούνται στην πηγή ιόντων διέρχονται μέσω του τετραπόλου και εισερχόμενα στο μαγνητικό πεδίο που αυτό δημιουργεί ακολουθούν μια σπειροειδή τροχιά. Ρυθμίζοντας λοιπόν κατάλληλα το δυναμικό στους πόλους μπορούμε να απομονώσουμε συγκεκριμένο ιόν ( $m/z$ ) ενώ τα υπόλοιπα φιλτράρονται εκτός ιοντικής δέσμης. Στην εικόνα που ακολουθεί φαίνεται η λειτουργία του τετραπολικού αναλυτή μαζών.



Εικόνα 2.4: Τετράπολο<sup>[48]</sup>

Το τετράπολο είναι συνεχής αναλυτής μαζών, ανθεκτικός, μικρού μεγέθους και κόστους και υψηλής ταχύτητας σάρωσης, έχει όμως χαμηλή διακριτική ικανότητα.

Πλεονεκτήματα:

- Ο πιο αξιόπιστος και ο πιο διαδεδομένος αναλυτής μαζών
- Κατάλληλος για ποσοτική ανάλυση
- Κατάλληλος ανιχνευτής χρωματογραφίας
- Υψηλή ταχύτητα σάρωσης
- Φτηνός, μικρός και εύχρηστος
- Μικρές απαιτήσεις κενού ( $10^{-5}$  Torr) και τάσης λειτουργίας
- Δυνατότητα MS/MS (διαδοχική φασματομετρία μαζών)
- Ιδανικό για σύζευξη με πηγές ιονισμού AP

Μειονεκτήματα:

- Χαμηλή διακριτική ικανότητα
- Περιορισμένο εύρος  $m/z$
- Μειωμένη ευαισθησία σε υψηλή  $R$  (διακριτική ικανότητα)

Στη διαδοχική φασματομετρία μαζών (tandem mass spectrometry) χρησιμοποιούνται τρία τετράπολα σε σειρά (τριπλό τετράπολο). Στο πρώτο απομονώνεται το μητρικό (ή πρόδρομο) ιόν που παράγεται στην πηγή ιονισμού, στο δεύτερο (κυψελίδα συγκρούσεων) το μητρικό ιόν συγκρούεται με περίσσεια ενός αδρανούς αερίου (Ar ή He) οπότε παράγονται θυγατρικά ιόντα και στο τρίτο γίνεται διαχωρισμός και μέτρηση των θυγατρικών ιόντων. Το πρώτο και το τρίτο τετράπολο μπορούν να εκτελούν ελεύθερη διέλευση των ιόντων, απομόνωση επιλεγμένου λόγου  $m/z$  ή σάρωση  $m/z$ . Το δεύτερο τετράπολο μπορεί είτε να πραγματοποιεί θραυσματοποίηση είτε ελεύθερη διέλευση των ιόντων που διέρχονται απ' αυτό. Έτσι λοιπόν μπορούν να γίνουν διάφοροι συνδυασμοί και να βελτιστοποιούμε την χρήση του τριπλού τετραπόλου ανάλογα με το σκοπούμενο. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι (πέντε) λειτουργίες του τριπλού τετραπόλου.



Εικόνα 2.5: Τριπλό τετράπολο<sup>[48]</sup>

**Πίνακας 2.1:** Λειτουργίες τριπλού τετραπόλου<sup>[48]</sup>

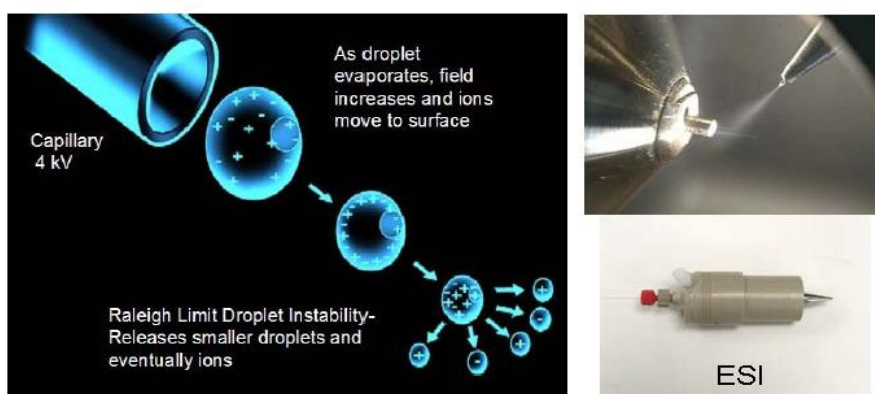
Λειτουργία	Πρώτο τετράπολο	Δεύτερο τετράπολο	Τρίτο τετράπολο	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Φασματομετρία πλήρους σάρωσης	Σάρωση m/z	Ελεύθερη διέλευση	Ελεύθερη διέλευση	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Πληροφορία για το MB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αργή σάρωση</li> <li>• Όχι ποσοτικοποίηση</li> </ul>
Παρακολούθηση επιλεγμένου ιόντος (SIM)	Επιλογή m/z	Ελεύθερη διέλευση	Ελεύθερη διέλευση	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παρακολούθηση συγκεκριμένου αναλύτη</li> <li>• Γρήγορη σάρωση</li> <li>• Απλότητα</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παρεμποδίσεις</li> <li>• Λιγότερο ευαίσθητη από την SRM</li> </ul>
MS/MS θυγατρικών ιόντων	Επιλογή m/z	Θραυσματοποίηση	Σάρωση m/z	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παρέχει πληροφορίες για τη δομή</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αργή σάρωση</li> <li>• Όχι ποσοτικοποίηση</li> </ul>
MS/MS επιλεγμένου μητρικού ιόντος	Σάρωση m/z	Θραυσματοποίηση	Επιλογή m/z	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ταυτοποίηση ενώσεων που δίνουν ένα συγκεκριμένο θυγατρικό ιόν</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Αργή σάρωση</li> </ul>
Παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης (SRM)	Επιλογή m/z	Θραυσματοποίηση	Επιλογή m/z	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Παρακολούθηση επιλεγμένου αναλύτη</li> <li>• Γρήγορη σάρωση</li> <li>• Ταυτόχρονη παρακολούθηση πολλών μεταπτώσεων</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Οι πληροφορίες για τη δομή της ένωσης είναι περιορισμένες</li> </ul>

### Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (ESI)

Στην παρούσα εργασία για την παραγωγή ιόντων χρησιμοποιήθηκε ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI). Είναι πηγή “μαλακού” ιοντισμού με εκρόφηση, ιδανική για σύζευξη LC/MS και ο ιοντισμός γίνεται στην υγρή φάση στην ατμοσφαιρική πίεση. Μπορεί να δημιουργήσει

μονοφορισμένα ιόντα ή και πολλαπλών φορτίων, πράγμα που δίνει τη δυνατότητα προσδιορισμού μορίων μεγάλου εύρους μαζών.

Το υγρό δείγμα ψεκάζεται μέσα από τριχοειδή σωλήνα στον οποίο εφαρμόζεται υψηλή τάση (3-4 kv προκειμένου για θετικό ιονισμό και περίπου 2,5 kv για αρνητικό) και σχηματίζονται μικρές φορτισμένες σταγόνες. Ο διαλύτης εξατμίζεται και έτσι οι σταγόνες του αερολύματος μικραίνουν πράγμα που αυξάνει την πυκνότητα του φορτίου, κι έτσι γίνεται εκρόφηση των ιόντων στο περιβάλλον (αδρανές) αέριο.<sup>[48]</sup>



**Εικόνα 2.6:** Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό<sup>[48]</sup>

Πλεονεκτήματα:

- Τεχνική προσδιορισμού μοριακού βάρους χωρίς περιορισμό στη μάζα
- Καλή τεχνική προσδιορισμού για ποικιλία μορίων (μετρίως πολικών και πολικών)
- Οι σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες ιονισμού επιτρέπουν τη μελέτη θερμικώς ασταθών μορίων
- Καλή ευαισθησία και εύκολη ποσοτικοποίηση
- Δυνατότητα σύζευξης με υγροχρωματογραφία και τριχοειδή ηλεκτροφόρηση

Μειονεκτήματα:

- Απαραίτητα χαμηλή ταχύτητα ροής
- Τα ιόντα του αναλύτη δημιουργούνται στην υγρή φάση
- Απόσβεση σήματος σε διαλύματα με άλατα και ανταγωνιστική μήτρα

### 2.2.3 Χρωματογραφικές παράμετροι

Η επιτυχία ενός χρωματογραφικού διαχωρισμού εξαρτάται από την αποδοτικότητα της στήλης, δηλαδή την ικανότητά της να διαχωρίζει τα επιμέρους συστατικά του ενιόμενου δείγματος στο συντομότερο χρονικό διάστημα. Τούτο επιτυγχάνεται με τη βελτιστοποίηση των πειραματικών συνθηκών έχοντας ως απώτερο σκοπό τη μείωση της διεύρυνσης των ζωνών και τη μεταβολή της σχετικής ταχύτητας μετανάστευσης των συστατικών. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της χρωματογραφικής στήλης αναφέρονται ακολούθως.

- Αριθμός και ύψος θεωρητικών πλακών (N, H)

Μπορούμε να δούμε την αναλυτική στήλη σαν μια συστοιχία «θεωρητικών πλακών». Σε κάθε μια από αυτές πραγματοποιείται ένας στοιχειώδης διαχωρισμός. Όσο μικρότερο το ύψος των θεωρητικών πλακών (H) και όσο μεγαλύτερος είναι ο αριθμός τους (N), τόσο πληρέστερος είναι τελικά ο διαχωρισμός. Οι δύο συγγενείς αυτοί όροι χρησιμοποιούνται ευρύτατα ως ποσοτικά μέτρα της αποδοτικότητας μια χρωματογραφικής στήλης και συνδέονται μέσω της σχέσης:

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.1)$$

όπου,

L: το μήκος της στήλης

Πειραματικά οι παράμετροι H και N υπολογίζονται σύμφωνα με τις παρακάτω σχέσεις:

$$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{w} \right)^2 \quad (2.2)$$

$$N = 5,5 \times \left( \frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2 \quad (2.3)$$

όπου,

$t_R$ : χρόνος ανάσχεσης της ουσίας

$w$ : εύρος χρωματογραφικής κορυφής

$w_{0.5}$ : εύρος στο ήμισυ του ύψους της χρωματογραφικής κορυφής

➤ Ασυμμετρία κορυφής (T ή AF)

Ο παράγοντας ασυμμετρίας αποτελεί ένδειξη ασυμβατότητας του δείγματος με τη στατική ή την κινητή φάση, γεγονός που παρατηρείται με την εμφάνιση «χημικών ουρών» στο χρωματογράφημα της εκλουόμενης ένωσης. Υπολογίζεται μέσω της παρακάτω σχέσης:

$$T = \frac{b_{0.1}}{a_{0.1}} \quad (2.4)$$

όπου,

$b_{0.1}$ : η κάθετη απόσταση από το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής μέχρι την πρόσθια πλευρά της ζώνης στο 10% του ύψους της κορυφής

$a_{0.1}$ : η κάθετη απόσταση από το ύψος της χρωματογραφικής κορυφής μέχρι την οπίσθια πλευρά της ζώνης στο 10% του ύψους της κορυφής

Τα επιθυμητά όρια διακύμανσης των τιμών του παράγοντα ασυμμετρίας είναι από 0,8 έως 1,2.

➤ Παράγοντας κατακράτησης ή παράγοντας χωρητικότητας ( $k'$ )

Ο παράγοντας κατακράτησης είναι μια σημαντική παράμετρος η οποία χρησιμοποιείται ευρύτατα για την περιγραφή της μετανάστευσης των διαλυμένων ουσιών στις στήλες. Ορίζεται ως εξής:

$$k' = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (2.5)$$

όπου,

$t_0$ : νεκρός χρόνος, δηλαδή ο χρόνος που χρειάζεται μια μη κατακρατούμενη ουσία να φτάσει στον ανιχνευτή

Όταν ο παράγοντας χωρητικότητας μιας ουσίας είναι μικρότερος από τη μονάδα, η έκλουση πραγματοποιείται πολύ γρήγορα δυσκολεύοντας τον ορθό υπολογισμό των χρόνων κατακράτησης, ενώ όταν ο παράγοντας κατακράτησης είναι πολύ μεγάλος η έκλουση καθίσταται χρονοβόρα. Για τον λόγο αυτό επιδιώκεται οι διαχωρισμοί να διενεργούνται υπό συνθήκες που να εξασφαλίζουν τιμές παραγόντων κατακράτησης στην περιοχή 1 - 5.

➤ Παράγοντας εκλεκτικότητας ( $\alpha$ )

Ο παράγοντας εκλεκτικότητας περιγράφει τις σχετικές ταχύτητες μετανάστευσης των συστατικών του ενιόμενου δείγματος στη στήλη και για δύο ουσίες A, B ορίζεται ως εξής:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (2.6)$$

$$\alpha = \frac{[(t_R)_A - t_0]}{[(t_R)_B - t_0]} \quad (2.7)$$

όπου,

$K_B$ : η σταθερά κατανομής για την ισχυρότερα κατακρατούμενη ένωση

$K_A$ : η σταθερά κατανομής για την ασθενέστερα κατακρατούμενη ένωση



$(t_R)_A$ : ο χρόνος ανάσχεσης της ουσίας A

$(t_R)_B$ : ο χρόνος ανάσχεσης της ουσίας B

Εξ' ορισμού ο παράγοντας εκλεκτικότητας είναι μεγαλύτερος από τη μονάδα, ενώ ιδανικά κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 1,05 – 2.

➤ Διαχωριστική ικανότητα ή παράγοντας διαχωρισμού ( $R_s$ )

Η διαχωριστική ικανότητα μιας στήλης αποτελεί την ποσοτική έκφραση της ικανότητάς της να διαχωρίζει δύο χημικές ενώσεις. Ορίζεται από τον ακόλουθο τύπο:

$$R_s = 2 \left[ \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{w_A + w_B} \right] \quad (2.8)$$

όπου,

$w_A$ : εύρος χρωματογραφικής κορυφής της ουσίας A

$w_B$ : εύρος χρωματογραφικής κορυφής της ουσίας B

Ο διαχωρισμός είναι ικανοποιητικός όταν  $R_s > 1,5$ . Σε μικρότερες τιμές δεν έχουμε επαρκή διαχωρισμό.<sup>[45, 47]</sup>

#### 2.2.4 Εσωτερικό πρότυπο

Η μέγιστη επαναληψιμότητα στην ποσοτική χρωματογραφική ανάλυση λαμβάνεται με τη χρήση εσωτερικών προτύπων, επειδή αποφεύγονται οι αβεβαιότητες οι οποίες εισάγονται κατά την έγχυση του δείγματος. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή μια προσεκτικά μετρημένη ποσότητα μιας ουσίας, που αποτελεί το εσωτερικό πρότυπο, προστίθεται σε κάθε πρότυπο διάλυμα και σε κάθε δείγμα. Ως αναλυτική παράμετρος χρησιμοποιείται ο λόγος της επιφάνειας της κορυφής του αναλύτη προς την αντίστοιχη του εσωτερικού προτύπου.<sup>[45]</sup>

Οι ιδιότητες που πρέπει να έχει ένα εσωτερικό πρότυπο είναι οι εξής:

- να μην περιέχεται στο δείγμα
- η κορυφή του να είναι ευδιάκριτη, συμμετρική και να διαχωρίζεται από τα άλλα συστατικά ( $R_s > 1,5$ )
- να έχει παρόμοια δομή με τους αναλύτες
- να μην αντιδρά με τα συστατικά του δείγματος
- να έχει υψηλή καθαρότητα

## **2.3 Προσδιορισμός τετρακυκλινών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης**

### **2.3.1 Εισαγωγή**

Διάφορες υγροχρωματογραφικές μέθοδοι έχουν προταθεί κατά καιρούς για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών σε διάφορα τρόφιμα ζωικής προέλευσης (γάλα, μέλι, αυγά, ψάρια, γαρίδες, χοίρους, βοοειδή) χρησιμοποιώντας ανιχνευτές όπως UV και MS-MS (ESI και APCI). Οι χρωματογραφικές μέθοδοι που δημοσιεύονται στα επιστημονικά περιοδικά αυξάνονται διαρκώς σε αριθμό παρουσιάζοντας υψηλή αξιοπιστία, ακρίβεια και ευαισθησία.

### **2.3.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση**

Στη συνέχεια παρατίθεται μια σύντομη βιβλιογραφική ανασκόπηση αντιπροσωπευτικών μεθόδων HPLC που έχουν βρει εφαρμογή στον προσδιορισμό τετρακυκλινών σε διάφορα είδη τροφίμων.

Τα τελευταία χρόνια, πολλές υγροχρωματογραφικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας ως ανιχνευτή φασματόμετρο μάζας (LC/MS ή LC/MS/MS) για τον προσδιορισμό της οξυτετρακυκλίνης, της τετρακυκλίνης, της χλωροτετρακυκλίνης και της δοξυκυκλίνης σε διάφορα είδη υποστρώματος όπως γάλα, χοιρινό, βοδινό, μέλι, αυγά, ψάρι και γαρίδα. Σε αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί διάφοροι τρόποι εκχύλισης, όπως προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος  $\text{Na}_2\text{EDTA-McIlvaine}$  0,1 M (pH 4)<sup>[49-51, 55, 56]</sup>, διαλύματος ηλεκτρικού νατρίου (pH 4)<sup>[52, 53]</sup> καθώς και διαλύματος

τριχλωροξικού οξέως 20% (v/v).<sup>[54]</sup> Επίσης σε όλες αυτές τις μεθόδους χρησιμοποιείται εσωτερικό πρότυπο (DMCTC)<sup>[50, 51, 53, 54, 56]</sup> καθώς και εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) είτε με στήλες HLB, είτε με στήλες C<sub>18</sub> για τον καθαρισμό του δείγματος και την απομόνωση των τετρακυκλινών.<sup>[49, 50, 52-54, 56]</sup> Σε δυο περιπτώσεις μόνο δεν χρησιμοποιείται εκχύλιση στερεάς φάσης αφού ο καθαρισμός του δείγματος γίνεται σε σειρά με το υδροχρωματογραφικό σύστημα (on-line SPE) με αποτέλεσμα να γίνεται πιο σύντομη η όλη πειραματική διαδικασία.<sup>[51, 55]</sup> Στο σύστημα της υδροχρωματογραφίας οι στήλες που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως C<sub>8</sub> ή C<sub>18</sub> αντίστροφης φάσης με σωματίδια διαφόρων διαμέτρων (2-30 μm)<sup>[49-52, 54-56]</sup> καθώς και πολυμερικές (PLRS-S).<sup>[53]</sup> Σε κάποιες από αυτές τις μεθόδους η έκλυση γίνεται ισοκρατικά με σύσταση της κινητής φάσης να ποικίλει από μέθοδο σε μέθοδο όπως: ακετονιτρίλιο-τριφθοροξικό οξύ 0,05 % (1/4)<sup>[49]</sup> καθώς και ακετονιτρίλιο-μεθανόλη-οξαλικό οξύ.<sup>[50, 52, 55]</sup> Στις περισσότερες όμως έχουμε βαθμιδωτή έκλυση χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση είτε νερό (+ 3% φορμικό οξύ)-ακετονιτρίλιο (+ 3% φορμικό οξύ)<sup>[51]</sup>, είτε 0,001 M οξαλικό οξύ, 0,5% φορμικό οξύ και 3% τετραυδροφουράνιο σε νερό-τετραυδροφουράνιο<sup>[53]</sup>, είτε 1% φορμικό οξύ σε νερό και διάλυμα μεθανόλης-ακετονιτρίλιου σε αναλογία 70/30<sup>[54]</sup>, είτε 5% μεθανόλη και 95% διαλύματος τριφθοροξικού οξέως 0,01 M.<sup>[56]</sup>

Παρά τον μεγάλο αριθμό μεθόδων που έχουν αναπτυχθεί, ελάχιστες ασχολούνται και με τον προσδιορισμό των επιμερών. Ο Ruysck και οι συνεργάτες του<sup>[54]</sup> καθώς και ο Cherlet και οι συνεργάτες του<sup>[53]</sup> κατάφεραν να προσδιορίσουν ταυτόχρονα τις τετρακυκλίνες με τα επιμερή τους σε γάλα και χοιρινό αντίστοιχα με LC/MS/MS χωρίς όμως να επιτύχουν τον πλήρη διαχωρισμό της χλωροτετρακυκλίνης με την επι-χλωροτετρακυκλίνη. Επίσης ο Zhenfeng και η ομάδα του<sup>[56]</sup> προσδιόρισαν επτά τετρακυκλίνες μαζί με τρία επιμερή στο γάλα χωρίς τον επιτυχή διαχωρισμό της οξυτετρακυκλίνης με την επι-οξυτετρακυκλίνη. Τέλος καμία μέθοδος που να περιλαμβάνει όλες αυτές τις ενώσεις δεν έχει αναπτυχθεί σε ιστούς ψαριών.

**Πίνακας 2.2:** Βιβλιογραφική ανασκόπηση

Άρθρο	Εκχύλιση	SPE	IS	Στήλη	Κινητή φάση	Ροή	Ανιχνευτής	Ανάκτηση	LOD
Improvement of chemical analysis of antibiotics XXIII. Identification of residual tetracyclines in bovine tissues by electrospray high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, by Hisao Oka et al. [49]	Na <sub>2</sub> EDTA-McIlvaine buffer (pH 4) 0,1 M	Bond Elut C <sub>18</sub> (500 mg)	-	TSK Gel Super Octyl (2 μm, 100x4,6 mm)	Isocratic:acetonitrile-0,05 % TFA (1/4)	0,5 ml/min	ESI LC-MS-MS	55,5-79,1 %	-
Simultaneous determination of residual tetracyclines in foods by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, by Hiroyuki Nakazawa et al. [50]	Na <sub>2</sub> EDTA-McIlvaine buffer (pH 4) 0,1 M	Bond Elut C <sub>18</sub> (500 mg)	DMCTC	Bakerbond C <sub>8</sub> column (5 μm, 250x4,6 mm)	Isocratic: methanol-acetonitrile-oxalic acid 5mM (18/27/55)	1 ml/min	APCI LC-MS-MS	60,1-88,9 %	1 μg/kg (OTC, TC), 4 μg/kg (CTC), 2 μg/kg (DC)
Determination of tetracyclines in bovine kidney by liquid chromatography/tandem mass spectrometry with on-line extraction and clean-up, by Nico Van Eeckhout et al. [51]	Na <sub>2</sub> EDTA-McIlvaine buffer (pH 4) 0,1 M	-	DMCTC	Oasis HLB (30 μm, 50x1,0 mm)	Gradient: A. water(+ 3 % formic acid), B. acetonitrile (+ 3 % formic acid)	4 ml/min	ESI-MS-MS	71-91 %	18 μg/kg (TC), 23 μg/kg (OTC), 24 μg/kg (CTC), 21 μg/kg (DC)

Άρθρο	Εκχύλιση	SPE	IS	Στήλη	Κινητή φάση	Ροή	Ανιχνευτής	Ανάκτηση	LOD
Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry, by Wendy C. Andersen et al. [52]	Succinic acid	Oasis HLB (200 mg)	-	MacMod Hydrobond PS C <sub>8</sub> (5 μm, 250x4,6 mm for shrimp – 150x4,6 mm for milk)	Isocratic: 75% A – 18% acetonitrile – 7% methanol A. 0,01 M oxalic acid for milk samples or 0,1% formic acid for shrimp samples	1 ml/min	LC-UV and LC-MS-MS	75%	-
Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry, by Marc Cherlet et al. [53]	Sodium succinate solution (pH 4)	Oasis HLB	DMCTC	PLRP-S popolymeric reversed phase column (8 μm, 250x4,6 mm)	Gradient: A. 0,001 M oxalic acid, 0,5% formic acid and 3% THF in water B. THF	1 ml/min	LC-MS-MS	12-65%	0,5-4,5 μg/kg
Determination of tetracycline antibiotics in cow's milk by liquid chromatography/tandem mass spectrometry, by Hendrik De Ruyck et al. [54]	Trtichloroacetic acid	Oasis HLB	DMCTC	Altima C18 reversed phase column (3μm, 150x2,1mm)	Gradient: A. 1% formic acid in water B. methanol/ acetonitrile (70/30) with 1% formic acid	0,25 ml/min	ESI LC-MS-MS	90,4-101,2%	5-20 μg/kg

Άρθρο	Εκχύλιση	SPE	IS	Στήλη	Κινητή φάση	Ροή	Ανιχνευτής	Ανάκτηση	LOD
Simultaneous residue monitoring of four tetracycline antibiotics in fish muscle by in – tube solid phase microextraction coupled with high performance liquid chromatography, by Wen Yi et al. [55]	Na <sub>2</sub> EDTA-McIlvaine buffer (pH 4) 0,1 M	SPME	-	Kromasil ODS column (5μm, 250x4,6 mm)	Isocratic: A. 20% methanol B. 20% acetonitrile C. 60% 0,02 mol/L oxalic acid solution (pH 3)	0,8 ml/min	PAD	-	16–30 μg/kg
Determination of multi – residues of tetracyclines and their metabolites in milk by high performance liquid chromatography – tandem positive – ion electrospray ionization mass spectrometry, by Zhenfeng Yue et al. [56]	Na <sub>2</sub> EDTA-McIlvaine buffer (pH 4) 0,1 M	Oasis HLB	DMCTC	Intertsil C8 reversed phase column (5μm, 150x2,1 mm)	Gradient: A. 5% methanol B. 95% 0,01 M TFA	0,3 ml/min	LC-MS-MS	74,4–101%	0,5-10 μg/kg

### **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3**

#### **ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ**

Σκοπός αυτής της διατριβής ειδίκευσης ήταν η ανάπτυξη μιας νέας μεθόδου προσδιορισμού των τετρακυκλινών και των επιμερών τους σε ιστούς ψαριών με υδροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτές UV – Vis και MS/MS, έπειτα από παραλαβή και καθαρισμό με την τεχνική dispersive SPE (dSPE). Στόχος ήταν ο διαχωρισμός των τετρακυκλινών και των επιμερών τους και η ανάπτυξη μιας μεθόδου προσδιορισμού σε ιστό ψαριού γρήγορης, εύκολης και χαμηλού κόστους.

Ως πρώτη προσέγγιση στη συγκεκριμένη μελέτη επιχειρήθηκε η βελτιστοποίηση των χρωματογραφικών συνθηκών με επιλογή της κατάλληλης σύστασης των διαλυτών, χρήση βαθμιδωτής έκλουσης, ρύθμιση του pH και της ροής της κινητής φάσης για τρεις διαφορετικές στατικές φάσεις, ώστε να επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός των ενώσεων και των επιμερών τους. Οι συνθήκες κατεργασίας του δείγματος για την απομόνωση των προσδιοριζόμενων ενώσεων ήταν η δεύτερη προσέγγιση βελτιστοποίησης της μεθόδου. Εξετάστηκαν η επίδραση του εκχυλιστικού μέσου καθώς και του είδους καθαρισμού (dSPE και SPE).

Ακολούθως η μέθοδος επικυρώθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας (τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας όσο και αναπαραγωγιμότητας), ενώ προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

#### 4.1 Συσσκευές και βοηθητικά μέσα

1. Σύστημα Υγροχρωματογραφίας Agilent 1100 Series αποτελούμενο από :
  - Αντλία HPLC ανάμειξης τεσσάρων διαλυτών (G1311A)
  - Ανιχνευτή ορατού-υπεριώδους(G1314A)
  - Φθορισμομετρικό ανιχνευτή (G1321A)
  - Θερμοστατούμενο θάλαμο στηλών HPLC.
  - Συσσκευή απαέρωσης της κινητής φάσης.
  - Ηλεκτρονικό υπολογιστή με λογισμικό CHEM STATION για τον έλεγχο και τη λειτουργία των παραπάνω συσκευών καθώς και για την λήψη και επεξεργασία του σήματος του ανιχνευτή.
2. Σύστημα Υγροχρωματογραφίας-Φασματομετρίας μαζών Thermo αποτελούμενο από:
  - Φασματόμετρο μαζών με τρία τετράπολα (triple stage quadrupole analyzer), TSQ Quantum Access.
  - Αντλία υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης Accela Pump UPLC δύο εμβόλων, με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών.
  - Αυτόματο δειγματολήπτη Accela Autosampler με ενσωματωμένο θερμοστάτη στηλών.
  - Γεννήτρια αζώτου Peak Scientific.
  - Οβίδα αργού
  - UPS τύπου GXT2 με ισχύς 6 KVA
  - Ηλεκτρονικός υπολογιστής με λογισμικό Xcalibur Data System (2.0.6. SR2, TSQ14, SUR1, LCQuan 2.5, XReport 1.0)
3. Αναλυτικές στήλες:
  - Waters Xterra MS C18, 3,5 μm, 2,1x100 mm με προστήλη Waters Xterra C18
  - Waters Symmetry C18, 5 μm, 3,9x150 mm με προστήλη Waters Symmetry



- Supelco Ascentis (Fused – Core Express) C18, 2,7 μm, 2,1x75 mm
- 4. Ζυγός με ακρίβεια τέταρτου δεκαδικού ψηφίου της εταιρείας Shimadzu (AUW320)
- 5. Φασματοφωτόμετρο Hitachi U-2000
- 6. Συσκευή περιδίνησης τύπου Vortex (Velp Scientifica)
- 7. Φυγοκεντρική συσκευή (Rotofix 32 Hettich)
- 8. Λουτρό υπερήχων (Branson 2510)
- 9. Συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (Vac Elut SPS 24)
- 10. Συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού Millipore Direct – Q UV
- 11. Πιπέτες μεταβλητού όγκου 100 – 1000 μl της εταιρείας Transferpette για υδατικά διαλύματα
- 12. Πιπέτες μεταβλητού όγκου 10 – 100 μl και 100 – 1000 μl της εταιρείας Gilson για οργανικούς διαλύτες
- 13. Ογκομετρικές φιάλες των 5,0, 10,0, 50,0, 250,0 και 500,0 ml
- 14. Φυγοκεντρικοί πλαστικοί σωλήνες των 15 ml με πώμα
- 15. Πλαστικά φιαλίδια Ependorff των 2 ml
- 16. Υάλινα σιφώνια των 5,00 και 10,0 ml
- 17. Υάλινη σύριγγα των 100 μl για την εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα (Agilent)
- 18. Υάλινες πιπέτες Pasteur και σταγονόμετρα
- 19. Φίλτρα οξικής κυτταρίνης 0,22 μm της εταιρείας Teknokroma (PK/100, 25 mm)
- 20. Φυσίγγια Waters Sep-Pak Vac C18 500 mg/3 ml, Waters Oasis HLB 200 mg/3 ml και Biotage Isolute 101 200 mg/3 ml
- 21. Συσκευή εξάτμισης με άζωτο

## 4.2 Αντιδραστήρια και πρότυπα

### 4.2.1 Αντιδραστήρια

- 1. Πρωτογενή πρότυπα τετρακυκλινών και των επιμερών τους
- 2. Μεθανόλη (CH<sub>3</sub>OH ή MeOH), καθαρότητας HPLC και MS της εταιρείας Lab – Scan.

3. Ακετονιτρίλιο ( $\text{CH}_3\text{CN}$  ή  $\text{ACN}$ ), καθαρότητας HPLC και MS της εταιρείας Lab – Scan,
4. Φορμικό οξύ, LC-MS της Fluka
5.  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6. Κιτρικό οξύ μονοένυδρο
7. Όξινο φωσφορικό νάτριο διένυδρο
8. Οξικό οξύ, LC-MS της Fluka
9. Οξικό αμμώνιο
10. Τριχλωροξικό οξύ
11. Υπερκάθαρο νερό
12. PSA
13. C18

#### 4.2.2 Διαλύματα

1. Υδατικό διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2): Λαμβάνονται 5,0 ml φορμικού οξέος σε ογκομετρική φιάλη των 500,0 ml και αραιώνονται μέχρι τη χαραγή με νερό

2. Ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine/EDTA: Διαλύονται 10,5 g κιτρικού οξέος σε 500 ml υπερκάθαρο νερό και 11,2 g όξινου φωσφορικού νατρίου σε 312 ml υπερκάθαρου νερού. Αναμιγνύονται τα δύο διαλύματα και βεβαιώνεται ότι το pH είναι  $4 \pm 0,05$ . Στο προκύπτον διάλυμα διαλύονται 33,5 g EDTA και το όλο αναδεύεται για τουλάχιστον μια ώρα και φυλάσσεται στους  $4^\circ\text{C}$ .

3. Ρυθμιστικό διάλυμα  $\text{CH}_3\text{COONH}_4/\text{CH}_3\text{COOH}/\text{EDTA}$ : Διαλύονται 3,1 g οξικού αμμωνίου και 16,5 g EDTA σε 250 ml υπερκάθαρο νερό και το pH ρυθμίζεται στην τιμή  $4 \pm 0,05$  με προσθήκη οξικού οξέος. Το διάλυμα αναδεύεται και φυλάσσεται στους  $4^\circ\text{C}$ .

4. Υδατικό διάλυμα τριχλωροξικού οξέως σε συγκέντρωση 0,5 g/ml: Διαλύονται 25 g τριχλωροξικού οξέος σε 50,0 ml υπερκάθαρο νερό.

### **4.2.3 Πρότυπα**

#### **4.2.3.1 Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης τετρακυκλινών συγκεντρώσεως 1000 µg/ml σε μεθανόλη**

Το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης της κάθε τετρακυκλινής σε μεθανόλη συγκέντρωσης 1000 µg/ml παρασκευάζεται με ζύγιση 0,0500 g της εκάστοτε ουσίας, μεταφορά της σε ογκομετρική φιάλη των 50,0 ml και συμπληρώνοντας μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη.

#### **4.2.3.2 Ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης τετρακυκλινών συγκεντρώσεως 10 µg/ml σε μεθανόλη**

Το ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα των τετρακυκλινών συγκέντρωσης 10 µg/ml παρασκευάζεται μεταφέροντας με πιπέτα 0,10 ml από κάθε διάλυμα παρακαταθήκης των 1000 µg/ml σε ογκομετρική φιάλη των 10 ml και αραιώνοντας μέχρι τη χαραγή με μεθανόλη.

#### **4.2.3.3 Πρότυπα διαλύματα εργασίας τετρακυκλινών στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,002-5,0 µg/ml σε νερό**

Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας των τετρακυκλινών στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,002-5,0 µg/ml παρασκευάζονται από το ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης με κατάλληλες αραιώσεις.

Το πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης των 1000 µg/ml ήταν σταθερό για δώδεκα μήνες στους -18 °C και το ενδιάμεσο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης των 10 µg/ml διατηρείτο σταθερό για μια εβδομάδα στους -18 °C. Τα πρότυπα διαλύματα εργασίας παρασκευάζονταν κατά την έναρξη κάθε εργαστηριακής μέρας.

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5**

### **ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΤΗ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ**

#### **5.1 Ανάπτυξη και βελτιστοποίηση υγροχρωματογραφίας στο σύστημα HPLC - UV**

##### **5.1.1 Επιλογή βέλτιστου μήκους κύματος**

Για τη φασματοφωτομετρική ανίχνευση των τετρακυκλινών έχουν προταθεί διάφορα μήκη κύματος στην περιοχή ορατού - υπεριώδους. Ελήφθησαν λοιπόν τα φάσματα των ενώσεων και των επιμερών τους σε κινητή φάση έτσι ώστε να επιλεγθεί το βέλτιστο μήκος κύματος απορρόφησης. Τα φάσματα παρουσιάζουν δύο μέγιστα απορρόφησης, ένα περίπου στα 265 και ένα στα 360 nm. Καταλληλότερο κρίθηκε το μέγιστο στα 360 nm παρόλο που είναι μικρότερης έντασης από αυτό στα 265 nm διότι σε μικρά μήκη κύματος παρουσιάζεται μη ειδική απορρόφηση από τα συστατικά των δειγμάτων και της κινητής φάσης.

##### **5.1.2 Επιλογή στήλης και κινητής φάσης**

Οι τετρακυκλίνες είναι ενώσεις μέτριας πολικότητας και για την ανάλυση τους χρησιμοποιείται υγροχρωματογραφία αντίστροφης φάσης με στατική φάση C<sub>18</sub>. Στην παρούσα εργασία, στο σύστημα HPLC - UV ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές αναλυτικές στήλες αντίστροφης φάσης C<sub>18</sub>:

- Symmetry 3,9x150mm/5μm/ C<sub>18</sub> της εταιρείας Waters συνδεδεμένη με προστήλη Waters Symmetry C18
- Ascentis 2,1x75mm/2,7μm/ C<sub>18</sub> της εταιρείας Supelco με προστήλη
- Xterra MS 2,1x100mm/3,5μm/ C<sub>18</sub> της εταιρείας Waters με προστήλη Waters Xterra C18

Όσον αφορά την επιλογή του εκλουστικού συστήματος, αυτή έγινε με στόχο τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των τετρακυκλινών και των επιμερών τους σύμφωνα με τον παράγοντα διαχωριστότητας  $R_s$ . Επίσης ελέγχθηκαν ο παράγοντας κατακράτησης  $k'$  και ο παράγοντας ασυμμετρίας AF κάθε ένωσης ώστε να βρίσκονται εντός αποδεκτών τιμών. Πραγματοποιήθηκε λοιπόν βαθμιδωτή έκλυση με κινητή φάση που αποτελείτο από δύο διαλύτες. Ο ένας διαλύτης ήταν μίγμα ακετονιτριλίου-μεθανόλης στο οποίο δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες 60/40, 50/50 και 40/60 και ο δεύτερος ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φορμικού οξέος στο οποίο ελέγχθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις, pH 2, 3 και 4. Οι παραπάνω δοκιμές ως προς την αναλογία και τη σύσταση της κινητής φάσης πραγματοποιήθηκαν για κάθε αναλυτική στήλη. Τέλος όσον αφορά την αναλυτική στήλη Waters Symmetry έγινε βελτιστοποίηση και ως προς την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης (0,6, 0,8 και 1,0 ml/min) ενώ στις άλλες δυο στήλες η ταχύτητα ροής της κινητής φάσης ήταν 0,4 ml/min.

Τελικά οι χρωματογραφικές παράμετροι που επιλέχθηκαν ως καταλληλότερες για το σύστημα HPLC - UV ήταν:

- Αναλυτική στήλη Xterra
- Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (60:40)/ διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2)
- Ταχύτητα ροής: 0,4 ml/min.

## **5.2 Βελτιστοποιήσεις κατά την προκατεργασία του δείγματος στο σύστημα HPLC – UV**

### **5.2.1 Παραλαβή τετρακυκλινών από ιστό ψαριών**

Για το στάδιο της παραλαβής των τετρακυκλινών από τον ιστό ψαριών, αρχικά χρησιμοποιήθηκε ένα πρωτόκολλο εργασίας από τη βιβλιογραφία, σύμφωνα με το οποίο οι τετρακυκλίνες εκχυλίζονται με ρυθμιστικό διάλυμα McIlvaine/EDTA (pH=4).<sup>[58]</sup> Αναλυτικότερα: αρχικά ζυγίστηκαν 2,00 g ομογενοποιημένου ιστού ψαριού από λευκό δείγμα σε φυγοκεντρικό πλαστικό

σωλήνα των 15 ml, προστέθηκαν 800 ml νερό και έγινε εμβολιασμός με 200 ml από το πρότυπο του 1 µg/ml. Το δείγμα παρέμεινε για 10 min σε σκιερό μέρος και στη συνέχεια προστέθηκαν 10 ml εκχυλιστικού διαλύματος. Οι φυγοκεντρικοί σωλήνες μεταφέρθηκαν σε λουτρό υπερήχων για 20 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε άλλο φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 ml και προστέθηκαν αργά 2 ml τριχλωροξικού οξέως (0,5 g/ml) για την απομάκρυνση των πρωτεϊνών του δείγματος, και ακολούθησε ανάδευση για 10 sec σε συσκευή περιδίνησης τύπου vortex. Στην συνέχεια πραγματοποιήθηκε ανάδευση για 10 min σε περιστροφικό ανακινητήρα στις 100 rpm και φυγοκέντρηση για 5 min στις 2000 rpm. Έπειτα ακολουθεί καθαρισμός του υπερκείμενου με χρήση διάφορων τεχνικών.

### 5.2.2 Βελτιστοποίηση καθαρισμού εκχυλίσματος

Για τον καθαρισμό του εκχυλίσματος αρχικά χρησιμοποιήθηκε εκχύλιση στερεάς φάσης σύμφωνα με τη βιβλιογραφία.<sup>[58]</sup> Έτσι δοκιμάστηκαν φυσιγγία C<sub>18</sub>, Isolute 101 και Oasis HLB.

Η ενεργοποίηση των φυσιγγίων της SPE και στις τρεις περιπτώσεις έγινε με διαβίβαση 2 ml μεθανόλης, στη συνέχεια 2 ml νερού και τέλος 2 ml ρυθμιστικού διαλύματος McIlvaine/EDTA (pH=4). Μετά τη διαβίβαση των δειγμάτων ακολούθησε έκπλυση με 4x1 ml νερό και η έκλουση των τετρακυκλινών έγινε με 2x0,5 ml μεθανόλης.

Τέλος σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκε εξάτμιση του εκλούσματος μεθανόλης στους 46 °C σε ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού και ανασύσταση με 400 µl κινητής φάσης. Το διάλυμα αυτό ήταν έτοιμο για εισαγωγή στο σύστημα της υγροχρωματογραφίας.

Εκτός από την διαδικασία καθαρισμού με εκχύλιση στερεάς φάσης πραγματοποιήθηκε και καθαρισμός με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE) διότι στα λαμβανόμενα χρωματογραφήματα από τη διαδικασία της SPE μαζί με τους αναλύτες συνεκλούονταν και παρεμποδίζουσες ουσίες. Στην dSPE χρησιμοποιήθηκαν φυγοκεντρικοί σωλήνες των 15 ml οι οποίοι περιείχαν 900 mg MgSO<sub>4</sub>, 150 mg PSA και 150 mg C<sub>18</sub>. Αρχικά λοιπόν ζυγίστηκαν 2,0 g δείγματος, έγινε εμβολιασμός στα 1,5 µg/g (15xMRL) και

ακολούθησε εκχύλιση με 6 ml ρυθμιστικού διαλύματος McIlvaine/EDTA (pH=4). Το εκχύλισμα μεταφέρθηκε στο λουτρό υπερήχων για 20 min και φυγοκεντρήθηκε στις 4000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα dSPE, ακολούθησε ανακίνηση για 2 min και τέλος φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μετά από φιλτράρισμα εισάγεται στο σύστημα της HPLC.

Στην διαδικασία αυτή δεν εμφανίστηκαν παρεμποδίσεις στα χρωματογραφήματα όπως στην περίπτωση καθαρισμού με SPE, όμως οι συγκεντρώσεις τελικά ήταν πολύ μικρές πράγμα που επηρέαζε το τελικό σήμα. Έτσι δοκιμάστηκε να γίνει προσυγκέντρωση των αναλυτών με υγρό – υγρό εκχύλιση (LLE). Συγκεκριμένα, το υπερκείμενο που λαμβάνεται μετά από την dSPE μεταφέρθηκε σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα και προστέθηκαν 3x2 ml διαλύτη εκχύλισης, ακολούθησε ανακίνηση για 2 min και φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 5 min. Συλλέχθη η οργανική φάση, εξατμίστηκε σε ρεύμα αζώτου, έγινε ανασύσταση με 0,4 ml κινητής φάσης και εισαγωγή στον υγροχρωματογράφο. Ως διαλύτες εκχύλισης χρησιμοποιήθηκαν ο οξικός αιθυλεστέρας με και χωρίς την παρουσία χλωριούχου νατρίου, διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα – ισοπροπανόλης σε αναλογία 12/1<sup>[59]</sup> και διχλωρομεθάνιο.

Με την υγρό-υγρό εκχύλιση τελικά δεν εκχυλίστηκαν όλες οι τετρακυκλίνες, εκτός απ' την περίπτωση του οξικού αιθυλεστέρα που όμως παρουσιάστηκαν μικρές ανακτήσεις κι έτσι η μέθοδος αυτή κρίθηκε μη αποτελεσματική για τον προσδιορισμό τους. Γι' αυτό η μέθοδος της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης με απευθείας εισαγωγή του υπερκείμενου στο υγροχρωματογραφικό σύστημα κρίθηκε ως καταλληλότερη και μεταφέρθηκε στο σύστημα της φασματομετρίας μαζών το οποίο παρέχει πολύ μεγαλύτερη ευαισθησία.

### **5.3 Βελτιστοποίηση συστήματος MS/MS**

Η διαδικασία βελτιστοποίησης του σήματος των τετρακυκλινών στο φασματόμετρο μάζας με την τεχνική ιοντισμού του ηλεκτροψεκασμού και η διαδικασία εύρεσης των πρόδρομων και παράγωγων ιόντων όπως και η

ρύθμιση συναφών παραμέτρων (ενέργεια, πίεση θραυσματοποίησης) πραγματοποιήθηκαν σε προηγούμενη ερευνητική εργασία.<sup>[57]</sup>

Συνοπτικά αναφέρουμε πως επιλέχθηκε να εφαρμοσθεί τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό εφαρμόζοντας υψηλή τάση θετικής πολικότητας, με αποτέλεσμα οι ενώσεις μας να είναι συνεχώς θετικά φορτισμένες. Οι παράμετροι που ερευνήθηκαν ήταν η θέση του ακροσωλήνιου ιοντισμού (probe), η τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού (spray voltage), οι παροχές του αερίου εκνέφωσης N<sub>2</sub> (sheath gas) και του αερίου ξήρανσης (auxiliary gas).

Όσον αφορά την εύρεση πρόδρομων και προϊόντων ιόντων, η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε είναι γνωστή ως Παρακολούθηση Επιλεγμένης Αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM) και αποτελεί την πιο διαδεδομένη τεχνική λειτουργίας των συστημάτων LC/MS/MS για ποσοτική ανάλυση. Χαρακτηριστικό της τεχνικής αυτής, είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης παρακολούθησης της θραυσματοποίησης πολλαπλών (επιλεγμένων) πρόδρομων ιόντων και καταγραφής του σήματος των αντίστοιχων προϊόντων ιόντων τους.

Συγκεκριμένα, στην τεχνολογία του τριπλού τετραπόλου, στο πρώτο τετράπολο επιλέγονται τα πρόδρομα ιόντα τα οποία θραυσματοποιούνται στο δεύτερο τετράπολο και τα θραύσματά τους (προϊόντα ιόντα) ανιχνεύονται στο τρίτο τετράπολο. Ο συνδυασμός επιλεγμένου πρόδρομου και προϊόντος ή προϊόντων ιόντων αποτελεί ένα είδος αποτυπώματος για την κάθε χημική ουσία ικανού, σε συνδυασμό με το χρόνο ανάσχεσης ( $t_R$ ), να οδηγήσει στην ταυτοποίησή της. Επιπλέον, η απόρριψη και μη καταγραφή όλων των άλλων ιόντων που μπορεί να παράγονται από τον ιοντισμό ενώσεων που τυχόν βρίσκονται στο υπόστρωμα ή στην κινητή φάση οδηγεί σε υψηλούς λόγους σήματος/θορύβου με επακόλουθη συνέπεια την αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου. Η διαδικασία επιλογής SRM πραγματοποιείται με πειράματα απευθείας έγχυσης (infusion) προτύπων διαλυμάτων της κάθε ένωσης χωριστά. Στο στάδιο της ανάλυσης των παραγόμενων πρόδρομων ιόντων καθώς και στο στάδιο παραγωγής των προϊόντων ιόντων σημαντική επίδραση έχουν παράμετροι που επηρεάζουν τη διακριτική ικανότητα του φασματομέτρου μαζών όπως η διαφορά μαζών μεταξύ δύο μόλις διαχωριζόμενων κορυφών στα τετράπολα Q1 και Q3 (Full Width at Half



Maximum, FWHM), ή την θραυσματοποίηση των πρόδρομων ιόντων στο τετράπολο Q2 [ενέργεια θραυσματοποίησης (collision energy)] και πίεση του αερίου θραυσματοποίησης (χρησιμοποιείται αργό υψηλής καθαρότητας).

#### **5.4 Βελτιστοποιήσεις κατά την προκατεργασία του δείγματος στο σύστημα LC – MS/MS**

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η προκατεργασία των δειγμάτων με dSPE μεταφέρθηκε στο σύστημα LC-MS/MS με τις απαραίτητες τροποποιήσεις έτσι ώστε να ικανοποιούνται οι νέες απαιτήσεις. Συγκεκριμένα ζυγίστηκε 1,0 g ιστού ψαριού σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 ml, έγινε εμβολιασμός του δείγματος στο MRL (0,1 µg/g) και εκχύλιση με 5 ml διαλύματος οξικού αμμωνίου/οξικού οξέος/EDTA (pH=4). Ο σωλήνας μεταφέρθηκε στο λουτρό υπερήχων για 20 min και ακολούθησε φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο μεταφέρθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα dSPE που περιείχε στην πρώτη περίπτωση 150 mg C<sub>18</sub>, στη δεύτερη 150 mg PSA και στην τρίτη από 150 mg C<sub>18</sub> και PSA. Ακολούθησε ανακίνηση για 2 min, φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min, φιλτράρισμα και εισαγωγή στο σύστημα LC-MS/MS.

Οι τροποποιήσεις που έγιναν για τη μεταφορά της μεθόδου στο LC – MS/MS ήταν η αντικατάσταση του ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών του εκχυλιστικού με ρυθμιστικό διάλυμα οξικών ίδιου pH και η αποφυγή χρήσης θειικού μαγνησίου κατά τη διαδικασία καθαρισμού με dSPE. Η χρήση των φωσφορικών ιόντων και των αλάτων είναι γνωστό πως αποφεύγεται στη φασματομετρία μαζών μιας και προκαλούν απόσβεση του ιοντισμού, ένα φαινόμενο που επιδρά στην ένταση του σήματος του αναλύτη αρνητικά και μάλιστα όχι επαναλήψιμα, με αποτέλεσμα να μειώνεται η ευαισθησία.

#### **5.5 Επικύρωση**

Ως επικύρωση νοείται η επιβεβαίωση κατόπιν εξέτασης και η προσκόμιση πραγματικών τεκμηρίων για το ότι πληρούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για τον σκοπό που προορίζεται μια μέθοδος προσδιορισμού.<sup>[60]</sup> Η

επικύρωση μιας μεθόδου προσδιορισμού είναι απολύτως απαραίτητη για την πιστοποίηση της ακρίβειας των αναλυτικών αποτελεσμάτων που εξάγονται από τη μέθοδο αυτή. Αποτελεί αναπόσπαστο μέρος του Εσωτερικού Ελέγχου Ποιότητας του εργαστηρίου, ο οποίος εξασφαλίζει αποδεικτικά στοιχεία για την αβεβαιότητα των αποτελεσμάτων που θα παραχθούν, βάσει καθορισμένων κριτηρίων.

Η επικύρωση της μεθόδου περιλαμβάνει τα εξής:

- Έλεγχο της γραμμικότητας τόσο του συστήματος της HPLC όσο και της μεθόδου
- Εκτίμηση της επαναληψιμότητας του χρόνου κατακράτησης
- Εκτίμηση της ακρίβειας και της επαναληψιμότητας του οργάνου
- Εκτίμηση της ορθότητας και της πιστότητας, της ενδοεργαστηριακής επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας της μεθόδου.
- Προσδιορισμός του ορίου ανίχνευσης και του ορίου ποσοτικοποίησης τόσο του οργάνου όσο και της μεθόδου

### **5.5.1 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC – UV**

Σε μια πρώτη προσέγγιση της διαδικασίας επικύρωσης χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα των τετρακυκλινών και των επιμερών τους προκειμένου να κατασκευαστούν καμπύλες αναφοράς και να ελεγχθεί η γραμμικότητα. Επίσης προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του οργάνου, η ακρίβεια και επαναληψιμότητα αυτού καθώς και η επαναληψιμότητα του χρόνου κατακράτησης.

#### **5.5.1.1 Γραμμικότητα – καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων**

Για την εύρεση της γραμμικής περιοχής απόκρισης του ανιχνευτή, εντός της ίδιας ημέρας εργασίας αναλύονται εις διπλούν, πρότυπα διαλύματα μείγματος τετρακυκλινών και των επιμερών τους σε πέντε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Η εισαγωγή των προτύπων διαλυμάτων για ανάλυση στο σύστημα HPLC γίνεται με σειρά αυξανόμενης συγκέντρωσης και επαναλαμβάνεται με τον ίδιο τρόπο. Εν συνεχεία, υπολογίζεται η μέση τιμή

των εμβαδών των κορυφών και με την ευθεία ελαχίστου αθροίσματος τετραγώνων συσχετίζονται οι συγκεντρώσεις με τις αντίστοιχες μέσες τιμές επιφάνειας των κορυφών αυτών. Τα αποτελέσματα της συσχέτισης δείχνουν εάν υπάρχει ικανοποιητική ευθύγραμμη συνάρτηση ανάμεσα στη συγκέντρωση και στην απόκρισή του συστήματος HPLC, σε όλη την εξετασθείσα περιοχή συγκεντρώσεων και αποδεικνύεται από τους υψηλούς συντελεστές συσχέτισης ( $r > 99\%$ ).

Κατασκευάστηκαν λοιπόν καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων TCs συγκεντρώσεων 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 και 5,0  $\mu\text{g/ml}$ . Υπολογίστηκαν η κλίση και η τεταγμένη επί την αρχή των αξόνων καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης  $r^2$  για κάθε καμπύλη.

Επίσης ελέγχθηκε εάν οι καμπύλες βαθμονόμησης διέρχονται από την αρχή των αξόνων (μηδέν). Για το σκοπό αυτό εξετάζεται με κριτήριο  $t$  η σημαντικότητα της τιμής της τομής  $a$  από το μηδέν, διαιρώντας την τομή με την τυπική της απόκλιση. Το ευρεθέν  $t_{\text{πειρ}}$  συγκρίνεται με την τιμή  $t_{\text{θεωρ}}$  για  $n = n-2$  και στάθμη εμπιστοσύνης 95%, όπου  $n$  είναι ο αριθμός των σημείων της καμπύλης βαθμονόμησης. Εάν  $t_{\text{πειρ}} \geq t_{\text{θεωρ}}$  τότε η καμπύλη βαθμονόμησης δεν διέρχεται από την αρχή των αξόνων.

### 5.5.1.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 0,2  $\mu\text{g/ml}$ . Από τις έξι αυτές επαναλήψεις υπολογίστηκαν, ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Με βάση την τιμή του SD και την κλίση  $b$  της καμπύλης αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων για κάθε τετρακυκλίνη βρέθηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του συστήματος HPLC-UV μέσω των παρακάτω εξισώσεων:

$$LOD = 3,3 \times \frac{SD}{b} \quad (5.1) \quad LOQ = 10 \times \frac{SD}{b} \quad (5.2)$$

### 5.5.1.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου

Η επαναληψιμότητα σχετίζεται με την εγγύτητα μιας σειράς μετρήσεων και εκφράζεται μέσω της τυπικής απόκλισης SD και της σχετικής τυπικής απόκλισης %RSD. Τα στατιστικά αυτά στοιχεία υπολογίζονται από τις παρακάτω σχέσεις:

$$SD = \sqrt{\frac{\sum(x-\bar{x})^2}{n-1}} \quad (5.3) \quad \%RSD = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100 \quad (5.4)$$

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας του συστήματος στην ίδια μέρα παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών σε συγκέντρωση 0,5 µg/ml που αντιστοιχεί στο μέγιστο επιτρεπόμενο όριο (MRL = 0,1 µg/g). Το διάλυμα αναλύεται έξι φορές και υπολογίζεται η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση από τις τιμές των αναλυτικών σημάτων.

### 5.5.1.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης

Χρόνος κατακράτησης ή ανάσχεσης ( $t_R$ ) μιας ουσίας είναι το χρονικό διάστημα που μεσολαβεί από τη στιγμή της έγχυσης του προς ανάλυση διαλύματος στο σύστημα της HPLC μέχρι τη στιγμή που εμφανίζεται το μέγιστο της χρωματογραφικής κορυφής του αναλύτη. Είναι πολύ σημαντική παράμετρος επειδή μας μεταφέρει την ποιοτική πληροφορία. Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας του χρόνου κατακράτησης αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 0,5 µg/ml έξι φορές και υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των τιμών των χρόνων κατακράτησης. Οι τιμές του χρόνου κατακράτησης θα πρέπει να βρίσκονται στην περιοχή  $t_R \pm 3SD$  min.

## **5.5.2 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα LC – MS/MS**

### **5.5.2.1 Γραμμικότητα – καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων**

Κατασκευάστηκαν καμπύλες αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων TCs σε επτά διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100 και 200 ng/ml. Υπολογίστηκαν η κλίση και η τεταγμένη επί την αρχή των αξόνων καθώς και ο συντελεστής συσχέτισης  $r^2$  για κάθε καμπύλη. Επίσης έγινε έλεγχος εάν οι καμπύλες βαθμονόμησης διέρχονται από την αρχή των αξόνων.

### **5.5.2.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου**

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 2,0 ng/ml. Από τις έξι αυτές επαναλήψεις υπολογίστηκαν, ο μέσος όρος, η τυπική απόκλιση (SD) και η σχετική τυπική απόκλιση (%RSD). Με βάση την τιμή του SD και την κλίση  $b$  της καμπύλης αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων για κάθε τετρακυκλίνη βρέθηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του συστήματος LC-MS/MS μέσω των εξισώσεων 5.1 και 5.2.

### **5.5.2.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου**

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας του συστήματος στην ίδια μέρα παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών σε συγκέντρωση 20,0 ng/ml που αντιστοιχεί στο μέγιστο επιτρεπόμενο όριο (MRL = 0,1 μg/g). Το διάλυμα αναλύεται έξι φορές και υπολογίζεται η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση από τις τιμές των αναλυτικών σημάτων.

#### 5.5.2.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των χρόνων κατακράτησης αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 20,0 ng/ml έξι φορές και υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση των τιμών των χρόνων κατακράτησης. Οι τιμές του χρόνου κατακράτησης θα πρέπει να βρίσκονται στην περιοχή  $t_R \pm 3SD$  min.

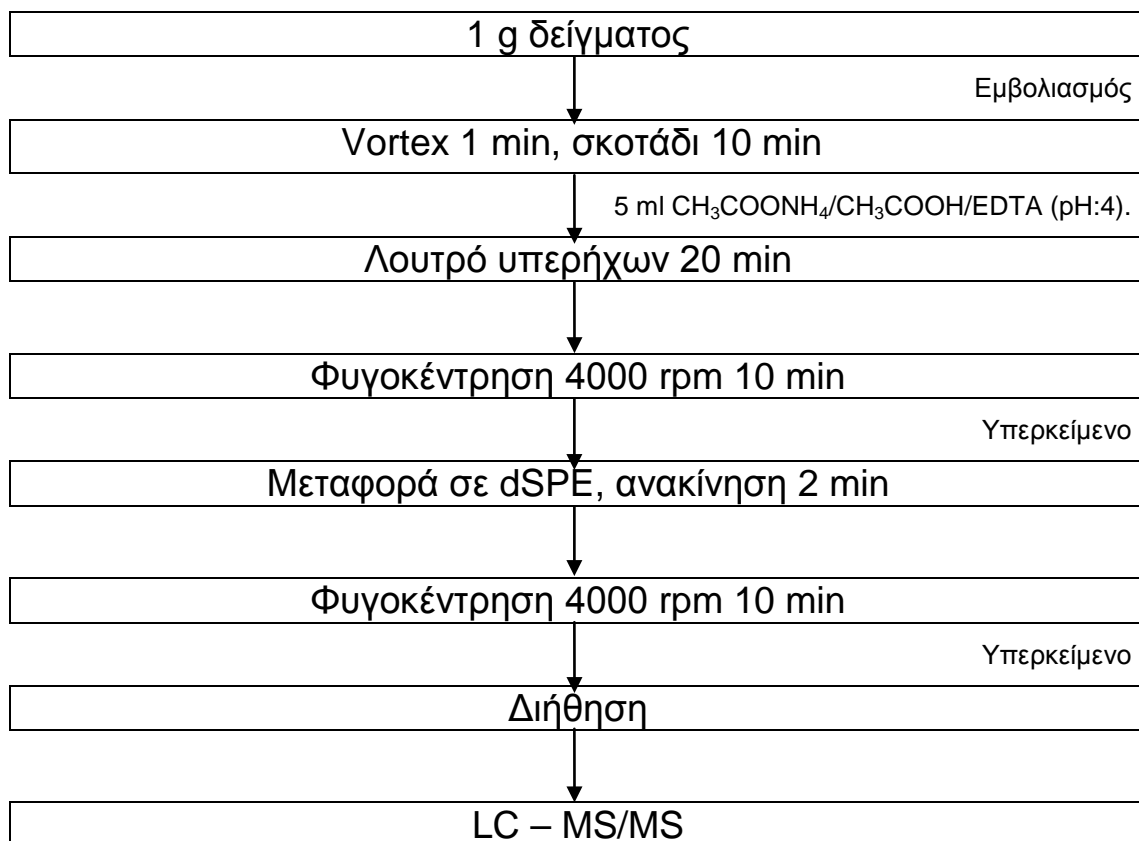
#### 5.5.3 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE) στο σύστημα HPLC – MS/MS

Η πορεία που ακολουθήθηκε στον προσδιορισμό των τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών είναι η εξής:

Αρχικά ζυγίζεται 1,0 g ομογενοποιημένου ιστού ψαριού σε φυγοκεντρικό σωλήνα των 15 ml σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων και εμβολιάζεται με 100 μl από το πρότυπο διάλυμα του 1,0 μg/ml (εμβολιασμός στο MRL). Ανακινείται σε συσκευή περιδίνησης τύπου vortex για 1 min και παραμένει στο σκοτάδι για 10 min. Στο σωλήνα προστίθενται 5 ml  $CH_3COONH_4/CH_3COOH/EDTA$  (pH=4). Ο φυγοκεντρικός σωλήνας μεταφέρεται στο λουτρό υπερήχων για 20 min και ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 4000 rpm για 10 min. Στη συνέχεια το υπερκείμενο μεταφέρεται σε νέο φυγοκεντρικό σωλήνα ο οποίος περιέχει 150 mg PSA και 150 mg  $C_{18}$  (dSPE). Ακολουθεί ανακίνηση για 2 min και ο σωλήνας της dSPE τοποθετείται στη φυγόκεντρο, όπου και φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 10 min. Τέλος το υπερκείμενο υγρό διαβιβάζεται μέσω φίλτρου οξικής κυτταρίνης με διάμετρο πόρων 0,22 μm οπότε και είναι έτοιμο να εισέλθει στο σύστημα LC-MS/MS.

Το πρωτόκολλο της μεθόδου που εφαρμόστηκε για τον ποσοτικό προσδιορισμό των τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών συνοψίζεται στο σχήμα 5.1.

Τα χαρακτηριστικά επίδοσης ως προς τα οποία επικυρώθηκε η μέθοδος είναι η γραμμικότητα, η ορθότητα, η πιστότητα υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και αναπαραγωγιμότητας καθώς και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης.



**Σχήμα 5.1:** Διάγραμμα ροής μεθόδου προσδιορισμού τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE)

### 5.5.3.1 Καμπύλη εμβολιασμένων δειγμάτων

Για την εξάλειψη του φαινομένου επίδρασης της μήτρας και για την εγκυρότητα των μετρήσεων που προκύπτουν από την εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα χρησιμοποιείται η τεχνική της προσθήκης γνωστών ποσοτήτων. Επτά λευκά δείγματα ιστού ψαριού του ενός γραμμαρίου εμβολιάστηκαν με πρότυπα διαλύματα μείγματος τετρακυκλινών σε επίπεδα συγκέντρωσης 10,0, 25,0, 50,0, 100, 250, 500 και 1000 ng/g. Ο εμβολιασμός γίνεται ως εξής:

Επίπεδο 10,0 ng/g: 40 μl προτύπου διαλύματος 0,25 μg/ml

Επίπεδο 25,0 ng/g: 100 μl προτύπου διαλύματος 0,25 μg/ml

Επίπεδο 50,0 ng/g: 50 μl προτύπου διαλύματος 1 μg/ml

Επίπεδο 100 ng/g: 100 μl προτύπου διαλύματος 1 μg/ml

Επίπεδο 250 ng/g: 250 μl προτύπου διαλύματος 1 μg/ml

Επίπεδο 500 ng/g: 100 µl προτύπου διαλύματος 5 µg/ml

Επίπεδο 1000 ng/g: 200 µl προτύπου διαλύματος 5 µg/ml

Τα δείγματα αναλύονται ακολουθώντας την πορεία του σχήματος 5.1. Οι θεωρητικές συγκεντρώσεις των τελικών εκχυλισμάτων που εισάγονται στο σύστημα της HPLC είναι 2,0, 5,0, 10,0, 20,0, 50,0, 100 και 200 ng/ml, δηλαδή αντίστοιχες με τις συγκεντρώσεις των προτύπων διαλυμάτων. Κατασκευάστηκαν λοιπόν οι καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων για την κάθε τετρακυκλίνη από τα εμβαδά των κορυφών και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών τους.

### **5.5.3.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου**

Το όριο ανίχνευσης (LOD) είναι το επίπεδο συγκέντρωσης στο οποίο κάποιος αναλύτης μπορεί να ανιχνευθεί με αξιοπιστία. Ορίζεται δε ως το άθροισμα της μέσης τιμής με την τυπική απόκλιση πολλαπλασιασμένη επί 3,3 που προκύπτουν από πολλαπλούς προσδιορισμούς λευκών-εμβολιασμένων δειγμάτων. Το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) ορίζεται ως η χαμηλότερη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αξιοπιστία και ισούται με το τριπλάσιο του ορίου ανίχνευσης.

Για τον προσδιορισμό του ορίου ανίχνευσης μπορούν να χρησιμοποιηθούν διάφορες προσεγγίσεις, όπως η οπτική αξιολόγηση που χρησιμοποιείται συνήθως στις μη ενόργανες μεθόδους ανάλυσης, με βάση το λόγο σήμα προς θόρυβο που εφαρμόζεται μόνο σε αναλυτικές μεθόδους οι οποίες παρουσιάζουν θόρυβο γραμμής βάσεως όπως και με βάση την τυπική απόκλιση της αναλυτικής απόκρισης και της κλίσης της καμπύλης αναφοράς που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη μέθοδο.<sup>[32]</sup>

Αναλύθηκαν λοιπόν έξι λευκά δείγματα ιστού ψαριού τα οποία εμβολιάστηκαν με πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών σε επίπεδο συγκέντρωσης 10,0 ng/g, σύμφωνα με τη μέθοδο εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση (SD) των εμβαδών των κορυφών. Λαμβάνοντας υπόψη τις κλίσεις b των καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων της συγκεκριμένης μεθόδου υπολογίστηκαν οι τιμές των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης από τους ακόλουθους τύπους:



$$LOD = 3,3 \times \frac{SD}{b} \quad (5.5) \quad LOQ = 10 \times \frac{SD}{b} \quad (5.6)$$

### 5.5.3.3 Ακρίβεια

Ως ακρίβεια νοείται η συμφωνία μεταξύ του αποτελέσματος μιας δοκιμής και της αποδεκτής τιμής αναφοράς. Προσδιορίζεται με τον έλεγχο της ορθότητας, δηλαδή της εγγύτητας μεταξύ της τιμής του μέσου όρου που λαμβάνεται από μια σειρά αποτελεσμάτων δοκιμών και της αποδεκτής τιμής αναφοράς, καθώς και με τον έλεγχο της πιστότητας, δηλαδή της εγγύτητας των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων δοκιμών υπό καθορισμένες συνθήκες. Στην περίπτωση που δεν διατίθεται πιστοποιημένο υλικό αναφοράς ως προς το οποίο θα συγκριθούν τα αποτελέσματα των δοκιμών, όπως στην παρούσα εργασία, η ορθότητα αξιολογείται με τον υπολογισμό των ανακτήσεων προσθηκών γνωστών ποσοτήτων των αναλυτών σε λευκά δείγματα. Η πιστότητα υπολογίζεται ως η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων μιας σειράς μετρήσεων που αποκτώνται τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας όσο και υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου ορίζεται ως η διασπορά των μετρήσεων στο ίδιο δείγμα, στο ίδιο εργαστήριο, από τον ίδιο αναλυτή, με τις ίδιες συσκευές, την ίδια μέρα ή σε σύντομο χρονικό διάστημα. Μέτρα εκτίμησης της επαναληψιμότητας είναι η τυπική απόκλιση  $SD_r$  και ο συντελεστής διακύμανσης  $RSD_r$ .

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα της μεθόδου, ορίζεται ως η διασπορά των μετρήσεων στο ίδιο δείγμα, στο ίδιο εργαστήριο, από διαφορετικούς αναλυτές, με την ίδια ή διαφορετικές συσκευές, στο ίδιο ή σε διαφορετικό χρονικό διάστημα. Μέτρα εκτίμησης της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας είναι η τυπική απόκλιση  $SD_L$  και ο συντελεστής διακύμανσης  $RSD_L$ .

## Ορθότητα

Όπως προαναφέρθηκε, για την εκτίμηση της ορθότητας, εφόσον δεν υπήρχαν πιστοποιημένα υλικά αναφοράς, υπολογίστηκαν οι μέσες ανακτήσεις προσθηκών γνωστών ποσοτήτων των αναλυτών σε λευκά δείγματα καθώς και οι ολικές ανακτήσεις.

Για τον υπολογισμό των μέσων ανακτήσεων πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ιστού ψαριού σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων 10,0, 100 και 1000 ng/g και έξι μετρήσεις προτύπων διαλυμάτων αντιστοίχων συγκεντρώσεων. Η μέση ανάκτηση σε κάθε περίπτωση βρέθηκε σύμφωνα με την παρακάτω σχέση:

$$\%R = (A_{sp} / A_{std}) \times 100 \quad (5.7)$$

όπου,

$A_{sp}$ : εμβαδό κορυφής του εμβολιασμένου δείγματος

$A_{std}$ : μέσος όρος εμβαδών κορυφής προτύπων στο εκάστοτε επίπεδο

Για τον υπολογισμό των ολικών ανακτήσεων χρησιμοποιήθηκαν οι καμπύλες αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων και οι καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων. Συγκεκριμένα, η ολική ανάκτηση ισούται με το πηλίκο της κλίσης από την εξίσωση της ευθείας της καμπύλης εμβολιασμένων δειγμάτων προς την κλίση από την εξίσωση της ευθείας της καμπύλης αναφοράς των προτύπων.

$$\%R_o = (b_{add} / b_{sol}) \times 100 \quad (5.8)$$

όπου,

$b_{add}$ : κλίση καμπύλης εμβολιασμένων δειγμάτων

$b_{sol}$ : κλίση καμπύλης αναφοράς

## Πιστότητα

Η πιστότητα όπως αναφέρθηκε εκτιμάται ως η τυπική απόκλιση των αποτελεσμάτων μιας σειράς μετρήσεων που αποκτώνται τόσο υπό συνθήκες επαναληψιμότητας όσο και υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Όσον αφορά την επαναληψιμότητα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων στο MRL (100 ng/g) και υπολογίστηκαν ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, η τυπική απόκλιση ( $SD_r$ ) καθώς και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD<sub>r</sub>).

Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ελέγχθηκε με την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων σε διαφορετικές μέρες και από άλλον αναλυτή. Συγκεκριμένα αναλύθηκαν τέσσερα εμβολιασμένα δείγματα στο MRL (100 ng/g). Υπολογίστηκαν και εδώ ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, η τυπική απόκλιση ( $SD_L$ ) καθώς και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD<sub>L</sub>).

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

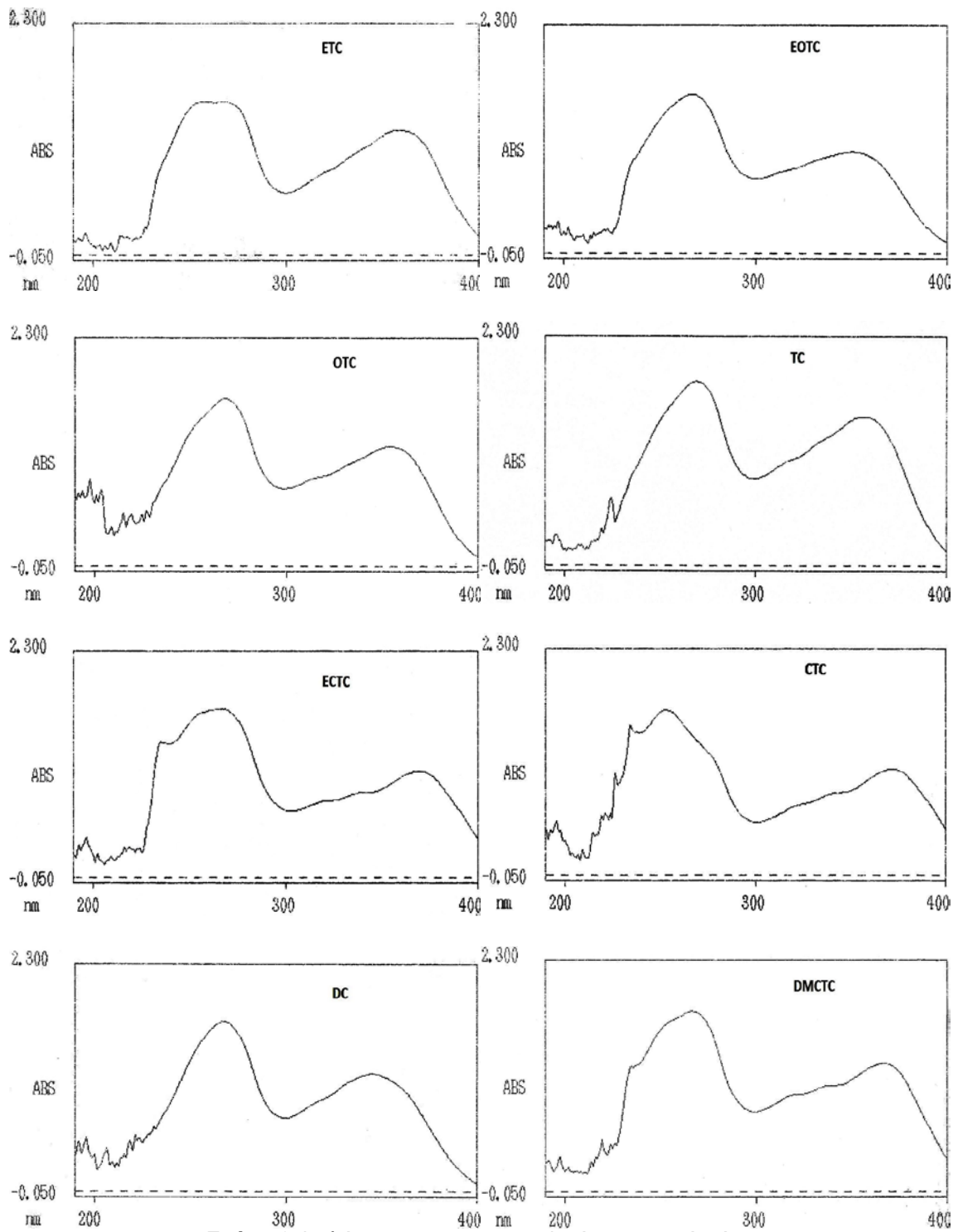
### 6.1 Επιλογή βέλτιστου μήκους κύματος στο UV

Ελήφθησαν φάσματα των τετρακυκλινών και των επιμερών τους καθώς και του εσωτερικού προτύπου (DMCTC) σε κινητή φάση (ακετονιτρίλιο :μεθανόλη (60:40) / διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v). Στον παρακάτω πίνακα παρουσιάζονται τα μέγιστα απορρόφησης για κάθε τετρακυκλίνη. Ως πιο κατάλληλο μήκος κύματος επιλέχθηκαν τα 360 nm παρ' όλο που το μέγιστο σ' αυτή την περιοχή είναι χαμηλότερης έντασης, επειδή παρουσιάζει λιγότερες παρεμποδίσεις.

*Πίνακας 6.1: Μέγιστα απορρόφησης και αντίστοιχα μήκη κύματος*

TCs	$\lambda_1$	$A_1$	$\lambda_2$	$A_2$
ETC	258	1,53	358	1,24
EOTC	268	1,60	350	1,03
OTC	268	1,69	354	1,21
TC	268	1,85	356	1,50
DMCTC	266	1,79	366	1,27
ECTC	254	1,67	370	1,08
CTC	266	1,71	372	1,08
DC	268	1,72	346	1,19

Στο σχήμα 6.1 παρουσιάζονται τα φάσματα των τετρακυκλινών και των επιμερών τους σε κινητή φάση.



**Σχήμα 6.1:** Φάσματα των τετρακυκλινών σε κινητή φάση

## 6.2 Βελτιστοποίηση χρωματογραφικών παραμέτρων (HPLC-UV)

Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές στήλες υγροχρωματογραφίας με σκοπό τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των τετρακυκλινών και των επιμερών τους βάσει του παράγοντα διαχωριστότητας  $R_s$  και σε κάθε μια από αυτές έγινε βελτιστοποίηση διαφόρων παραμέτρων. Χρησιμοποιήθηκαν λοιπόν πρότυπα διαλύματα μείγματος της κάθε τετρακυκλίνης με το αντίστοιχο επιμερές της σε συγκέντρωση 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

### 6.2.1 Βελτιστοποίηση για τη στήλη Waters Symmetry C<sub>18</sub>

Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση της οξύτητας της κινητής φάσης δοκιμάζοντας τρεις διαφορετικές τιμές pH (2, 3, 4) διατηρώντας σταθερή την αναλογία μεθανόλης-ακετονιτριλίου (50:50). Η ταχύτητα ροής που επιλέχθηκε αρχικά ήταν 0,8 ml/min. Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι χρόνοι ανάσχεσης ( $t_R$ ), τα εμβαδά των κορυφών (Area), οι παράγοντες ασυμμετρίας (AF), ο αριθμός των θεωρητικών πλακών και οι παράγοντες διαχωριστότητας ( $R_s$ ) για κάθε τετρακυκλίνη.

**Πίνακας 6.2:** Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή του pH για σύσταση κινητής φάσης ACN – MeOH 50:50 και ταχύτητα ροής 0,8 ml/min για τη στήλη Waters Symmetry C<sub>18</sub>

	pH 2					pH 3					pH 4				
<b>TCs</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Area</b>	<b>AF</b>	<b>N</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Area</b>	<b>AF</b>	<b>N</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Area</b>	<b>AF</b>	<b>N</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>ETC</b>	8,02	17,63	0,91	21120		5,76	15,16	0,83	12758		10,35	12,74	0,74	23121	
<b>EOTC</b>	8,47	4,10	0,86	29884	1,37	6,86	5,57	0,86	19641	4,03	11,12	3,33	0,62	30782	2,10
<b>TC</b>	9,03	21,87	0,84	32640	1,83	9,30	18,21	0,85	31283	8,75	11,96	19,94	0,71	39300	2,47
<b>OTC</b>	9,73	21,06	0,94	34272	2,58	9,30	21,69	0,82	34622	0	12,52	15,91	0,71	37753	1,61
<b>ECTC</b>	12,10	7,42	0,88	50952	8,49	9,79	11,17	0,80	31492	1,67	14,92	7,17	0,63	40393	6,23
<b>CTC</b>	14,14	7,12	0,98	61049	7,15	13,79	8,55	0,87	51383	12,46	17,44	7,32	0,72	42562	5,68
<b>DC</b>	16,67	9,18	1,12	91353	8,61	14,86	8,80	0,75	56724	6,31	17,44	6,81	0,64	40559	0

Από τους παράγοντες διαχωριστότητας φαίνεται πως στη συγκεκριμένη στήλη ο διαχωρισμός δεν είναι ικανοποιητικός για όλες τις τετρακυκλίνες σε καμία τιμή pH. Έτσι επιλέχθηκε ως καταλληλότερη η τιμή pH 3 γιατί δεν είναι ακραία για τη συγκεκριμένη στήλη, σε αντίθεση με την τιμή pH 2 παρότι αυτή έδωσε καλύτερα αποτελέσματα.

Στη συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση της ροής της κινητής φάσης. Υπολογίστηκαν οι ίδιες χρωματογραφικές παράμετροι για ταχύτητα ροής 0,6, 0,8 και 1,0 ml/min και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.3.



**Πίνακας 6.3:** Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της ταχύτητας ροής για σύσταση κινητής φάσης ACN – MeOH 50:50 και pH 3 για τη στήλη Waters Symmetry C<sub>18</sub>

	0,6 (ml/min)					0,8 (ml/min)					1,0 (ml/min)				
TCs	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>
<b>ETC</b>	7,37	16,37	0,75	17504		5,76	15,16	0,83	12758		5,07	11,79	0,87	10939	
<b>EOTC</b>	8,53	5,34	0,80	26330	3,94	6,86	5,57	0,86	19641	4,03	6,03	2,59	0,86	18061	3,83
<b>TC</b>	10,98	19,05	0,71	35496	7,99	9,30	18,21	0,85	31283	8,75	8,31	15,83	0,77	28766	8,97
<b>OTC</b>	11,05	27,02	0,74	40115	0,23	9,30	21,69	0,82	34622	0	8,37	13,99	0,84	28043	0,22
<b>ECTC</b>	11,64	12,38	0,74	43732	1,88	9,79	11,17	0,80	31492	1,67	8,85	4,32	0,79	28315	1,73
<b>CTC</b>	15,73	11,46	0,76	53438	11,76	13,79	8,55	0,87	51383	12,46	12,71	5,45	0,91	44437	12,59
<b>DC</b>	16,87	13,71	0,59	56218	2,79	14,86	8,80	0,75	56724	6,31	13,65	6,82	0,88	48324	2,83

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως ο διαχωρισμός δεν επηρεάζεται από την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και γι' αυτό επιλέχθηκε ως καταλληλότερη η ταχύτητα ροής 1,0 ml/min λόγω μικρότερου χρόνου ανάλυσης.

Τέλος έγινε βελτιστοποίηση της σύστασης της κινητής φάσης ως προς την αναλογία ακετονιτριλίου-μεθανόλης. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες, 50:50, 60:40 και 40:60 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.4.

**Πίνακας 6.4:** Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της αναλογίας ακετονιτριλίου – μεθανόλης στην κινητή φάση για pH 3 και ταχύτητα ροής 1 ml/min για τη στήλη Waters Symmetry C<sub>18</sub>

ACN/ MeOH	40/60					50/50					60/40				
TCs	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>
ETC	5,49	10,70	0,72	10080		5,07	11,79	0,87	10939		4,86	11,19	0,85	10968	
EOTC	6,61	2,28	0,73	17103	3,89	6,03	2,59	0,86	18061	3,83	5,64	2,59	0,76	16547	3,18
TC	9,11	12,30	0,60	20635	8,37	8,31	15,83	0,77	28766	8,97	7,71	15,60	0,84	29541	8,77
OTC	9,15	14,78	0,73	24645	0,12	8,37	13,99	0,84	28043	0,22	7,93	14,68	0,83	28568	0,89
ECTC	9,57	7,14	0,73	24356	1,19	8,85	4,32	0,79	28315	1,73	8,43	7,21	0,76	30938	1,90
CTC	13,80	6,84	0,75	28718	10,53	12,71	5,45	0,91	44437	12,59	11,98	6,79	0,90	47178	12,36
DC	15,07	7,39	0,59	33370	2,80	13,65	6,82	0,88	48324	2,83	12,58	7,66	0,9	45988	1,96

Από τους παράγοντες διαχωριστότητας συμπεραίνουμε πως καμία διαφορετική αναλογία ακετονιτριλίου-μεθανόλης δεν επιφέρει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό όλων των τετρακυκλινών. Συγκριτικά, καλύτερα αποτελέσματα έχουμε με την αναλογία ακετονιτριλίου-μεθανόλης 60:40 αφού η τιμή του  $R_s$  για την τετρακυκλίνη (TC) και την οξυτετρακυκλίνη (OTC) είναι μεγαλύτερη από αυτή των άλλων αναλογιών χωρίς όμως να βρίσκεται και αυτή εντός αποδεκτών τιμών ( $> 1,5$ ).

Είναι λοιπόν προφανές πως με τη συγκεκριμένη στήλη δε μπορεί να επιτευχθεί ο διαχωρισμός όλων των τετρακυκλινών αν και τα επιμερή μπορούν να διαχωριστούν με τις αντίστοιχες τετρακυκλίνες. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 1.

### **6.2.2 Βελτιστοποίηση για τη στήλη Supelco Ascentis C<sub>18</sub>**

Για την Supelco Ascentis C18 έγινε βελτιστοποίηση ως προς την αναλογία ακετονιτριλίου-μεθανόλης και την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Το pH διατηρήθηκε σταθερό στην τιμή 3 λόγω του ότι η στήλη δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλότερες τιμές pH. Αρχικά δοκιμάστηκαν οι ίδιες αναλογίες ACN/MeOH που χρησιμοποιήθηκαν στη στήλη Waters Symmetry, υπολογίστηκαν οι χρωματογραφικές παράμετροι και τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον πίνακα 6.5.

**Πίνακας 6.5:** Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της αναλογίας ακετονιτριλίου – μεθανόλης στην κινητή φάση για pH 3 και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min για τη στήλη Supelco Ascentis C<sub>18</sub>

ACN/ MeOH	40/60					50/50					60/40				
	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>
<b>ETC</b>	3,73	22,83	0,47	1948		4,31	21,30	0,38	1367		4,23	20,52	0,44	1909	
<b>EOTC</b>	4,79	3,08	0,73	5788	2,63	5,01	3,74	0,57	2985	1,31	4,82	4,00	0,62	3877	1,24
<b>OTC</b>	5,79	39,08	0,42	6820	2,69	5,73	26,55	0,42	2510	1,50	5,52	31,45	0,41	4155	1,65
<b>TC</b>	5,93	28,37	0,33	2940	0,26	6,27	23,95	0,27	1011	0,70	6,18	24,83	0,35	1956	1,08
<b>ECTC</b>	7,83	18,99	0,42	9736	3,54	8,20	15,04	0,38	4679	2,40	7,78	15,21	0,39	6445	2,54
<b>CTC</b>	9,95	15,73	0,39	8787	4,00	10,17	11,17	0,55	2483	2,42	9,55	11,82	0,33	3867	2,81
<b>DC</b>	11,43	19,32	0,39	10929	2,49	11,60	12,89	0,34	2736	1,37	10,83	16,18	0,36	3909	1,59

Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως σε καμία από τις τρεις διαφορετικές αναλογίες ακετονιτριλίου-μεθανόλης δεν υπάρχει ικανοποιητικός διαχωρισμός των τετρακυκλινών. Επίσης παρατηρείται ότι οι παράγοντες ασυμμετρίας και στις τρεις περιπτώσεις, για όλες τις τετρακυκλίνες, βρίσκονται εκτός αποδεκτών ορίων και γι' αυτό το λόγο, στα πλαίσια της βελτιστοποίησης της ροής δεν έγιναν δοκιμές σε χαμηλότερη ταχύτητα από 0,4 ml/min. Όταν δοκιμάστηκε μεγαλύτερη ταχύτητα ροής οι κορυφές των τετρακυκλινών που εκκλύονται αρχικά (ETC και EOTC) δεν εμφανίζονται στο χρωματογράφημα (συνεκλούνται στον νεκρό χρόνο) κι έτσι ως καταλληλότερη ταχύτητα ροής επιλέχθηκε η 0,4 ml/min. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο Παράρτημα 2.

### **6.2.3 Βελτιστοποίηση για τη στήλη Waters Xterra C<sub>18</sub>**

Αρχικά έγινε βελτιστοποίηση ως προς την αναλογία ακετονιτριλίου-μεθανόλης της κινητής φάσης. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες αναλογίες όπως και στις προηγούμενες στήλες με ταχύτητα ροής 0,4 ml/min και διατηρώντας σταθερό το pH στην τιμή 3. Υπολογίστηκαν οι χρωματογραφικές παράμετροι που παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6.6:** Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή της αναλογίας ακετονιτριλίου – μεθανόλης στην κινητή φάση για pH 3 και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min για τη στήλη Waters Xterra C<sub>18</sub>

ACN/ MeOH	40/60					50/50					60/40				
	TCS	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	R <sub>s</sub>	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N
<b>ETC</b>	5,59	21,68	0,81	5359		5,18	28,82	0.84	4264		4,90	25,84	0,86	4350	
<b>EOTC</b>	6,66	3,54	0,85	9881	2,82	6,15	4,78	0.84	8174	2,38	5,45	4,37	0,80	7145	1,41
<b>OTC</b>	7,79	35,31	0,74	13723	3,10	7,19	37,51	0.70	12464	2,91	6,42	40,62	0,76	10937	2,75
<b>TC</b>	7,97	28,43	0,75	13732	0,49	7,50	30,37	0.72	12534	0,86	7,01	33,73	0.69	12420	1,71
<b>ECTC</b>	10,12	16,80	0,75	19665	5,53	9,65	18,18	0.80	18408	5,71	8,90	17,74	0,74	19062	5,33
<b>CTC</b>	12,75	17,95	0,87	27935	6,31	12,11	18,48	0.80	27377	6,19	11,16	20,28	0,85	28614	6,21
<b>DC</b>	14,64	20,40	0,68	39971	4,45	13,80	20,53	0.69	37640	4,14	12,60	19,85	0,66	38227	3,85

Παρατηρείται, σύμφωνα με τις τιμές των παραγόντων διαχωριστότητας, πως δεν έχει επιτευχθεί ικανοποιητικός διαχωρισμός για όλες τις τετρακυκλίνες σε καμία από τις τρεις διαφορετικές αναλογίες ακετονιτριλίου-μεθανόλης. Στην περίπτωση όμως της αναλογίας 60:40 η τιμή του  $R_s$  για την τετρακυκλίνη και την οξυτετρακυκλίνη είναι μεγαλύτερη από αυτή των άλλων δύο αναλογιών και έτσι επιλέχθηκε ως καταλληλότερη για το επόμενο βήμα της βελτιστοποίησης.

Στη συνέχεια λοιπόν, έγινε βελτιστοποίηση της οξύτητας της κινητής φάσης δοκιμάζοντας τρεις διαφορετικές τιμές pH (2, 3, 4) και διατηρώντας σταθερή την αναλογία ακετονιτριλίου-μεθανόλης (60:40). Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.7.



**Πίνακας 6.7:** Μεταβολές των χρωματογραφικών παραμέτρων σε σχέση με τη μεταβολή του pH για σύσταση κινητής φάσης ακετονιτρίλιο – μεθανόλη 60:40 και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min για τη στήλη Waters Xterra C<sub>18</sub>

	pH 2					pH 3					pH 4				
<b>TCs</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Area</b>	<b>AF</b>	<b>N</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Area</b>	<b>AF</b>	<b>N</b>	<b>R<sub>s</sub></b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Area</b>	<b>AF</b>	<b>N</b>	<b>R<sub>s</sub></b>
<b>ETC</b>	5,54	29,91	0,92	6061		4,90	25,84	0,86	4350		6,25	26,26	0,83	6354	
<b>EOTC</b>	5,97	3,93	1,10	9023	1,64	5,45	4,37	0,80	7145	1,41	6,93	3,97	0,82	11938	1,77
<b>OTC</b>	6,43	42,43	0,85	10273	1,77	6,42	40,62	0,76	10937	2,75	7,34	35,80	0,78	14794	1,26
<b>TC</b>	7,34	40,04	0,92	13192	3,47	7,01	33,73	0,69	12420	1,71	7,88	35,71	0,77	15439	1,64
<b>ECTC</b>	9,68	9,10	0,93	22188	6,64	8,90	17,74	0,74	19062	5,33	10,34	15,36	0,75	20541	6,69
<b>CTC</b>	11,74	13,98	1,00	32132	7,58	11,16	20,28	0,85	28614	6,21	12,09	18,41	0,92	28884	4,37
<b>DC</b>	14,21	17,44	1,02	53638	9,34	12,60	19,85	0,66	38227	3,85	12,23	17,88	0,65	29570	0,35

Από τους παράγοντες διαχωριστότητας φαίνεται πως για τιμή pH 2 όλες οι τετρακυκλίνες διαχωρίζονται τόσο μεταξύ τους, όσο και με τα επιμερή, δίνοντας σε κάθε περίπτωση  $R_s > 1,5$ . Επίσης οι τιμές των παραγόντων ασυμμετρίας βρίσκονται εντός αποδεκτών ορίων κι έτσι δε χρειάστηκε να γίνει βελτιστοποίηση ως προς την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης, αφού και ο χρόνος ανάλυσης ήταν σε λογικά πλαίσια.

Τελικά οι βέλτιστες συνθήκες χρωματογραφικής ανάλυσης που επιλέχθηκαν ήταν οι εξής:

- Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (60:40) / διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2) με βαθμιδωτή έκλυση σύμφωνα με τον πίνακα 6.8.
- Ροή: 0.4 ml/min
- Ενιόμενος όγκος: 20  $\mu$ l
- Χρόνος ανάλυσης: 20 min
- Μήκος κύματος απορρόφησης: 360 nm
- Στατική φάση: στήλη Waters Xterra MS C18, 3,5  $\mu$ m, 2,1x100 mm με προστήλη Waters Xterra C18
- Θερμοκρασία μέτρησης: 20 °C

**Πίνακας 6.8:** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλυσης, όπου A: ακετονιτρίλιο/μεθανόλη σε αναλογία 60/40 και B: διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2)

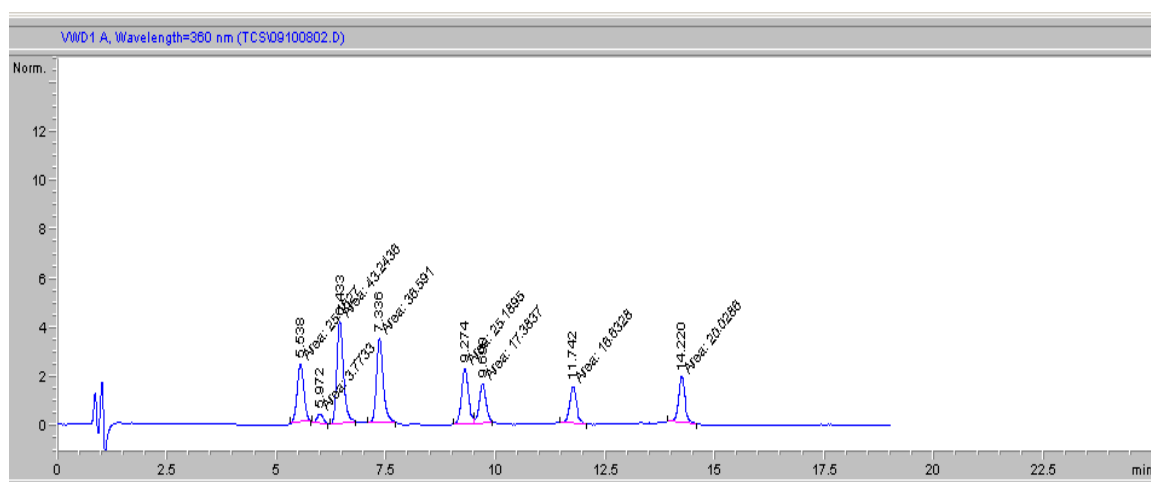
<b>t (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	10	90
1	10	90
18	40	60
19	10	90

Οι χρόνοι ανάρθεσης και οι χρωματογραφικές παράμετροι N, AF,  $k'$  και  $R_s$  των τετρακυκλινών και του εσωτερικού προτύπου (DMCTC) που υπολογίζονται σύμφωνα με τις σχέσεις 2.2, 2.4, 2.5 και 2.8 αντίστοιχα στις συγκεκριμένες χρωματογραφικές συνθήκες παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα:

**Πίνακας 6.9:** Χρόνοι ανάσχεσης και χρωματογραφικές παράμετροι των τετρακυκλινών

TCs	t <sub>R</sub> (min)	Area	AF	N	Rs	k'
ETC	5,54	25,16	0,87	6724		3,6
EOTC	5,97	3,77	0,89	8544	1,64	4,0
OTC	6,43	43,24	0,82	9808	1,77	4,4
TC	7,34	36,59	0,85	12758	3,47	5,1
DMCTC	9,27	25,19	0,88	18024	7,22	6,7
ECTC	9,69	17,38	1,01	20908	1,53	7,1
CTC	11,74	16,63	0,94	29776	7,58	8,8
DC	14,22	20,03	0,85	48697	9,34	10,9

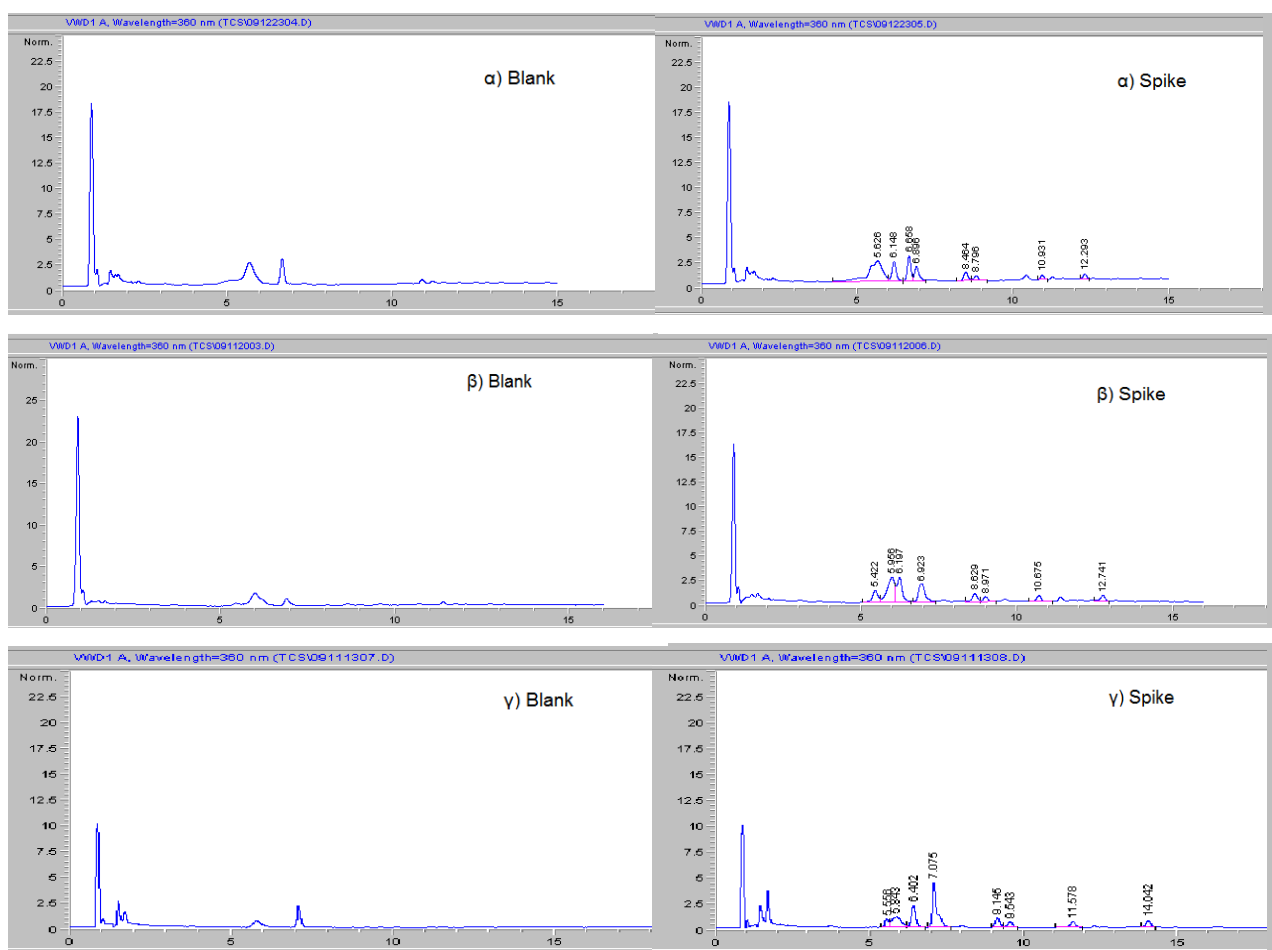
Στο σχήμα 6.2 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών σε συγκέντρωση 0,5 μg/ml.



**Σχήμα 6.2:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 0,5 μg/ml

### 6.3 Βελτιστοποίηση και επιλογή μεθόδων καθαρισμού

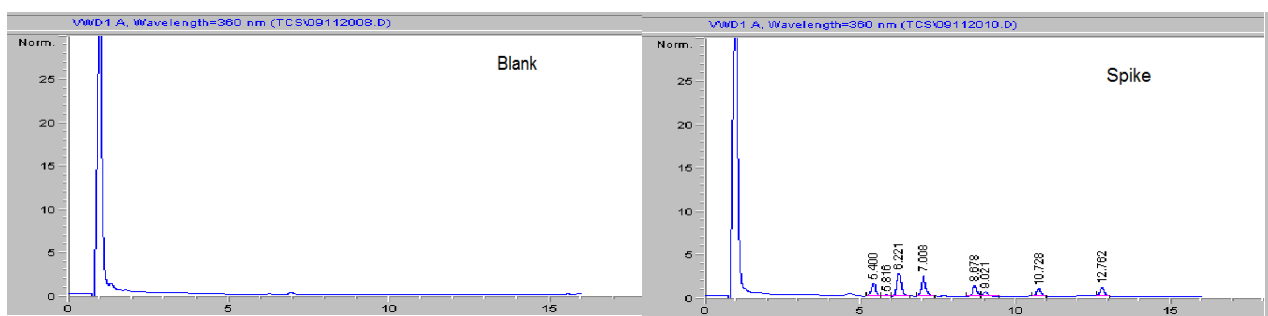
Αρχικά έγινε δοκιμή καθαρισμού του δείγματος με εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE). Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν φυσίγγια C<sub>18</sub>, 101 και HLB σύμφωνα με τη μεθοδολογία που αναφέρεται στο εδάφιο 5.2.2. Στο σχήμα που ακολουθεί φαίνονται τα χρωματογραφήματα των τετρακυκλινών σε UV μετά από προκατεργασία με SPE για τα τρία είδη φυσιγγίων.



**Σχήμα 6.3:** Χρωματογραφήματα λευκών και εμβολιασμένων δειγμάτων ιστού ψαριού με μείγμα TCs μετά από καθαρισμό με SPE, α) C<sub>18</sub>, β) 101, γ) HLB

Όπως φαίνεται στο σχήμα 6.3 σε όλες τις περιπτώσεις λευκών δειγμάτων εμφανίζονται παρεμπόδισεις, των οποίων μάλιστα οι χρόνοι ανάλυσης συμπίπτουν με τους χρόνους ανάλυσης των τετρακυκλινών που εκλύονται αρχικά από τη στήλη (ETC, EOTC και OTC), κάτι που επιβεβαιώνεται και με τα χρωματογραφήματα που ελήφθησαν από εμβολιασμένα δείγματα.

Επειδή ο καθαρισμός με εκχύλιση στερεάς φάσης δεν είχε ικανοποιητικά αποτελέσματα, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των δειγμάτων με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE). Χρησιμοποιήθηκαν φυγοκεντρικοί σωλήνες των 15 ml οι οποίοι περιείχαν 900 mg MgSO<sub>4</sub>, 150 mg PSA και 150 mg C18 και η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι αυτή που περιγράφεται στο εδάφιο 5.2.2. Στο σχήμα 6.4 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα λευκού και εμβολιασμένου δείγματος (15xMRL) μετά από προκατεργασία με dSPE.



**Σχήμα 6.4:** Χρωματογραφήματα λευκού και εμβολιασμένου δείγματος ιστού ψαριού με μείγμα TCs μετά από καθαρισμό με dSPE

Όπως φαίνεται από τα χρωματογραφήματα του σχήματος 6.4, τόσο το λευκό όσο και το εμβολιασμένο δείγμα είναι απαλλαγμένα από παρεμποδίζουσες ουσίες και οι τετρακυκλίνες εμφανίζουν ικανοποιητικές ανακτήσεις οι οποίες παρουσιάζονται στον πίνακα 6.10 με και χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου.

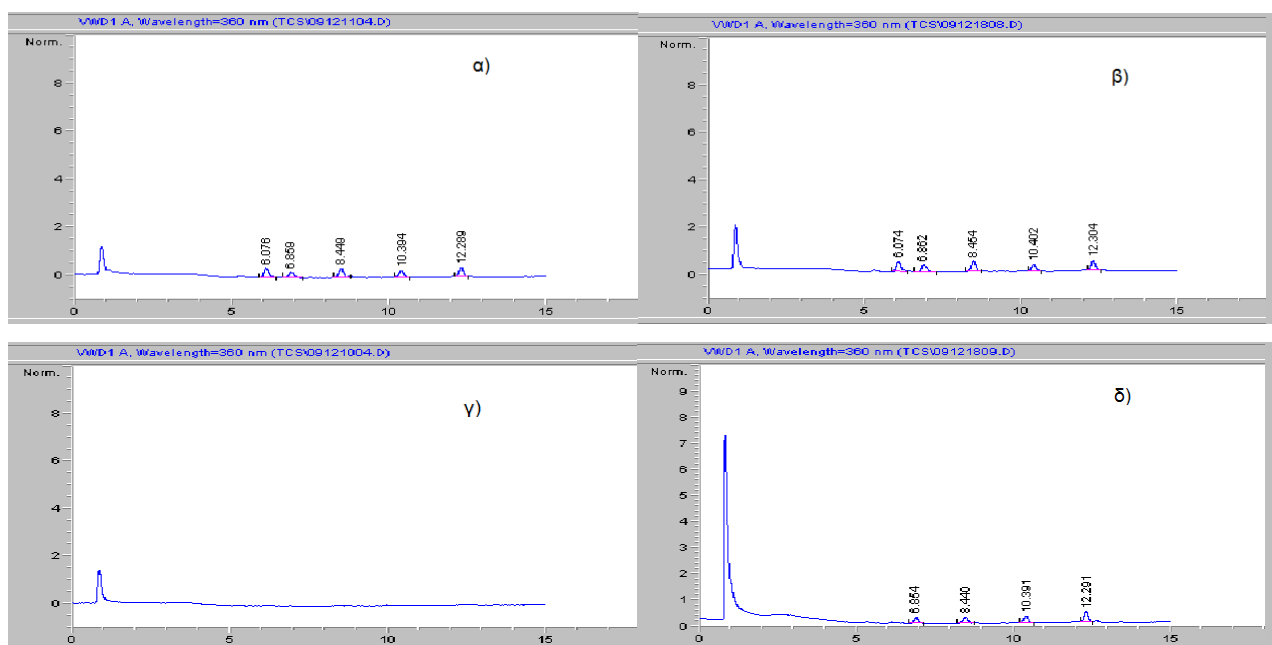
**Πίνακας 6.10:** Ανακτήσεις τετρακυκλινών με και χωρίς τη χρήση εσωτερικού προτύπου για εμβολιασμένο δείγμα ιστού ψαριού μετά από καθαρισμό με dSPE

TCS	Area (std)	Area (spike)	R <sub>ext</sub>	R <sub>int</sub>
ETC	24,87	17,37	69,8	87,3
EOTC	3,37	2,22	65,9	92,5
OTC	39,79	27,07	68,0	89,6
TC	32,72	26,96	82,4	74,0
DMCTC	21,79	13,28	60,9	
ECTC	10,29	5,79	56,3	108
CTC	15,66	10,28	65,6	92,8
DC	16,49	10,21	61,9	98,4

Παρά τα ικανοποιητικά χαρακτηριστικά που εμφανίζει η μέθοδος καθαρισμού με dSPE (απουσία παρεμποδίσεων, υψηλές ανακτήσεις,

ταχύτητα και απλότητα) δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσια για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών διότι εάν εφαρμοστεί στο MRL, το διάλυμα που εισάγουμε στον υγροχρωματογράφο τελικά έχει συγκέντρωση 0,03 μg/ml, συγκέντρωση πολύ χαμηλή για το συγκεκριμένο όργανο. Αυτό αποτελεί και το βασικό μειονέκτημα της dSPE σε σχέση με την SPE, με την οποία μπορούμε να κάνουμε προσυγκέντρωση του δείγματος.

Επομένως ήταν απαραίτητη η χρήση μιας μεθόδου προσυγκέντρωσης, η οποία θα γινόταν στο υπερκείμενο που λαμβάνεται από τον καθαρισμό με dSPE. Έτσι έγινε δοκιμή της υγρό-υγρό εκχύλισης (LLE) με τρεις διαφορετικούς διαλύτες εκχύλισης (οξικός αιθυλεστέρας με και χωρίς την παρουσία χλωριούχου νατρίου, διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα-ισοπροπανόλης σε αναλογία 12/1 και διχλωρομεθάνιο) σύμφωνα με το εδάφιο 5.2.2, έτσι ώστε να μεταφερθούν οι τετρακυκλίνες από την υδατική (McIlvaine EDTA) στην οργανική φάση και να ακολουθήσει εξάτμιση μέχρι ξηρού και ανασύσταση στην επιθυμητή συγκέντρωση. Στο σχήμα 6.5 παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων στο MRL μετά από καθαρισμό με dSPE και προσυγκέντρωση με LLE.



**Σχήμα 6.5:** Χρωματογραφήματα εμβολιασμένων δειγμάτων ιστού ψαριού με μείγμα TCs μετά από καθαρισμό με dSPE και προσυγκέντρωση με LLE με διαλύτες εκχύλισης α) οξικός αιθυλεστέρας, β) οξικός αιθυλεστέρας – NaCl, γ) διάλυμα οξικού αιθυλεστέρα – ισοπροπανόλης σε αναλογία 12/1 και δ) διχλωρομεθάνιο

Όπως φαίνεται από το σχήμα 6.5, σε καμία από τις τέσσερις περιπτώσεις δεν εκχυλίζονται όλες οι τετρακυκλίνες και όσες εκχυλίζονται εμφανίζουν πολύ μικρή ανάκτηση. Έτσι κρίθηκε απαραίτητο η μέθοδος προσδιορισμού τετρακυκλινών σε ιστό ψαριών μετά από καθαρισμό με dSPE να μεταφερθεί στο σύστημα HPLC-MS/MS, όπου δεν απαιτείται προσυγκέντρωση λόγω υψηλής ευαισθησίας του συγκεκριμένου ανιχνευτή.

#### 6.4 Βελτιστοποίηση παραμέτρων στο σύστημα HPLC-MS/MS

Όπως έχει ήδη αναφερθεί στην ενότητα 5.3 η βελτιστοποίηση των παραμέτρων του φασματομέτρου μαζών για την ανίχνευση των τετρακυκλινών, όπως και η εύρεση των μητρικών και θυγατρικών ιόντων των ενώσεων, έχει πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη εργασία. Στους παρακάτω πίνακες παρουσιάζονται τόσο οι παράμετροι λειτουργίας του οργάνου όσο και οι αναλυτικές παράμετροι για κάθε αναλύτη.

**Πίνακας 6.11:** Οι κυριότερες παράμετροι λειτουργίας του φασματομέτρου μαζών

Παράμετρος	Επιλεγμένη τιμή
Πολικότητα ( <i>polarity</i> )	Θετική
Θέση του ακροσωλήνιου ιοντισμού ( <i>probe</i> )	Θέση B
Τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού ( <i>Spray Voltage</i> )	4000 V
Παροχή του αερίου εκνέφωσης (N <sub>2</sub> ) ( <i>Sheath gas Pressure</i> )	60 A.U.
Παροχή αερίου ξήρανσης (N <sub>2</sub> ) ( <i>Auxiliary gas</i> )	20 A.U.
Θερμοκρασία αγωγού μεταφοράς των ιόντων ( <i>Ion transfer capillary temperature</i> )	270 °C
Πίεση θραυσματοποίησης	1,5 mTorr
Ροή διαλύματος ( <i>Flow rate</i> )	0,2 ml/min

**Πίνακας 6.12:** Αναλυτικές παράμετροι στο LC-MS/MS για τις τετρακυκλίνες

TCs	[M-H] <sup>+</sup> (m/z)	Ποσοτικό ιόν	Ενέργεια θραυσματοποίησης (V)	t <sub>R</sub> (min)
ETC	445	426,4	12	6,39
EOTC	461	425,8	19	6,54
OTC	461	425,8	19	6,79
TC	445	426,4	12	7,32
DMCTC	465	447,8	16	8,39
ECTC	479	444,0	20	8,64
CTC	479	444,0	20	9,66
DC	445	427,4	19	10,78

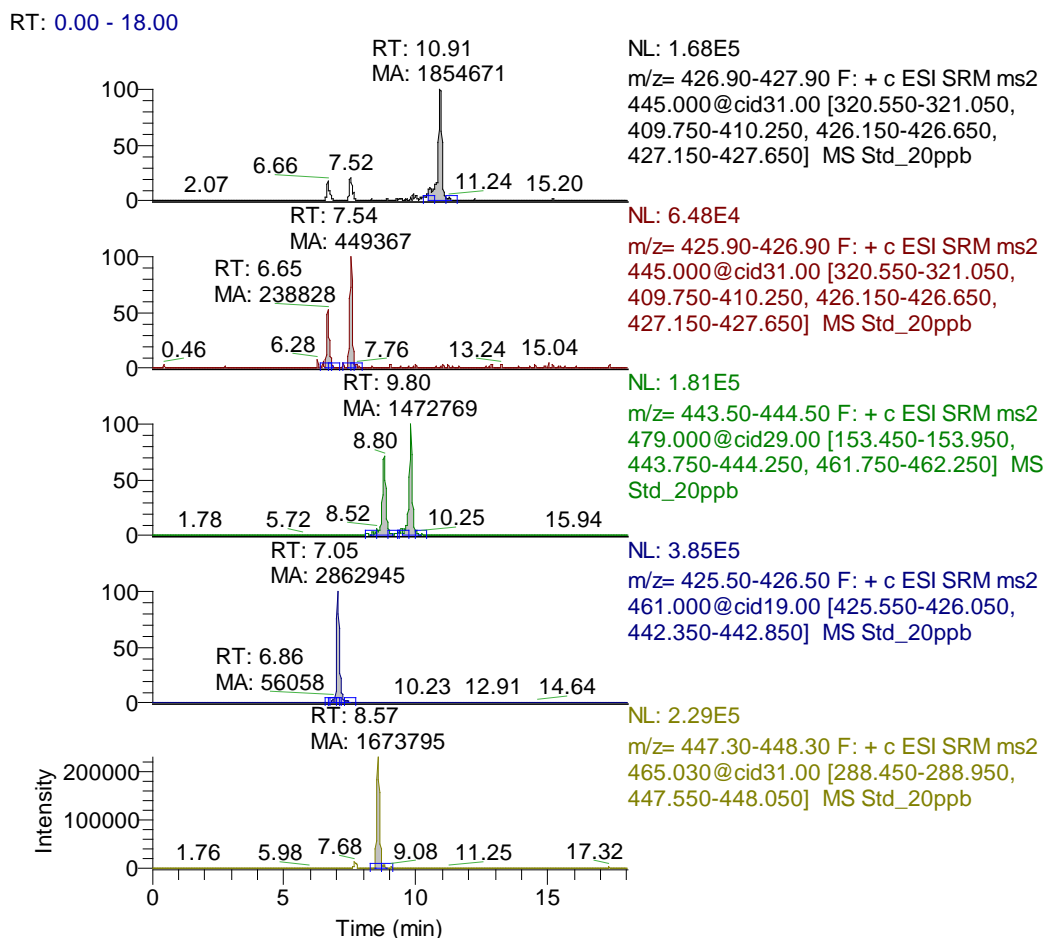
Η αναλυτική στήλη και η σύσταση της κινητής φάσης στο φασματόμετρο μάζας είναι όμοιες με αυτές του συστήματος HPLC-UV , εφόσον η μέθοδος διαχωρισμού των τετρακυκλινών και των επιμερών τους μεταφέρθηκε αυτούσια. Παρ' όλα αυτά, επειδή οι φασματογράφοι μαζών απαιτούν μικρούς όγκους διαλυτών, έπρεπε να γίνει προσαρμογή της μεθόδου στο νέο σύστημα, ως προς την ταχύτητα ροής της κινητής φάσης και ως προς το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Το πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για το σύστημα HPLC-MS/MS παρουσιάζεται στον επόμενο πίνακα.

**Πίνακας 6.13:** Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης, όπου A: ακετονιτρίλιο/μεθανόλη σε αναλογία 60/40 και B: διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2)

t (min)	A (%)	B (%)
0	10	90
1	10	90
18	30	70
18,5	10	90
22	10	90

Στο σχήμα 6.6 παρουσιάζεται το χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 20 ng/ml.





**Σχήμα 6.6:** Χρωματογράφημα πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 20 ng/ml

## 6.5 Βελτιστοποιήσεις κατά την προκατεργασία του δείγματος στο σύστημα LC-MS/MS

Όπως αναφέρθηκε στο εδάφιο 5.4, η μέθοδος μεταφέρθηκε από το σύστημα HPLC-UV στο LC-MS/MS τροποποιημένη σύμφωνα με τις απαιτήσεις του νέου οργάνου. Στα πλαίσια αυτά έγινε βελτιστοποίηση της διαδικασίας καθαρισμού με dSPE. Έτσι έγιναν δοκιμές με dSPE που περιείχαν:

- 150 mg C<sub>18</sub>
- 150 mg PSA
- 150 mg C<sub>18</sub> και 150 mg PSA

Υπολογίστηκαν οι ανακτήσεις των τετρακυκλινών και των επιμερών τους και στις τρεις περιπτώσεις και εκ των αποτελεσμάτων ως καταλληλότερη μέθοδος καθαρισμού επιλέχθηκε η dSPE με 150 mg C<sub>18</sub> και 150 mg PSA.

**Πίνακας 6.14:** Ανακτήσεις τετρακυκλινών μετά από προκατεργασία με διαφορετικά είδη dSPE

TCs	C <sub>18</sub>			PSA			C <sub>18</sub> + PSA		
	Std	Spike	%R	Std	Spike	%R	Std	Spike	%R
<b>ETC</b>	276158	139064	<b>50,4</b>	276158	108633	<b>39,3</b>	241783	231770	<b>95,9</b>
<b>EOTC</b>	68346	58240	<b>85,2</b>	68346	38172	<b>55,9</b>	47050	37487	<b>79,7</b>
<b>OTC</b>	3909955	2014762	<b>51,5</b>	3909955	1437086	<b>36,8</b>	3894555	2537919	<b>65,2</b>
<b>TC</b>	454325	430998	<b>94,9</b>	454325	367252	<b>80,8</b>	457890	411097	<b>89,8</b>
<b>DMCTC</b>	2392935	719052	<b>30,0</b>	2392935	428940	<b>17,9</b>	2211299	1056773	<b>47,8</b>
<b>ECTC</b>	984689	792038	<b>80,4</b>	984689	483066	<b>49,1</b>	955621	804587	<b>84,2</b>
<b>CTC</b>	1389979	1124167	<b>80,9</b>	1389979	808263	<b>58,1</b>	1340673	991067	<b>73,9</b>
<b>DC</b>	1292418	695081	<b>53,8</b>	1292418	903171	<b>69,9</b>	1280461	525069	<b>41,0</b>

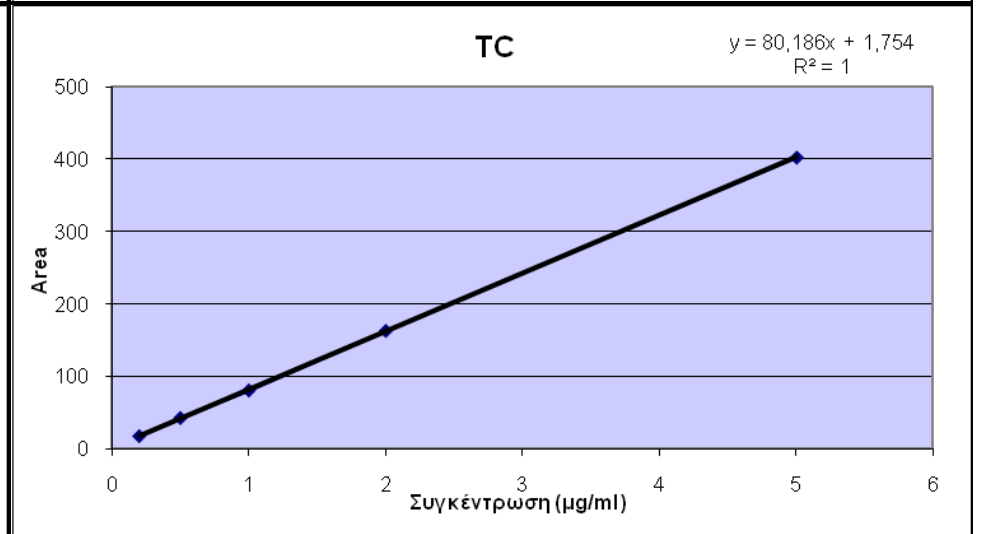
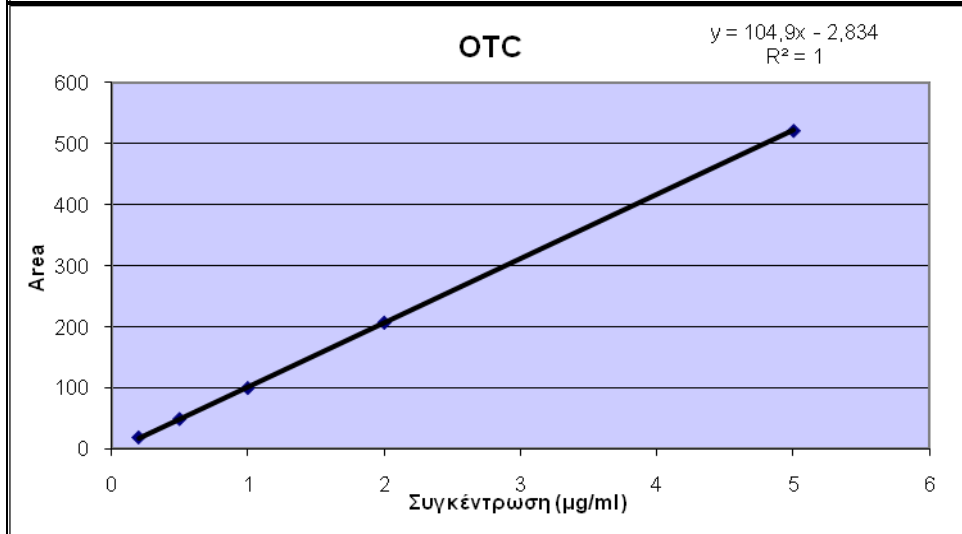
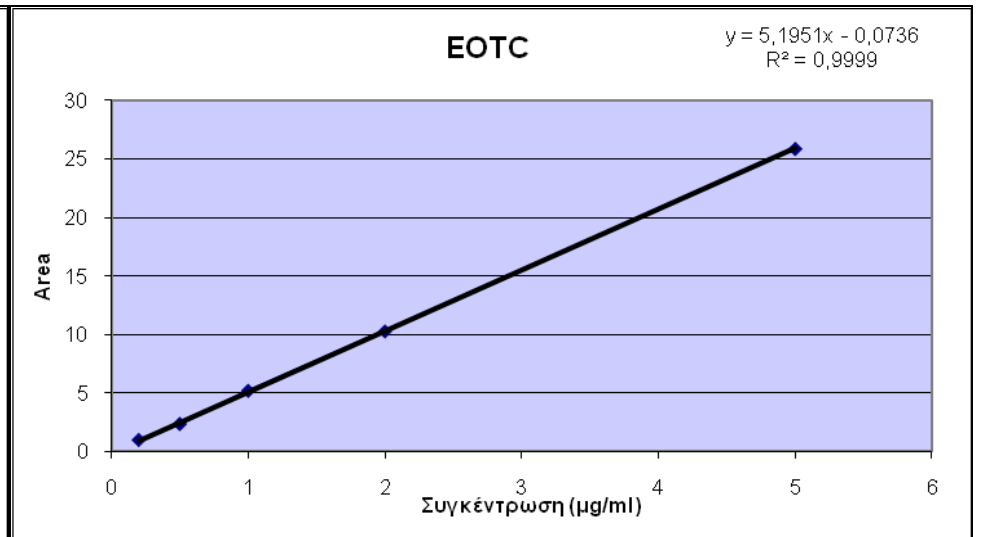
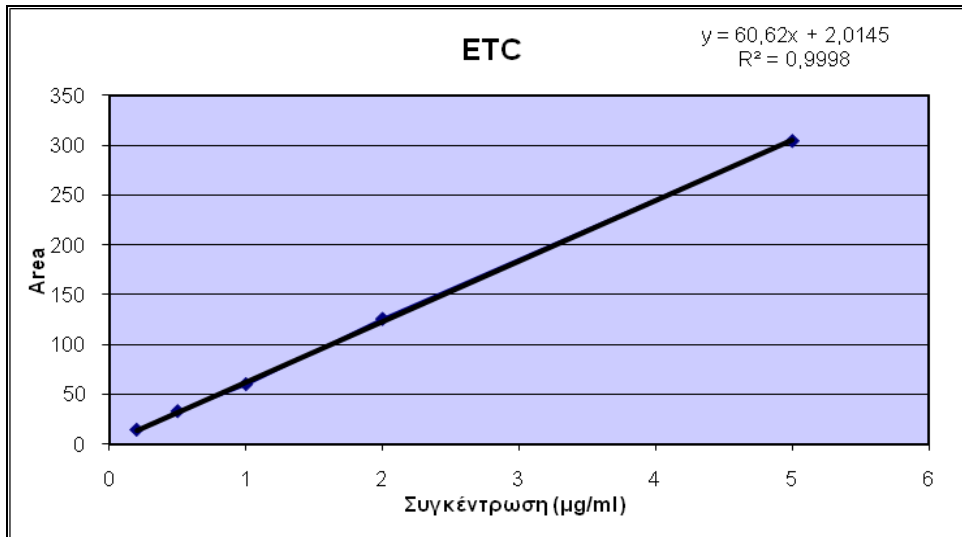
## 6.6 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC - UV

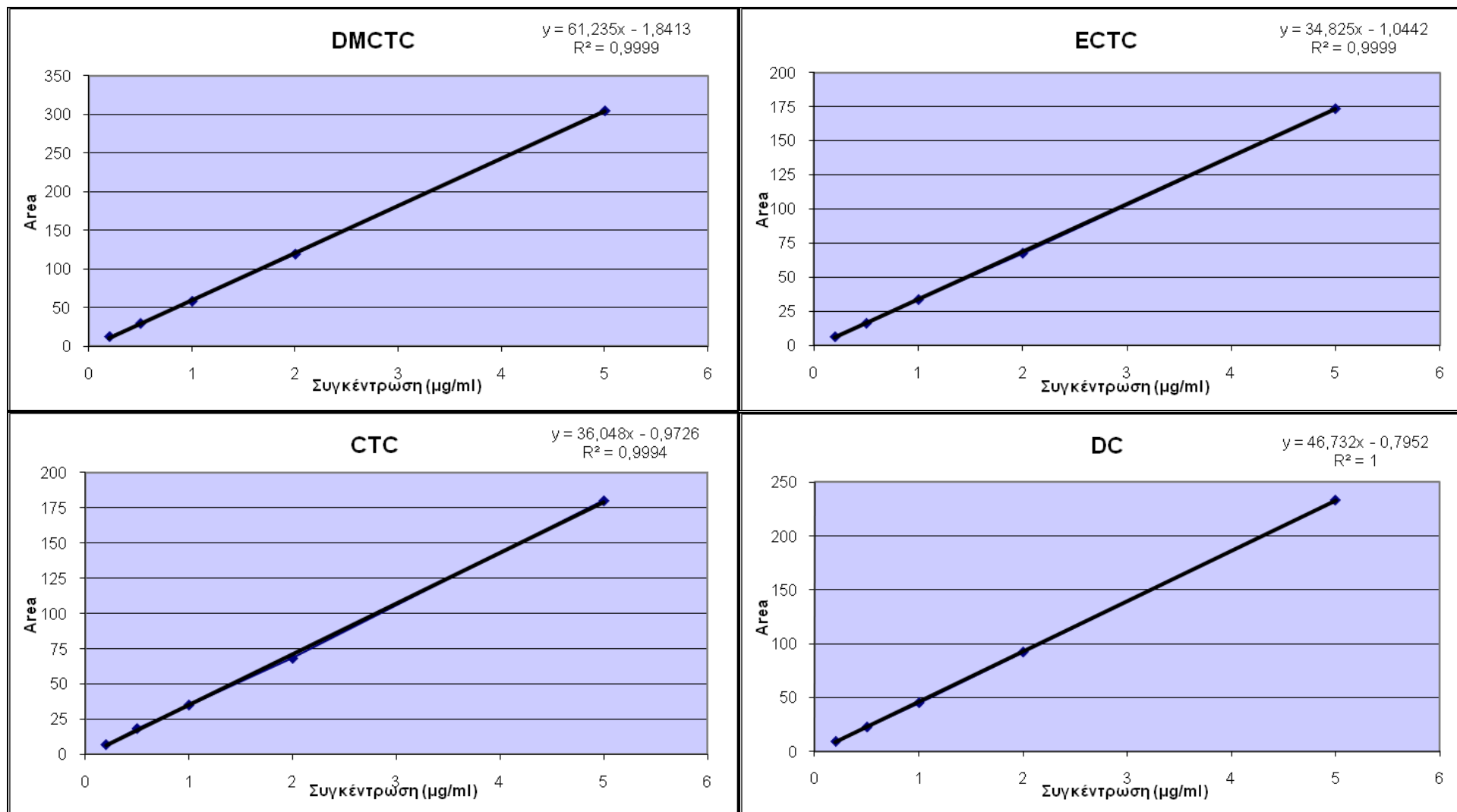
### 6.6.1 Γραμμικότητα-καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων

Η γραμμικότητα ελέγχθηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων μείγματος τετρακυκλινών σε συγκεντρώσεις 0,2, 0,5, 1,0, 2,0 και 5,0 µg/ml. Τα εμβαδά των κορυφών που χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες αναφοράς φαίνονται στον πίνακα 6.15 και η γραφική απεικόνισή τους στο σχήμα 6.7.

**Πίνακας 6.15:** Δεδομένα καμπυλών αναφοράς

	<b>C (µg/ml)</b>				
<b>TCS</b>	<b>0,2</b>	<b>0,5</b>	<b>1,0</b>	<b>2,0</b>	<b>5,0</b>
<b>ETC</b>	14,23	32,91	60,05	125,7	304,6
<b>EOTC</b>	1,02	2,39	5,22	10,30	25,90
<b>OTC</b>	19,35	49,56	100,3	207,5	521,8
<b>TC</b>	17,50	42,60	80,75	163,1	402,5
<b>DMCTC</b>	12,08	29,20	57,98	119,2	305,1
<b>ECTC</b>	6,52	16,38	33,76	67,65	173,4
<b>CTC</b>	6,87	18,30	35,07	68,25	180,3
<b>DC</b>	9,33	22,68	45,23	92,20	233,2





Σχήμα 6.7: Καμπύλες αναφοράς των τετρακυκλινών στο σύστημα HPLC - UV

Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης των ευθειών παλινδρόμησης στο UV για όλες τις τετρακυκλίνες δείχνουν ότι υπάρχει ικανοποιητική συμφωνία με το γραμμικό μοντέλο.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης διέρχονται από την αρχή των αξόνων εφόσον:  $t_{\text{πειρ.}} < t_{\text{θεωρ.}}$ , όπου  $t_{\text{θεωρ.}} = 3,182$  για  $\nu = 5 - 2 = 3$  και επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, εκτός από την περίπτωση της ΟΤC.

**Πίνακας 6.16:** Έλεγχος διέλευσης καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων

<b>TCS</b>	<b><math>t_{\text{πειρ.}}</math></b>
<b>ETC</b>	1,524
<b>EOTC</b>	1,151
<b>OTC</b>	3,587
<b>TC</b>	2,793
<b>DMCTC</b>	1,832
<b>ECTC</b>	2,415
<b>CTC</b>	0,795
<b>DC</b>	1,829

## 6.6.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του UV πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 0,2 µg/ml. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις 5.1 και 5.2. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρατίθενται στον πίνακα 6.17.

*Πίνακας 6.17: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου*

<b>TCS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>SD</b>	<b>LOD (µg/ml)</b>	<b>LOQ (µg/ml)</b>
<b>ETC</b>	14,23	15,43	14,15	14,22	13,29	14,17	0,68	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>
<b>EOTC</b>	1,02	1,23	1,65	1,33	1,28	1,58	0,23	<b>0,15</b>	<b>0,44</b>
<b>OTC</b>	19,35	19,77	20,05	19,88	18,35	21,34	0,97	<b>0,03</b>	<b>0,09</b>
<b>TC</b>	17,5	19,5	22,1	19,31	19,7	20,08	1,48	<b>0,06</b>	<b>0,18</b>
<b>DMCTC</b>	12,08	14,67	15,67	14,45	12,25	14,76	1,47	<b>0,08</b>	<b>0,24</b>
<b>ECTC</b>	6,52	7,02	6,53	6,28	7,46	8,12	0,70	<b>0,07</b>	<b>0,20</b>
<b>CTC</b>	6,87	8,89	6,77	7,45	7,93	8,52	0,87	<b>0,08</b>	<b>0,24</b>
<b>DC</b>	9,33	10,07	10,18	9,04	9,55	10,33	0,52	<b>0,04</b>	<b>0,11</b>

Τα όρια ανίχνευσης αλλά και ποσοτικοποίησης στο UV για όλες τις τετρακυκλίνες είναι πολύ χαμηλότερα από τα 0,5 µg/ml, συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο MRL.

### 6.6.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας του συστήματος παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο επιτρεπόμενο όριο (0,5 µg/ml). Το διάλυμα αναλύθηκε έξι φορές και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 6.18.

*Πίνακας 6.18: Επαναληψιμότητα οργάνου*

<b>TCS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Μέσος όρος</b>	<b>SD</b>	<b>%RSD</b>
<b>ETC</b>	32,49	32,91	32,61	33,39	33,09	32,52	32,83	0,36	<b>1,10</b>
<b>EOTC</b>	2,30	2,39	2,43	2,22	2,36	2,49	2,36	0,10	<b>4,03</b>
<b>OTC</b>	50,60	49,56	50,06	49,81	49,96	50,07	50,01	0,35	<b>0,69</b>
<b>TC</b>	42,48	42,60	42,22	42,39	42,62	42,51	42,47	0,15	<b>0,35</b>
<b>DMCTC</b>	28,93	29,20	29,23	29,36	28,69	29,56	29,16	0,31	<b>1,06</b>
<b>ECTC</b>	16,30	16,38	16,41	16,81	16,49	16,88	16,55	0,24	<b>1,45</b>
<b>CTC</b>	18,54	18,30	18,24	18,36	18,22	18,86	18,42	0,25	<b>1,34</b>
<b>DC</b>	22,62	22,68	22,84	22,92	22,56	22,82	22,74	0,14	<b>0,61</b>

Η επαναληψιμότητα του οργάνου κυμαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα αφού οι τιμές της επί τοις εκατό τυπικής απόκλισης είναι χαμηλές.



#### 6.6.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας του χρόνου κατακράτησης κάθε αναλύτη, αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 0,5 µg/ml έξι φορές και υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση από τις τιμές των χρόνων κατακράτησης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.19.

*Πίνακας 6.19: Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης*

<b>TCS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Μέσος όρος</b>	<b>SD</b>	<b>%RSD</b>
<b>ETC</b>	5,29	5,28	5,27	5,27	5,30	5,32	5,29	0,02	<b>0,37</b>
<b>EOTC</b>	5,69	5,68	5,66	5,66	5,71	5,71	5,69	0,02	<b>0,39</b>
<b>OTC</b>	6,10	6,10	6,09	6,09	6,12	6,14	6,11	0,02	<b>0,32</b>
<b>TC</b>	6,89	6,89	6,88	6,88	6,90	6,92	6,89	0,02	<b>0,22</b>
<b>DMCTC</b>	8,48	8,49	8,49	8,49	8,51	8,52	8,50	0,01	<b>0,17</b>
<b>ECTC</b>	8,82	8,83	8,82	8,82	8,84	8,85	8,83	0,01	<b>0,14</b>
<b>CTC</b>	10,43	10,44	10,45	10,44	10,46	10,46	10,45	0,01	<b>0,11</b>
<b>DC</b>	12,32	12,33	12,34	12,34	12,36	12,36	12,34	0,02	<b>0,13</b>

Οι μικρές τιμές των %RSD των χρόνων ανάλυσης στο UV επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα του συστήματος για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών.

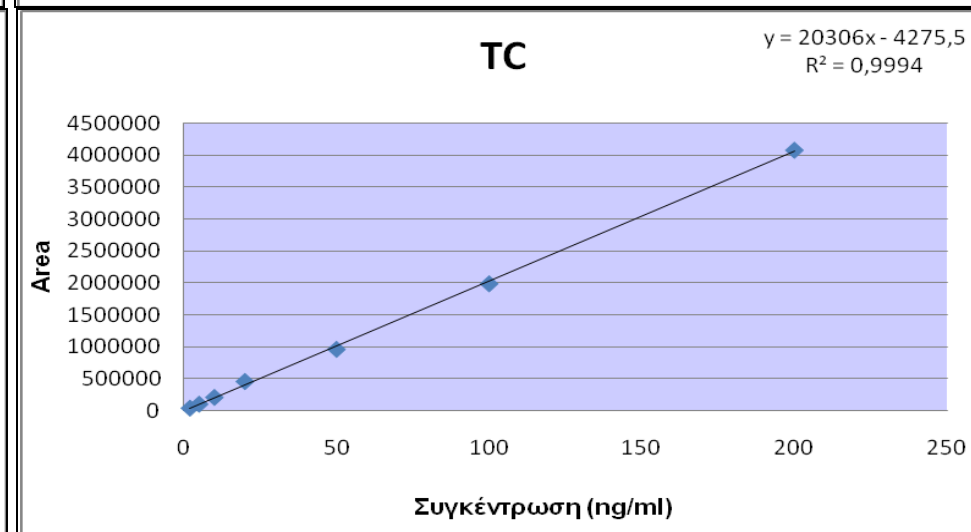
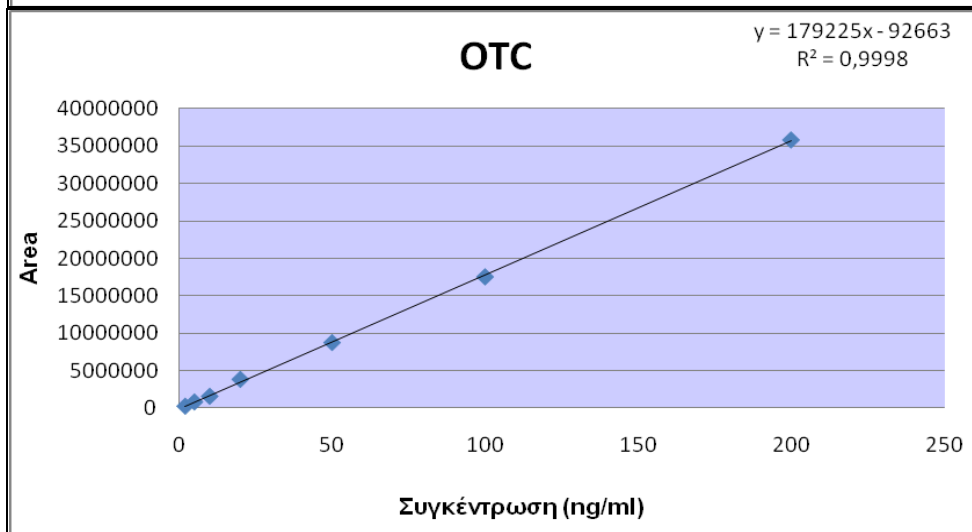
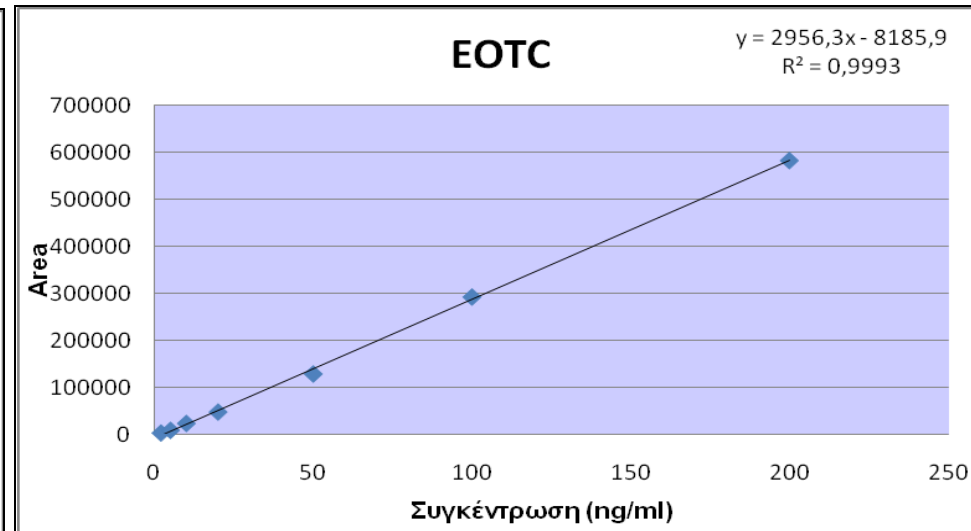
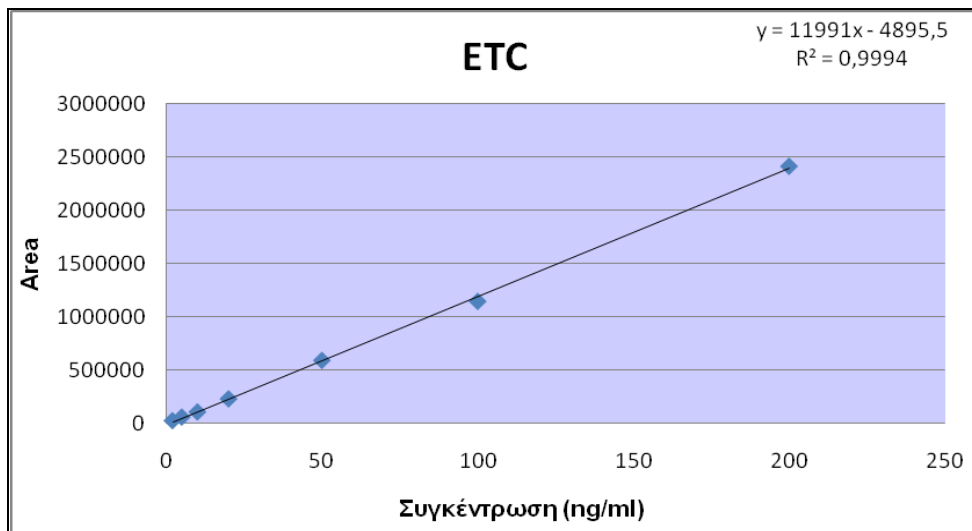
## 6.7 Επικύρωση με πρότυπα διαλύματα στο σύστημα HPLC - MS/MS

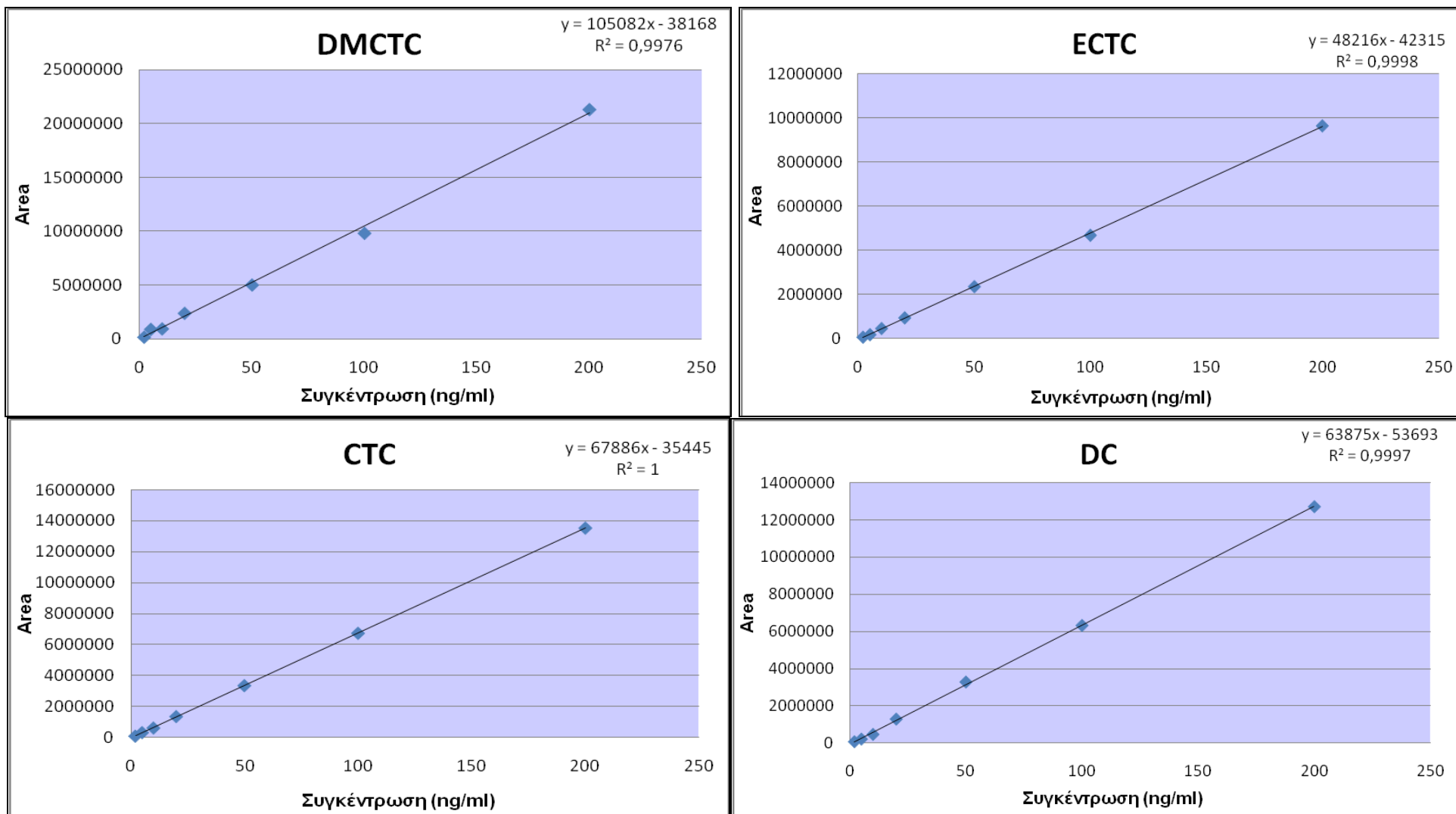
### 6.7.1 Γραμμικότητα-καμπύλη αναφοράς πρότυπων διαλυμάτων

Η γραμμικότητα ελέγχθηκε με τη χρήση πρότυπων διαλυμάτων μείγματος τετρακυκλινών σε συγκεντρώσεις 2,0, 5,0, 10,0 20,0, 50,0, 100 και 200 ng/ml. Τα εμβαδά των κορυφών που χρησιμοποιήθηκαν για τις καμπύλες αναφοράς φαίνονται στον πίνακα 6.20 και η γραφική απεικόνισή τους στο σχήμα 6.8.

*Πίνακας 6.20: Δεδομένα καμπυλών αναφοράς*

<b>C (ng/ml)</b>	<b>ETC</b>	<b>EOTC</b>	<b>OTC</b>	<b>TC</b>	<b>ECTC</b>	<b>CTC</b>	<b>DC</b>	<b>DMCTC</b>
<b>2</b>	31568	2877	254283	37538	71122	88315	75145	133049
<b>5</b>	65243	8436	819617	99240	186564	318608	218548	861974
<b>10</b>	112948	23277	1576428	205919	465331	615826	467542	909699
<b>20</b>	235872	47516	3845929	454631	946708	1356803	1288798	2360710
<b>50</b>	596307	128633	8771282	960023	2360997	3355338	3281673	4995952
<b>100</b>	1149357	292697	17563723	1987989	4687702	6744083	6317392	9807084
<b>200</b>	2414921	583335	35880197	4083126	9644887	13544971	12694605	21331269





Σχήμα 6.8: Καμπύλες αναφοράς των τετρακυκλινών στο σύστημα HPLC – MS/MS

Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης των ευθειών παλινδρόμησης στο σύστημα HPLC-MS/MS για όλες τις τετρακυκλίνες δείχνουν ότι υπάρχει ικανοποιητική συμφωνία με το γραμμικό μοντέλο.

Οι καμπύλες βαθμονόμησης διέρχονται από την αρχή των αξόνων εφόσον:  $t_{\text{πειρ.}} < t_{\text{θεωρ.}}$ , όπου  $t_{\text{θεωρ.}} = 2,571$  για  $\nu = 7 - 2 = 5$  και επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, εκτός από τις περιπτώσεις των EOTC και CTC.

**Πίνακας 6.21:** Έλεγχος διέλευσης καμπυλών αναφοράς από την αρχή των αξόνων

<b>TCS</b>	<b><math>t_{\text{πειρ.}}</math></b>
<b>ETC</b>	0,427
<b>EOTC</b>	2,687
<b>OTC</b>	0,869
<b>TC</b>	0,224
<b>DMCTC</b>	0,189
<b>ECTC</b>	1,759
<b>CTC</b>	3,295
<b>DC</b>	1,207

### 6.7.2 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου

Για τον υπολογισμό των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης του MS/MS πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις πρότυπου διαλύματος μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 2,0 ng/ml. Οι υπολογισμοί πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις εξισώσεις 5.1 και 5.2. Οι λαμβανόμενες τιμές των εμβαδών των κορυφών και τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 6.22 μετά από απόρριψη των έκτροπων τιμών, οι οποίες παρουσιάζονται με κόκκινο χρώμα.

Πίνακας 6.22: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης οργάνου

TCS	1	2	3	4	5	6	SD	LOD (ng/ml)	LOQ (ng/ml)
ETC	33607	25225	31623	30360	18701	31512	3153,49	0,87	2,60
EOTC	5941	2058	2325	505	2823	2930	412,55	0,46	1,38
OTC	247367	255318	247158	260795	250026	253247	5255,74	0,10	0,29
TC	36125	36208	38242	37588	37488	36403	880,37	0,14	0,43
DMCTC	156937	132556	171177	100964	120688	133542	15173,40	0,48	1,43
ECTC	83848	71022	71221	71376	85451	72003	423,87	0,03	0,09
CTC	84492	82891	88108	98842	96256	88521	5168,13	0,25	0,75
DC	79457	74946	77242	71062	76849	75343	2826,26	0,15	0,44

Τα όρια ανίχνευσης αλλά και ποσοτικοποίησης στο σύστημα φασματομετρίας μαζών για όλες τις τετρακυκλίνες είναι πολύ χαμηλότερα από τα 20,0 ng/ml, συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο MRL.

### 6.7.3 Επαναληψιμότητα του οργάνου

Για τον υπολογισμό της επαναληψιμότητας του συστήματος παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών σε συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο μέγιστο επιτρεπόμενο όριο (20,0 ng/ml). Το διάλυμα αναλύθηκε έξι φορές και τα αποτελέσματα δίνονται στον πίνακα 6.23.

*Πίνακας 6.23: Επαναληψιμότητα οργάνου*

TCS	1	2	3	4	5	6	Μέσος όρος	SD	%RSD
ETC	243327	242236	235859	235884	243571	216988	236311	9226,79	<b>3,90</b>
EOTC	48346	47749	47283	43138	49467	46317	47050	1996,06	<b>4,24</b>
OTC	3909955	4003520	3759320	3814785	4002677	3877073	3894555	90146,4	<b>2,31</b>
TC	454325	454936	462887	473480	462834	468879	462890	6887,73	<b>1,49</b>
DMCTC	2185680	2228485	2244255	2252567	2202644	2146907	2210090	36408,1	<b>1,65</b>
ECTC	984689	943714	997229	929140	949702	929253	955621	26298	<b>2,75</b>
CTC	1339979	1315525	1360675	1316305	1352931	1308623	1332340	19948,2	<b>1,50</b>
DC	1292418	1300423	1270195	1285177	1320912	1213643	1280461	33590,7	<b>2,62</b>

Η επαναληψιμότητα του οργάνου κυμαίνεται σε ικανοποιητικά επίπεδα αφού οι τιμές της επί τοις εκατό τυπικής απόκλισης είναι χαμηλές.

#### 6.7.4 Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης

Για τον έλεγχο της επαναληψιμότητας των χρόνων κατακράτησης αναλύθηκε πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών συγκέντρωσης 20,0 ng/ml έξι φορές και υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση από τις τιμές των χρόνων κατακράτησης. Τα αποτελέσματα των μετρήσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 6.24.

*Πίνακας 6.24: Επαναληψιμότητα χρόνων κατακράτησης*

<b>TCS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>Μέσος όρος</b>	<b>SD</b>	<b>%RSD</b>
<b>ETC</b>	6,42	6,32	6,33	6,42	6,42	6,42	6,39	0,04	0,70
<b>EOTC</b>	6,56	6,45	6,51	6,56	6,56	6,59	6,54	0,05	0,70
<b>OTC</b>	6,82	6,70	6,74	6,83	6,81	6,85	6,79	0,05	0,79
<b>TC</b>	7,34	7,22	7,29	7,36	7,34	7,39	7,32	0,05	0,75
<b>DMCTC</b>	8,41	8,28	8,35	8,43	8,42	8,45	8,39	0,06	0,69
<b>ECTC</b>	8,66	8,52	8,60	8,68	8,67	8,68	8,64	0,06	0,67
<b>CTC</b>	9,68	9,53	9,65	9,70	9,70	9,70	9,66	0,06	0,63
<b>DC</b>	10,80	10,66	10,77	10,82	10,82	10,82	10,78	0,06	0,53

Οι μικρές τιμές των %RSD των χρόνων ανάλυσης στο σύστημα LC-MS/MS επιβεβαιώνουν την καταλληλότητα του συστήματος για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών.



## 6.8 Επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού τετρακυκλινών σε ιστό ψαριού με εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (dSPE)

### 6.8.1 Υπολογισμός μέσης και ολικής ανάκτησης

Η μέση και η ολική ανάκτηση υπολογίστηκαν για την εκτίμηση της ορθότητας, εφόσον δεν υπήρχαν πιστοποιημένα υλικά αναφοράς.

Για τον υπολογισμό των μέσων ανακτήσεων πραγματοποιήθηκαν έξι μετρήσεις εμβολιασμένων δειγμάτων ιστού ψαριού σε επίπεδα συγκέντρωσης 10,0, 100 και 1000 ng/g και έξι μετρήσεις πρότυπου διαλύματος αντίστοιχης συγκέντρωσης για κάθε επίπεδο (2,0, 20,0 και 200 ng/ml). Η μέση ανάκτηση για κάθε τετρακυκλίνη υπολογίστηκε σύμφωνα με τη σχέση 5.7 και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 6.25:** Μέσες ανακτήσεις τετρακυκλινών σε χαμηλό (10,0 ng/g), μεσαίο (100 ng/g) και υψηλό (1000 ng/g) επίπεδο συγκέντρωσης

TCS	10,0 ng/g			100 ng/g			1000 ng/g		
	spike	std	%R	spike	std	%R	spike	std	%R
<b>ETC</b>	28829	31424	<b>91,7</b>	224256	236311	<b>94,9</b>	2312253	2414921	<b>95,7</b>
<b>EOTC</b>	2046	2312	<b>88,5</b>	38130	47050	<b>81,0</b>	482307	583335	<b>82,7</b>
<b>OTC</b>	146759	250652	<b>58,6</b>	2599038	3894555	<b>66,7</b>	24140356	35880197	<b>67,3</b>
<b>TC</b>	35052	36342	<b>96,4</b>	411963	457890	<b>90,0</b>	3980755	4083126	<b>97,5</b>
<b>DMCTC</b>				1108260	2205090	<b>50,3</b>			
<b>ECTC</b>	57353	72576	<b>79,0</b>	834653	955621	<b>87,3</b>	8503929	9644887	<b>88,2</b>
<b>CTC</b>	60855	86716	<b>70,2</b>	1008757	1340673	<b>75,2</b>	10488730	13544971	<b>77,4</b>
<b>DC</b>	34211	75650	<b>45,2</b>	565629	1280461	<b>44,2</b>	5835446	12694605	<b>46,0</b>

Οι μέσες ανακτήσεις για τις τετρακυκλίνες και τα επιμερή τους κρίνονται ικανοποιητικές, αφού είναι σε κάθε περίπτωση μεγαλύτερες από 50%, εκτός από την δοξυκυκλίνη (DC) όπου παρατηρείται ανάκτηση της τάξης του 45%. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούμε το εσωτερικό πρότυπο (DMCTC) για την ποσοτικοποίηση της. Η ανάκτηση της DC με χρήση εσωτερικού προτύπου είναι **87,9%** για το χαμηλό επίπεδο και **90%** για το μεσαίο και το υψηλό επίπεδο.

Για τον υπολογισμό της ολικής ανάκτησης χρησιμοποιήθηκαν η καμπύλη αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων και η καμπύλη εμβολιασμένων δειγμάτων για κάθε τετρακυκλίνη. Η ολική ανάκτηση υπολογίστηκε σύμφωνα με την εξίσωση 5.8 από τις κλίσεις των αντίστοιχων εξισώσεων. Συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.26.

**Πίνακας 6.26:** Συγκεντρωτικός πίνακας ανακτήσεων

TCs	Μέσες ανακτήσεις			Ολικές ανακτήσεις
	10,0 ng/g (χαμηλό επίπεδο)	100 ng/g (μεσαίο επίπεδο)	1000 ng/g (υψηλό επίπεδο)	
ETC	91,7	94,9	95,7	96,0
EOTC	88,5	81,0	82,7	82,7
OTC	58,6	66,7	67,3	66,9
TC	96,4	90,0	97,5	97,6
ECTC	79,0	87,3	88,2	88,4
CTC	70,2	75,2	77,4	77,0
DC	89,7	90,0	90,0	90,7

## 6.8.2 Καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων

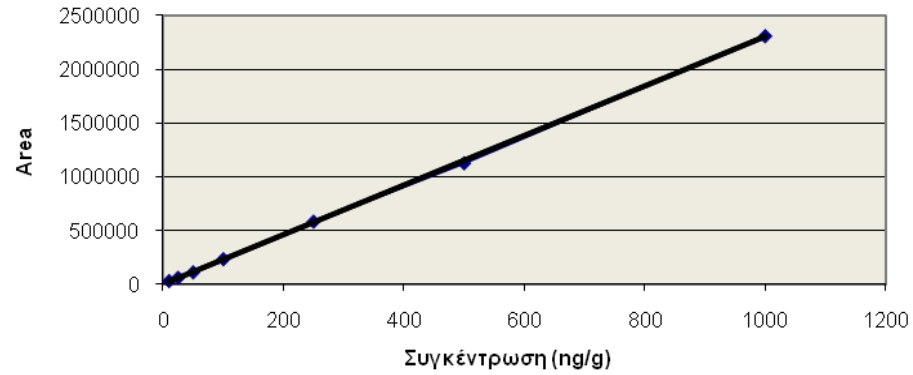
Επτά λευκά δείγματα ιστού ψαριού του ενός γραμμαρίου εμβολιάστηκαν με πρότυπα διαλύματα μείγματος τετρακυκλινών σε επίπεδα συγκέντρωσης 10,0, 25,0, 50,0, 100, 250, 500 και 1000 ng/g και αναλύθηκαν σύμφωνα με την πορεία που περιγράφεται στο εδάφιο 5.4.3. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.27 και οι καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων στο σχήμα 6.9.

*Πίνακας 6.27: Δεδομένα καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων*

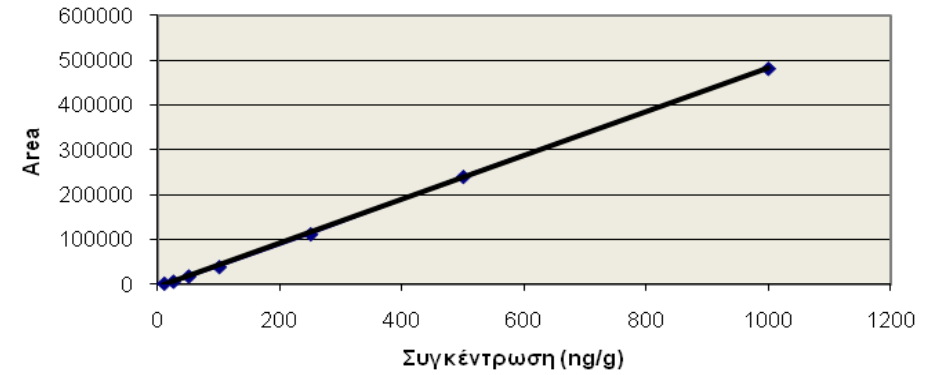
<b>C (ng/g)</b>	<b>ETC</b>	<b>EOTC</b>	<b>OTC</b>	<b>TC</b>	<b>ECTC</b>	<b>CTC</b>	<b>DC</b>
<b>10</b>	28579	1948	148380	35115	57766	60081	32989
<b>25</b>	59327	6437	479048	96549	142378	268315	98572
<b>50</b>	109983	18132	897315	190388	392046	532779	202854
<b>100</b>	232840	39025	2696841	413964	842137	1092644	564337
<b>250</b>	582761	112309	5378211	952123	2081370	2579022	1368431
<b>500</b>	1127340	240554	11035798	1920748	4172669	5132790	2685029
<b>1000</b>	2312253	482307	24140356	3980755	8503929	10488730	5835446

**ETC**

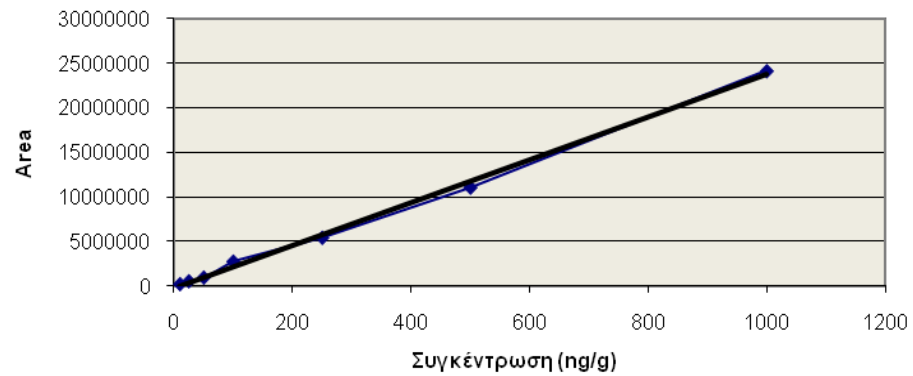
$$y = 2302,9x - 429,3$$
$$R^2 = 0,9998$$

**EOTC**

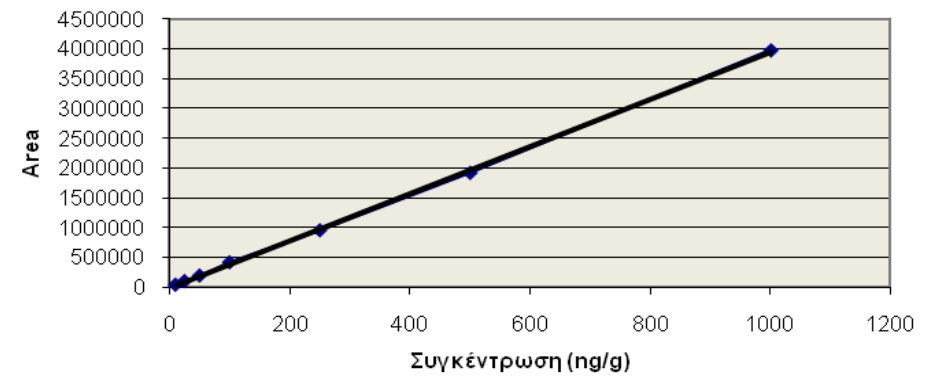
$$y = 488,94x - 6482,8$$
$$R^2 = 0,9998$$

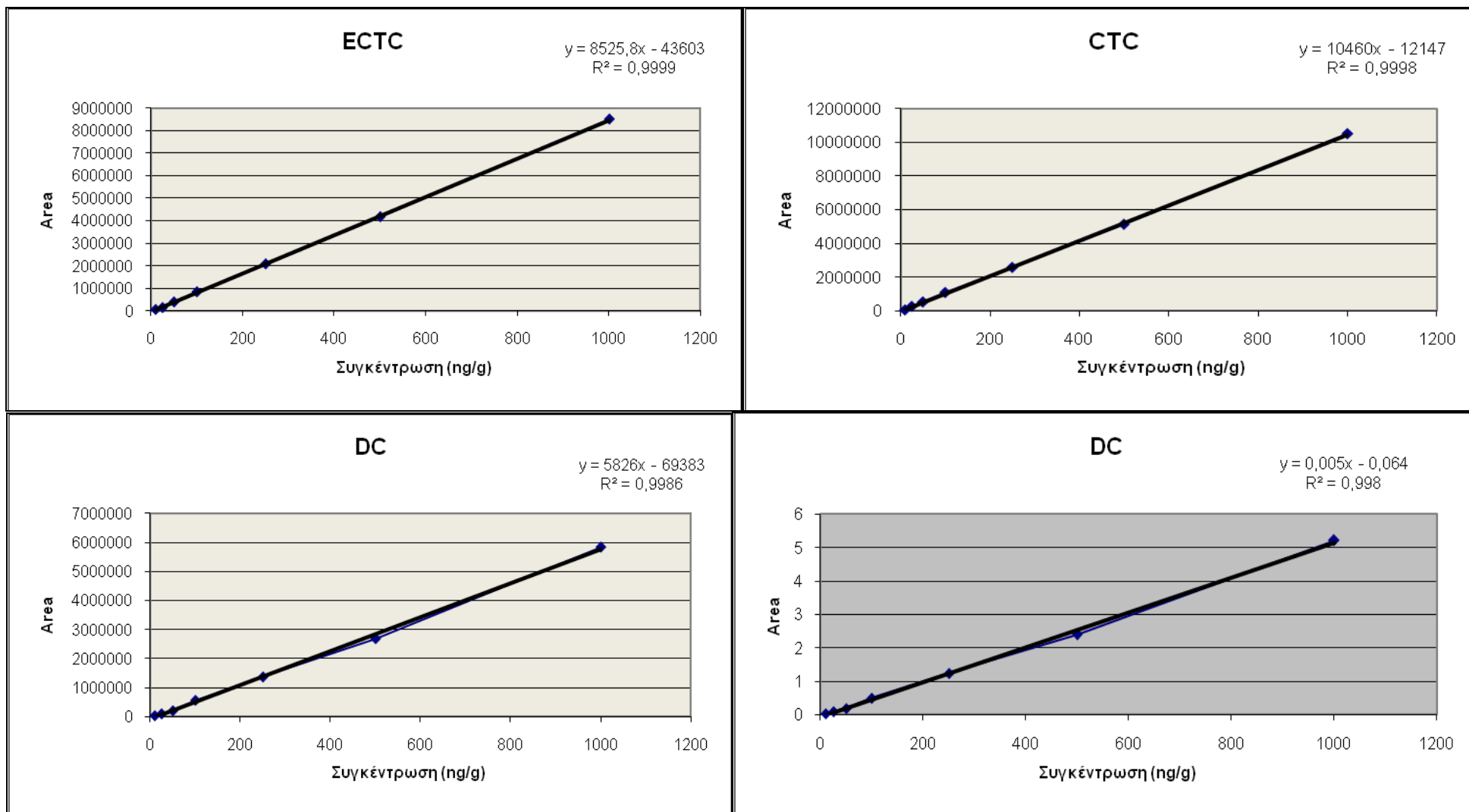
**OTC**

$$y = 23966x - 228427$$
$$R^2 = 0,9975$$

**TC**

$$y = 3964x - 11519$$
$$R^2 = 0,9996$$





Σχήμα 6.9: Καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων των τετρακυκλινών στο σύστημα HPLC – MS/MS

Οι τιμές των συντελεστών συσχέτισης των ευθειών παλινδρόμησης δείχνουν ότι υπάρχει ικανοποιητική συμφωνία με το γραμμικό μοντέλο.

Οι καμπύλες εμβολιασμένων δειγμάτων διέρχονται από την αρχή των αξόνων εφόσον:  $t_{\text{πειρ.}} < t_{\text{θεωρ.}}$  όπου  $t_{\text{θεωρ.}} = 2,571$  για  $n = 7 - 2 = 5$  και επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, εκτός από τις περιπτώσεις των ΕΟΤC και ΕCΤC.

**Πίνακας 6.28:** Έλεγχος διέλευσης καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων από την αρχή των αξόνων

<b>TCS</b>	<b><math>t_{\text{πειρ.}}</math></b>
<b>ETC</b>	0,070
<b>ΕΟΤC</b>	4,518
<b>ΟΤC</b>	0,977
<b>ΤC</b>	0,744
<b>ΕCΤC</b>	2,854
<b>CTC</b>	0,456
<b>DC</b>	1,645
<b>DC</b> (με χρήση εσωτερικού προτύπου)	1,724

### 6.8.3 Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου

Για την εύρεση των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου αναλύθηκαν έξι δείγματα ιστού ψαριού τα οποία εμβολιάστηκαν με πρότυπο διάλυμα μείγματος τετρακυκλινών σε συγκέντρωση 10,0 ng/g. Μετά τη χρωματογραφική τους ανάλυση υπολογίσθηκαν οι τυπικές αποκλίσεις των εμβαδών των κορυφών των τετρακυκλινών και με χρήση των εξισώσεων 5.5 και 5.6 καθώς και των κλίσεων των καμπυλών γνωστών προσθηκών υπολογίσθηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης της μεθόδου για κάθε τετρακυκλίνη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.29.

*Πίνακας 6.29: Όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεθόδου*

<b>TCS</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>SD</b>	<b>LOD (ng/g)</b>	<b>LOQ (ng/g)</b>
<b>ETC</b>	29362	29044	28432	29715	28935	27487	785,51	<b>1,13</b>	<b>3,38</b>
<b>EOTC</b>	1938	2047	2155	1870	1910	2355	183,57	<b>1,24</b>	<b>3,72</b>
<b>OTC</b>	144372	148759	143220	148082	148774	147345	2382,28	<b>0,33</b>	<b>0,98</b>
<b>TC</b>	35153	34948	34868	35389	35246	34708	254,72	<b>0,21</b>	<b>0,64</b>
<b>ECTC</b>	58742	58821	58035	56443	58799	56911	1045,38	<b>0,33</b>	<b>0,98</b>
<b>CTC</b>	56340	58075	56297	57366	58148	57890	846,54	<b>0,29</b>	<b>0,88</b>
<b>DC</b>	60185	59934	60890	60286	62385	61452	929,46	<b>0,51</b>	<b>1,52</b>

#### 6.8.4 Επαναληψιμότητα και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα της μεθόδου

Όσον αφορά την επαναληψιμότητα πραγματοποιήθηκαν τέσσερις αναλύσεις εμβολιασμένων δειγμάτων σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/g. Υπολογίστηκαν η τυπική απόκλιση ( $SD_r$ ) και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD<sub>r</sub>) για κάθε τετρακυκλίνη υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.30.

**Πίνακας 6.30:** Επαναληψιμότητα της μεθόδου στο MRL (100 ng/g)

<b>TCs</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Μέσος όρος</b>	<b>SD<sub>r</sub></b>	<b>%RSD<sub>r</sub></b>
<b>ETC</b>	233542	232907	229763	200812	224256	15716,42	<b>7,01</b>
<b>EOTC</b>	37522	36043	39198	39756	38129	1684,21	<b>4,42</b>
<b>OTC</b>	2648075	2758334	2772069	2217673	2599038	260229,92	<b>10,0</b>
<b>TC</b>	403351	408927	412518	423056	411963	8301,54	<b>2,02</b>
<b>DMCTC</b>	1124842	1080713	1125254	1102231	1108260	21283,36	<b>1,92</b>
<b>ECTC</b>	853207	792276	847899	845230	834653	28445,21	<b>3,41</b>
<b>CTC</b>	1037560	998352	992774	1006342	1008757	19993,04	<b>1,98</b>
<b>DC</b>	535572	582344	592770	551831	565629	26519,38	<b>4,69</b>

Για την εύρεση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγισιμότητας αναλύθηκαν τέσσερα εμβολιασμένα δείγματα σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/g. Υπολογίστηκαν και εδώ ο μέσος όρος των εμβαδών των κορυφών, η τυπική απόκλιση ( $SD_L$ ) καθώς και η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD<sub>L</sub>) για κάθε τετρακυκλίνη και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα 6.31.



**Πίνακας 6.31:** Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγισιμότητα της μεθόδου στο MRL (100 ng/g)

<b>TCs</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>Μέσος όρος</b>	<b>SD<sub>L</sub></b>	<b>%RSD<sub>L</sub></b>
<b>ETC</b>	230840	220036	292118	232270	243816	32661,18	<b>13,4</b>
<b>EOTC</b>	39042	38485	37866	33013	37101	2767,66	<b>7,46</b>
<b>OTC</b>	2844371	2208432	2639755	2650205	2585691	268529,74	<b>10,4</b>
<b>TC</b>	411376	402227	430469	417652	415431	11858,37	<b>2,85</b>
<b>DMCTC</b>	1072439	1138242	1037720	1154807	1100802	55082,04	<b>5,00</b>
<b>ECTC</b>	870945	834221	805689	859843	842674	29059,52	<b>3,45</b>
<b>CTC</b>	978715	1022336	988048	967379	989119	23702,23	<b>2,40</b>
<b>DC</b>	589893	542203	530762	535894	549688	27208,67	<b>4,95</b>

Η επίδραση των τυχαίων σφαλμάτων είναι εντονότερη στα πειράματα αναπαραγωγισιμότητας διότι διεξάγονται σε διαφορετικές μέρες, σε αντίθεση με τα πειράματα επαναληψιμότητας τα οποία ολοκληρώνονται σε μια εργαστηριακή μέρα.

## 6.9 Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία έγινε αρχικά προσπάθεια διαχωρισμού των τετρακυκλινών με τα αντίστοιχα επιμερή τους στο σύστημα HPLC-UV, ο οποίος επετεύχθη μέσω βελτιστοποίησης διαφόρων χρωματογραφικών συνθηκών όπως σύσταση, pH και ταχύτητα ροής κινητής φάσης, είδος στατικής φάσης και κατάλληλο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης. Συγκεκριμένα οι χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν ως καταλληλότερες ήταν: στήλη Xterra C18 (3,5  $\mu\text{m}$ , 2,1x100 mm), σύσταση κινητής φάσης A: ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (60:40) – B: διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2) και ταχύτητα ροής 0,4 ml/min.

Στη συνέχεια έγινε βελτιστοποίηση ως προς τον καθαρισμό του αρχικού εκχυλίσματος για την απομόνωση των τετρακυκλινών από τον ιστό ψαριού κατά την προκατεργασία του δείγματος. Έγινε δοκιμή διαφόρων μεθόδων όπως SPE, dSPE και dSPE-LLE. Στην περίπτωση της SPE ενώ αποτελεί μία πολύ καλή μέθοδο προσυγκέντρωσης, εμφανίστηκαν παρεμποδίσεις, συνεπώς ο καθαρισμός του εκχυλίσματος ήταν ελλιπής. Όσον αφορά την dSPE, ενώ δεν υπήρχαν παρεμποδίζουσες ουσίες στο χρωματογράφημα ήταν απαραίτητη η εφαρμογή της σε συνδυασμό με μια μέθοδο προσυγκέντρωσης όπως SPE ή LLE. Στην πρώτη περίπτωση ήταν μεγάλες οι απώλειες των αναλυτών (χαμηλές ανακτήσεις) λόγω ύπαρξης δύο σταδίων καθαρισμού, ενώ στην δεύτερη περίπτωση δεν επετεύχθη εκχύλιση όλων των τετρακυκλινών και των επιμερών τους. Λόγω όλων των παραπάνω παραγόντων, η μέθοδος δεν μπόρεσε να αναπτυχθεί στο σύστημα HPLC-UV και μεταφέρθηκε στο σύστημα LC-MS/MS.

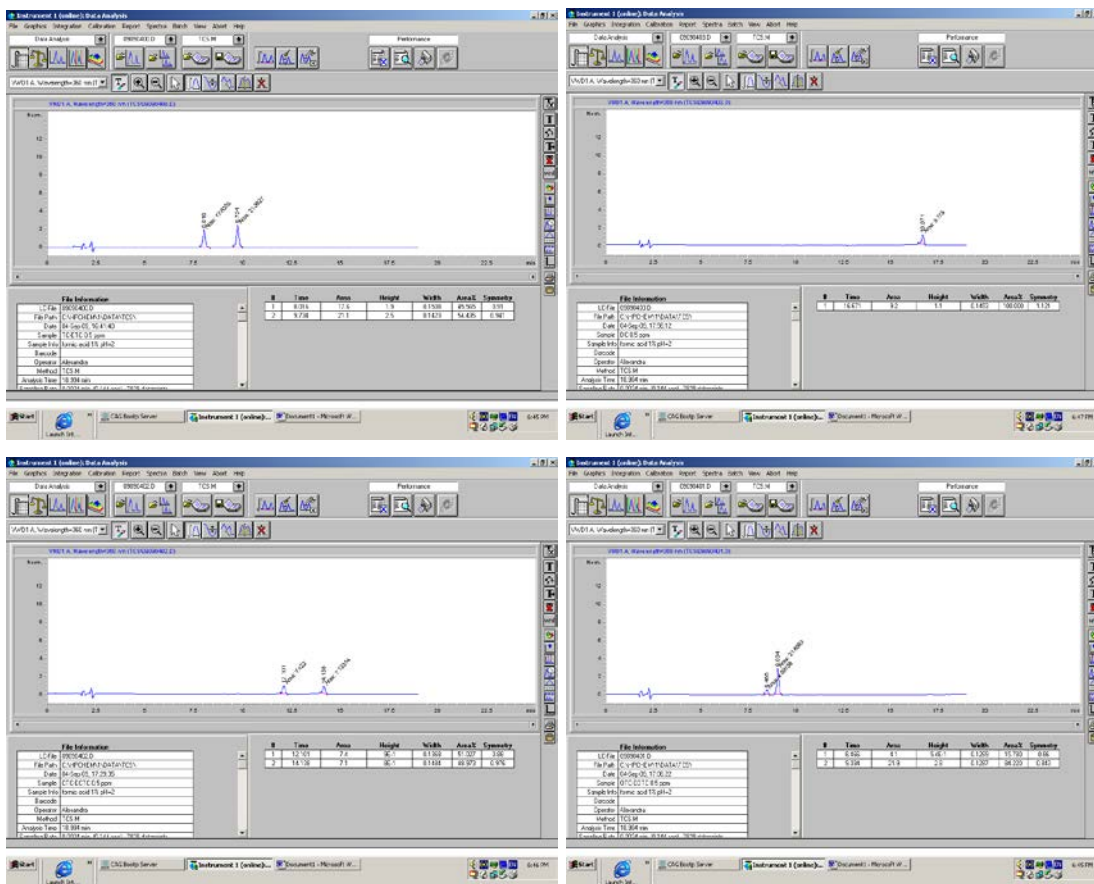
Στο σύστημα LC-MS/MS διατηρήθηκαν οι ίδιες χρωματογραφικές συνθήκες με μια μικρή μεταβολή στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης και στην ταχύτητα ροής της κινητής φάσης. Λόγω μεγαλύτερης ευαισθησίας του ανιχνευτή φασματομετρίας μαζών, ο καθαρισμός του εκχυλίσματος έγινε μόνο με χρήση dSPE και απευθείας έγχυση στο σύστημα LC-MS/MS, με αποτέλεσμα να αναπτυχθεί μία μέθοδος προσδιορισμού των τετρακυκλινών και των επιμερών τους αρκετά σύντομη και απλή.

Η μέθοδος επικυρώθηκε και οι παράμετροι που εκτιμήθηκαν ήταν η γραμμικότητα, η πιστότητα (ανακτήσεις > 66,9%), η ακρίβεια ( $RSD_R < 15\%$ )

και τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης τόσο του οργάνου όσο και της μεθόδου (LOD: 0,03 – 1,24 ng/g και LOQ: 0,09 – 3,72 ng/g). Η ποσοτικοποίηση γίνεται με την χρήση καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων και στην περίπτωση της DC, λόγω της χαμηλής ανάκτησης (45,0%), η ποσοτικοποίηση γίνεται με την χρήση καμπυλών εμβολιασμένων δειγμάτων και χρήση εσωτερικού προτύπου.

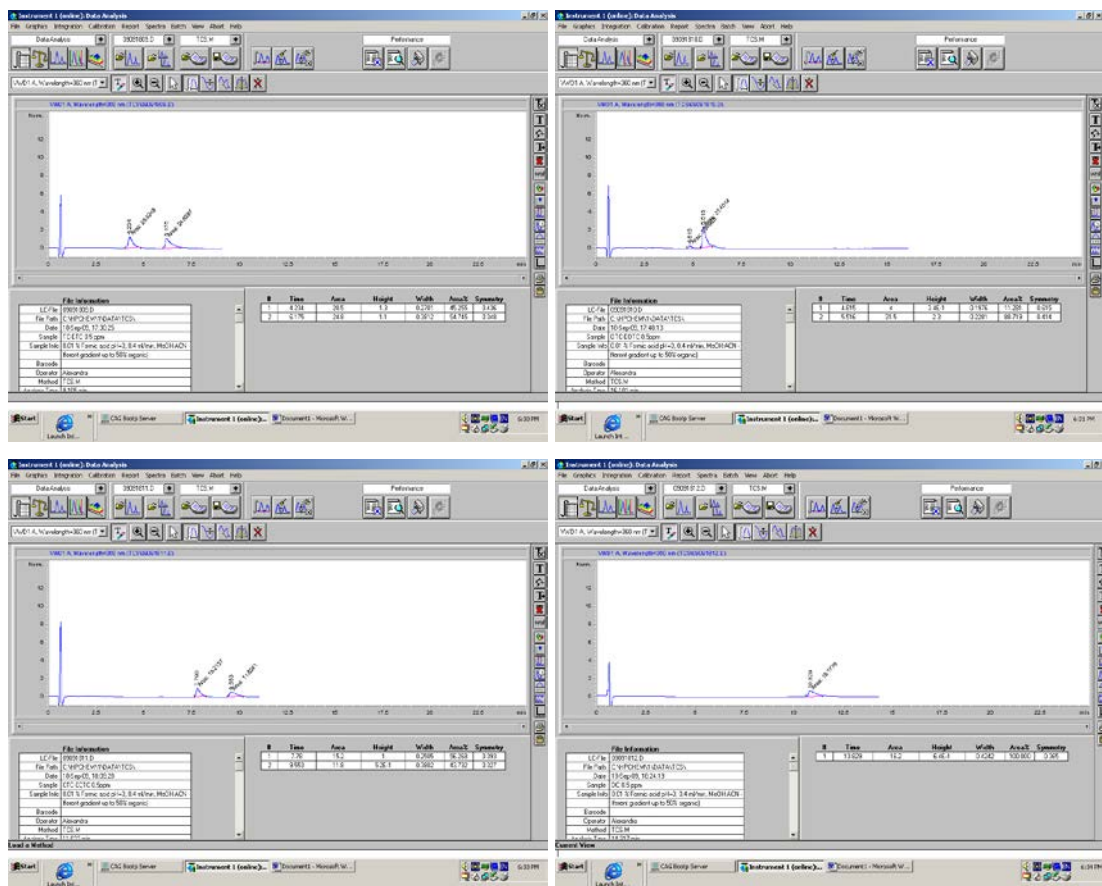
# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: 1

- Χρωματογραφήματα τετρακυκλινών και των επιμερών τους σε ζεύγη για τη στήλη Symmetry 3,9x150mm/5μm/ C<sub>18</sub> της εταιρείας Waters συνδεδεμένη με προστήλη Waters Symmetry C18 στις παρακάτω συνθήκες:
  - Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (50:50) / διάλυμα φορμικού οξέος 1% v/v (pH 2) με βαθμιδωτή έκλυση σύμφωνα με τον πίνακα 6.8.
  - Ροή: 0,8 ml/min



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ: 2

- Χρωματογραφήματα τετρακυκλινών και των επιμερών τους σε ζεύγη για τη στήλη Ascentis 2,1x75mm/2,7μm/ C<sub>18</sub> της εταιρείας Supelco συνδεδεμένη με προσθήκη στις παρακάτω συνθήκες:
  - Κινητή φάση: ακετονιτρίλιο:μεθανόλη (60:40) / διάλυμα φορμικού οξέος 0,1% v/v (pH 3) με βαθμιδωτή έκλουση σύμφωνα με τον πίνακα 6.8.
  - Ροή: 0,4 ml/min



## Βιβλιογραφία:

- [1]. Oka, H., Ito, Y. and Matsumoto, H., J. Chromatogr. A., 2000, **882**, 109 – 113.
- [2]. Cinquina, A.L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L. and Cozzani, R., J. Chromatogr. A., 2003, **987**, 227 – 233.
- [3]. [http://en.wikipedia.org/wiki/Tetracycline\\_antibiotics](http://en.wikipedia.org/wiki/Tetracycline_antibiotics) (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [4]. <http://en.wikipedia.org/wiki/Antibiotics> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [5]. Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., Φαρμακολογία, εκδ. Παρισιανού, 2<sup>η</sup> έκδοση, Αθήνα, 1997.
- [6]. <http://www.drugdevelopment-technology.com/projects/tygacil/tygacil1.html> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [7]. <http://www.resourcing.uk.com/cpd/medicines/classes-of-antibiotics.aspx> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [8]. Lock, C.M., Chen, L. and Volmer, D.A., Rapid Commun. Mass Spectrom., 1999, **13**, 1744 – 1754.
- [9]. Durckheimer, W., Ang. Chemie, 1975, **14**, 721 – 774.
- [10]. Ahmed, B.M. and Jee, R.D., Anal. Chim. Acta, 1984, **166**, 329 – 333.
- [11]. Anderson, C.R., Rupp, H.S. and Wu, W., J. Chromatogr. A., 2005, **1075**, 23 – 32.
- [12]. Fedeniuk, R.W. and Shand, P.J., J. Chromatogr. A., 2004, **1022**, 125 – 129.
- [13]. Martinez, E. and Shimoda, W., J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1989, **72**, 848 – 850.
- [14]. Kuhne, M., Hamscher, G., Korner, U., Shedl, D. and Wenzel, S., Food Chem., 2001, **75**, 423 – 429.
- [15]. Sorensen, B.H., Sengelov, G. and Tjornelund, J., Arch. Environ. Contam. Toxicol., 2002, **42**, 263 – 271.
- [16]. <http://www.drugs.com/pro/tetracycline.html> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [17]. <http://www.fedesa.com> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [18]. Ruyck, H., Ridder, H., Renterghem, R.V. and Wambeke, F.V., Food Add. Contam., 1999, **16**, 47 – 56.

- [19]. Debuf, Y.E., The Veterinary Formulary, Pharmaceutical Press, London, 1998, 97.
- [20]. <http://www.chm.bris.ac.uk/> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [21]. Chopra, I. and Roberts, M., Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2001, **65**, 232 – 260.
- [22]. <http://student.ccbcmd.edu/courses/bio141/lecguide/unit2/control/tetres.html> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [23]. Nathwani, D., Int. J. of Ant. Agents, 2005, **25**, 185 – 192.
- [24]. [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tigecycline\\_structure.svg](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Tigecycline_structure.svg) (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [25]. <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v36je06.htm> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [26]. [http://en.wikipedia.org/wiki/Fanconi\\_syndrome](http://en.wikipedia.org/wiki/Fanconi_syndrome) (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [27]. Diaz – Cruz, M.S., Lopez de Alda, M.J. and Barcelo, D., TrAC – Trends Anal. Chem., 2003, **22**, 340 – 351.
- [28]. Schneider, J., Quimica Anal., 1994, **1**, 34 – 42.
- [29]. Arnold, D., Ann. Resh. Vet., 1990, **21**, 103 – 105.
- [30]. Reilly, A. and Kaferstein, F., Aqua. Res., 1997, **28**, 735 – 752.
- [31]. Ιωσηφίδου, Ε.Γ. και Ψωμάς, Ι.Ε., Προσέγγιση στο πρόβλημα των καταλοίπων των κτηνιατρικών φαρμάκων στους ιχθύς των εκτροφών, Ελληνική πραγματικότητα, Δελτίο της Ελληνικής Κτηνιατρικής Εταιρείας, 1996, **47**, 19 – 25.
- [32]. McEvoy, J.D.G., Anal. Chim. Acta, 2002, **473**, 3 – 26.
- [33]. 524/70/EC. Council Directive of 23 November 1970 concerning additives in feeding – stuffs, Brussels, Belgium, Off. J. Eur. Commun., 1970, L270, 1 – 17.
- [34]. 96/23/EC. Council Directive of 29 April 1996 on measures to monitor certain substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC, Off. J. Eur. Commun., 1996, L125, 10 – 32.
- [35]. Stolker, A. and Brinkman, U., J. Chromatogr. A., 2005, **1067**, 15 – 23.

- [36]. 2001/82/EC. 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, Off. J. Eur. Commun., 2001, L311, 1-66.
- [37]. 2377/90/EC. Council Regulation of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in food stuffs of animal origin, Off. J. Eur. Commun., 1990, L224, 1 – 124.
- [38]. 657/2002/EC. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, Off. J. Eur. Commun., 2002, L221, 8 – 36.
- [39]. Χατζηγιάννου, Θ. και Κουππάρης, Μ., Ενόργανη Ανάλυση, Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, 1997.
- [40]. <http://services.leatherheadfood.com/mycotoxins/item.asp?sectionid=3&mytype=training&number=2&fsid=61> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [41]. [http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other\\_images/DiisQuE.jpg](http://www.waters.com/webassets/cms/category/media/other_images/DiisQuE.jpg) (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [42]. <http://www.quechers.com> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [43]. <http://www.restek.com> (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [44]. [www.wikipedia.org/wiki/HPLC](http://www.wikipedia.org/wiki/HPLC) (τελευταία επίσκεψη 15/7/11).
- [45]. Skoog, Holler and Nieman, Μεταφραστική ομάδα: Καραγιάννης, Μ., Ευσταθίου, Κ. και Χανιωτάκης, Ν., Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης, 5<sup>η</sup> έκδοση, Κωσταράκης, 2002, 844-869.
- [46]. Αρχοντάκη, Ε., Σημειώσεις «Χημεία της στατικής φάσης και εξέλιξη των στηλών στην Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης», Αθήνα, 2003.
- [47]. Αρχοντάκη, Ε., Σημειώσεις «Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης», Αθήνα, 2003.
- [48]. Θωμαΐδης, Ν., Σημειώσεις «Φασματομετρία μαζών», Αθήνα 2009.
- [49]. Oka, H., Ikai, Y., Ito, Y., Hayakawa, J., Harada, K., Suzuki, M., Odani, H. and Maeda, K., J. Chromatogr., 1997, **693**, 337 – 344.
- [50]. Nakazawa, H., Ino, S., Kato, K., Watanabe, T., Ito, Y. and Oka, H., J. of Chrom., 1999, **732**, 55 – 64.
- [51]. Eeckhoyt, N.V., Perez, J.C., Claereboudt, J., Vandeputte, R. and Peteghem, C.V., Rapid Commun. Mass Spectrom., 2000, **14**, 280 – 285.



- [52]. Andersen, W.C., Roybal, J.E., Gonzales, S.A., Turnipseed, S.B., Pfenning, A.P. and Kuck, L.R., J. Anal. Chim. Acta, 2005, **529**, 145 – 150.
- [53]. Cherlet, M., Schelkens, M., Croubels, S. and Backer, P.D., J. Anal. Chim. Acta, 2003, **492**, 199 - 213.
- [54]. Ruyck, H.D. and Ridder, H.D., Rapid Commun. Mass Spectrom., 2007, **21**, 1511 – 1520.
- [55]. Wen, Y., Wang, Y. and Feng, Y.Q., Talanta, 2006, **70**, 153 – 159.
- [56]. Zhenfeng, Y., Yueming, Q., Xiuyun, L. and Caini, J., Chin. J. Anal. Chem., 2006, **34**, 1255 – 1259.
- [57]. Dasenaki, M., Thomaidis, N., J. Anal. Chim. Acta, 2009, **672**, 93 – 102.
- [58]. Σπαγγούρου, Δ., Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού καταλοίπων τετρακυκλινών σε ιστούς ψαριών με υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης και ανιχνευτή υπεριώδους – ορατού (HPLC/UV), Ερευνητική εργασία διπλώματος ειδίκευσης, ΕΚΠΑ, Αθήνα, 2007.
- [59]. Anderson, C.R., Rupp, H.S. and Wu, W., J. of Chrom., 2005, **1075**, 23-32.
- [60]. Κουππάρης, Μ.Α., Σημειώσεις «Επικύρωση Αναλυτικών Μεθόδων», Αθήνα, 2003.