



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΗPLC-DAD ΓΙΑ
ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΞΙ
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΣ
ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ**

**ΚΕΧΑΓΙΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017



**ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



**ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΔΙΔΡΥΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ – ΕΛΕΓΧΟΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ»**

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-DAD ΓΙΑ
ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΞΙ
ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ
ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΣ
ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ**

**ΚΕΧΑΓΙΑ ΜΑΡΙΑ
ΧΗΜΙΚΟΣ Α.Π.Θ.**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-DAD ΓΙΑ ΤΟΝ
ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΞΙ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ ΣΕ
ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ
ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΑΚΩΣ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΟΥ
ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ

Κεχαγιά Μαρία
Χημικός Α.Π.Θ.

Β. Φ. Σαμανίδου, Καθηγήτρια
Επιβλέπουσα

Μέλη τριμελούς επιτροπής:

Ι. Παπαδογιάννης, Καθηγητής

Β. Σαμανίδου, Καθηγήτρια

Γ. Θεοδωρίδης, Καθηγητής

Θεσσαλονίκη, 2017

Πρόλογος

Το γάλα είναι μία σπουδαία τροφή για τον άνθρωπο, είναι η πρώτη τροφή που λαμβάνει κατά τη γέννησή του, από την ίδια τη μητέρα (μητρικό γάλα), αλλά και μέσω συσκευασμένων μορφών (σκόνη γάλακτος, συμπυκνωμένο γάλα, φρέσκο γάλα). Θεωρείται τροφή υψηλής θρεπτικής αξίας, χάρη στις πρωτεΐνες, τα μέταλλα και τις βιταμίνες που περιέχει.

Το γάλα λοιπόν, είναι ένα από τα σημαντικά προϊόντα μίας κτηνοτροφικής παραγωγικής μονάδας. Στις κτηνοτροφικές μονάδες από τα μέσα της δεκαετίας του '50 άρχισε η χορήγηση αντιβιοτικών σκευασμάτων που αποσκοπούσε στην πρόληψη και στη θεραπεία των μολύνσεων των ζώων. Ακόμη, η προσθήκη αντιβιοτικών στις ζωοτροφές ήταν και είναι ένα σύνηθες φαινόμενο που στοχεύει στην αύξηση του προβλεπόμενου σωματικού βάρους του ζώου και στη γρήγορη ανάπτυξή του. Στα ζώα χορηγούνται ίδιες ομάδες αντιβιοτικών με αυτές που προορίζονται και για θεραπεία στον άνθρωπο, όπως, β-λακτάμες, κινολόνες, τετρακυκλίνες, κεφαλοσπορίνες και σουλφοναμίδια.

Από τη χορήγηση αντιβιοτικών στα ζώα είναι εμφανές ότι μέσω της κατανάλωσης γάλακτος, ο ανθρώπινος οργανισμός μπορεί να είναι ο τελικός αποδέκτης των αντιβιοτικών αυτών. Κάτι το οποίο δεν είναι θεμιτό να συμβαίνει δεδομένου ότι από τη συσσώρευση αντιβιοτικών μέσω της τροφής ενισχύεται η ανοχή του ανθρώπινου οργανισμού στα διάφορα φαρμακευτικά σκευάσματα. Για αυτό το λόγο η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία έχει ορίσει ανώτατα επιτρεπτά όρια των διάφορων κατηγοριών αντιβιοτικών στο γάλα. Επομένως, είναι απαραίτητο να αναπτύσσονται μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αντιβιοτικών στο γάλα, οι οποίες στη συνέχεια επικυρώνονται σύμφωνα με την προβλεπόμενη νομοθεσία που για την Ευρώπη έχει θεσπιστεί η απόφαση 657/2002/EE.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος για τον προσδιορισμό καταλοίπων έξι σουλφοναμιδίων (σουλφανιλαμιδίου, σουλφακεταμίδης, σουλφαδιαζίνης, σουλφαθειαζόλης, σουλφαμεραζίνης, σουλφαμεθειζόλης) στο γάλα. Η εκχύλιση των συστατικών από το γάλα πραγματοποιήθηκε με μέθοδο που βελτιστοποιήθηκε ως προς την εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση μοριακώς αποτυπωμένου πολυμερούς (Molecularly Imprinted Polymer, MIP) ως υλικό πλήρωσης, (Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction, MIPSPE). Ο προσδιορισμός των συστατικών πραγματοποιήθηκε σε

σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης, (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC), με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων, (Diode Array Detector, DAD).

Τα πειράματα διεξήχθησαν στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας κ. Σαμανίδου Βικτωρίας, την οποία ήθελα να την ευχαριστήσω θερμά για τις οδηγίες, τις συμβουλές, την υποστήριξη και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε καθ' όλη τη συνεργασία μας. Ακόμη, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή και υπεύθυνο του Μεταπτυχιακού Προγράμματος κ. Ι. Παπαδογιάννη, όπως και τον Καθηγητή κ. Γ. Θεοδορίδη για την καθοδήγηση και τις χρήσιμες διορθώσεις τους, ως μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής.

Θεσσαλονίκη, Ιούλιος 2017.

Περιεχόμενα

Θεωρητικό μέρος.....	1
1. ANTIBIOTIKA	1
1.1. Δράση αντιβιοτικών	2
1.2. Σουλφοναμίδια	2
1.2.1. Ιστορικά στοιχεία	2
1.2.2. Χημεία - Δομή.....	3
1.2.3. Μηχανισμός δράσης.....	3
2. ΓΑΛΑ	5
2.1. Είδη γάλακτος	5
2.2. Διατροφική αξία του γάλακτος	6
2.3. Επεξεργασία γάλακτος – παστερίωση.....	7
2.4. Επιμέρους κατηγορίες γάλακτος	8
2.5. Η χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και η άμεση συσχέτιση με το γάλα.....	9
2.6. Νομοθεσία	10
3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ.....	12
3.1. Πράσινη χημεία	12
3.2. Κλασικές τεχνικές	13
3.3. Σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας.....	15
3.3.1.1. Υλικά που χρησιμοποιούνται στην SPE.....	17
4. ΜΟΡΙΑΚΩΣ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ.....	21
4.1. Γενικά στοιχεία για τη μοριακή αποτύπωση.....	21
4.2. Η διαδικασία της μοριακής αποτύπωσης	22
4.3. Sol-gel μέθοδος για την παρασκευή MIPs	23
5. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ	25
5.1. Ιστορικά Στοιχεία	25
5.2. Γενικά Στοιχεία	25
5.3. Μηχανισμοί της HPLC.....	26
5.3.1. Χρωματογραφία προσρόφησης.....	26
5.3.2. Χρωματογραφία κατανομής.....	27
5.3.3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής.....	27
5.3.4. Χρωματογραφία συγγένειας.....	27
5.3.5. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους	27

5.4. Οργανολογία της HPLC	28
5.4.1. Φιάλες παροχής διαλυτών	29
5.4.2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος	30
5.4.3. Χρωματογραφικές στήλες της HPLC	30
5.4.4. Ανιχνευτές HPLC	31
6. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	32
6.1. Κριτήρια επίδοσης αναλυτικών χρωματογραφικών μεθόδων σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC	34
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ	40
7.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση εργασιών που αναφέρονται στη χρήση των MIPs για τον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων στο γάλα	40
7.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση εργασιών που αναφέρονται στην εφαρμογή MIPs στον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων στον γάλα	42
8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	45
9. ΟΡΓΑΝΑ, ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	47
9.1. Οργανολογία του χρωματογραφικού συστήματος με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων	47
9.2. Συσκευές-Υλικά	47
9.3. Αντιδραστήρια	48
10. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	50
10.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων σουλφοναμιδίων	50
10.2. Επιλογή μήκους κύματος	50
10.3. Χρωματογραφικές Συνθήκες	54
10.4. Εξισώσεις παλινδρόμησης προτύπων διαλυμάτων	56
10.5. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης	57
10.6. Υπολογισμός Διαχωριστικής Ικανότητας	57
10.7. Μελέτη σταθερότητας σε πρότυπα διαλύματα	58
11. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ	59
11.1. Μελέτη MIP(STZ)	59
11.1.1. Χρωματογραφικές συνθήκες για προσδιορισμό της STZ με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης	59
11.2. Εφαρμογή του υλικού MIP(STZ) με διαφορετικές προσεγγίσεις σε πρότυπα διαλύματα	61
11.2.1. Εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση του MIP(STZ)	61

11.2.2. Μαγνητική κάψουλα με ενσωματωμένο MIP(STZ)	64
11.4. Μελέτη MIP(6-sulfa).....	69
11.4.1. Μελέτη MIP(6-sulfa) σε πρότυπα διαλύματα	69
11.4.2. Μελέτη MIP(6-sulfa) σε δείγματα γάλακτος	73
12.ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ MIPSPE(6-sulfa).....	75
12.1. Επίδραση ενεργοποίησης	75
12.2. Επίδραση μάζας υλικού MIP(6-sulfa).....	76
12.3. Επίδραση χρόνου φόρτωσης δείγματος	77
12.4. Επίδραση διαλύτη έκλουσης	77
12.5. Επίδραση όγκου διαλύτη έκλουσης	77
12.6. Επίδρασης χρόνου έκλουσης.....	78
12.7. Κατεργασία γάλακτος	78
12.8. Τελικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου.....	80
12.9. Μελέτες που αναφέρονται στο υλικό MIP(6-sulfa)	82
12.9.1. Μελέτη εκλεκτικότητας του υλικού.....	82
12.9.2. Μελέτη χωρητικότητας του υλικού.....	83
12.9.3 Μελέτη του χρόνου ζωής του υλικού.....	84
13. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ 657/2002/ΕΕ	86
13.1. Κατασκευή εξισώσεων παλινδρόμησης σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος	86
13.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης	87
13.3. Υπολογισμός διαχωριστικής ικανότητας σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος	88
13.4. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα (intra-day repeatability).....	89
13.5. Ακρίβεια και πιστότητα σε διάρκεια τεσσάρων ημερών (inter-day precision).....	90
13.6. Όριο απόφασης (CC_{α}) και ικανότητα ανίχνευσης (CC_{β})	91
13.7. Ανθεκτικότητα μεθόδου	93
13.8. Εκλεκτικότητα της μεθόδου	95
14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	98
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	101
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	103

Θεωρητικό μέρος

1. ANTIBIOTIKA

Τα αντιβιοτικά, γνωστά επίσης και ως αντιμικροβιακά φάρμακα, είναι φάρμακα τα οποία καταπολεμούν τις λοιμώξεις που προκαλούνται από βακτήρια, ιούς, μύκητες και παράσιτα. Ο Alexander Fleming ανακάλυψε το πρώτο αντιβιοτικό, την πενικιλίνη, το 1927. Μετά την ανακάλυψη της πενικιλίνης, ακολούθησε η ανακάλυψη και άλλων αντιβιοτικών, όπως οι στρεπτομυκίνες, οι τετρακυκλίνες, οι κεφαλοσπορίνες και άλλα φυσικά, ημισυνθετικά και συνθετικά αντιμικροβιακά. Η ανακάλυψη και η χρήση των αντιβιοτικών αποτέλεσε επανάσταση στο χώρο της Ιατρικής, καθώς μειώθηκαν δραματικά οι ασθένειες και οι θάνατοι από λοιμώδεις νόσους. Πέρα από το πεδίο της Ιατρικής, αντιβιοτικά φάρμακα χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική, στη γεωργία, αλλά και στην ιχθυοκαλλιέργεια.

Ωστόσο, λίγο μετά την εισαγωγή τους στην κλινική πρακτική, εμφανίστηκε η ανάπτυξη αντοχής. Μικροβιακή αντοχή καλείται η κατάσταση, όπου ο μικροοργανισμός εμφανίζεται ανθεκτικός σε κάποιο ή κάποια αντιβιοτικά του φάσματος του. Μέχρι πριν από μερικά χρόνια η προσπάθεια αντιμετώπισης της μικροβιακής αντοχής επικεντρωνόταν στην ανάπτυξη νέων αντιβιοτικών που είχαν την ικανότητα να εξουδετερώνουν τους μηχανισμούς αντοχής. Παραδείγματος χάρη, οι διάφορες γενιές κεφαλοσπορινών δείχνουν ακριβώς αυτόν τον τρόπο αντιμετώπισης της μικροβιακής αντοχής. Τα τελευταία χρόνια ο τρόπος αυτός έχει παρακμάσει, αφού νέες ομάδες αντιβιοτικών δεν έχουν ανακαλυφθεί, ενώ η σχετική έρευνα είναι πλέον εξαιρετικά δύσκολη, χρονοβόρα και δαπανηρή. Ενώ λοιπόν τα πρώτα αντιβιοτικά ήταν πολύ φθηνά, βρέθηκαν σχετικά εύκολα και αναπτύχθηκαν γρήγορα, κάτι τέτοιο δεν ισχύει πλέον, ώστε να ευνοηθεί η ανακάλυψη νέων αντιβιοτικών. Αντίστοιχα, έχουν γίνει αυστηρότερα τα κριτήρια που θέτουν οι διάφορες υπηρεσίες που δίνουν άδεια κυκλοφορίας των φαρμάκων, γενικά, και των αντιβιοτικών ειδικότερα, όπως η FDA στην Αμερική και η EMEA στην Ευρωπαϊκή Ένωση. [1]

1.1. Δράση αντιβιοτικών

Τα αντιβιοτικά μπορεί να βελτίωσαν την ποιότητα της ανθρώπινης ζωής και να αύξησαν το προσδόκιμο ζωής, όμως η χρήση τους έχει και αρνητικές επιπτώσεις, αφού δρουν ως εξής:

1. Αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση.
2. Αναστέλλουν τη σύνθεση του κυτταρικού τοιχώματος.
3. Καταστρέφουν την κυτταρική μεμβράνη των βακτηρίων.
4. Αναστέλλουν τη σύνθεση του φυλλικού οξέος.

1.2. Σουλφοναμίδια

1.2.1. Ιστορικά στοιχεία

Τα σουλφοναμίδια (sulfonamides, sulphonamides, sulfa drugs ή sulpha drugs) ήταν τα πρώτα αντιβιοτικά που χρησιμοποιήθηκαν συστηματικά και άνοιξαν το δρόμο για την επανάσταση των αντιβιοτικών στην επιστήμη της Ιατρικής. Το πρώτο σουλφοναμίδιο, το οποίο θεωρήθηκε ως προφάρμακο είχε το εμπορικό όνομα Prontosil. Οι πειραματικές μελέτες με το Prontosil ξεκίνησαν το 1932 στα εργαστήρια της εταιρείας Bayer, όπου συντέθηκε το πρώτο φάρμακο από τον χημικό Josef Klarer. Δοκιμές για το εν λόγω φάρμακο πραγματοποιήθηκαν σε ποντίκια, από τον παθολόγο Gerhard Domagk. [2]

Το Prontosil ήταν το πρώτο φάρμακο που ανακαλύφθηκε και εκτιμήθηκε ότι θα μπορούσε να θεραπεύσει αποτελεσματικά μια σειρά από βακτηριακές λοιμώξεις. Καθώς έχει ισχυρή προστατευτική δράση κατά των λοιμώξεων που προκαλούνται από τους στρεπτόκοκκους. Ωστόσο, το συγκεκριμένο φάρμακο είχε αποτελεσματικότητα μόνο *in vivo* και όχι *in vitro*. Μια γαλλική ερευνητική ομάδα με επικεφαλής τον Ernest Fourneau στο Ινστιτούτο Pasteur, διαπίστωσε ότι το φάρμακο μεταβολίζεται σε δύο τμήματα μέσα στο σώμα, απελευθερώνοντας άχρωμη, δραστική ένωση που ονομάζεται σουλφανιλαμίδα, η οποία αρχικά είχε συντεθεί το 1906 και έτσι η πατέντα ευρεσιτεχνίας της ένωσης είχε λήξει επομένως και η δυνατότητα να κερδίσει χρήματα η εταιρεία.

Αυτό είχε ως αποτέλεσμα μέχρι το τέλος της δεκαετίας του 1930 να έχουν παρασκευαστεί δεκάδες τόνοι φαρμάκων της μορφής της σουλφανιλαμίδης. Δυστυχώς όμως μία από τις μορφές αυτές παρασκευάστηκε με διαλύτη

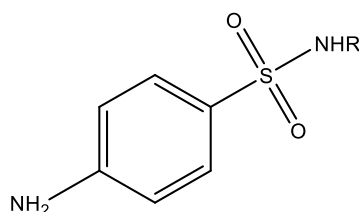
διαιθυλενογλυκόλη, με αποτέλεσμα το 1937 να βρουν το θάνατο σχεδόν εκατό άτομα, στις ΗΠΑ, έτσι ήρθε και το τέλος της σουλφαναμιδίου. [2]

Τα σουλφοναμίδια, καθώς ήταν τα πρώτα αποτελεσματικά αντιβιοτικά πριν την ανακάλυψη της πενικιλίνης, χρησιμοποιήθηκαν ευρέως κατά τη διάρκεια του Β' Παγκοσμίου Πολέμου. Μέχρι σήμερα έχουν υπάρξει περισσότερα από 10.000 παράγωγα σουλφαναμιδίου και σαράντα από αυτά βρίσκουν εφαρμογή στο πεδίο της ιατρικής και της κτηνιατρικής. [2]

1.2.2. Χημεία - Δομή

Τα σουλφοναμίδια είναι παράγωγα του σουλφανιλικού οξέος και είναι μία από τις παλαιότερες κατηγορίες αντιμικροβιακών φαρμάκων, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία ανθρώπων και ζώων, ήδη από τα μέσα του εικοστού αιώνα. Δρουν ως βακτηριοστατικοί παράγοντες και διαθέτουν χημειοθεραπευτική δράση έναντι λοιμώξεων που προκαλούνται από gram-θετικά και gram-αρνητικά βακτήρια και κάποια πρωτόζωα.

Κάθε μόριο σουλφοναμιδίου περιέχει τη βασική μονάδα, η οποία είναι μία σουλφονική ομάδα ενωμένη με μία αμινομάδα. Η γενική δομή της ομάδας των σουλφοναμιδίων φαίνεται στο Σχήμα 1.1., όπου το R είναι μία οργανική ομάδα. [3]



Σχήμα 1.1. Γενική δομή των σουλφοναμιδίων.

1.2.3. Μηχανισμός δράσης

Τα βασικά δομικά χαρακτηριστικά όλων των σουλφοναμιδίων είναι ο βενζολικός δακτύλιος με δύο υποκαταστάτες σε θέση πάρα, μία αμινομάδα και μία μονουποκατεστημένη σουλφοναμιδο- ομάδα, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως.

Η αμινομάδα πρέπει να βρίσκεται σε πάρα-θέση ως προς τη σουλφοναμιδική ομάδα, ώστε το σουλφοναμίδιο να έχει αντιμικροβιακές ιδιότητες.

Τα σουλφοναμίδια έχουν ανάλογη δομή με το π-αμινο βενζοϊκό οξύ (PABA), με αποτέλεσμα να δρουν ανταγωνιστικά και να εμποδίζουν τη συμμετοχή του στη σύνθεση του φολικού οξέος, το οποίο συμμετέχει και στο σχηματισμό του DNA. Η βασική αυτή δομή δε μπορεί να τροποποιηθεί, καθώς πρέπει να μπορεί να μιμηθεί τη δομή του PABA. Τα σουλφοναμίδια αναστέλλουν τη δράση του βακτηριακού ενζύμου διυδροπτεροάση, το οποίο ευθύνεται για την ενσωμάτωση του PABA στο διυδροφολικό οξύ, ενός προδρόμου του φολικού οξέος. Επομένως, αναστέλλεται η σύνθεση του διυδροφολικού οξέος και μειώνεται η ποσότητα του τετραϋδροφολικού οξέος, το οποίο αποτελεί συμπράγοντα για τη σύνθεση των πουρινών, της θυμίνης και του DNA. Τα σουλφοναμίδια αναστέλλουν την πρωτεϊνική σύνθεση και αλλοιώνουν διάφορες μεταβολικές διαδικασίες. [3]

2. ΓΑΛΛΑ

Σύμφωνα με το άρθρο 79 του Ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών, νοπό γάλα νοείται το γάλα που εκκρίνεται από τους μαστικούς αδένες μίας ή περισσότερων αγελάδων, προβατίνων, αιγών ή βουβαλιδών, το οποίο δεν έχει θερμανθεί πέρα των 40 °C, ούτε έχει υποβληθεί σε επεξεργασία με ισοδύναμο αποτέλεσμα. [4]

Το γάλα είναι θρεπτικό, λευκό ή ελαφρώς κιτρινωπό υγρό, που προορίζεται για τη διατροφή των νεογνών. Πρόκειται για ένα μίγμα διάφορων ουσιών, όπως νερό, λίπος, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, ένζυμα, άλατα και βιταμίνες. Μερικά από τα συστατικά αυτά, όπως το λίπος, είναι δυνατό να χωριστούν από το υπόλοιπο γάλα με μηχανικό τρόπο. [5]

2.1. Είδη γάλακτος

Το γάλα χωρίζεται σε διάφορους τύπους ανάλογα με ορισμένα κριτήρια. Τα διάφορα είδη γάλακτος που υπάρχουν αναφέρονται στον Πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1. Είδη γάλακτος που προκύπτουν λαμβάνοντας υπόψη συγκεκριμένα κριτήρια.

Κριτήριο	Είδος Γάλακτος
Γεύση	ξινόγαλο, κακάο, με γεύσεις φρούτων
Ενίσχυση	με βιταμίνες, μέταλλα και ιχνοστοιχεία
Επεξεργασία	νωπό, παστεριωμένο, ομογενοποιημένο, συμπυκνωμένο, ζαχαρούχο
Μέθοδος εκτροφής ή παραγωγής	από ζώα ελεύθερας βοσκής, ζώα σε κτηνοτροφική μονάδα, οργανικό, βιολογικό
Προέλευση	ζωικής προέλευσης: αγελαδινό, κατσικίσιο, πρόβειο φυτικής προέλευσης: καρύδας, σόγιας, αμυγδάλου
Σύνθεση	πλήρες, χαμηλό σε λιπαρά, άπαχο
Συντήρηση	διαρκείας, σε σκόνη
Συσκευασία	σε μπουκάλι (γυάλινο, πλαστικό), σε χαρτόνι
Σύσταση	χωρίς λακτόζη, υποαλλεργικό

Να αναφερθεί ότι η σύνθεση του γάλακτος μπορεί να διαφέρει από ζώο σε ζώο, όμως είναι δυνατό να διαφέρει ακόμη και στο ίδιο το ζώο. Αυτό οφείλεται στο είδος της τροφής που λαμβάνει το ζώο, αλλά και στην ώρα που γίνεται το άρμεγμα. Στις αγελάδες για παράδειγμα, το πρωινό γάλα έχει μεγαλύτερο ποσοστό λίπους από εκείνο που αρμέγεται το βράδυ. [6]

2.2. Διατροφική αξία του γάλακτος

Το γάλα είναι μία ιδιαίτερα σημαντική πηγή θρεπτικών συστατικών, τόσο για τα μωρά των θηλαστικών, όσο και για τον ίδιο τον άνθρωπο. Τα μωρά θηλαστικών αμέσως μετά τη γέννησή τους τρέφονται για ένα χρονικό διάστημα αποκλειστικά με γάλα. Για το λόγο αυτό, παραδοσιακά, το γάλα θεωρείται φυσική, πλήρης και καθολική τροφή.

Το γάλα είναι μια πολύ πλούσια και αναγκαία τροφή για τον ανθρώπινο οργανισμό, από τις πρώτες ώρες της ζωής του, με απώτερο σκοπό τη δημιουργία και διατήρηση ενός υγιούς οργανισμού. Αυτό συμβαίνει, αφού το γάλα περιέχει μεγάλη ποικιλία συστατικών, όπως πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λίπη, άλατα και βιταμίνες σε υψηλή συγκέντρωση. Η μεγάλη σημασία του γάλακτος και των προϊόντων του στην ανάπτυξη και διατήρηση της υγείας, σε όλα τα στάδια της ζωής (παιδική, εφηβική, ενήλικη) υπογραμμίζεται από τον WHO που ξεχωρίζει τα γαλακτοκομικά ως ιδιαίτερη ομάδα τροφίμων, συστήνοντας την κατανάλωση δύο ή τριών μερίδων καθημερινά, στο πλαίσιο μίας ισορροπημένης διατροφής.

Οι πρωτεΐνες αποτελούν το βασικό δομικό συστατικό του οργανισμού. Διασφαλίζουν τη σωστή λειτουργία του, καθώς και την ανάπτυξη των μυών. Σημειώνεται ότι, με πρόσληψη δύο ποτηριών γάλακτος την ημέρα καλύπτεται το 25% των ημερήσιων αναγκών ενός μέσου ανθρώπου σε πρωτεΐνη.

Το γάλα είναι το μοναδικό τρόφιμο στη φύση που περιέχει την υψηλής βιολογικής σημασίας πρωτεΐνη, γνωστή ως καζεΐνη. Τα πεπτίδια που προέρχονται από την καζεΐνη έχουν τις ακόλουθες ιδιότητες:

- Ενισχύουν τη φυσική άμυνα του οργανισμού.
- Ρυθμίζουν τη σωστή πίεση του αίματος.
- Βοηθούν στην αντιμετώπιση του στρες.

Ακόμη η λακτόζη του γάλακτος, είναι ένας υδατάνθρακας που αποτελεί πηγή ενέργειας για τον οργανισμό. Τέλος, το γάλα χαρίζει στον οργανισμό σημαντικές βιταμίνες (όπως βιταμίνη D,K,A,C,H,B₁,B₂,B₃) και πληθώρα ωφέλιμων μετάλλων, όπως μαγνήσιο, φώσφορο, ασβέστιο, κάλιο και σελήνιο. [5, 7]

2.3. Επεξεργασία γάλακτος – παστερίωση

Το γάλα που διατίθεται για κατανάλωση παστεριώνεται από τις βιομηχανίες, ώστε να είναι ασφαλές για κατανάλωση. Στα εργοστάσια, αφού αφαιρεθεί μέρος από το λίπος, αρχίζει η διαδικασία της παστερίωσης, η οποία αποβλέπει στο να καταστρέψει τους μικροοργανισμούς που περιέχει το γάλα. Η παστερίωση γίνεται μέσα σε ειδικές εγκαταστάσεις. Η θερμοκρασία και η διάρκεια της παστερίωσης γίνεται ανάλογα με το βαθμό μόλυνσης που μπορεί να έχει το γάλα.

Με τον όρο παστερίωση, αρχικά ονομάστηκε η ήπια θερμική επεξεργασία, κατά την οποία γίνεται χρήση σχετικά χαμηλών θερμοκρασιών, με σκοπό την καταστροφή

ή την ελάττωση των βλαπτικών μορφών των μικροοργανισμών ενός υγρού προϊόντος, ώστε να μπορεί να διατηρηθεί για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα. Επινοήθηκε από τον Γάλλο χημικό Λουί Παστέρ, από τον οποίο πήρε και το όνομά της. Σήμερα, διακρίνεται η παστερίωση σε χαμηλή και υψηλή. [6]

2.4. Επιμέρους κατηγορίες γάλακτος

Τρία είδη παστεριωμένου γάλακτος χρησιμοποιούνται κατεξοχήν για κατανάλωση στην Ελλάδα, αλλά και διεθνώς: το παστεριωμένο, το υψηλής παστερίωσης και το μακράς διάρκειας. Τα χαρακτηριστικά κάθε επιμέρους κατηγορίας περιγράφονται στη συνέχεια.

Παστεριωμένο γάλα. Το παστεριωμένο γάλα θερμαίνεται συνήθως στους 72-75 °C για 15-30 sec. Σκοπός της παστερίωσης του γάλακτος είναι η καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών. Το παστεριωμένο γάλα περιέχει λιγότερους από 10.000 μικροοργανισμούς ανά mL γάλακτος, οι οποίοι είναι ανενεργοί ή δεν είναι παθογόνοι. Παρά τη θερμική επεξεργασία που υφίσταται το παστεριωμένο γάλα, δεν είναι δυνατή η εξόντωση των σπορίων και η καταστροφή ορισμένων αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων που έχουν αρνητική επίδραση στην ποιότητα του γάλακτος, των θρεπτικών του συστατικών και στη διάρκεια ζωής του. Κατά τη διαδικασία της παστερίωσης, δεν παρατηρούνται ουσιαστικές μεταβολές στην ποιότητα των θρεπτικών στοιχείων του γάλακτος. Το παστεριωμένο γάλα διατηρείται στο ψυγείο από 3 έως 5 ημέρες, χωρίς να αλλοιωθούν οι φυσικοχημικές του ιδιότητες.

Γάλα υψηλής παστερίωσης. Το γάλα υψηλής παστερίωσης θερμαίνεται περίπου στους 100 °C για ελάχιστα δευτερόλεπτα. Σκοπός του είναι η καταστροφή των αλλοιογόνων μικροοργανισμών και ενζύμων. Όταν το γάλα έχει υποστεί επεξεργασία υψηλής παστερίωσης, παρατηρείται περιορισμένη επίδραση στα θρεπτικά του συστατικά, όπως π.χ. μείωση της βιταμίνης C, μικρή μετουσίωση πρωτεϊνών, η οποία θεωρείται σχεδόν αμελητέα. Ενώ, στα φυσικά χαρακτηριστικά του γάλακτος παρατηρείται ελαφριά μεταβολή του αρώματος. Με την υψηλή παστερίωση επιτυγχάνεται, καταστροφή όλων των βλαπτικών μορφών των μικροοργανισμών, αλλά όχι και των σπορίων. Η διάρκεια ζωής αυτού του τύπου γάλακτος κυμαίνεται από 10-30 ημέρες εντός ψυγείου.

U.H.T. (ultra high temperature) γάλα ή αλλιώς γάλα υψηλής θερμικής επεξεργασίας ή μακράς διάρκειας. Το γάλα U.H.T. θερμαίνεται συνήθως στους 135

ή 145 °C για 30 ή 1 sec αντίστοιχα. Σκοπός, με αυτόν τον τύπο εξεργασίας, είναι η καταστροφή όλων των μικροοργανισμών και σπόρων, καθώς και η καταστροφή των περισσότερων αλλοιογόνων ενζύμων. Στο γάλα που έχει υποστεί την U.H.T. επεξεργασία παρατηρούνται αλλαγές στα θρεπτικά συστατικά, οι οποίες είναι μικρής έκτασης και έντασης, π.χ. μετουσίωση πρωτεϊνών ~20%, μη δραστηριότητα, καταστροφή της βιταμίνης C, η οποία δεν είναι ιδιαίτερα σημαντική, γιατί το γάλα δεν είναι η κατεξοχήν πηγή πρόσληψης βιταμίνης C. Το μεγάλο πλεονέκτημα του U.H.T. γάλακτος είναι η καταλληλότητά του για άτομα ευαίσθητα στη λακτόζη, γιατί αυτή διασπάται σε λακτουλόζη, η οποία είναι και πιο γλυκιά και εύπεπτη από τη λακτόζη. Στα φυσικά χαρακτηριστικά του γάλακτος παρατηρείται μια αμυδρή αλλαγή του χρώματος, πιο γλυκιά γεύση και ελαφριά οσμή βρασμένου. Το U.H.T. γάλα είναι ένα αποστειρωμένο γάλα που διατηρείται σε ασηπτική συσκευασία και μπορεί να διατηρηθεί κι εκτός ψυγείου για μέχρι και έξι μήνες. [8]

2.5. Η χρήση αντιβιοτικών στην κτηνοτροφία και η άμεση συσχέτιση με το γάλα

Τα σύγχρονα κτηνιατρικά φάρμακα (veterinary antibiotics, Vas) χρησιμοποιούνται στην κτηνοτροφία αποσκοπώντας, στη μείωση της θνησιμότητας, της νοσηρότητας από μολύνσεις, στην αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των ζώων, στην ηρεμία των ζώων, αλλά και στην αύξηση της έκκρισης γάλακτος.

Τα κτηνιατρικά φάρμακα, κυρίως είναι χημειοθεραπευτικά (π.χ. αντιβιοτικά, όπως τα σουλφοναμίδια), ενδοπαρασιτοκτόνα, εξωπαρασιτοκτόνα, ορμόνες και απολυμαντικά για το θηλασμό και το δέρμα (π.χ. ιωδοφόρα, όπως η χλωροφαινιδίνη). Οι δραστικές ενώσεις αυτών των κατηγοριών φαρμάκων μπορούν να προσδιοριστούν στο γάλα. [9]

Τα κτηνιατρικά αντιβιοτικά χορηγούνται σε αγέλες ή κοπάδια για θεραπεία, πρόληψη, αλλά ακόμη και για την προώθηση της ανάπτυξης των ζώων. Σύμφωνα με τον FDA περισσότερα από 2.000 κτηνιατρικά φαρμακευτικά προϊόντα παράγονται σε 400 ενεργά εργαστήρια, με σκοπό τη θεραπεία διαφόρων ειδών ζώων.

Φυσικό επακόλουθο της χρήσης αντιβιοτικών στο πεδίο της κτηνοτροφίας είναι να εκτίθεται το γάλα των ζώων στις ουσίες αυτές, κατά τη διαδικασία της παραγωγής του. Όταν το γάλα παράγεται μέσα στο σώμα του ζώου, μέσω της φυσιολογικής διαδικασίας που ενσωματώνει διάφορα θρεπτικά συστατικά, μπορούν κάλλιστα να

ενσωματωθούν και ανεπιθύμητες προσμίξεις προερχόμενες από τις ζωοτροφές. Σαφώς αυτό δεν είναι θεμιτό, αφού μπορεί να έχει άμεσες συνέπειες στην υγεία των καταναλωτών και ιδιαίτερα των βρεφών και των παιδιών, αφού το γάλα σε αυτές τις ηλικίες αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της καθημερινής διατροφής εξαιτίας της υψηλής θρεπτικής αξίας του. [9]

Διάφοροι τύποι χημικών ουσιών που σχετίζονται με την κτηνοτροφία, πέρα από τα κτηνιατρικά φάρμακα και μπορούν μέσω της κατανάλωσης γάλακτος να φτάσουν στον τελικό αποδέκτη που είναι ο άνθρωπος, είναι οι εξής:

- Υπολείμματα φυτοφαρμάκων.
- Παραμένοντες οργανικοί ρύποι (POPs) , όπως πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), διβενζο-π-διοξίνες (PCDDs), και διβενζο-π-φουράνια (PCDFs).
- Βαρέα μέταλλα.
- Ραδιονουκλίδια.
- Αφλατοξίνες και μυκοτοξίνες.
- Νιτρώδη και νιτρικά.
- Απορρυπαντικά και απολυμαντικά.

Οι λόγοι χρήσης αντιβιοτικών φαρμάκων, είτε για πρόληψη ασθενειών, είτε ως πρόσθετα σε ζωοτροφές, είναι κατανοητοί. Ωστόσο, πρέπει να προστατευτεί η υγεία του καταναλωτή προϊόντων γάλακτος και να εξασφαλιστεί η ασφάλειά του. Σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να υποβαθμίζεται η ποιότητα των προϊόντων αυτών. Για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητος ο έλεγχος υπολειμματικών συγκεντρώσεων αντιβιοτικών (και άλλων ξενιστών ουσιών) στο γάλα. [10]

2.6. Νομοθεσία

Έχοντας ως στόχο την προστασία των καταναλωτών συντάχθηκαν και συστάθηκαν με νόμο τα ανώτατα όρια καταλοίπων (maximum residue level, MRL) φαρμάκων. Οι ενώσεις (επιτρεπόμενες) με MRL περιλαμβάνονται στον Πίνακα 1 του Παραρτήματος του Άρθρου 1 του Κανονισμού 37/2010/ΕΕ. Η Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) έχει εκδώσει ειδική απόφαση (2002/657/ΕΕ), σχετικά με την αποτελεσματικότητα των μεθόδων και την ερμηνεία των αποτελεσμάτων τους στο επίσημο έλεγχο των καταλοίπων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης.

Σύμφωνα με τον ισχύοντα κανονισμό της Ευρωπαϊκής Ένωσης, το σύνολο των καταλοίπων ουσιών της ομάδας των σουλφοναμιδίων δεν πρέπει να υπερβαίνει τα 100 μg/kg στο γάλα προερχόμενο από βοοειδή, πρόβατα και αίγες. [11]

3. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Κάθε αναλυτική διεργασία αποτελείται από τρία βασικά και κρίσιμα στάδια, τη δειγματοληψία, την προκατεργασία του δείγματος και την ανάλυση. Η συνεισφορά κάθε σταδίου και κάθε βήματος που πραγματοποιείται είναι σημαντική στη λήψη επαναλήψιμων αποτελεσμάτων.

Η προκατεργασία του δείγματος είναι ένα αναγκαίο στάδιο που πρέπει να ακολουθηθεί σε κάθε λαμβανόμενο δείγμα πριν την ανάλυση και είναι μία χρονοβόρα διαδικασία για τον αναλυτικό χημικό, καθώς καταλαμβάνει το μεγαλύτερο χρόνο όλης της αναλυτικής πορείας. Σκοπός της προκατεργασίας είναι η απομόνωση, η παραλαβή, ο καθαρισμός και η προσυγκέντρωση των επιθυμητών συστατικών.

Η ιδανική τεχνική προκατεργασίας θα πρέπει να συνοψίζει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Να χρησιμοποιεί μικρή ποσότητα οργανικών διαλυτών έως καθόλου.
- Να είναι απλή στην εφαρμογή.
- Να είναι ταχεία.
- Να είναι οικονομική.
- Να είναι αποτελεσματική και επαναλήψιμη.
- Να είναι εκλεκτική ως προς τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.
- Να είναι συμβατή με μεγάλο αριθμό διαχωριστικών τεχνικών.
- Να μπορεί να αυτοματοποιηθεί. [12, 13]

3.1. Πράσινη χημεία

Η ιδέα της πράσινης χημείας έχει τις ρίζες της στη βιώσιμη ανάπτυξη. Οι πρώτες δραστηριότητες που ανέλαβαν οι χημικοί για τη βιωσιμότητα επικεντρώθηκαν κυρίως σε διεργασίες και προϊόντα βιομηχανικής κλίμακας, σύμφωνα με τις δώδεκα αρχές της πράσινης χημείας (*Green Chemistry*) που πρότεινε ο Anastas σε συνεργασία με τον Warner το 1998. Οι αρχές της πράσινης χημείας κυριαρχούσαν κυρίως σε θέματα πράσινης οργανικής σύνθεσης, σε διάφορους κλάδους της χημικής βιομηχανίας, ειδικά στη φαρμακευτική βιομηχανία. [14]

Ο όρος *πράσινη αναλυτική χημεία (green analytical chemistry, GAC)* εξάγεται από την πράσινη χημεία, έχοντας ως στόχο την εισαγωγή της πράσινης σκέψης στην αναλυτική χημεία. Οι αρχές που βρίσκουν εφαρμογή για αναλυτικούς σκοπούς είναι:

- Πρόληψη των αποβλήτων.
- Χρήση ασφαλέστερων, μη τοξικών διαλυτών και αντιδραστηρίων.
- Βελτιστοποίηση του σχεδιασμού για ενεργειακή απόδοση.
- Μείωση της διαδικασίας της παραγωγοποίησης. [15]

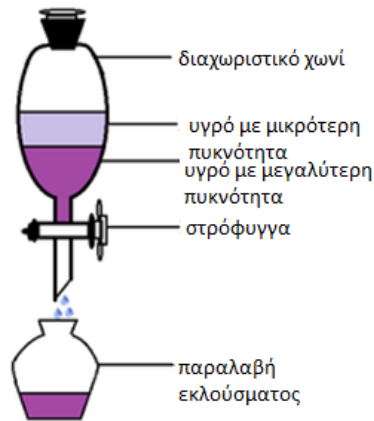
Τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση για να γίνει περισσότερο φιλικό προς το περιβάλλον το στάδιο της προκατεργασίας δείγματος. Με απώτερο σκοπό τη βελτίωση της ευαισθησίας και την αύξηση της εκλεκτικότητας των αναλυτικών μεθόδων, αλλά σαφώς και την προστασία του περιβάλλοντος. Ωφέλιμο είναι τόσο για την προστασία του περιβάλλοντος, όσο και της ανθρώπινης υγείας, να εισάγονται “πράσινες” τεχνικές και έννοιες στους διάφορους κλάδους της Χημείας. [14, 15]

Στη συνέχεια αναφέρονται οι κλασικές τεχνικές εκχύλισης για εκχύλιση συστατικών που ενδιαφέρουν, αλλά και νεότερες που πλησιάζουν τις αρχές της πράσινης αναλυτικής χημείας, με χρήση κυρίων νέων και καινοτόμων υλικών.

3.2. Κλασικές τεχνικές

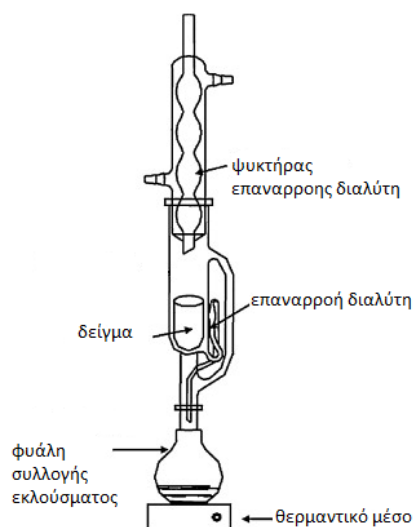
Ως κλασικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος αναφέρονται η εκχύλιση υγρού-υγρού και η εκχύλιση Soxhlet.

Η εκχύλιση υγρού-υγρού αποτελεί μία κλασική τεχνική για την προκατεργασία υγρών δειγμάτων. Πρόκειται για τη μίξη ενός υδατικού διαλύματος του δείγματος με έναν οργανικό διαλύτη που δεν αναμιγνύονται μεταξύ τους. Οι δύο αυτές φάσεις αλληλεπιδρούν και οι ενώσεις που ενδιαφέρουν θα πρέπει να μεταβούν στην οργανική στιβάδα, αφού ο οργανικός διαλύτης που έχει επιλεγεί εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια με αυτές. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάμιξη γίνεται σε ένα διαχωριστικό χωνί, όπου αναταράσσονται οι δύο φάσεις, ώστε να αποκατασταθεί ισορροπία, όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1. Η τεχνική όμως αυτή εμφανίζει σημαντικά μειονεκτήματα, όπως είναι η χρήση μεγάλων όγκων οργανικών διαλυτών, ο σχηματισμός γαλακτωμάτων κατά τη διάρκεια της ανάμιξης και η συνεκχύλιση συστατικών του υποστρώματος που μπορεί να παρεμποδίζουν την ανάλυση. Επομένως χαρακτηρίζεται ως χρονοβόρα και μη φιλική προς το περιβάλλον. [12]



Σχήμα 3.1. Εκχύλιση υγρού-υγρού.

Η εκχύλιση Soxhlet πραγματοποιείται σε ειδική συσκευή εκχύλισης. Σε αυτή την τεχνική, στερεό δείγμα πρόκειται να καθαριστεί με κάποιο οργανικό διαλύτη. Το στερεό δείγμα τοποθετείται σε έναν πορώδη χάρτινο υποδοχέα μίας χρήσης και με τη σειρά του ο υποδοχέας τοποθετείται στη συσκευή Soxhlet. Η συσκευή είναι σχεδιασμένη για την επαναροή του διαλύτη εκχύλισης, καθώς ο χώρος στον οποίο βρίσκεται ο υποδοχέας γεμίζει με συγκεκριμένο όγκο διαλύματος. Το διάλυμα που έχει παραλάβει τις ενώσεις, επιστρέφει στη φιάλη βρασμού και η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να απομονωθεί η ένωση με επιτυχία από το στερεό υπόστρωμα, Σχήμα 3.2. Η τεχνική αυτή είναι αρκετά χρονοβόρα, αφού ο πλήρης καθαρισμός μπορεί να διαρκέσει και περισσότερο από ένα εικοσιτετράωρο. [12]



Σχήμα 3.2. Συσκευή εκχύλισης Soxhlet.

3.3. Σύγχρονες τεχνικές προκατεργασίας

3.3.1 Εκχύλιση στερεάς φάσης

Τα προβλήματα, τα οποία δημιουργούνται με την εφαρμογή κλασικών τεχνικών προκατεργασίας μπορούν να ξεπεραστούν με εφαρμογή σύγχρονων τεχνικών, όπως είναι για παράδειγμα η εκχύλιση στερεάς φάσης (Solid Phase Extraction, SPE).

Η εκχύλιση στερεάς φάσης είναι μία αρκετά ελκυστική τεχνική, καθώς συνοψίζει μία σειρά πλεονεκτημάτων, όπως το ότι είναι ταχεία, αποτελεσματική, εκλεκτική, χρησιμοποιεί μικρούς όγκους διαλυτών και είναι κατάλληλη να συνδυαστεί με διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές, όπως η HPLC, TLC, GC.

Η αρχή της SPE περιλαμβάνει την κατανομή των εκχυλιζόμενων συστατικών ανάμεσα σε δύο φάσεις, μία στερεή που είναι το προσροφητικό υλικό και μία υγρή, το υγρό υπόστρωμα, το οποίο φέρει και τις πιθανές παρεμποδίσεις. Τα προς προσδιορισμό συστατικά θα πρέπει να έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τη στερεή φάση, απ' ό,τι με το υπόστρωμα του δείγματος, ώστε να μπορέσουν να συγκρατηθούν από το προσροφητικό υλικό. Οι μηχανισμοί συγκράτησης προκύπτουν από διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που πραγματοποιούνται ανάμεσα στα προσδιοριζόμενα συστατικά, τις ενεργές ομάδες στην επιφάνεια του προσροφητικού και στην υγρή φάση του υποστρώματος του δείγματος. [12]

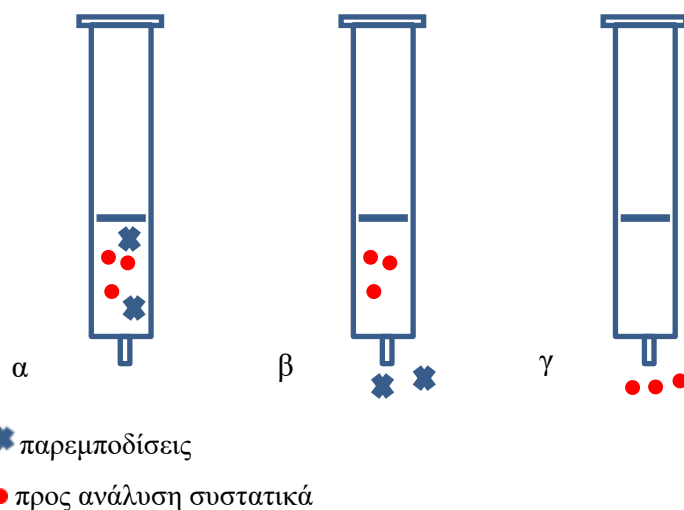
Η SPE διεξάγεται σύμφωνα με τα ακόλουθα στάδια, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.3.:

1. **Ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού.** Πραγματοποιείται με κατάλληλους διαλύτες, ώστε να επιδιαλυτωθούν οι δραστικές ομάδες του υλικού και να αλληλεπιδράσει με το δείγμα.
2. **Φόρτωση του δείγματος.** Κατά το στάδιο αυτό, οι ενώσεις που μας ενδιαφέρουν, αλλά και ανεπιθύμητα συστατικά δεσμεύονται από το προσροφητικό. Για να επιτευχθεί μεγαλύτερη δέσμευση, μπορεί να αραιωθεί το δείγμα με νερό, ώστε να αυξηθεί η πολικότητα του περιβάλλοντος των συστατικών.
3. **Έκπλυση.** Επιλέγεται κατάλληλος διαλύτης για την απομάκρυνση ενώσεων που έχουν προσροφηθεί, αλλά δεν ενδιαφέρουν. Ο διαλύτης θα πρέπει να είναι ασθενής, ώστε να μην εκροφηθούν τα συστατικά που μας ενδιαφέρουν από το προσροφητικό.

4. **Ξήρανση προσροφητικού.** Πραγματοποιείται στην περίπτωση που πρέπει να απομακρυνθεί το νερό, όταν ο διαλύτης έκλυσης είναι μη αναμίξιμος. Η ξήρανση επιτυγχάνεται με εφαρμογή κενού, με διαβίβαση ρεύματος αζώτου ή με φυγοκέντρωση.
5. **Έκλυση** με χρήση κατάλληλου διαλύτη για ποσοτική παραλαβή των ενώσεων που ενδιαφέρουν.
6. **Εξάτμιση του διαλύτη** υπό ήπιο ρεύμα αζώτου και επαναδιάλυση του στερεού υπολείμματος στην κινητή φάση. [12]

Απαντώνται διάφοροι τύποι, με τους οποίους είναι εμπορικά διαθέσιμη η SPE και είναι οι εξής:

- Μικροστήλες σύριγγας (syringe barrel columns).
- Μικροστήλες Cartridges.
- Πλάκες 96-well.
- Μεμβράνες σε μορφή δίσκων.
- Συσκευές κενού για πολλαπλή κατεργασία μικροστηλών.
- Εκχύλιση SPE με μικροστήλη προσαρμοσμένη σε συσκευή κενού.
- Αυτοματοποιημένες διατάξεις για ταυτόχρονη προκατεργασία δειγμάτων.



Σχήμα 3.3. Εκχύλιση στερεάς φάσης. (α) φόρτωση δείγματος, (β) απομάκρυνση παρεμποδίσσεων, (γ) έκλυση με κατάλληλο διαλύτη και παραλαβή των επιθυμητών συστατικών.

3.3.1.1. Υλικά που χρησιμοποιούνται στην SPE

Οι μικροστίγλες που χρησιμοποιούνται στην τεχνική της SPE είναι πακτωμένες με διάφορα προσροφητικά στερεάς φάσης. Στο εμπόριο διατίθεται μία ποικιλία από προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται. Τα προσροφητικά αυτά περιλαμβάνουν ιοντοανταλλακτικές ρητίνες και δεσμευμένο διοξείδιο του πυριτίου. Οι ρητίνες παρουσιάζουν μεγάλη χωρητικότητα, αλλά επηρεάζονται από την παρουσία οργανικών διαλυτών.

Τα πυριτικά προσροφητικά υλικά είναι αυτά που έχουν χρησιμοποιηθεί και έχουν βρει πληθώρα εφαρμογών. Κυρίως, εφαρμόζονται πυριτικά υλικά που φέρουν δεκαοκτυλο- (C_{18}), όκτυλο- (C_8), βούτυλο- (C_4), αμινο- ($-NH_2$) ομάδες και ομάδες καρβοξυλικών οξέων ($-COOH$). [12]

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια υπάρχει η τάση για σύνθεση και εφαρμογή καινοτόμων υλικών. Αυτό συμβαίνει, καθώς προτιμώνται υλικά με αυξημένη προσροφητική ικανότητα, περισσότερο εκλεκτικά, πιο εύκολα και οικονομικά στην παρασκευή τους. Η παρασκευή καινοτόμων, σύγχρονων υλικών καλύπτει της αρχές της Πράσινης Αναλυτικής Χημείας και το τρίπτυχο αντικατάσταση, μείωση και ανακύκλωση. Αυτή η προσέγγιση καθιστά δυνατή την αντικατάσταση των τοξικών διαλυτών από πράσινους/φιλικούς διαλύτες, τη μειωμένη κατανάλωση διαλυτών και ροφητικών και την επαναχρησιμοποίηση των ροφητικών υλικών. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται υλικά που αναπτύσσονται ολοένα και περισσότερο τα τελευταία χρόνια, σύμφωνα με τις σύγχρονες απαιτήσεις. [13]

Τα ιονικά υγρά ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά το 1970 από τον Atwood και τους συνεργάτες του, ωστόσο το πρώτο σταθερό στον αέρα και στο νερό ιονικό υγρό παρασκευάστηκε μόλις το 1992 και ήταν το 1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο. Τα ιονικά υγρά είναι άλατα υγρά σε μια περιοχή θερμοκρασιών από $-85\text{ }^\circ\text{C}$ έως $223\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ τα συνηθισμένα άλατα είναι υγρά μόνο μετά τη θερμοκρασία τήξεώς τους, που είναι αρκετά υψηλή (π.χ. για το $NaCl$ το σ.τ. είναι $801\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ για το $LiCl$ το σ.τ. είναι $604\text{ }^\circ\text{C}$). Για τις περισσότερες εφαρμογές χρησιμοποιούνται ιοντικά υγρά στην περιοχή θερμοκρασιών από $-20\text{ }^\circ\text{C}$ έως $100\text{ }^\circ\text{C}$, ενώ μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα ιονικά υγρά που είναι υγρά κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος. Μία εξαιρετική ιδιότητά τους είναι ότι έχουν αμελητέα τάση ατμών, οπότε δε μπορούν να εξατμιστούν και να οδηγήσουν σε εκπομπές ανεπιθύμητων συστατικών στο περιβάλλον, με αποτέλεσμα να θεωρούνται περίπου ως ιδανικοί διαλύτες. Έχουν

σημαντική σταθερότητα και αρκετά μεγάλη περιοχή θερμοκρασιών, όπου βρίσκονται σε υγρή κατάσταση, είναι χημικώς και φυσικώς σταθερές ενώσεις, καθώς, επίσης, είναι ανακυκλώσιμα και επαναχρησιμοποιήσιμα χημικά αντιδραστήρια. [13, 16]

Η δομή των ιονικών υγρών εμφανίζει την ιδιαιτερότητα να περιλαμβάνει ένα μεγάλο οργανικό κατιόν και ένα, συνήθως, μικρό ανόργανο ανιόν, ενώ σε πιο σπάνιες περιπτώσεις, το μικρό ανιόν είναι επίσης οργανικό. Έτσι, η τελική δομή που προκύπτει για τα αντιδραστήρια αυτά είναι μη-κρυσταλλική, αφού δεν υπάρχει η δυνατότητα συμμετρικής διάταξης, οπότε σε αντίθεση με τα συνηθισμένα άλατα που είναι στερεά (και κρυσταλλικά), αυτά μπορεί να είναι υγρά, ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Τα περισσότερα κοινά κατιόντα είναι βασισμένα στα παράγωγα ιμιδαζολίου (imidazolium), πυριδινίου (pyridinium), πυρρολιδινίου (pyrrolidinium), αμμωνίου (ammonium) και φωσφωνίου (phosphonium). Τα ανιόντα που απαντώνται κυρίως είναι ανόργανα ή οργανικά (π.χ. τετραφθοροβορικό, εξαφθοροφωσφορικό, βρωμιούχο). [13, 16]

Όπως αναφέρεται στη βιβλιογραφία, τα ιονικά υγρά υποστηριζόμενα από πυριτικά υποστρώματα έχουν βρει με επιτυχία εφαρμογή στην εκχύλιση στερεάς φάσης (π.χ. για προσδιορισμό μετάλλων σε νερό).

Επιπλέον, στην SPE χρησιμοποιούνται υλικά πορώδους γραφίτη (Graphitized Carbon), κυρίως άνθρακα γραφίτη (carbon graphite), νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (Multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)) και νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (single-walled CNTs (SWCNTs)). Τα υλικά αυτά χαρακτηρίζονται από ομοιογένεια και μεγάλη ειδική επιφάνεια $120 \text{ m}^2/\text{g}$. Το 2004, η ανακάλυψη του γραφενίου (Graphene) αποτέλεσε επανάσταση στα γραφιτικά υλικά, χάρη στα εξαιρετικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζει, όπως είναι οι εξαιρετικές θερμικές και μηχανικές ιδιότητες, η καλή θερμική αγωγιμότητα, η υψηλή αντοχή στη θραύση, η μεγάλη ειδική επιφάνεια και η μεγάλη ικανότητα ρόφησης. [5]

Τα υλικά περιορισμένης προσέγγισης (Restricted Access Materials, RAMs) παρουσιάζουν μια διπλή επιφανειακή διαμόρφωση που ενεργεί ταυτόχρονα. Η εσωτερική επιφάνεια ευνοεί τη συγκράτηση και το διαχωρισμό των ενώσεων χαμηλού μοριακού βάρους με υδρόφοβες, υδρόφιλες, ιονικές ή χημικές αλληλεπιδράσεις. Ενώ, η εξωτερική επιφάνεια ενεργεί ως ασπίδα σε μια διαδικασία αποκλεισμού που εμποδίζει τη συγκράτηση των συστατικών υψηλού μοριακού

βάρους από το υπόστρωμα του δείγματος με την ύπαρξη ενός φυσικού ή χημικού εμποδίου.

Τα ανοσοπροσροφητικά υλικά (Immunosorbents) είναι αντισώματα ακινητοποιημένα σε ένα στερεό ή υπό μορφή πηκτώματος (π.χ. σίλικα ή κυτταρίνη) και επωφελούνται από αλληλεπιδράσεις υψηλής ειδικότητας ανάμεσα στο αντιγόνο και το αντίσωμα για να παρέχουν μοριακή αναγνώριση. Τα μονοκλωνικά αντισώματα (monoclonal antibodies, mAbs) είναι πιο επιλεκτικά, κυρίως για μεγάλα μόρια, σε σύγκριση με πολυκλωνικά αντισώματα (polyclonal antibodies, pAbs).

Στην κατηγορία των εκλεκτικών υλικών ανήκουν και τα μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή (Molecular Imprinted Polymers, MIPs). Πρόκειται για πολυμερικά υλικά με εκλεκτικές θέσεις αναγνώρισης για συγκεκριμένα μόρια. Εκτενής λόγος γίνεται στο Κεφάλαιο 4. [13]

3.3.2 Εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά

Η SPE, όπως περιγράφηκε στην προηγούμενη παράγραφο, χαρακτηρίζεται από εύκολο χειρισμό, απλότητα στη λειτουργία και χαμηλή κατανάλωση διαλυτών σε σχέση με προγενέστερες τεχνικές προκατεργασίας δειγμάτων, όπως η εκχύλιση υγρού-υγρού. Ωστόσο, η SPE παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα, όπως είναι η δυσκολία στον ταυτόχρονο χειρισμό πολλών εκχυλισμάτων, το μπλοκάρισμα της μικροστήλης κατά τη φόρτωση του δείγματος και το μεγάλο χρονικό διάστημα που μπορεί να συνεπάγεται η διαδικασία.

Για τον περιορισμό των μειονεκτημάτων της εκχύλισης στερεάς φάσης, εισήχθη μία παραλλαγή της τεχνικής αυτής, που ονομάζεται εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά, dispersive solid-phase extraction, dSPE. Στην dSPE, το ροφητικό υλικό δεν είναι πακτωμένο μέσα σε μία μικροστήλη, αλλά βρίσκεται σε απευθείας επαφή με το υγρό δείγμα, έτσι δίνεται μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής του δείγματος και του ροφητικού υλικού.

Η dSPE συνήθως χρησιμοποιείται για σκοπούς καθαρισμού (clean-up) προσθέτοντας το υγρό δείγμα ή το υπερκείμενο υγρό (που έχει προκύψει από προκατεργασία), το οποίο περιέχει τις προσδιοριζόμενες ενώσεις και μερικές πιθανές παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα, σε ένα ποτήρι ζέσεως μαζί με το ροφητικό υλικό

και το διαλύτη εκχύλισης, ο οποίος συνήθως περιέχεται στο υγρό δείγμα. Έπειτα απομακρύνεται το υγρό που παραλαμβάνει και τα ενδιαφερόμενα συστατικά.

Στην εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά μπορούν να εφαρμοστούν όλοι οι τύποι ροφητικών υλικών που βρίσκουν εφαρμογές και στην εκχύλιση στερεάς φάσης.

[17]

4. ΜΟΡΙΑΚΩΣ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

4.1. Γενικά στοιχεία για τη μοριακή αποτύπωση

Ως μοριακή αποτύπωση ορίζεται η δημιουργία εξειδικευμένων θέσεων αναγνώρισης ενός μορίου-προσδέτη σε ένα συνθετικό πολυμερές, όπου ένα μόριο-στόχος (άτομο, ιόν, μόριο, σύμπλοκο συναρμογής ή ένα μοριακό, ιονικό ή μακρομοριακό οργανωμένο σύστημα, συμπεριλαμβανομένων των μικροοργανισμών) χρησιμοποιείται προκειμένου να ευνοηθεί η δημιουργία θέσεων αναγνώρισης κατά τη δημιουργία της κυρίως μάζας της πολυμερικής μήτρας. Ακολουθεί η απομάκρυνση μέρους ή ολόκληρου του μορίου-στόχου, ώστε να δημιουργηθούν στο πολυμερές κατάλληλες θέσεις δέσμευσης, οι οποίες είναι συμπληρωματικές ως προς το μέγεθος, το σχήμα και τη χαρακτηριστικότητα του μορίου-στόχου. Κατά τη δέσμευση, επιτυγχάνεται επιλεκτική δέσμευση του αποτυπωμένου μορίου στις εκκενωμένες από το μόριο-στόχο θέσεις αναγνώρισης. [18]

Το 1931 έγινε η πρώτη αναφορά περί μοριακής αποτύπωσης. Αρκετά χρόνια πριν εισαχθεί η έννοια της μοριακής αποτύπωσης, από την επιστημονική ομάδα του Polyakov στο Κίεβο, γινόταν μελέτη για την παρασκευή πηκτών πυριτίου με πολυμερισμό του πυριτικού νατρίου στο νερό, χρησιμοποιώντας $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ ως πηκτικό παράγοντα, με στόχο τη μετέπειτα χρήση τους στη χρωματογραφία. Τότε ήταν που διαπιστώθηκε πως κατά την προσθήκη συγκεκριμένων ουσιών (όπως βενζόλιο ή τολουόλιο), κατά τη διεργασία ξήρανσης, τα υλικά αυτά πυριτίου, μετά από εκτεταμένη πλύση με ζεστό νερό και την πλήρη απομάκρυνση των πρόσθετων ουσιών, εμφάνιζαν αυξημένη προσροφητική ικανότητα ως προς την ουσία που είχε προστεθεί κατά την ξήρανσή τους, σε σχέση με άλλες δομικά συγγενείς ουσίες. Αφού ακολούθησαν και άλλες μελέτες, αποδείχθηκε ότι η επιλεκτική αυτή δέσμευση προερχόταν από αλλαγές που είχε επιφέρει η παρουσία της πρόσθετης ουσίας στη δομή των υλικών πυριτίου, καθώς αυτή λειτουργούσε ως μόριο-στόχος κατά το σχηματισμό της πηκτής. [18]

Ακολούθησαν την ίδια χρονική περίοδο περίπου, προσπάθειες μοριακής αποτύπωσης από τον Pauling και φοιτητές του, αλλά το έντονο ενδιαφέρον για τη μοριακή αποτύπωση εγκαταλείφθηκε, αφού τα μοριακά αποτυπώματα πηκτών πυριτίου φαινόταν να παρουσιάζουν μειωμένη σταθερότητα και επαναληψιμότητα στη σύνθεση.

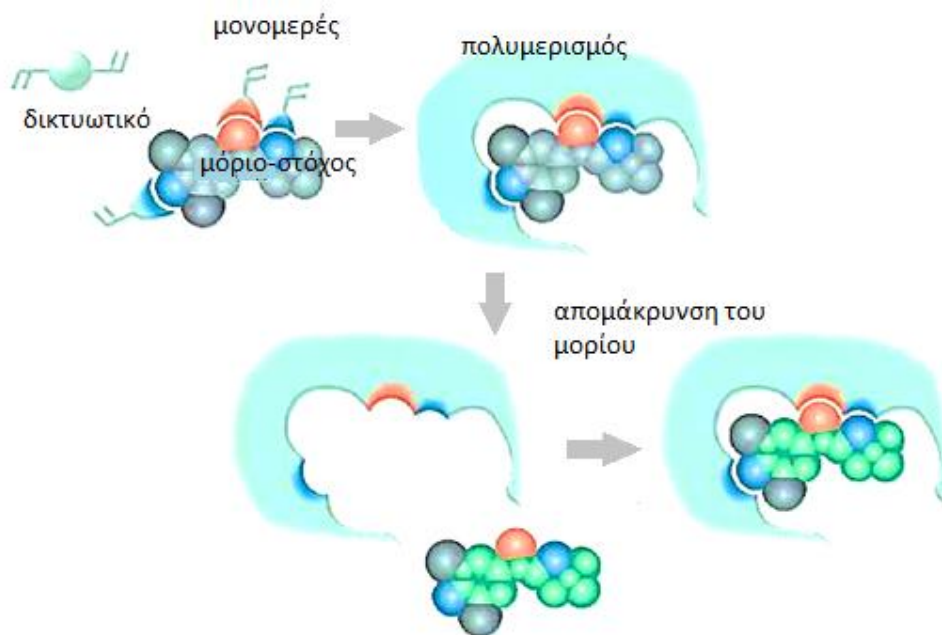
Ο Wulff και ο Klotz ξαναέφεραν το 1972 στην επιφάνεια τη μοριακή αποτύπωση, εισάγοντας τη μοριακή αποτύπωση με συνθετικά οργανικά πολυμερή. Λίγα χρόνια μετά, ο Mosbach εισήγαγε την έννοια της μη-ομοιοπολικής αποτύπωσης, διευρύνοντας σημαντικά το πεδίο της μοριακής αποτύπωσης. Οι Wulff και Mosbach θεωρούνται θεμελιωτές της νέας γενιάς των μοριακά αποτυπωμένων οργανικών πολυμερών. [18]

4.2. Η διαδικασία της μοριακής αποτύπωσης

Τα μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή (Molecularly Imprinted Polymers, MIPs) είναι αποτέλεσμα της διαδικασίας της μοριακής αποτύπωσης. Η μοριακή αποτύπωση πολυμερών είναι μία διαδικασία, κατά την οποία δημιουργούνται επιλεκτικές θέσεις αναγνώρισης στο πολυμερικό υλικό, ικανές να αναγνωρίζουν αποκλειστικά το μόριο-στόχο που χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση του αποτυπωμένου πολυμερούς.

Επομένως, κατά τη μοριακή αποτύπωση, μονομερή και μονομερή δικτύωσης πολυμερίζονται μαζί, με την παρουσία του μορίου-στόχου. Σε πρώτη φάση, τα μονομερή σχηματίζουν ένα σύμπλοκο με το μόριο-στόχο και στη συνέχεια πραγματοποιείται ο πολυμερισμός με περίσσεια του μονομερούς δικτύωσης. Το σύμπλοκο σχηματίζεται είτε με ομοιοπολικούς, είτε με μη ομοιοπολικούς δεσμούς. Αφού ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός και το μόριο-στόχος έχει ακινητοποιηθεί σε συγκεκριμένες θέσεις δέσμευσης της πολυμερικής μήτρας, θα πρέπει να ακολουθήσει η απομάκρυνσή του από αυτή. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την ελευθέρωση θέσεων δέσμευσης, οι οποίες φαίνονται να είναι εκλεκτικές μόνο για το μόριο-στόχο.

Στο Σχήμα 4.1. παρουσιάζεται διαγραμματικά τι συμβαίνει κατά το σχηματισμό των μοριακών αποτυπωμένων πολυμερών. Το μονομερές (functional monomer) πλαισιώνει το μόριο-στόχο (template molecule) και ξεκινάει ο πολυμερισμός με τη βοήθεια του δικτυωτικού (crosslinker). Κατά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού, έχουν σχηματιστεί πολυμερικές μήτρες (polymer matrix), οι οποίες έχουν εγκλωβίσει το μόριο-στόχο. Τέλος, ακολουθεί η απομάκρυνση του μορίου-στόχου από την πολυμερική μήτρα και αυτή πλέον φέρει θέσεις αναγνώρισης, οι οποίες είναι εκλεκτικές μόνο για το συγκεκριμένο μόριο. [18, 19]



Σχήμα 4.1. Διαδικασία της μοριακής αποτύπωσης.

Για να αξιολογηθεί η απόδοση των MIPs, πραγματοποιείται συγκριτική μελέτη με πολυμερή αναφοράς. Τα πολυμερή αναφοράς είναι είτε τα μοριακώς μη αποτυπωμένα πολυμερή (Non-Imprinted Polymers, NIP), που έχουν παρασκευαστεί, όπως ακριβώς και τα MIPs αλλά με απουσία του μορίου-στόχου, είτε μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή, όπου το μόριο-στόχος είναι διαφορετικό μόριο από αυτό που επιχειρείται να δεσμευτεί. Τελικά, αναμένεται τα MIPs να είναι περισσότερο εκλεκτικά για το μόριο-στόχο και να έχουν καλύτερη ικανότητα δέσμευσης. [18]

4.3. Sol-gel μέθοδος για την παρασκευή MIPs

Ο όρος «sol-gel» (λύματος-πηκτής) αποδίδεται σε όλες τις διεργασίες, κατά τις οποίες ένα διάλυμα ή αλλιώς sol μετατρέπεται σε μία άκαμπτη πορώδες μάζα, δηλαδή μία γέλη ή αλλιώς μία πηκτή (gel). Η τεχνολογία sol-gel περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

1. Προκατεργασία του υλικού που θα χρησιμοποιηθεί ως το υπόστρωμα.
2. Σχεδιασμός και προετοιμασία του sol διαλύματος.
3. Σχηματισμός της επίστρωσης sol-gel πάνω στο υπόστρωμα.
4. Ενεργοποίηση του ροφητικού ή post-gelation προετοιμασία.
5. Φυσικοχημικός χαρακτηρισμός των sol-gel προσροφητικών.

Η διαδικασία επίστρωσης σε επιφάνειες με την τεχνολογία sol-gel, ευνοεί την εύκολη και οικονομική δημιουργία υβριδικών οργανικών-ανόργανων υλικών. Τα υλικά που λαμβάνονται, είναι σε διαφορετικό βαθμό εκλεκτικά, μπορεί να ρυθμιστεί το πορώδες τους και παρουσιάζουν υψηλή θερμική και χημική αντοχή, αλλά και σταθερότητα σε ποικιλία διαλυτών. Εξαιτίας της σχετικής απλότητας και των υπολοίπων πλεονεκτημάτων παρασκευάζονται αρκετά υλικά με τις αρχές της sol-gel τεχνολογίας. [20, 21]

5.ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

5.1. Ιστορικά Στοιχεία

Ο όρος “χρωματογραφία” εισήχθη για πρώτη φορά από τον Ρώσο βοτανολόγο Mikhail Semenovich Tswett, το 1906. Η ανακάλυψη της χρωματογραφίας από τον Tswett έγινε στο πλαίσιο της έρευνάς του σχετικά με τις δραστικές ουσίες των φυτών. Χρησιμοποίησε χρωματογραφική στήλη με ανθρακικό ασβέστιο ως πληρωτικό μέσο και μίγματα πετρελαϊκού αιθέρα και αιθανόλης, ως μέσο έκλουσης για το διαχωρισμό χλωροφύλλης και καροτενοειδών. Η διαχωριστική αυτή μέθοδος περιγράφηκε για πρώτη φορά στις 30 Δεκεμβρίου του 1901, στο XI Συνέδριο Φυσιοφιδών και Ιατρών, στην Αγ. Πετρούπολη. Ωστόσο, ο Tswett λίγα χρόνια αργότερα, το 1906, δημοσιεύει στο περιοδικό *Bulletins of the German Botanical Society*, την εργασία με τίτλο: «Adsorption analysis and chromatographic method. Application to the chemistry of chlorophyll», όπου πρωτοεμφανίζεται ο όρος “χρωματογραφία”. [22, 12]

Μέχρι τη δεκαετία του 1960, πολλοί ερευνητές ασχολήθηκαν με χρωματογραφικά συστήματα, όπως οι Edgar Lederer, Richard Kuhn, Martin και Synge. Οι τελευταίοι μάλιστα έλαβαν το Νόμπελ Χημείας, το 1952, για την καινοτόμα ερευνά τους στο πεδίο της χρωματογραφίας. Ταυτόχρονα είχαν ήδη χρησιμοποιηθεί και διασαφηνιστεί όροι, όπως χρωματογραφία επί χάρτου, χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής, αέρια χρωματογραφία, χρωματογραφία ιοντικού αποκλεισμού και υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. [22, 12]

Την περίοδο 1964-65, ο Ούγγρος επιστήμονας Csaba Horvath σχεδιάζει τον πρώτο υγρό χρωματογράφο με τη μορφή που έχει έως και σήμερα, θέτοντας έτσι νέες βάσεις στο πεδίο της Αναλυτικής Χημείας. [12]

5.2. Γενικά Στοιχεία

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης, High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) ανήκει στις διαχωριστικές τεχνικές, εμφανίζοντας ολοένα και πιο πολλές εφαρμογές. Καθώς θεωρείται η πλέον κατάλληλη για τον ακριβή και επαναλήψιμο προσδιορισμό ενός μεγάλου εύρους χημικών ενώσεων, οργανικών, αλλά και ανόργανων. Η σύγχρονη τεχνική της HPLC αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας στήλης, διαφέρει όμως, αφού χρησιμοποιεί μικρόκοκκα υλικά πλήρωσης και εφαρμόζει υψηλές πιέσεις. Ακόμη υπερτερεί έναντι της

χρωματογραφίας στήλης, στην επίτευξη ταχύτερων και μεγαλύτερων αποδόσεων διαχωρισμών μιγμάτων. [23]

Ο διαχωρισμός στην χρωματογραφική τεχνική της HPLC είναι αποτέλεσμα συνδυαστικής δράσης της στατικής και της κινητής φάσης. Στην HPLC, το δείγμα εισάγεται στην κορυφή της στήλης και με τη βοήθεια της κινητής φάσης, τα συστατικά που μετακινούνται με τη μορφή ζωνών, τελικά εκκλύονται το ένα μετά το άλλο. Τα συστατικά κατανέμονται σε διαφορετικό βαθμό στις δύο φάσεις. Κατά την εισαγωγή του δείγματος στο χρωματογραφικό σύστημα, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις κατανέμονται μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης, με αποτέλεσμα να μετακινούνται με διαφορετικές ταχύτητες, κατά μήκος της διαχωριστικής στήλης. Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι δυνατή η χρήση μίγματος διαλυτών, καθώς και η βαθμιαία μεταβολή της σύστασης της κινητής φάσης. [23]

Ο χρόνος ανάλυσης με την HPLC συνήθως διαρκεί μερικά λεπτά, ενώ η ακρίβεια και η επαναληψιμότητά της είναι αρκετά ικανοποιητικές. Γενικά, πρόκειται για μία ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική που υπερισχύει σε σχέση με τις υπόλοιπες χρωματογραφικές τεχνικές. [23]

5.3. Μηχανισμοί της HPLC

Στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης μπορούν να εφαρμοστούν όλα τα είδη των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με χρήση κατάλληλου υλικού πλήρωσης ως στατική φάση και διαλύτη έκλυσης, ως κινητή φάση. Στη συνέχεια αναφέρονται τα είδη των μηχανισμών που εφαρμόζονται.

5.3.1. Χρωματογραφία προσρόφησης

Ο διαχωρισμός βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης των συστατικών στη στατική φάση. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ενώσεων με παρόμοια δομή, αλλά διαφορετική πολικότητα. Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας ανάμεσα στη στατική και στην κινητή φάση, προκύπτουν δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης, η χρωματογραφία κανονικής φάσης και η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.

Στη χρωματογραφία κανονικής φάσης, η στατική φάση (κυρίως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πιο πολική από την κινητή (συνήθως μίγμα μη πολικών διαλυτών, όπως

εξάνιο/τολουόλιο). Ενώ, η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης λαμβάνει χώρα, όταν η στατική φάση (συνήθως είναι SiO_2 δεσμευμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια, αμινομάδες κ.ά.) είναι λιγότερο πολική από την κινητή φάση (κυρίως αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών, όπως μεθανόλη, ακετονιτρίλιο σε συνδυασμό με ρυθμιστικά διαλύματα και νερό). Η χρωματογραφία αντίστροφης φάσης είναι η πιο δημοφιλής, αφού καλύπτει το μεγαλύτερο ποσοστό των αναλυτικών εφαρμογών.

5.3.2. Χρωματογραφία κατανομής

Σε αυτό το είδος χρωματογραφίας, ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των διάφορων συστατικών μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στον προσδιορισμό ομόλογων, μη ιονικών ενώσεων.

5.3.3. Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Ο διαχωρισμός βασίζεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των προς προσδιορισμό ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Ως πληρωτικά υλικά χρησιμοποιούνται κυρίως ρητίνες, οι οποίες αποτελούν συμπολυμερή στυρενίου - διβινυλοβενζολίου, στα οποία έχουν τοποθετηθεί σουλφονικές ή καρβοξυλικές ομάδες.

5.3.4. Χρωματογραφία συγγένειας

Στη χρωματογραφία συγγένειας, ο διαχωρισμός οφείλεται στην εκλεκτική δέσμευση των προσδιοριζόμενων συστατικών από υποκαταστάτες (ligand), οι οποίοι είναι δεσμευμένοι στην επιφάνεια του SiO_2 της στατικής φάσης.

5.3.5. Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους

Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται χάρη στο διαφορετικό σχήμα και μέγεθος των προσδιοριζόμενων μορίων. Αυτό το είδος χρωματογραφίας βρίσκει κυρίως εφαρμογή στον προσδιορισμό των πολυμερών. Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, σε αντίθεση με τα μικρότερα μόρια, τα οποία καθυστερούν, καθώς εισέρχονται και στους πόρους της στατικής φάσης. [23, 24]

5.4. Οργανολογία της HPLC

Ένα τυπικό σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης περιλαμβάνει τις εξής διατάξεις:

1. Φιάλη (ες) αποθήκευσης διαλυτών.
2. Αντλία.
3. Μονάδα εισαγωγής δείγματος.
4. Χρωματογραφική στήλη.
5. Ανιχνευτής.
6. Σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων.

Στην αναλυτική στήλη, πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης, μέσα από το υλικό πλήρωσης της στήλης, επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας υψηλής πίεσης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός ξεκινά κατά την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη, με τη βοήθεια της ειδικής βαλβίδας. Κάθε ένα από τα συστατικά του δείγματος εκλούεται και εμφανίζεται ως κορυφή (κωδωνοειδής καμπύλη Gauss) στο σύστημα καταγραφής. Η απόκριση του ανιχνευτή για κάθε ένα από τα συστατικά του δείγματος που απεικονίζεται σε υπολογιστή (παλαιότερα σε χαρτί) αποτελεί το χρωματογράφημα του διαχωρισμού και η αποθήκευση των αναλυτικών δεδομένων γίνεται σε ηλεκτρονικό υπολογιστή. [23] Στο Σχήμα 5.1. απεικονίζεται η διάταξη της HPLC που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες της παρούσας διπλωματικής.



Σχήμα 5.1. Διάταξη HPLC που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διπλωματική εργασία.

5.4.1. Φιάλες παροχής διαλυτών

Πρόκειται συνήθως για φιάλες ή δοχεία αποθήκευσης των διαλυτών που συνοδεύονται από ένα σύστημα απαέρωσης. Στην περίπτωση της ισοκρατικής έκλυσης αρκεί μία μόνο φιάλη διαλύτη, καθώς η σύσταση της κινητής φάσης διατηρείται αμετάβλητη κατά τη διάρκεια της ανάλυσης. Ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν μέχρι και τέσσερις φιάλες στην περίπτωση της βαθμωτής έκλυσης, όπου μεταβάλλεται κατά την ανάλυση η σύσταση της κινητής φάσης. Αφού λοιπόν πραγματοποιείται ανάμιξη διαλυτών, κρίνεται απαραίτητη η απαέρωσή τους. Αυτό συμβαίνει γιατί οι φυσαλίδες που δημιουργούνται από το διαλυμένο άζωτο και οξυγόνο του αέρα μπορούν να προκαλέσουν θόρυβο στον ανιχνευτή (αστάθεια στη βασική γραμμή) και απώλεια της ικανότητας της στήλης.

Η απαέρωση μπορεί να γίνει είτε με διαβίβαση ηλίου, το οποίο συντελεί στην απομάκρυνση του διαλυμένου αζώτου και οξυγόνου, είτε με χρήση υπερήχων και εφαρμογή κενού.

Όσον αφορά στη σύσταση της κινητής φάσης, μπορεί να είναι μίγμα διάφορων οργανικών διαλυτών ή και νερού, μπορεί επίσης να απαιτείται ρύθμιση pH με κατάλληλα ρυθμιστικά διαλύματα. Ορισμένες φορές, ειδικά αν έχει προηγηθεί για την παρασκευή της κινητής φάσης διαλυτοποίηση κάποιου στερεού, είναι απαραίτητη η διήθηση για την απομάκρυνση αιωρούμενων στερεών που μπορούν να φράξουν το σύστημα και να προκαλέσουν προβλήματα κατά τη διάρκεια της ανάλυσης.

Ένας διαλύτης που χρησιμοποιείται ως κινητή φάση στην υγρή χρωματογραφία θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, ορισμένες εκ των οποίων είναι:

1. Να είναι υψηλής καθαρότητας και κατάλληλος για χρωματογραφία.
2. Να είναι οικονομικός.
3. Να μην είναι τοξικός ή να είναι χαμηλής τοξικότητας.
4. Να μην απορροφά στο UV.
5. Να μην καταστρέφει το δείγμα.
6. Να μην είναι πτητικός.
7. Να είναι αποτελεσματικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις
8. Να έχει χαμηλό ιξώδες, χαμηλή πίεση επαναφοράς και μεγάλη ικανότητα διαχωρισμού. [23]

5.4.2. Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η μονάδα εισαγωγής του δείγματος παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης. Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με χρήση μικροσύριγγας, με ειδική βαλβίδα εισαγωγής δείγματος, είτε με αυτόματο δειγματολήπτη. Η μικροσύριγγα, με την οποία η εισαγωγή του δείγματος γίνεται απευθείας, δεν είναι τόσο χρησιμοποιούμενη, καθώς εμφανίζει αρκετά προβλήματα. Η ειδική βαλβίδα εισαγωγής χαρακτηρίζεται ως διάταξη εισαγωγής δείγματος υψηλής πίεσης. Αποτελείται από ένα βρόχο (loop), ο οποίος μπορεί να έχει χωρητικότητα 10 ή 20 μL , και στον οποίο εισάγεται ο όγκος του δείγματος με μια μικροσύριγγα. Εν συνεχεία, η κινητή φάση μεταφέρει το δείγμα στη στήλη, με περιστροφή της βαλβίδας από τη θέση πλήρωσης (load), στη θέση εισαγωγής (inject). Με τη χρήση βρόχου, έχουμε ακριβή και επαναλήψιμο όγκο σε κάθε ανάλυση. Οι αυτόματοι δειγματολήπτες αποτελούνται από τη βαλβίδα εισαγωγής, το βρόχο του δείγματος, τη σύριγγα, τα φιαλίδια που περιέχουν τα δείγματα και το δίσκο, όπου τοποθετούνται αυτά. Σαφώς, οι αυτόματοι δειγματολήπτες παρέχουν περισσότερη ασφάλεια, αφού δεν υπεισέρχεται το ανθρώπινο σφάλμα. Όποιο σύστημα εισαγωγής δείγματος υπάρχει στη διάθεση του αναλυτή θα πρέπει να εξασφαλίζει την εισαγωγή του δείγματος χωρίς αραίωση (αραίωση εμφανίζεται στη βαλβίδα εισαγωγής δείγματος) και ο διαχωρισμός να είναι επιτυχής χωρίς διασπορά. [23]

5.4.3. Χρωματογραφικές στήλες της HPLC

Η αναλυτική στήλη αποτελεί την καρδιά του χρωματογραφικού συστήματος. Πρέπει να είναι υψηλής πιστότητας για να δίνει ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Η στήλη αποτελείται από τον εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης στο εσωτερικό της. Ο εξωτερικός κύλινδρος συνήθως είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι ή πολυμερές. Ενώ το υλικό πλήρωσης βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που πρόκειται να διαχωριστούν. Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης έχουν ως βάση την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου, γιατί έχει μικρό κόστος και δεν καταστρέφεται εύκολα. [23]

5.4.4. Ανιχνευτές HPLC

Οι ανιχνευτές σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας χρησιμοποιούνται για τον συνεχή έλεγχο του υγρού που βγαίνει από τη στήλη. Ορισμένοι ανιχνευτές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης είναι ορατού-υπεριώδους, παράταξης φωτοδιόδων, αγωγιμομετρικοί, δείκτη διάθλασης, φασματογράφοι μάζας, φθορισμομετρικοί, ηλεκτροχημικοί κ.ά.

Ένα ανιχνευτής θα πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως:

1. Χαμηλό επίπεδο θορύβου.
2. Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής.
3. Μικρός χρόνος απόκρισης.
4. Μικρός νεκρός όγκος.
5. Ανεξαρτησία στις μεταβολές της θερμοκρασίας και της ροής.
6. Ευελιξία στις μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης.
7. Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση.
8. Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων.
9. Μη καταστροφή του αναλυόμενου δείγματος. [23]

6. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου δίνει στο χημικό τη δυνατότητα να εκτιμήσει αν η μέθοδος δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα. Κατά τη διαδικασία της επικύρωσης εξετάζεται αν το σύστημα δίνει ακριβή, επαναλήψιμα και αξιόπιστα αναλυτικά αποτελέσματα, εάν κρίνεται δηλαδή κατάλληλο για το σκοπό που προορίζεται (fitness for purpose) και ανταποκρίνεται στις εκάστοτε προδιαγραφές.

Επικύρωση απαιτείται από διάφορους κανονισμούς στο πλαίσιο της Ορθής Εργαστηριακής Πρακτικής (Good Laboratory Practice, GLP), καθώς και από το πρότυπο ISO 17025:2005. Οι μέθοδοι που χρήζουν επικύρωσης είναι οι μη πρότυπες μέθοδοι, μέθοδοι που σχεδιάζονται από το εργαστήριο (in-house methods), πρότυπες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται εκτός αντικειμένου και τροποποιημένες πρότυπες μέθοδοι. Τα χαρακτηριστικά ποιότητας που εξετάζονται κατά τη διαδικασία της επικύρωσης μίας αναλυτικής μεθόδου είναι τα εξής:

1. Ακρίβεια.
2. Πιστότητα.
3. Γραμμικότητα.
4. Εύρος.
5. Ευαισθησία.
6. Όριο ανίχνευσης.
7. Όριο ποσοτικής αποτίμησης.
8. Ανθεκτικότητα / Αντοχή.
9. Εκλεκτικότητα.
10. Ειδικότητα.
11. Σταθερότητα.
12. Πρακτικότητα / Εφαρμοσιμότητα.

Η **ακρίβεια (accuracy)** είναι ο βαθμός συμφωνίας των αποτελεσμάτων που εξάγονται από τη μέθοδο, με την πραγματική τιμή ή μία αποδεκτή ως πραγματική τιμή. Ποσοτικά, η ακρίβεια εκφράζεται από το σχετικό σφάλμα μέτρησης, το οποίο δίνεται από τη σχέση:

$$\text{τυπικό σφάλμα}(\%) = \frac{\text{μέση ευρεθείσα τιμή} - \text{πραγματική τιμή}}{\text{πραγματική τιμή}} \times 100$$

Ως **πιστότητα (precision)**, ορίζεται η εγγύτητα μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξαρτητών δοκιμών υπό ρητά καθορισμένες συνθήκες. Το μέτρο της πιστότητας

εκφράζεται με όρους μη πιστότητας και υπολογίζεται ως τυπική απόκλιση του αποτελέσματος της δοκιμής. Η πιστότητα έχει τρεις συνιστώσες, την επαναληψιμότητα, την ενδιάμεση πιστότητα και την αναπαραγωγιμότητα.

Η **γραμμικότητα (linearity)** μίας αναλυτικής μεθόδου είναι η ικανότητα να υπολογίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων, ή με προκαθορισμένες μαθηματικές μετατροπές, σε αναλογία με τη συγκέντρωση των προσδιοριζόμενων συστατικών ενός δείγματος σε συγκεκριμένο εύρος συγκεντρώσεων.

Το **εύρος (range)** μίας μεθόδου συνδέεται με τη γραμμικότητά της. Το εύρος καθορίζει το διάστημα ανάμεσα στη χαμηλότερη και την υψηλότερη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Ο όρος **ευαισθησία (sensitivity)** αναφέρεται στην ικανότητα της μεθόδου να αναγνωρίζει μικρές μεταβολές στη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού.

Ως **όριο ανίχνευσης (limit of detection, LOD)**, χαρακτηρίζεται η μικρότερη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού στο δείγμα, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί, αλλά όχι απαραίτητα να ποσοτικοποιηθεί. Δίνεται από τον τύπο:

$$LOD = \frac{3,3\sigma}{S}$$

Όπου σ είναι η τυπική απόκλιση της απόκρισης του σήματος και S είναι η κλίση της καμπύλης αναφοράς του συστατικού.

Ως **όριο ποσοτικής αποτίμησης (limit of quantification, LOQ)** ορίζεται η χαμηλότερη συγκέντρωση του προσδιοριζόμενου συστατικού στο δείγμα, η οποία προσδιορίζεται ποσοτικά με συγκεκριμένη ακρίβεια και επαναληψιμότητα. Δίνεται από τον τύπο:

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

Η **ανθεκτικότητα (ruggedness)**, εξετάζεται στη φάση της ανάπτυξης μεθόδου και περιγράφει την σταθερότητα της σε σκόπιμες μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων. Πραγματοποιείται, πειραματικός σχεδιασμός για να μελετηθούν διάφορες μεταβολές των πειραματικών παραμέτρων και εντοπίζονται αυτές, που επηρεάζουν τη μέθοδο, ώστε να τεθούν μέτρα ελέγχου. Σχετίζεται με την αντοχή (robustness) της μεθόδου σε τυχαίες μη σκοπούμενες μικρομεταβολές των πειραματικών παραμέτρων που αντιστοιχούν στον έλεγχο της διεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας.

Ως *εκλεκτικότητα (selectivity)* μίας αναλυτικής μεθόδου ορίζεται η ικανότητα αυτής να μετρά ένα συστατικό, παρουσία άλλων που παρεμποδίζουν.

Ως *ειδικότητα (specification)* νοείται η ικανότητα μιας μεθόδου να διακρίνει μια μετρούμενη προσδιοριζόμενη ουσία από άλλες ουσίες.

Η *σταθερότητα (stability)* εκφράζει το πόσο σταθερά είναι τα διάφορα δείγματα, εμβολιασμένα και πρότυπα, κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους που συνοδεύεται από ψύξη και απόψυξη αυτών.

Τέλος, χρήσιμο είναι να εκτιμηθεί η *εφαρμοσιμότητα* που έχει η μέθοδος σε πραγματικά δείγματα. [2, 25]

6.1. Κριτήρια επίδοσης αναλυτικών χρωματογραφικών μεθόδων σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC

Η απόφαση 2002/657/EC είναι η οδηγία που αφορά στην επίδοση των αναλυτικών μεθόδων σχετικά με την παρουσία καταλοίπων φαρμακευτικών σκευασμάτων σε προϊόντα ζωικής προέλευσης. Σύμφωνα με την παρούσα οδηγία, όπως αναφέρεται στο κανονιστικό της πλαίσιο, τα χαρακτηριστικά επίδοσης που εξετάζονται αναφέρονται παρακάτω.

Ειδικότητα (specification). Για τις αναλυτικές μεθόδους έχει σημασία η ικανότητα διάκρισης ανάμεσα στην προσδιοριζόμενη ένωση και σε συγγενικές ενώσεις (ισομερή, μεταβολίτες, προϊόντα αποικοδόμησης, ενδογενείς ουσίες, συστατικά της μήτρας, κ.λπ.). Πρέπει συνεπώς να επιλέγονται δυνητικά παρεμποδίζουσες ουσίες και να αναλύονται τα σχετικά τυφλά δείγματα για να ανιχνεύεται η παρουσία ενδεχόμενων παρεμποδίσεων και να υπολογίζεται η επίδρασή τους.

Ορθότητα (precision). Η ορθότητα μπορεί να εξακριβωθεί μόνο μέσω πιστοποιημένου υλικού αναφοράς (CRM). Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά στο ISO 5725-4.

Ορθότητα (%) = μέση ευρεθείσα συγκέντρωση διορθωμένη ως προς την ανάκτηση $\times 100$ / πιστοποιημένη τιμή

Ανθεκτικότητα (ruggedness). Στις μελέτες αυτού του είδους τα εργαστήρια εισάγουν σκόπιμα λογικές μεταβολές ήσσονος σημασίας και παρατηρούν τις

συνέπειες. Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του Youden, διεξάγεται μια δοκιμή ανθεκτικότητας, πρόκειται για έναν κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό.

Η βασική ιδέα δεν είναι να εξετάζεται μία μεταβολή κάθε φορά, αλλά να εισάγονται πολλές μεταβολές ταυτοχρόνως. Γίνεται η υπόθεση ότι τα A, B, C, D, E, F, G παριστάνουν τις ονομαστικές τιμές επτά διαφορετικών παραγόντων που θα μπορούσαν να επηρεάσουν τα αποτελέσματα, εάν οι ονομαστικές τους τιμές μεταβληθούν ελαφρώς. Έστω, ότι οι εναλλακτικές τους τιμές παριστάνονται από τα αντίστοιχα μικρά γράμματα a, b, c, d, e, f και g. Υπάρχουν 2^7 ή 128 διαφορετικοί δυνατοί συνδυασμοί.

Είναι δυνατόν να επιλεγθεί ένα υποσύνολο οκτώ συνδυασμών από τους παραπάνω που περιλαμβάνουν ίσο αριθμό κεφαλαίων και μικρών γραμμάτων. Πραγματοποιούνται οκτώ προσδιορισμοί που χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό των επιλεγμένων παραγόντων (A-G) και τα αποτελέσματα των προσδιορισμών αναφέρονται από S έως Z, όπως φαίνεται στον Πίνακα 6.1.

Πίνακας 6.1. Προσέγγιση πειραματικού σχεδιασμού κατά Youden.

Παράγοντες	Ονομαστικές	Εναλλακτικές	Αριθμός Πειράματος							
	Τιμές	Τιμές	1	2	3	4	5	6	7	8
A	A	a	A	A	A	A	a	a	a	a
B	B	b	B	B	b	b	B	B	b	b
C	C	c	C	c	C	c	C	c	C	c
D	D	d	D	D	d	d	d	d	D	D
E	E	e	E	e	E	e	e	E	e	E
F	F	f	F	f	f	F	F	f	f	F
G	G	g	G	g	g	G	g	G	G	g
Αποτέλεσμα			s	t	u	v	w	x	y	z

Σταθερότητα (stability). Η μελέτη σταθερότητας κρίνεται σκόπιμη, αφού έχει παρατηρηθεί ότι είναι ανεπαρκής η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ουσίας ή των συστατικών του υποστρώματος στο δείγμα, κατά την αποθήκευση ή την ανάλυση, κάτι που μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αποκλίσεις στο αποτέλεσμα της

ανάλυσης. Ακόμη, πρέπει να ελέγχεται η σταθερότητα του προτύπου βαθμονόμησης στο διάλυμα.

Καμπύλες βαθμονόμησης (calibration curves). Επιλέγονται τουλάχιστον πέντε επίπεδα για τη χάραξη της καμπύλης. Το εύρος εργασίας της καμπύλης πρέπει να περιγράφεται, όπως και ο μαθηματικός τύπος της καμπύλης.

Ανάκτηση (recovery). Εάν δεν υπάρχει διαθέσιμο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, η ανάκτηση πρέπει να προσδιορίζεται με έξι υποπολλαπλάσια δείγματα τυφλού υλικού, εμβολιασμένα με ποσότητα ίση με 0,5, 1 και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο. Τα αποτελέσματα εξάγονται από τον τύπο:

$$\% \text{ανάκτηση} = \frac{100 \text{χευρεθείσα συγκέντρωση}}{\text{επίπεδο εμβολισμού}}$$

Επαναληψιμότητα (repeatability). Ένα σύνολο δειγμάτων με τα ίδια υποστρώματα εμβολιάζονται με την προσδιοριζόμενη ένωση με ποσότητα ίση με 0,5, 1 και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο και σε κάθε επίπεδο η ανάλυση πραγματοποιείται έξι φορές. Υπολογίζονται οι συνολικές μέσες συγκεντρώσεις και οι συντελεστές μεταβλητότητας, CV των εμβολιασμένων δειγμάτων. [26]

Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (within-laboratory reproducibility).

Αναλύονται εμβολιασμένα δείγματα σε συγκεντρώσεις που ισοδυναμούν με 0,5 φορά, 1 φορά και 1,5 φορά το επιτρεπόμενο όριο. Σε κάθε επίπεδο η ανάλυση πρέπει να γίνεται έξι φορές. Η ανάλυση πρέπει να γίνεται τουλάχιστον άλλες δύο φορές με διαφορετικούς χειριστές και διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, π.χ. διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαλυτών κ.λπ., διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, διαφορετικά όργανα, κ.λπ. εάν είναι δυνατόν. Υπολογίζονται η μέση συγκέντρωση, η τυπική απόκλιση και το συντελεστή μεταβλητότητας των εμβολιασμένων δειγμάτων.

Αναπαραγωγιμότητα (between-laboratory reproducibility). Όταν κρίνεται σκόπιμη η μελέτη της αναπαραγωγιμότητας, το εργαστήριο θα πρέπει να συμμετέχει σε διεργαστηριακά σχήματα, σύμφωνα με το ISO 5725-2.

Όριο απόφασης (CC_α). Ως όριο απόφασης (CC_α), νοείται το όριο, στο οποίο και πάνω από το οποίο μπορεί να αποφασισθεί ότι ένα δείγμα είναι μη συμμορφούμενο με πιθανότητα σφάλματος α.

Στην περίπτωση ουσιών, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_α καθορίζεται, αναλύοντας τουλάχιστον 20 τυφλά υλικά ανά υπόστρωμα, για να υπολογιστεί ο λόγος του σήματος προς το θόρυβο το χρονικό διάστημα, κατά το

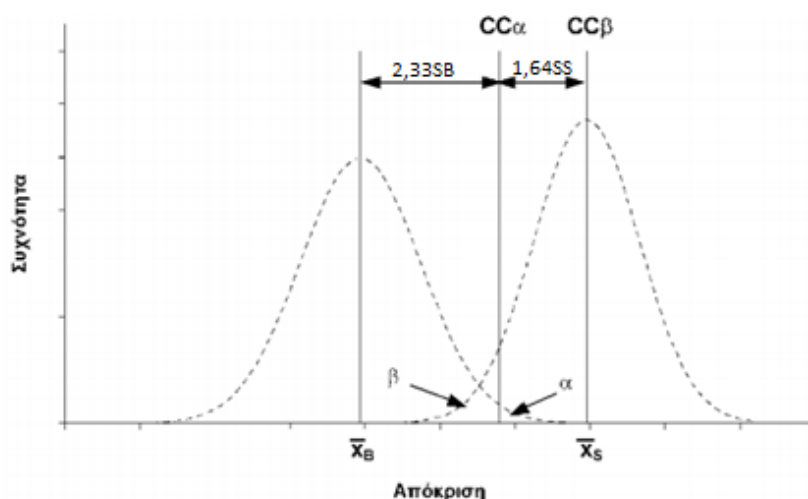
οποίο αναμένεται η προσδιοριζόμενη ένωση. Το τριπλάσιο του λόγου του σήματος προς τον θόρυβο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όριο απόφασης. Στην περίπτωση ουσιών για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_{α} καθορίζεται, αναλύοντας τουλάχιστον 20 τυφλά υλικά ανά υπόστρωμα, εμβολιασμένα με την προσδιοριζόμενη ένωση ή ενώσεις στο επιτρεπόμενο όριο. Η συγκέντρωση στο επιτρεπόμενο όριο συν 1,64 φορές την αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ισούται με το όριο απόφασης ($\alpha = 5\%$).

Ικανότητα ανίχνευσης (CC_{β}). Ως ικανότητα ανίχνευσης (CC_{β}), νοείται η μικρότερη περιεκτικότητα σε ουσία που μπορεί να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί ή/και να προσδιορισθεί ποσοτικά σε ένα δείγμα, με πιθανότητα σφάλματος β . Στην περίπτωση ενώσεων, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, η ικανότητα ανίχνευσης είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση, για την οποία μια μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύσει τα εμβολιασμένα δείγματα, με στατιστική βεβαιότητα 1- β . Στην περίπτωση ουσιών, για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, αυτό σημαίνει ότι η ικανότητα ανίχνευσης είναι η συγκέντρωση, στην οποία η μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύει συγκεντρώσεις στο επιτρεπόμενο όριο με στατιστική βεβαιότητα 1- β .

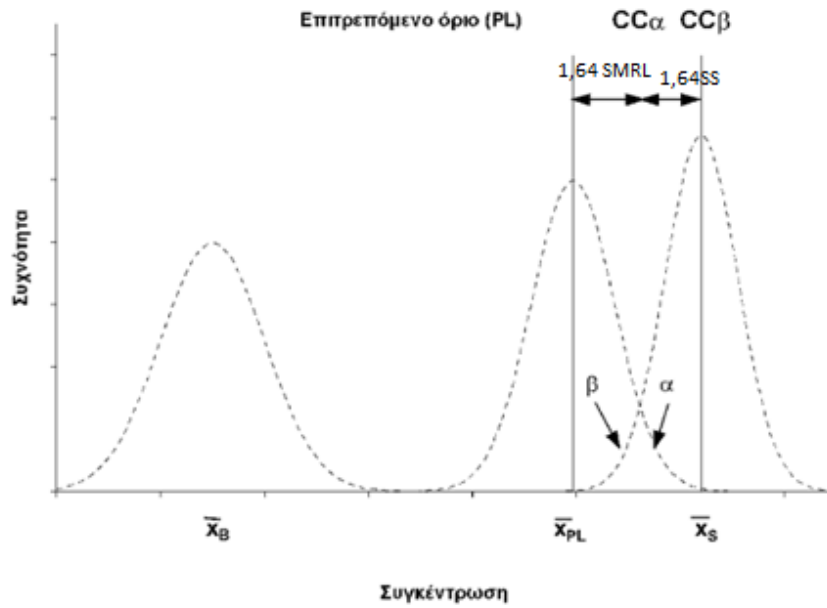
Στην περίπτωση ουσιών, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_{β} υπολογίζεται με ανάλυση τουλάχιστον 20 τυφλών υλικών ανά υπόστρωμα εμβολιασμένων με την προς ανάλυση ουσία ή ουσίες στο όριο απόφασης. Η τιμή του ορίου απόφασης συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μετρηθείσας περιεκτικότητας, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης ($\beta=5\%$). Στην περίπτωση ουσιών, για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_{β} καθορίζεται αναλύοντας τουλάχιστον 20 τυφλά υλικά ανά υπόστρωμα, εμβολιασμένα με την προς ανάλυση ουσία ή ουσίες, στο όριο απόφασης. Η τιμή του ορίου απόφασης συν 1,64 φορές την αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης ($\beta=5\%$).

Στα Σχήματα 6.1. και 6.2., φαίνονται οι γραφικές παραστάσεις των δύο ορίων CC_{α} και CC_{β} για ενώσεις, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί ανώτατο επιτρεπτό όριο και για τις ενώσεις, για τις οποίες έχει καθοριστεί αντίστοιχα. Στο Σχήμα 6.1., X_s είναι η μέση τιμή απόκρισης του εμβολιασμένου δείγματος, S_B η τυπική απόκλιση του τυφλού δείγματος υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, S_s η τυπική απόκλιση του εμβολιασμένου δείγματος, υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, α το ποσοστό ψευδώς μη συμμορφούμενων αποτελεσμάτων, β

το ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων, CC_α απόκριση με δεδομένο σφάλμα α και 50% σφάλμα β και CC_β απόκριση με πολύ μικρό «σφάλμα α » και δεδομένο «σφάλμα β ». Στο Σχήμα 6.2., \bar{X}_B είναι η μέση συγκέντρωση του τυφλού δείγματος, X_{PL} η μέση συγκέντρωση δείγματος που περιέχει την προσδιοριζόμενη ένωση στο επιτρεπόμενο όριο, \bar{X}_S η μέση συγκέντρωση του εμβολιασμένου δείγματος, S_{PL} η τυπική απόκλιση του δείγματος που περιέχει την προσδιοριζόμενη ένωση στο επιτρεπόμενο όριο, υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, S_S η τυπική απόκλιση του εμβολιασμένου δείγματος, υπό συνθήκες αναπαραγωγιμότητας, α το ποσοστό ψευδώς μη συμμορφούμενων αποτελεσμάτων, β το ποσοστό ψευδώς συμμορφούμενων αποτελεσμάτων, CC_α απόκριση με δεδομένο σφάλμα α και 50% σφάλμα β και CC_β απόκριση με πολύ μικρό σφάλμα α και δεδομένο σφάλμα β .



Σχήμα 6.1. Γραφική παράσταση των δύο ορίων CC_α και CC_β για ενώσεις, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί ανώτατο επιτρεπόμενο όριο.



Σχήμα 6.2. Γραφική παράσταση των δύο ορίων CC_α και CC_β για ενώσεις, για τις οποίες έχει καθοριστεί ανώτατο επιτρεπόμενο όριο.

Αξίζει να σημειωθεί, ότι στην απόφαση 2002/657/EC δεν περιγράφονται οι όροι όριο ανίχνευσης και όριο ποσοτικής αποτίμησης, καθώς αυτοί οι δύο όροι καλύπτονται από το όριο απόφασης και το όριο ποσοτικής αποτίμησης. [26, 27]

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

Πραγματοποιήθηκε βιβλιογραφική ανασκόπηση σε δημοσιευμένες εργασίες, στις οποίες χρησιμοποιούνται μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή για τον προσδιορισμό διάφορων ενώσεων στο γάλα. Ακολούθησε βιβλιογραφική αναζήτηση για εντοπισμό εργασιών, όπου χρησιμοποιούνται μοριακώς αποτυπωμένα πολυμερή αποκλειστικά για την εκχύλιση σουλφοναμιδίων από γάλα.

7.1. Βιβλιογραφική ανασκόπηση εργασιών που αναφέρονται στη χρήση των MIPs για τον προσδιορισμό διαφόρων ενώσεων στο γάλα

Ο Xu X. και η ομάδα του δημοσίευσαν, τον Οκτώβριο του 2016, μία εργασία που αναφέρεται στην εφαρμογή μαγνητικών μοριακά αποτυπωμένων πολυμερών για την εκχύλιση της εξαμεθυλενοτετραμίνης (hexamethylenetetramine, HMT) σε δείγματα γάλακτος. Αέρια χρωματογραφία συζευγμένη με διπλή φασματοσκοπία μάζας (GC-MS/MS) χρησιμοποιήθηκε για τους προσδιορισμούς υπολειμμάτων HMT σε δείγματα γάλακτος. Η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην αέρια χρωματογραφία. Τα μαγνητικά σωματίδια MIP έδωσαν καλύτερα ποσοστά ανάκτησης από τα μαγνητικά σωματίδια NIP που χρησιμοποιήθηκαν. Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) βρέθηκαν 0,3 μg/kg και 1,0 μg/kg, αντίστοιχα. Η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) της επαναληψιμότητας της ανάλυσης κυμάνθηκε από 2,6% έως 5,2%, ενώ αυτή της πιστότητας κυμάνθηκε από 3,6% έως 11,5%. Τέλος, η ανάκτηση HMT σε δείγματα γάλακτος κυμάνθηκε από 88,7% έως 111,4%. [28]

Τον Ιούνιο του 2016, από τον Yuan Y. και τους συνεργάτες του, προτάθηκε μία μέθοδος για γρήγορη και εκλεκτική εκχύλιση δισφαινόλης A (BPA) από δείγματα γάλακτος. Στην τρέχουσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε μια νέα στρατηγική για την εκχύλιση της BPA από το γάλα, χρησιμοποιώντας μαγνητικά σφαιρίδια με επιφανειακά αποτυπωμένα σφαιρίδια πυρήνα που παρασκευάστηκαν με την τεχνική «reversible addition-fragmentation chain transfer», RAFT. Για την αποτύπωση δισφαινόλης A, επιλέχθηκε μία νέα μέθοδος που χρησιμοποιεί δύο λειτουργικά μονομερή. Η νέα μέθοδος παρασκευής των μαγνητικών μοριακών πολυμερών φαίνεται να έχει εξαιρετικά προσροφητικά αποτελέσματα. Ο προσδιορισμός της BPA έγινε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και φασματοφωτομετρικό ανιχνευτή

(HPLC-UV). Στα δείγματα γάλακτος η παρούσα μέθοδος εμφάνισε όρια ανίχνευσης μικρότερα από 3,7 µg/L. Όπως αναφέρεται, οι ανακτήσεις της BPA σε δείγματα γάλακτος βρέθηκαν να είναι μεταξύ 99,21%, 98,07% και 97,23% αντίστοιχα σε τρεις συγκεντρώσεις: 1,0 µmol/L, 10,0 µmol/L και 100,0 µmol/L. [29]

Το Νοέμβρη του 2016, δημοσιεύτηκε μία εργασία για τον προσδιορισμό της αμπικιλίνης σε αγελαδινό γάλα, με εφαρμογή MIP κατά το στάδιο της προκατεργασίας. Για τον προσδιορισμό της αμπικιλίνης αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος σε σύστημα HPLC-DAD. Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να παρασκευαστούν και να χαρακτηριστούν MIP, τα οποία απευθείας θα χρησιμοποιηθούν ως προσροφητικά υλικά στην εκχύλιση στερεάς φάσης. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε είναι ικανή να ανιχνεύει και να προσδιορίζει αμπικιλίνη σε συγκεντρώσεις κάτω από το ανώτατο επιτρεπτό όριο της Ευρωπαϊκής Ένωσης που είναι 4 µg/kg. Οι λαμβανόμενες ανακτήσεις ήταν υψηλότερες από 98%. Το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ), υπολογίστηκαν σύμφωνα με την οδηγία, Guidance for Industry, για τον FDA (2011) και εκτιμήθηκαν 10,7 και 35,8 µg/L αντίστοιχα. Τέλος, να σημειωθεί ότι η εκλεκτικότητα του MIP-AMP αξιολογήθηκε παρουσία άλλων δομικά παρόμοιων ενώσεων που ανήκουν επίσης στην κατηγορία της β-λακτάμης (αμοξικιλίνη, οξακιλλίνη, πενικιλίνη G) και το MIP ως ήταν αναμενόμενο δίνει καλύτερα αποτελέσματα για το μόριο-στόχο που είναι η αμπικιλίνη. [30]

Μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές εφαρμόστηκε ως υλικό ρόφησης στην τεχνική stir bar sorptive extraction, SBSE, με σκοπό την εκχύλιση μελαμίνης από δείγματα σκόνης γάλακτος. Για τον προσδιορισμό της μελαμίνης αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μέθοδος με την τεχνική HPLC-UV. Το εύρος της γραμμικής περιοχής ήταν από 0,0631 έως 12,6 ng/mL, με συντελεστή συσχέτισης 0,9983 και το όριο ανίχνευσης υπολογίστηκε 0,0127 ng/mL, με βάση τρεις φορές την αναλογία σήματος προς θόρυβο. Αυτή η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς στον προσδιορισμό της μελαμίνης σε κονιοποιημένη μορφή γάλακτος, με ικανοποιητικές ανακτήσεις πάνω από 87%. Η μέθοδος που προτάθηκε και εφαρμόστηκε είναι απλή και κατάλληλη για τον προσδιορισμό της μελαμίνης, που έχει μεγάλη σημασία για τον ποιοτικό έλεγχο των γαλακτοκομικών προϊόντων. [31]

Τέλος, από το εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Α.Π.Θ., προτάθηκε η εφαρμογή sol-gel MIP ως προσροφητικό υλικό στην εκχύλιση στερεάς φάσης για τον προσδιορισμό χλωραμφενικόλης στο γάλα. Για την εφαρμογή του τελικού

πρωτοκόλλου της εκχύλισης μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν διάφορες παράμετροι που θα μπορούσαν να επιδράσουν στο τελικό αποτέλεσμα, όπως ο τύπος, ο όγκος και ο ρυθμός ροής του διαλύτη έκλουσης, ο χρόνος φόρτωσης δείγματος, αλλά και ο χρόνος έκλουσης. Μελετήθηκε η εκλεκτικότητα του MIP σε σχέση με μόρια παρόμοιας δομής που ανήκαν στην ομάδα των αμφενικολών (όπως θειαμφενικόλη και χλωραμφενικόλη), αλλά και η διάρκεια ζωής του υλικού, το πόσες φορές δηλαδή το υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί δίνοντας ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ακόμη έγινε αξιολόγηση της εκλεκτικότητας σε σύγκριση με NIP υλικό. Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ορίσει ως ανώτατο επιτρεπτό όριο χλωραμφενικόλης στο γάλα τα 0,3 μg/kg. Μετρήσεις στο εύρος 0,1 έως 50 μg/kg πραγματοποιήθηκαν με την τεχνική LC-MS, ενώ οι μετρήσεις σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σε HPLC-UV. Στο χρωματογραφικό σύστημα HPLC-UV, το LOD και το LOQ υπολογίστηκαν 17 και 50 μg/kg αντίστοιχα, ενώ οι μετρήσεις στο LC-MS έδωσαν 0,1 και 0,3 LOD και LOQ, αντίστοιχα. Το όριο ανίχνευσης CC_{α} της μεθόδου υπολογίστηκε 53,5 μg/kg και η ικανότητα ανίχνευσης, CC_{β} , 56,7 μg/kg. [32]

7.2. Βιβλιογραφική ανασκόπηση εργασιών που αναφέρονται στην εφαρμογή MIPs στον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων στον γάλα

Παρ' όλο που στη βιβλιογραφία απαντώνται αρκετές εργασίες, στις οποίες προτείνεται η χρήση μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών, κατά το στάδιο της προκατεργασίας για εκχύλιση των συστατικών που ενδιαφέρουν, λίγες είναι αυτές που υπόσχονται τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων με MIPs και πολύ λιγότερες εκείνες που εφαρμόζουν μοριακά πολυμερή για εκχύλιση σουλφοναμιδίων από δείγματα γάλακτος.

Το Σεπτέμβριο του 2010, προτάθηκε από τον Xu W. και την ερευνητική του ομάδα ένα καινοτόμο μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές περιορισμένης πρόσβασης (restricted access-molecularly imprinted material, RA-MIP). Το υλικό αυτό εφαρμόστηκε ως προστήλη στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης, για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό επτά σουλφοναμιδίων, από δείγματα βοδινού γάλακτος. Πραγματοποιήθηκε απευθείας έγχυση δείγματος στην HPLC. Αυτό απλοποιεί και συντομεύει την αναλυτική διαδικασία. Τα αποτελέσματα έδειξαν καλή γραμμικότητα στην περιοχή των 2 έως 400 ng/mL (με $R > 0,998$), για τα επτά εξεταζόμενα σουλφοναμίδια. Οι ανακτήσεις όλων των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε τρία

επίπεδα συγκέντρωσης είναι μεταξύ 93% και 107% με RSD <8,0%. Τα όρια ποσοτικοποίησης και τα όρια ανίχνευσης είναι μικρότερα ή ίσα με 2,7 ng/mL και 0,8 ng/mL αντίστοιχα, πολύ χαμηλότερα από τα ανώτατα επιτρεπτά όρια της Ευρωπαϊκής και της Κινέζικης νομοθεσίας, για τα σουλφοναμίδια στο γάλα. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην HPLC, έδειξε να είναι ακριβής, με επαναλήψιμα αποτελέσματα και αξιόπιστη για τον σκοπό που προορίζεται. [33]

Το 2008, προτάθηκε από Κινέζους ερευνητές, μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές, ως στατική φάση σε στήλη HPLC, για τον προσδιορισμό σουλφαμεθαζίνης στο γάλα. Το MIP(SMZ) εναποτέθηκε επιτυχώς πάνω σε επιφάνεια πηκτής του πυριτίου, ώστε να προσαρμοστεί σε στήλη υγρής χρωματογραφίας. Η μέθοδος που αναπτύχθηκε ήταν γραμμική στην κλίμακα συγκεντρώσεων από 0,1 έως 50 µg/mL με συντελεστή συσχέτισης $R > 0,999$. Το όριο ανίχνευσης για την SMZ ήταν 25 ng/mL και οι λαμβανόμενες ανακτήσεις ήταν πάνω από 78% για συγκεντρώσεις, σε τρία επίπεδα 0,024, 0,24 και 0,48 µg/mL. Η παρούσα μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα γάλακτος της τοπικής αγοράς και η συγκέντρωση της SMZ σε αυτά ήταν 0,007 µg/mL. [34]

Σε μία μελέτη, η οποία διεξήχθη το 2006 στην Ισπανία, προτείνεται η σύνθεση και η αξιολόγηση ενός μοριακώς εκτυπωμένου πολυμερούς (MIP) ως εκλεκτικού ροφητικού εκχύλισης στερεάς φάσης, συζευγμένου με βολταμμετρικό ανιχνευτή, για την αποτελεσματική προσυγκέντρωση και τον προσδιορισμό της σουλφαμεθαζίνης στο γάλα. Η ανίχνευση της σουλφαμεθαζίνης στα δείγματα γάλακτος διεξήχθη με βολταμμετρία τετραγωνικού κύματος (SVW) σε υαλώδες ηλεκτρόδιο άνθρακα σε MeOH: οξικό οξύ (9:1 v/v). Αυτό το μίγμα διαλυτών χρησιμοποιήθηκε επίσης για την έκλυση της σουλφαμεθαζίνης από το MIP. Χρησιμοποιήθηκαν μικροστήλες εκχύλισης στερεάς φάσης, που περιείχαν 0,16-0,18 g MIP. Ο προσδιορισμός της σουλφαμεθαζίνης στο γάλα, έγινε σύμφωνα με το μέγιστο επιτρεπόμενο από την επιτροπή του *Codex Alimentarius* που είναι 25 mg/L. Η επιλεκτικότητα του MIP στην παρούσα εργασία αξιολογήθηκε λαμβάνοντας υπόψη διαφορετικές ουσίες με μοριακές δομές παρόμοιες με τη σουλφαμεθαζίνη. Η σουλφαμεθαζίνη προσδιορίστηκε σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος, σε δύο επίπεδα συγκέντρωσης: 696 mg/L σε βουτυρόγαλα που λαμβάνεται μετά την αποπρωτεΐνωση του γάλακτος και 25 mg/L και σε βουτυρόγαλα και σε γάλα πριν από την αποπρωτεΐνωση. Σε όλες τις περιπτώσεις επιτεύχθηκαν ανακτήσεις σχεδόν 100%. [35]

Οι Susan Sadeghi και Ali Motaharian κατασκεύασαν ένα νέο ευαίσθητο βολταμετρικό αισθητήρα για τον προσδιορισμό της σουλφαδιαζίνης. Ο αισθητήρας περιλαμβάνει ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα, τροποποιημένο με πολυμερές αποτυπωμένο με τη σουλφαδιαζίνη ως μόριο-στόχο. Για σύγκριση, παρασκευάστηκε ηλεκτρόδιο πάστας τροποποιημένου άνθρακα μη-αποτυπωμένου πολυμερούς. Διεξήχθησαν κυκλικοί μέθοδοι βολταμετρίας (CV) και διαφορικής παλμικής βολταμετρίας (DPV), για τη μελέτη της δέσμευσης και της ηλεκτροχημικής συμπεριφορά της σουλφαδιαζίνης στα τροποποιημένα ηλεκτρόδια πάστας άνθρακα. Το τροποποιημένο με MIP ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα ήταν ανάλογο προς τη συγκέντρωση σουλφαδιαζίνης εντός της περιοχής $2,0 \times 10^{-7}$ - $1,0 \times 10^{-4}$ mol/L με όριο ανίχνευσης και ευαισθησία $1,4 \times 10^{-7}$ mol/L και $4,2 \times 10^5$ $\mu\text{A/L mol}$, αντίστοιχα. [36]

Από τις εργασίες που βρέθηκαν στη βιβλιογραφία καμία δε χρησιμοποιεί MIP ως υλικό πλήρωσης στην εκχύλιση στερεάς φάσης για offline ταυτόχρονο προσδιορισμό περισσότερων του ενός σουλφοναμιδίων στο γάλα.

8. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

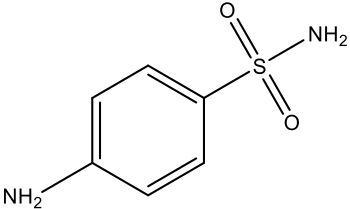
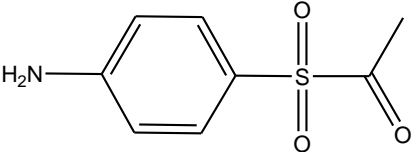
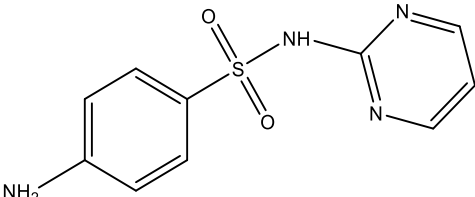
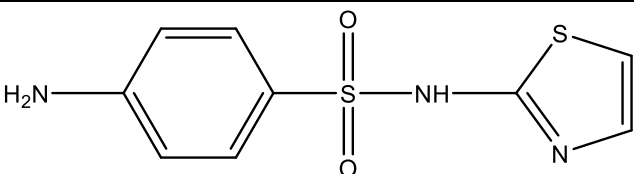
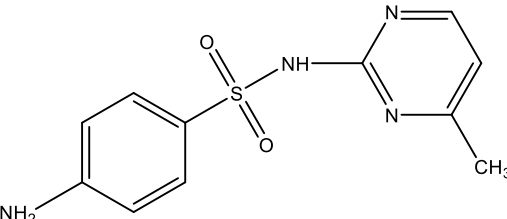
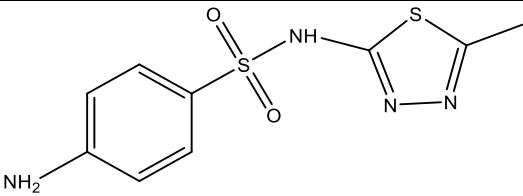
Η χρήση αντιβιοτικών σουλφοναμιδίων είτε ως πρόσθετα σε ζωοτροφές, είτε ως κτηνιατρικά φάρμακα, έχει ως αποτέλεσμα την παρουσία καταλοίπων σουλφοναμιδίων σε τελικά προϊόντα επεξεργασίας κρέατος ή σε γαλακτοκομικά προϊόντα, όπως το γάλα. Από την Ευρωπαϊκή Ένωση έχουν θεσπιστεί τα ανώτατα επιτρεπτά όρια καταλοίπων (MRL) σουλφοναμιδίων στο γάλα, αλλά και στα διάφορα είδη ιστών του κρέατος, όπως αναφέρεται στον κανονισμό 37/2010/ΕΕ.

Στην ανασκόπηση της βιβλιογραφίας αναφέρονται μέθοδοι για τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων σε διάφορα υποστρώματα συμπεριλαμβανομένου και του γάλακτος, χρησιμοποιώντας ποικίλες τεχνικές προκατεργασίας δείγματος. Ωστόσο δεν αναφέρεται κάποια τεχνική για offline ταυτόχρονο προσδιορισμό έξι σουλφοναμιδίων με εφαρμογή μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών ως ροφητικά υλικά στην εκχύλιση στερεάς φάσης. Ακόμη, για πρώτη φορά γίνεται χρήση της μαγνητικής κάψουλας και της τεχνικής FPSE, για προσδιορισμό σουλφοναμιδίων.

Έτσι, στην παρούσα διπλωματική εργασία, κρίθηκε σκόπιμο να αξιοποιηθεί το πλεονέκτημα της υψηλής εκλεκτικότητας των μοριακώς αποτυπωμένων πολυμερών. Σκοπός ήταν η ανάπτυξη μίας πρότυπης μεθόδου προκατεργασίας γάλακτος, με την τεχνική της στερεάς φάσης χρησιμοποιώντας ως προσροφητικό υλικό ένα MIP ταυτόχρονης μοριακής αποτύπωσης έξι σουλφοναμιδίων, σε συνδυασμό με την Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης. Το μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές που χρησιμοποιήθηκε είναι ικανό να αναγνωρίζει τα εξής έξι σουλφοναμίδια: σουλφανιλαμίδιο, σουλφακεταμίδη, σουλφαδιαζίνη, σουλφαθειαζόλη, σουλφαμεραζίνη, σουλφαμεθιζόλη. Οι δομές των σουλφοναμιδίων αυτών φαίνονται στο Σχήμα 8.1. Το πολυμερές έπειτα από δοκιμές και βελτιστοποιήσεις εφαρμόστηκε ως ροφητικό υλικό στην εκχύλιση στερεάς φάσης.

Η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδου προσδιορισμού των έξι σουλφοναμιδίων στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης έγινε σύμφωνα με την οδηγία 2002/657/ΕΕ. Επιπλέον, η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σε εμβολιασμένα δείγματα που παρασκευάστηκαν από γάλα του εμπορίου.

Πίνακας 8.1. Δομή των έξι σουλφοναμιδίων που μελετήθηκαν στην εργασία.

Ένωση	Δομή
Σουλφανιλαμίδιο (SN)	
Σουλφακεταμίδη (SCM)	
Σουλφαδιαζίνη (SDZ)	
Σουλφαθειαζόλη (STZ)	
Σουλφαμεραζίνη (SMZ)	
Σουλφαμεθιζόλη (SMT)	

Πειραματικό Μέρος

9. ΟΡΓΑΝΑ, ΣΥΣΚΕΥΕΣ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

9.1. Οργανολογία του χρωματογραφικού συστήματος με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων

- Αντλία Shimadzu LC-10AD_{VP} (Shimadzu, Kyoto, Japan).
- Βαλβίδα μίξης των διαλυτών της κινητής φάσης Shimadzu FCV-10AL_{VP}.
- Αναλυτική στήλη: Merck-Lichrospher RP18e, 5 μm 250 × 4 mm (Darmstadt, Germany).
- Βαλβίδα εισαγωγής δείγματος Rheodyne 7725i, με βρόχο 20 μL (Rheodyne, Cotati, California, USA).
- Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων Shimadzu SPD-M10A_{VP}.
- Σύστημα ελέγχου Shimadzu SCL-10AL_{VP}.
- Λογισμικό Shimadzu LabSolutions-LC solutions.
- Φιάλη ηλίου και μονάδα απαέρωσης διαλυτών DGU-10B.
- Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών 1000 mL.

9.2. Συσκευές-Υλικά

- Φυγόκεντρος, Hermle Z 230 (Hermle AG, Gosheim, Germany).
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας ±0,0001 g, AUX120 Shimadzu.
- Συσκευή για εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) δώδεκα θέσεων, Analytichem International (Harbor City, CA, USA).
- Συσκευή εξάτμισης με εννιά θέσεις, ReactiVap 9 18780, Pierce (Rockford, IL, USA).
- Αναδευτήρας vortex, Lalc Instruments (Treviglio, Italy).
- Πιπέτα 20-200 μL, ISO LAB Laborgerate GmbH.
- Συσκευή διήθησης (Altech Associates, Deerfield Illinois, USA).
- Φίλτρα Nylon, Altech Associates.
- Φίλτρα μεμβράνης για υδατικά δείγματα Fioroni (Fioroni Filters, France).
- Q-Max RR Syringe Filters Frisenette (Frisenette, Denmark).
- Συσκευή υπερήχων 460/h (Elma, Germany).

- Sulfathiazole Imprinted Polymer, SPE sorbent (A. Kabir, Florida International University).
- Six sulfa drugs Imprinted Polymer, SPE sorbent (A. Kabir, Florida International University).
- Non-Molecularly Imprinted Polymer (A. Kabir, Florida International University).
- Microextraction capsule, sulfathiazole sol-gel Mip (A. Kabir, Florida International University).
- Fabric Solid Phase Extraction, sulfathiazole imprinted polymer (A. Kabir, Florida International University).

9.3. Αντιδραστήρια

- Ακετονιτρίλιο HPLC Grade, Fischer Scientific (Loughborough, Leicestershire, UK).
- Μεθανόλη HPLC Grade, Chem-lab NV (Zedelgem, Belgium).
- Μυρμηκικό οξύ, Chem-Lab NV (Zedelgem, Belgium).
- Οξικό οξύ 99%, Merck.
- Τριφθοροξικό οξύ 99.8%, Merck.
- Τρισυδροχλωρικό οξύ, Duchefa Biochemie (Amsterdam, The Netherlands).
- Ακετόνη για ανάλυση, Merck.
- 2-προπανόλη για ανάλυση Chem-lab NV.
- Νερό δις απιονισμένο.
- Σουλφαναμιδίδιο Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).
- Σουλφακεταμίδη Sigma-Aldrich.
- Σουλφαδιαζίνη Sigma-Aldrich.
- Σουλφαθειαζόλη Sigma-Aldrich.
- Σουλφαμεραζίνη Sigma-Aldrich.
- Σουλφαμεθειζόλη Sigma-Aldrich.
- Σουλφαδιμεθοξίνη Sigma-Aldrich.
- Σουλφαμεθοξαζόλη Sigma-Aldrich.
- Σουλφισοξαζόλη Sigma-Aldrich.
- Χλωραμφενικόλη Alfa-Aesar (Karlsruhe, Germany).

- Θειαμφενικόλη Sigma-Aldrich.
- Φλορφενικόλη Sigma-Aldrich.
- Φλουμεκίκη Sigma-Aldrich.
- Οξακιλίνη Sigma-Aldrich.

10. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

Αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε κατάλληλη μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων, HPLC-DAD για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό των έξι σουλφοναμιδίων.

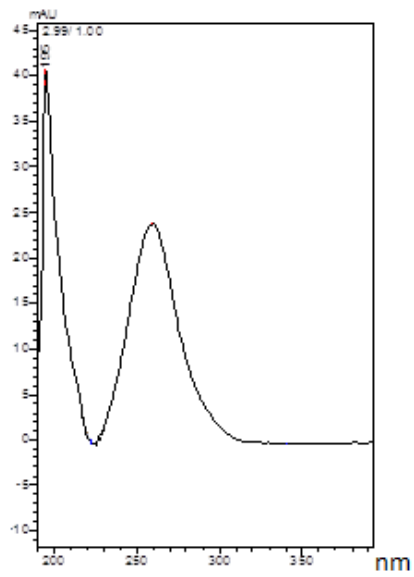
10.1. Παρασκευή προτύπων διαλυμάτων σουλφοναμιδίων

Παρασκευάστηκαν πυκνά μεθανολικά διαλύματα των 100 ng/μL για κάθε ένα από τα έξι σουλφοναμίδια, σουλφανιλαμίδιο (SN), σουλφακεταμίδη (SCM), σουλφαδιαζίνη (SDZ), σουλφαθειαζόλη (STZ), σουλφαμεραζίνη (SMZ), σουλφαμεθιζόλη (SMT), από τη στερεή κρυσταλλική μορφή τους. Στη συνέχεια από τα πυκνά διαλύματα παρασκευάστηκαν αραιά πρότυπα διαλύματα μιγμάτων των έξι ενώσεων, σε διάφορες συγκεντρώσεις, (οι οποίες καλύπτουν το εύρος της γραμμικής περιοχής) για την κατασκευή των καμπυλών αναφοράς και την επικύρωση των μεθόδων. Τα αραιά διαλύματα παρασκευάστηκαν στο μίγμα της κινητής φάσης που επιλέχτηκε για το διαχωρισμό. Για τις ενώσεις, σουλφανιλαμίδιο (SN), σουλφαδιαζίνη (SDZ), σουλφαθειαζόλη (STZ), σουλφαμεραζίνη (SMZ), η γραμμική περιοχή είναι από 0,02 έως 20 ng/μL, ενώ για τις ενώσεις σουλφακεταμίδη (SCM) και σουλφαμεθιζόλη (SMT), είναι από 0,04 έως 20 ng/μL. Τελικά για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς παρασκευάστηκαν αραιά διαλύματα στο μίγμα της κινητής φάσης που τελικά επιλέχθηκε και σε συγκεντρώσεις 0,1, 0,5, 1, 2, 5 και 10 ng/μL.

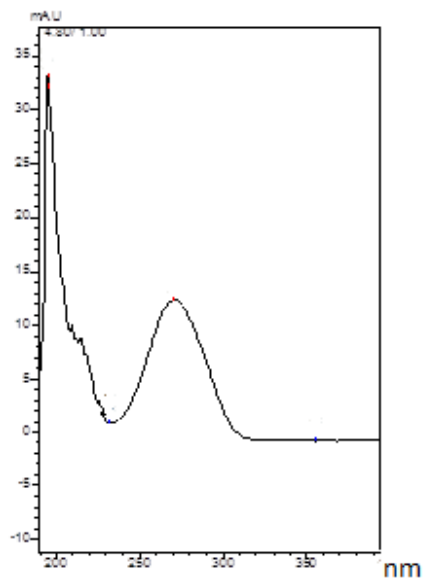
10.2. Επιλογή μήκους κύματος

Ως σύστημα ανίχνευσης χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (Diode Array Detector, DAD). Μελετώντας τα φάσματα απορρόφησης των έξι ενώσεων στο UV επιλέχθηκαν τα 265 nm ως κατάλληλο μήκος κύματος για παρακολούθηση. Ενώ, η ποσοτική αποτίμηση έγινε στο μέγιστο μήκος κύματος απορρόφησης για κάθε ένωση, που είναι 260 nm για το σουλφανιλαμίδιο, 270 nm για τη σουλφακεταμίδη, 265 nm για τη σουλφαδιαζίνη, 285 nm για τη σουλφαθειαζόλη, 265 nm για τη σουλφαμεραζίνη και 280 nm για τη σουλφαμεθιζόλη.

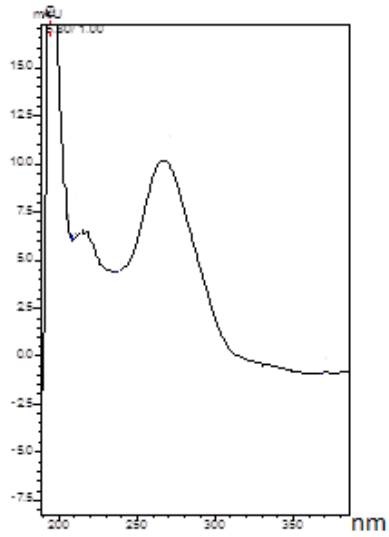
Τα φάσματα UV που λήφθηκαν για τα έξι σουλφοναμίδια φαίνονται στα Σχήματα 10.1. έως 10.6.



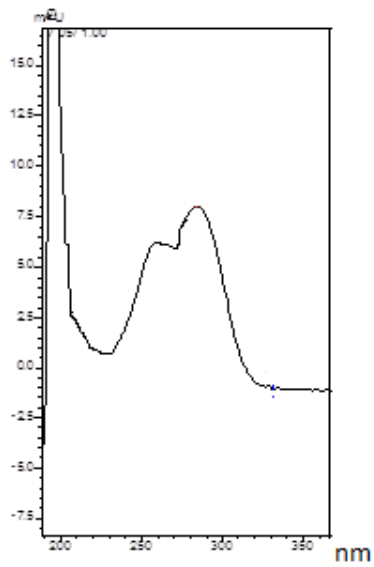
Σχήμα 10.1. Φάσμα απορρόφησης του σουλφοναμιδίου στο UV.



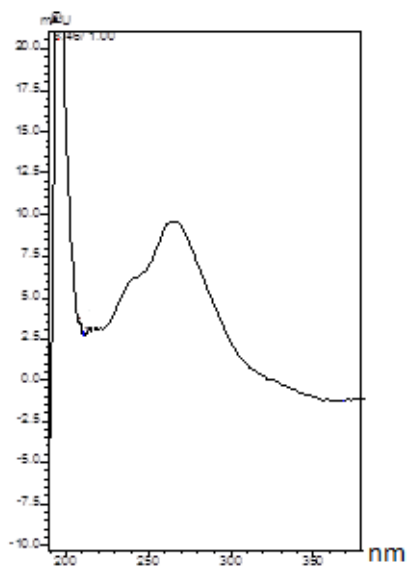
Σχήμα 10.2. Φάσμα απορρόφησης της σουλφακεταμίδης στο UV.



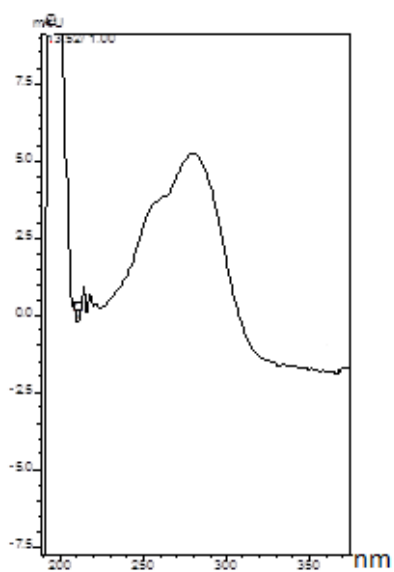
Σχήμα 10.3. Φάσμα απορρόφησης της σουλφραδιαζίνης στο UV.



Σχήμα 10.4. Φάσμα απορρόφησης της σουλφαθειαζόλης στο UV.



Σχήμα 10.5. Φάσμα απορρόφησης της σουλφαμεραζίνης στο UV.



Σχήμα 10.6. Φάσμα απορρόφησης της σουλφαμεθειζόλης στο UV.

10.3. Χρωματογραφικές Συνθήκες

Η στήλη που επιλέχθηκε για το διαχωρισμό ήταν η αναλυτική στήλη Merck-Lichrospher RP18e, 5 μm 250 \times 4 mm, της εταιρείας Merck. Ενώ, επιλέχθηκε ισοκρατική έκλουση για τον προσδιορισμό των έξι συστατικών, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση μίγμα μυρμηκικού οξέος, μεθανόλης και ακετονιτρίλιου.

Για την εύρεση της σύστασης του κατάλληλου εκλουστικού συστήματος έγιναν διάφορες δοκιμές ισοκρατικής έκλουσης, οι οποίες παρουσιάζονται στον Πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1. Δοκιμές για εύρεση της καταλληλότερης κινητής φάσης.

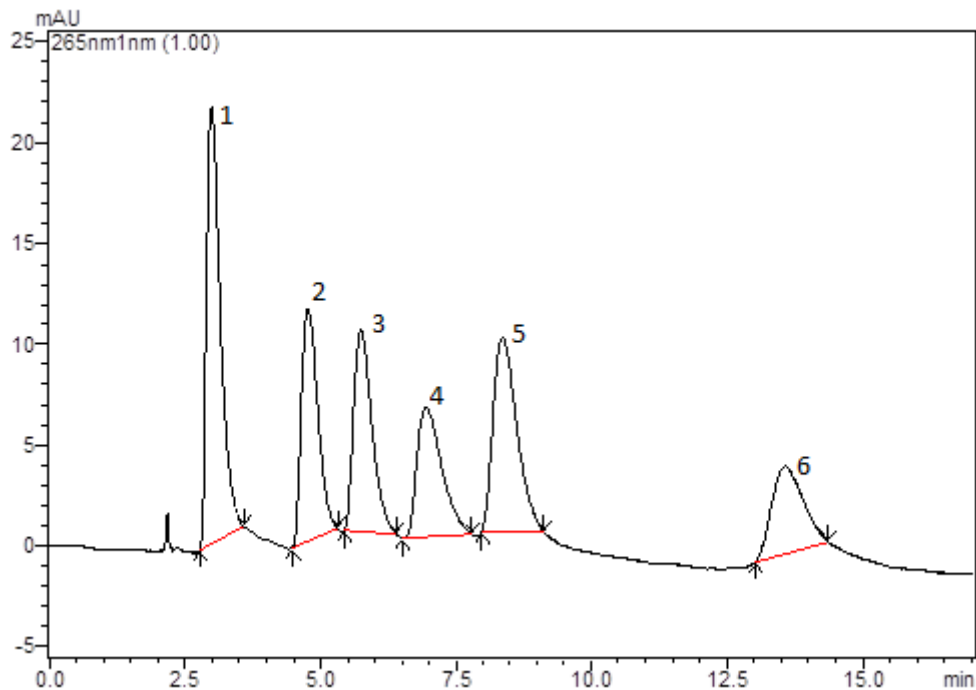
Πρόγραμμα	Ροή mL/min	t (min)	A:HCOOH 0,1%	B:ACN (v/v)	C:MeOH (v/v)
1	1	0	65	5	30
		16	65	5	30
2	1	0	72	3	25
		16	72	3	25
3	1	0	80	5	15
		16	80	5	15
4	1	0	80	3	17
		16	80	3	17

Τα προγράμματα 1, 2 και 3 απορρίφθηκαν, καθώς ο διαχωρισμός δεν ήταν ικανοποιητικός και υπήρχε συνέκλουση συστατικών. Απεναντίας, ο βέλτιστος διαχωρισμός επιτεύχθηκε, χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση, μίγμα μυρμηκικού οξέος 0,1% v/v, ακετονιτρίλιο και μεθανόλη με το πρόγραμμα 4 της ισοκρατικής έκλουσης που φαίνεται στον Πίνακα 10.1.

Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για τον επιτυχή διαχωρισμό και προσδιορισμό των έξι σουλφοναμιδίων δίνονται στον Πίνακα 10.2 και στο Σχήμα 10.7. Πρόκειται για ένα τυπικό χρωματογράφημα συγκέντρωσης 5 ng/ μL για τις έξι ενώσεις.

Πίνακας 10.2. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες.

Στήλη	Merck-Lichrospher RP18e, 5 μm 250 \times 4 mm
Κινητή Φάση	0,1% HCOOH:ACN:MeOH (80:3:17% v/v)
Ανιχνευτής	265 nm
Πίεση	175 bar
Ροή	1 mL/min
Θερμοκρασία στήλης	Θερμοκρασία περιβάλλοντος
Εισαγόμενος Όγκος	20 μL



Σχήμα 10.7. Τυπικό Χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος των έξι ενώσεων (5 ng/ μL). (1) SN 2,8 min, (2) SCM 4,5 min, (3) SDZ 5,5 min, (4) STZ 6,6 min, (5) SMZ 8,1 min, (6) SMT 13,2 min.

10.4. Εξισώσεις παλινδρόμησης προτύπων διαλυμάτων

Για τη χάραξη καμπυλών αναφοράς των προτύπων διαλυμάτων που αναφέρονται στην Παράγραφο 10.1. πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης. Η ποσοτική αποτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε με βάση το εμβαδόν της κορυφής της προσδιοριζόμενης ένωσης. Με τον τρόπο αυτό κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών των ελαχίστων τετραγώνων, με τη βοήθεια της μεθόδου της παλινδρόμησης για στάθμη εμπιστοσύνης 95%. Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι της μορφής $y = (a \pm SD_a)x + (b \pm SD_b)$, όπου y ο μέσος όρος (τριών μετρήσεων) του εμβαδού της κορυφής του κάθε σουλφοναμιδίου και x η συγκέντρωσή της σε $\text{ng}/\mu\text{L}$, a η κλίση της ευθείας, b η τεταγμένη επί την αρχή και SD_a , SD_b οι τυπικές αποκλίσεις τους αντίστοιχα. Οι λαμβανόμενες εξισώσεις παλινδρόμησης και οι αντίστοιχοι συντελεστές προσδιορισμού, που αποτελούν μέτρο γραμμικότητας φαίνονται στον Πίνακα 10.2.

Πίνακας 10.2. Εξισώσεις παλινδρόμησης και συντελεστής προσδιορισμού σε πρότυπα διαλύματα.

Προσδιοριζόμενη ένωση	Εξίσωση παλινδρόμησης	r^2
SN	$y = (75111 \pm 1876,82)x - (4421 \pm 8744,83)$	0,9975
SCM	$y = (49928 \pm 1023,56)x - (1215,8 \pm 4769,17)$	0,9983
SDZ	$y = (42363 \pm 1156,90)x - (457,03 \pm 5390,48)$	0,9970
STZ	$y = (40453 \pm 1273,18)x - (4987,1 \pm 5932,29)$	0,9961
SMZ	$y = (64148 \pm 1479,64)x - (12313 \pm 6894,21)$	0,9979
SMT	$y = (44782 \pm 407,77)x - (3479,9 \pm 1899,96)$	0,9997

10.5. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης

Το όριο ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και το όριο ποσοτικής αποτίμησης (Limit of Quantitation, LOQ), ορίζονται ως η μικρότερη συγκέντρωση μιας ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί και να προσδιοριστεί ποσοτικά, αντίστοιχα με βεβαιότητα 95%. Το LOD εκφράζει τη συγκέντρωση της ένωσης που δίνει τιμή μέτρησης, x_L , ίση με τη μέση τιμή των μετρήσεων, x_b , μιας σειράς από λευκούς προσδιορισμούς, αυξημένη κατά το τριπλάσιο της τυπικής απόκλισης s_b αυτών των μετρήσεων, ενώ για το LOQ η τιμή αυτή είναι αυξημένη κατά το δεκαπλάσιο της τυπικής απόκλισης s_b . Με βάση την εξίσωση της καμπύλης αναφοράς $LOD = (x_L - x_b) / κλίση$ και επειδή $x_L = x_b + 3,3s_b$, $LOD = 3,3s_b / κλίση$ και αντίστοιχα $LOQ = 10s_b / κλίση$. Στην τεχνική της HPLC, το LOD και το LOQ υπολογίζονται ως τιμή x_b την τεταγμένη επί την αρχή που υπολογίστηκε από τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς και ως s_b την τιμή αντίστοιχα της τυπικής απόκλισης της, SD_b . Οι τιμές των ορίων ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης των σουλφοναμιδίων που ελήφθησαν αναγράφονται στον Πίνακα 10.3.

Πίνακας 10.3. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης των έξι ενώσεων σε πρότυπα διαλύματα.

Ένωση	LOD (ng/μL)	LOQ (ng/μL)
SN	0,02	0,06
SCM	0,04	1,2
SDZ	0,02	0,06
STZ	0,02	0,06
SMZ	0,02	0,06
SMT	0,04	1,2

10.6. Υπολογισμός Διαχωριστικής Ικανότητας

Η διαχωριστική ικανότητα R_s (Resolution) μιας στήλης είναι η ικανότητα που έχει η στήλη να διαχωρίζει δύο ή περισσότερα συστατικά και προκύπτει από τη σχέση:

$$R_s = \frac{t_2 - t_1}{0,5(t_{w1} + t_{w2})}$$

Όπου, t_1 και t_2 είναι οι χρόνοι συγκράτησης των ενώσεων και t_{w1} και t_{w2} τα εύρη των κορυφών Gauss εκφρασμένα στη μονάδα του χρόνου.

Τα αποτελέσματα για τη διακριτική ικανότητα που προέκυψαν ανά ζεύγη των ενώσεων, σύμφωνα με το βέλτιστο πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης, δίνονται στον Πίνακα 10.4

Πίνακας 10.4. Διαχωριστική ικανότητα ανά ζεύγος ενώσεων.

Ενώσεις	Διαχωριστική Ικανότητα
SN- SCM	1,1
SCM-SDZ	0,55
SDZ-STZ	0,55
STZ-SMZ	0,68
SMZ-SMT	2,12

10.7. Μελέτη σταθερότητας σε πρότυπα διαλύματα

Από τη μελέτη σταθερότητας, βρέθηκε ότι τα πυκνά μεθανολικά διαλύματα των 100 ng/μL για κάθε ένα από τα έξι σουλφοναμίδια είναι σταθερά για τέσσερις μήνες στους 4 °C. Ακόμη, τα αραιά διαλύματα είναι σταθερά στις ίδιες συνθήκες για ένα μήνα.

11. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ

Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου σε πρότυπα διαλύματα, ακολούθησε η μελέτη ανάπτυξης κατάλληλης μεθόδου, με σκοπό την εκλεκτική παραλαβή των επιθυμητών συστατικών από το γάλα. Στη συνέχεια, παρουσιάζονται τα στάδια εφαρμογής της μεθόδου και η επικύρωσή της, σύμφωνα με τα κριτήρια που επιβάλλει η ευρωπαϊκή νομοθεσία.

11.1. Μελέτη MIP(STZ)

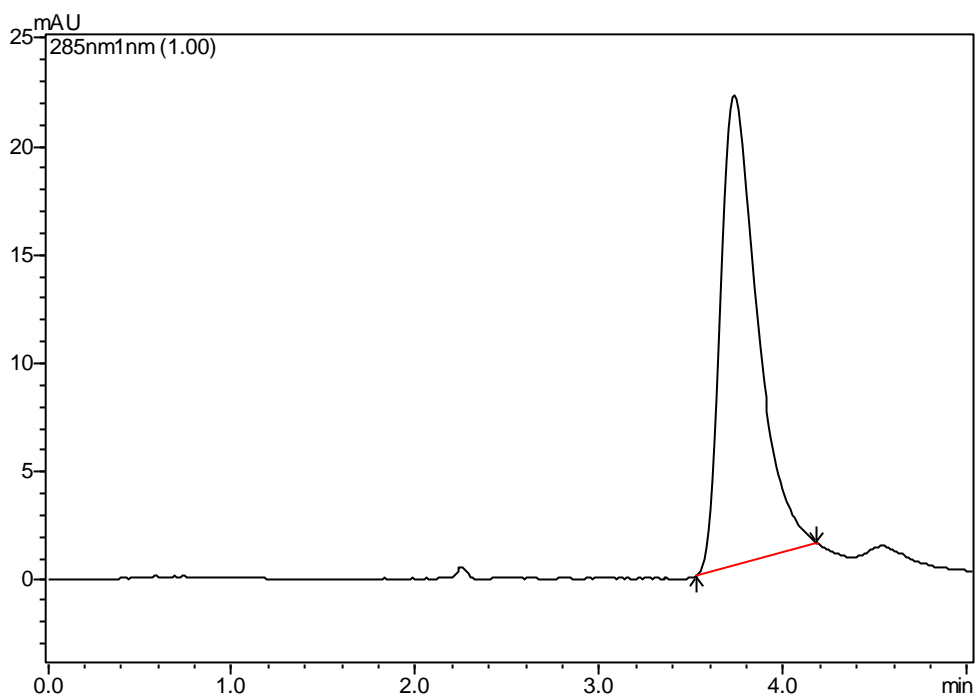
Αξίζει να αναφερθεί ότι κατά την έναρξη της παρούσας διπλωματικής έρευνας μελετήθηκε εκτενώς ένα μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές που έφερε τη μήτρα ενός σουλφοναμιδίου, της σουλφαθειαζόλης (STZ), στη συνέχεια θα αναφέρεται ως MIP(STZ). Παράλληλα με το υλικό αυτό, εξετάστηκε και μη μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές NIP. Αυτή η μελέτη έπαιξε σημαντικό ρόλο στο τελικό πρωτόκολλο προκατεργασίας που εφαρμόστηκε.

11.1.1. Χρωματογραφικές συνθήκες για προσδιορισμό της STZ με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης

Πρώτο μέλημα ήταν να αναπτυχθεί μία μέθοδος στην HPLC ικανή για τον προσδιορισμό της προσδιοριζόμενης ένωσης. Οι χρωματογραφικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν για την ανίχνευση της STZ παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.1., ενώ στο Σχήμα 11.1. δίνεται ένα χρωματογράφημα που προκύπτει από τις συνθήκες αυτές.

Πίνακας 11.1. Χρωματογραφικές συνθήκες για τον προσδιορισμό STZ στην HPLC-DAD.

Στήλη	Merck-Lichrospher RP18e, 5 μ m 250 \times 4 mm
Κινητή Φάση	0,1% HCOOH:ACN:MeOH (ισοκρατική έκλυση, 65:5:30% v/v)
Ανιχνευτής	285 nm
Πίεση	187 bar
Ροή	1 mL/min
Θερμοκρασία στήλης	Θερμοκρασία περιβάλλοντος
Εισαγόμενος Όγκος	20 μ L



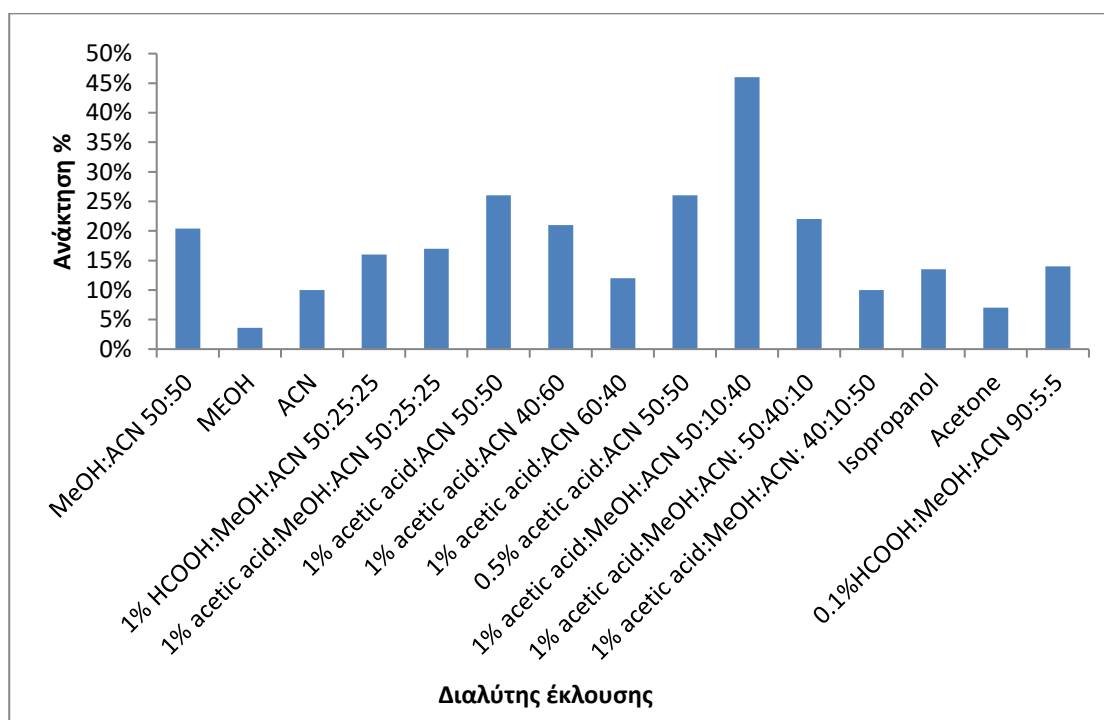
Σχήμα 11.1. Τυπικό χρωματογράφημα STZ (5 ng/ μ L)

11.2. Εφαρμογή του υλικού MIP(STZ) με διαφορετικές προσεγγίσεις σε πρότυπα διαλύματα

11.2.1. Εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση του MIP(STZ)

Αρχικά πακτώθηκαν μικροστήλες της εκχύλισης στερεάς φάσης με ικανοποιητική ποσότητα υλικού MIP(STZ) και NIP αντίστοιχα, 30 mg. Οι πρώτες δοκιμές έγιναν σε πρότυπα διαλύματα. Οι μικροστήλες εφαρμόστηκαν στη συσκευή της SPE.

Σε πρώτη φάση εκτιμήθηκε ο βέλτιστος διαλύτης έκλουσης διατηρώντας σταθερές τις ακόλουθες παραμέτρους: μάζα υλικού 30 mg, 500 μ L προτύπου διαλύματος STZ 5 ng/ μ L, χρόνος φόρτωσης δείγματος και έκλουσης 15 min, όγκος διαλύτη έκλουσης 1 mL. Πραγματοποιήθηκε φόρτωση προτύπου διαλύματος για 15 min. Στη συνέχεια εφαρμόστηκαν, με τη σειρά, διάφορα εκλουστικά συστήματα, όπου παρέμειναν σε επαφή με το υλικό για 15 min και ακολούθησαν τα στάδια: παραλαβή του εκλούσματος, εξάτμιση μέχρι ξηρού σε ρεύμα αζώτου, επαναδιάλυση σε 500 μ L κινητής φάσης και μέτρηση στην HPLC-DAD. Στο Σχήμα 11.2. φαίνονται τα διάφορα εκλουστικά συστήματα που δοκιμάστηκαν και η ανάκτηση που έδωσαν ως προς την προσδιοριζόμενη ένωση.



Σχήμα 11.2. Διαγραμματική αναπαράσταση των ανακτήσεων που έδωσαν τα υπό εξέταση εκλουστικά συστήματα.

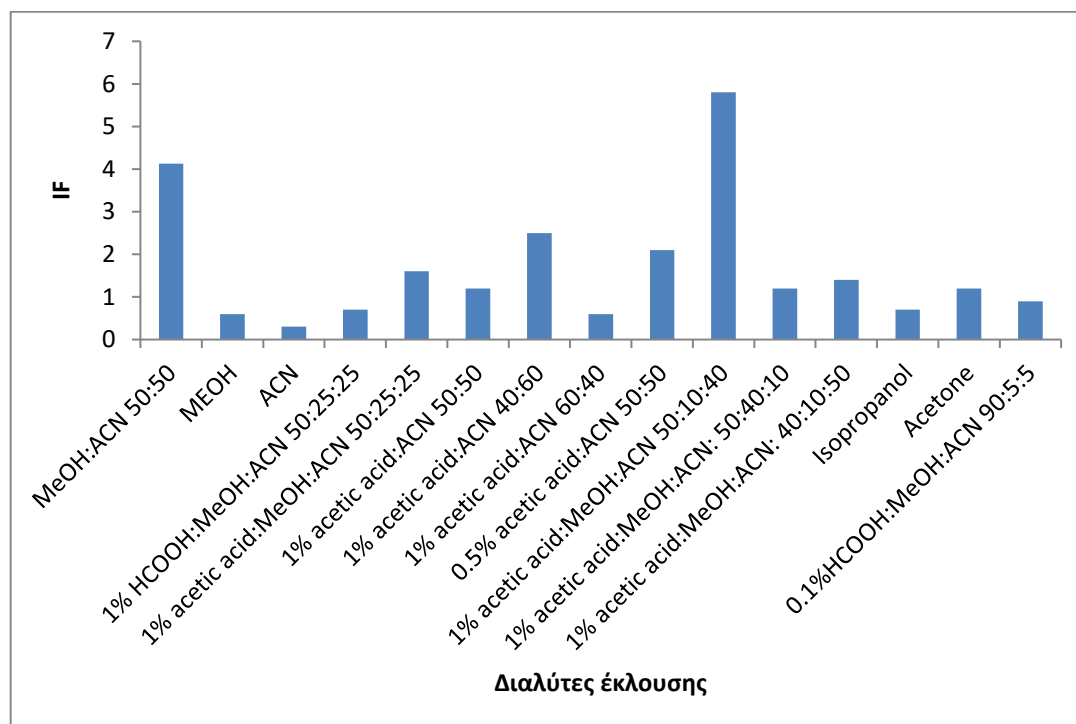
Από το διάγραμμα του σχήματος 11.2 προκύπτει ότι το βέλτιστο εκλουστικό σύστημα είναι το 1% CH₃COOH:ACN:MeOH σε αναλογία 50:10:40% v/v.

Για κάθε ένα εκλουστικό σύστημα διερευνήθηκε παράλληλα και ο παράγοντας αποτύπωσης (imprinted factor, IF), με εφαρμογή των ίδιων συνθηκών σε μικροστήλες της SPE πακτωμένες αυτή τη φορά με NIP. Ο παράγοντας αποτύπωσης είναι ένα μέτρο της ισχύος της αλληλεπίδρασης του αποτυπωμένου πολυμερούς με το μόριο-στόχο. Λαμβάνεται από την αναλογία του συντελεστή συγκράτησης του MIP προς το NIP, ως εξής:

$$IF = \frac{K_{mip}}{K_{nip}}$$

Όπου οι K_{mip} και K_{nip} είναι οι συντελεστές κατανομής της προσδιοριζόμενης ένωσης στο MIP και NIP, αντίστοιχα.

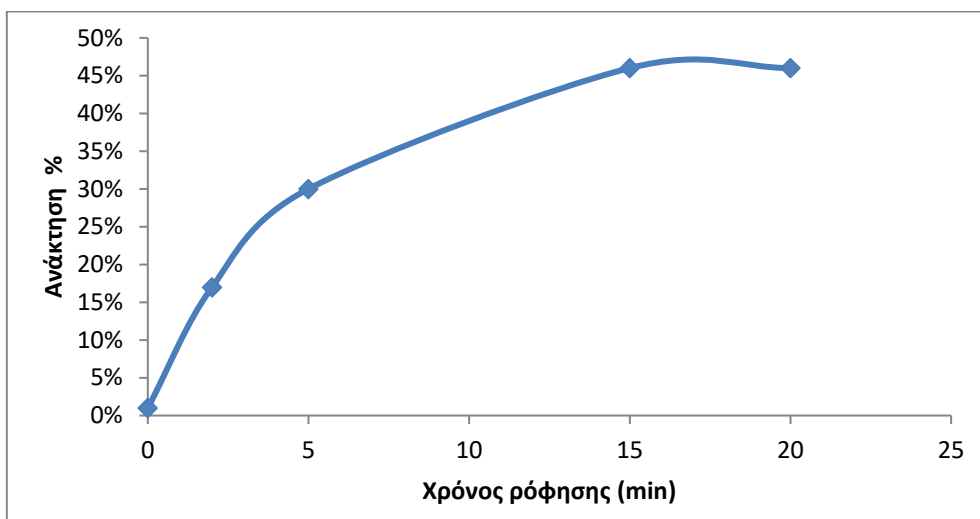
Στο Σχήμα 11.3. φαίνεται ότι με το βέλτιστο εκλουστικό σύστημα λαμβάνεται και ο μεγαλύτερος παράγοντας αποτύπωσης. Αυτό φανερώνει την εκλεκτικότητα του MIP για το μόριο-στόχο, σε σύγκριση με ένα υλικό NIP, το οποίο παρασκευάστηκε με τον ίδιο τρόπο, αλλά απουσία του μορίου-στόχου.



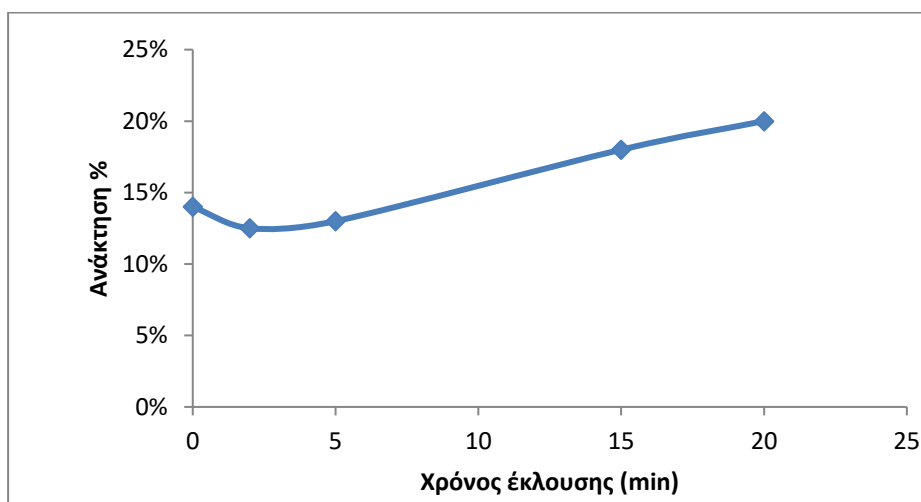
Σχήμα 11.3. Διαγραμματική αναπαράσταση των IF που προέκυψαν για τα διάφορα εκλουστικά συστήματα με μελέτη του υλικού NIP.

Αφού εκτιμήθηκε το καταλληλότερο εκλουστικό σύστημα μελετήθηκαν και άλλες παράμετροι που παίζουν καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία της εκχύλισης, όπως ο χρόνος φόρτωσης και ο χρόνος έκλουσης. Τόσο ο χρόνος έκλουσης, όσο και ο χρόνος φόρτωσης μελετήθηκαν για 0, 2, 5, 15 και 20 min αντίστοιχα. Διαπιστώθηκε, ότι τα 15 min είναι ο βέλτιστος χρόνος φόρτωσης και έκλουσης, (Σχήμα 11.4. και 11.5., αντίστοιχα). Ο χρόνος έκλουσης φαίνεται να είναι ικανοποιητικός για 15 και 20 min, ωστόσο επιλέχθηκαν τα 15 min, ώστε να είναι πιο σύντομος ο συνολικός χρόνος προκατεργασίας.

Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι η ενεργοποίηση που δοκιμάστηκε στο MIP(STZ), δεν ευνόησε τη διαδικασία της εκχύλισης, επομένως αυτό το στάδιο παραλήφθηκε.



Σχήμα 11.4. Μελέτη βέλτιστου χρόνου φόρτωσης δείγματος.



Σχήμα 11.5. Μελέτη βέλτιστου χρόνου έκλουσης.

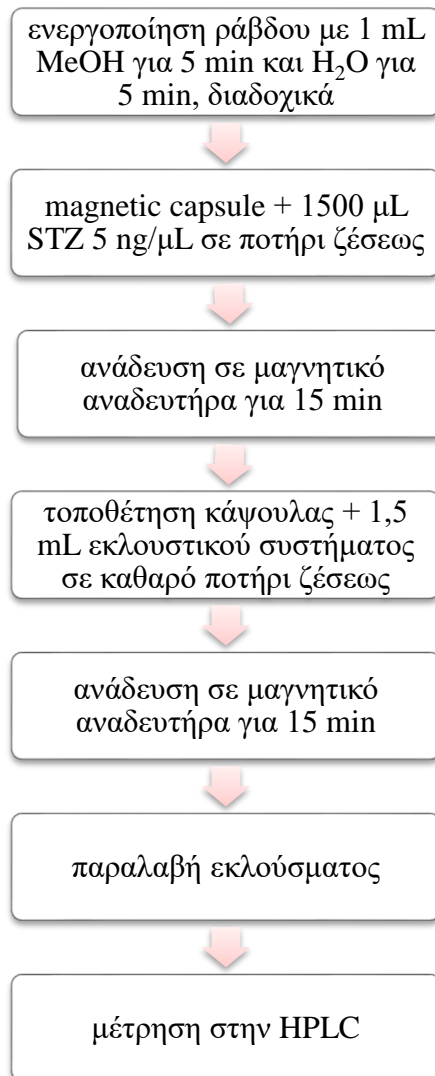
Οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων που μελετήθηκαν δίνονται στον Πίνακα 11.2.

Πίνακας 11.2. Βέλτιστες τιμές των παραμέτρων του επηρεάζουν το ποσοστό ανάκτησης.

Μάζα υλικού	30 mg
Εκλουστικό σύστημα	1% CH ₃ COOH:ACN:MeOH (50:10:40% v/v)
Όγκος διαλύτη έκλουσης	1 mL
Χρόνος φόρτωσης/ρόφησης	15 min
Χρόνος έκλουσης/εκρόφησης	15 min
Ενεργοποίηση	όχι

11.2.2. Μαγνητική κάψουλα με ενσωματωμένο MIP(STZ)

Στη συνέχεια, οι βέλτιστες τιμές των παραμέτρων που μελετήθηκαν εφαρμόστηκαν σε μαγνητική κάψουλα (magnetic capsule) με ενσωματωμένο σε ίνες κυτταρίνης στο εσωτερικό της το MIP(STZ). Η διαδικασία της εκχύλισης που ακολουθήθηκε παρουσιάζεται αναλυτικά στο Σχήμα 11.6. Στο Σχήμα 11.7. απεικονίζεται η μαγνητική κάψουλα. Ουσιαστικά, όπως φαίνεται και στην εικόνα, η κάψουλα αποτελείται από δύο μέρη, στη μία ράβδο περιέχει μαγνήτη και στην άλλη περιέχει πακτωμένο το υλικό MIP(STZ).



Σχήμα 11.6. Διαδικασία εκχύλισης με χρήση μαγνητικής κάψουλας.

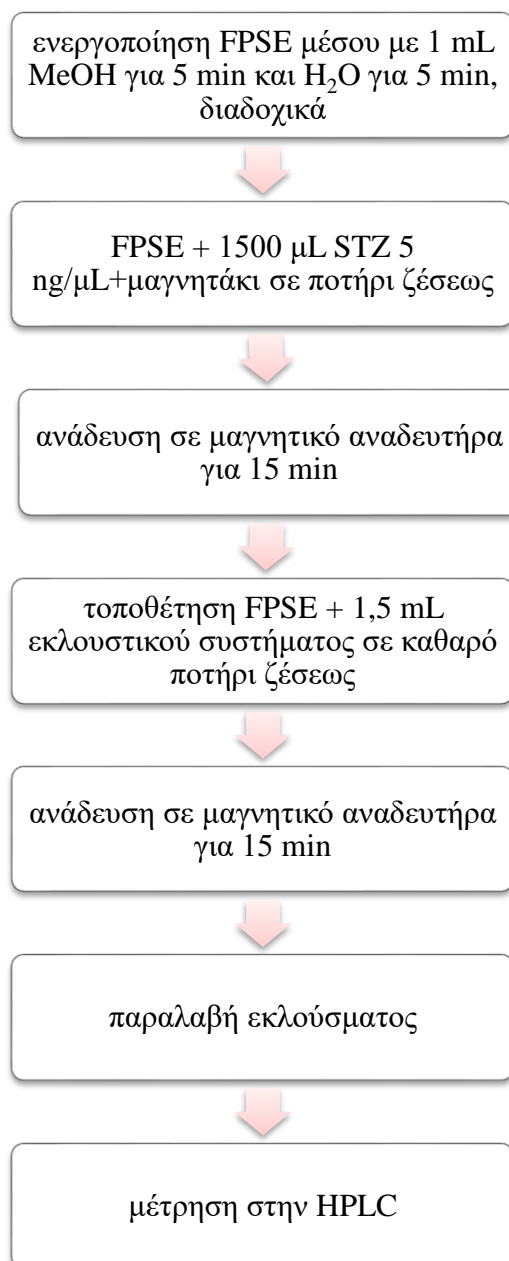


Σχήμα 11.7. Μαγνητική κάψουλα.

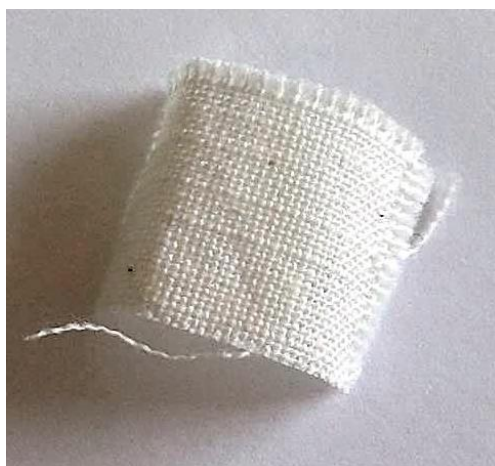
11.2.3. Fabric solid phase extraction με ενσωματωμένο MIP(STZ)

Η ίδια μελέτη διεξήχθη και με χρήση της τεχνικής Fabric Phase Sorptive Extraction (FPSE) με ενσωματωμένο και πάλι το MIP(STZ). Το πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε, παρουσιάζεται στο Σχήμα 11.8. Η FPSE είναι μία τεχνική νέας γενιάς για προκατεργασία δείγματος που αναπτύχθηκε από τους Kabir και Furton. [37] Πρόκειται για υφασμάτινη επιφάνεια, όπως φαίνεται στο Σχήμα 11.9., η οποία μπορεί να επικαλυφθεί με κάποιο πολυμερές. Όπως αναφέρεται από τους εισηγητές, η τεχνική συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (solid phase microextraction, SPME) και της SPE.

Κατά τη διαδικασία της FPSE, το υλικό εμβαπτίζεται σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει το δείγμα. Πραγματοποιείται ρόφηση των προσδιοριζόμενων συστατικών και το στάδιο αυτό μπορεί να συνοδεύεται από ανάδευση. Έπειτα, το υλικό βυθίζεται σε ένα άλλο ποτήρι ζέσεως, με το διαλύτη έκλουσης και στο στάδιο της έκλουσης μπορεί να εφαρμοστεί ανάδευση. Αφού ολοκληρωθεί το στάδιο της έκλουσης, παραλαμβάνεται το έκλουσμα και ακολουθεί ανάλυση με κατάλληλη αναλυτική τεχνική. [37]



Σχήμα 11.8. Διαδικασία εκχύλισης με εφαρμογή FPSE.



Σχήμα 11.9. Υλικό που εφαρμόζεται στην τεχνική FPSE.

Συμπερασματικά, οι ανακτήσεις που ελήφθησαν για το μόριο της STZ, τόσο με χρήση μαγνητικής κάψουλας MIP(STZ), όσο και με εφαρμογή της τεχνικής FPSE MIP(STZ), ήταν χαμηλότερες από την ανάκτηση που πρόκυψε με εφαρμογή MIP(STZ) στην εκχύλιση στερεάς φάσης.

11.3. Εφαρμογή του υλικού MIP(STZ) με διαφορετικές προσεγγίσεις σε δείγματα γάλακτος

Στα τρία υλικά που παρουσιάστηκαν έως τώρα έγιναν και δοκιμές σε δείγμα γάλακτος άπαχο 0% που αγοράστηκε από την τοπική αγορά. Στο δείγμα γάλακτος έγινε αποπρωτεΐνωση ως εξής:

1. Σε ένα falcon τοποθετήθηκαν 1 g γάλακτος, 500 μL STZ 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ και 2 mL ακετονιτρίλιο.
2. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση στο vortex για 1 min.
3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min.
4. Παραλαβή υπερκειμένου.
5. Εξάτμιση σε ρεύμα N_2 , μέχρι τελικό όγκο 1 mL.

Το δείγμα πλέον ήταν έτοιμο και εισήχθη στο πρώτο στάδιο των τριών πρωτοκόλλων που αναφέρθηκαν στην Παράγραφο 11.2. Οι ανακτήσεις που προέκυψαν παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.3.

Πίνακας 11.3. Ανακτήσεις STZ σε δείγματα γάλακτος με διαφορετικές τεχνικές προκατεργασίας.

Τεχνική	Ανάκτηση STZ %
SPE	6
Magnetic Capsule	2,4
FPSE media	3,7

Συμπερασματικά, τόσο στα πρότυπα διαλύματα, όσο και στα δείγματα γάλακτος, σχετικά καλύτερα αποτελέσματα πάρθηκαν με την τεχνική της SPE.

11.4. Μελέτη MIP(6-sulfa)

Στην πορεία, μελετήθηκε ένα μοριακώς αποτυπωμένο πολυμερές που έφερε θέσεις αναγνώρισης για έξι διαφορετικά σουλφοναμίδια: σουλφανιλαμίδιο (SN), σουλφακεταμίδη (SCM), σουλφαδιαζίνη (SDZ), σουλφαθειαζόλη (STZ), σουλφαμεραζίνη (SMZ) και σουλφαμεθιζόλη (SMT). Όπως φαίνεται, ένα από τα έξι σουλφοναμίδια είναι η σουλφαθειαζόλη, η οποία έχει ήδη μελετηθεί. Το υλικό θα αναφέρεται ως MIP(6-sulfa). Αυτό ήταν τελικά και το ροφητικό υλικό, στο οποίο στηρίχθηκε η ανάπτυξη και η επικύρωση μεθόδου σε δείγματα γάλακτος. Το πλεονέκτημα του συγκεκριμένου υλικού είναι η δυνατότητα που έχει να αναγνωρίζει εκλεκτικά παραπάνω από ένα μόρια και μάλιστα μόρια, τα οποία είναι δομικά παρόμοια μεταξύ τους.

11.4.1. Μελέτη MIP(6-sulfa) σε πρότυπα διαλύματα

Όλες οι μετρήσεις που έγιναν για τον προσδιορισμό των έξι ενώσεων, στηρίχθηκαν στο πρόγραμμα που αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης και παρουσιάζεται στην Παράγραφο 10.3. Πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με χρήση του υλικού MIP(6-sulfa) στην τεχνική της SPE, όπως και σε φιαλίδιο erperdorf με και χωρίς την υποστήριξη των υπέρηχων, όπως παριστάνεται στα Σχήματα 11.10. και 11.11., αντίστοιχα. Αρχικά πακτώθηκαν μικροστήλες της SPE και προετοιμάστηκε φιαλίδιο erpendorf με το MIP(6-sulfa).

Στην SPE, η διαδικασία που ακολουθήθηκε, βασίστηκε σε αυτή της μελέτης με MIP(STZ) και έχει ως εξής:

1. Προσθήκη 30 mg MIP(6-sulfa) σε μικροστήλη της SPE.
2. Φόρτωση 500 μ L προτύπου διαλύματος μίγματος των έξι σουλφοναμιδίων 5 ng/ μ L.
3. Χρόνος φόρτωσης 15 min.
4. Απομάκρυνση δείγματος.
5. Προσθήκη 1 mL διαλύτη έκλουσης 1% CH₃COOH:MeOH:ACN-50:10:40% v/v.
6. Χρόνος έκλουσης 15 min.
7. Απομάκρυνση διαλύτη έκλουσης και παραλαβή εκλούσματος.
8. Εξάτμιση σε ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού.
9. Επαναδιάλυση σε 0,5 mL κινητής φάσης και μέτρηση στην HPLC.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο φιαλίδιο erpendorf με και χωρίς την υποστήριξη των υπέρηχων, έχει ως εξής:

1. Προσθήκη 30 mg MIP(6-sulfa) σε φιαλίδιο erpendorf .
2. Φόρτωση 500 μ L προτύπου διαλύματος μίγματος των έξι σουλφοναμιδίων 5 ng/ μ L.
3. Χρόνος φόρτωσης 15 min, σε αυτό το στάδιο μελετήθηκε η περίπτωση της παραμονής του δείγματος με το υλικό στο φιαλίδιο erpendorf, με απλή ανακίνηση, αλλά και η περίπτωση με χρήση υπερήχων.
4. Απομάκρυνση δείγματος από το erpendorf.
5. Προσθήκη 1 mL διαλύτη έκλουσης 1% CH₃COOH:MeOH:ACN-50:10:40% v/v.
6. Χρόνος έκλουσης 15 min, σε αυτό το στάδιο μελετήθηκε η περίπτωση της παραμονής του δείγματος με το υλικό στο φιαλίδιο erpendorf, με απλή ανακίνηση, αλλά και η περίπτωση χρήσης υπερήχων.
7. Απομάκρυνση διαλύτη έκλουσης και παραλαβή εκλούσματος.
8. Εξάτμιση σε ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού.
9. Επαναδιάλυση σε 0,5 mL κινητής φάσης και μέτρηση στην HPLC.

Στις τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις που εφαρμόστηκαν, τα αποτελέσματα των ανακτήσεων και του παράγοντα αποτύπωσης που υπολογίστηκαν, δίνονται στους Πίνακες 11.4. και 11.5. αντίστοιχα.

Πίνακας 11.4. Ανακτήσεις προτύπων διαλυμάτων των έξι σουλφοναμιδίων με τρεις διαφορετικές εφαρμογές του MIP(6-sulfa).

Ένωση	Ανάκτηση %		
	SPE	Eppendorf	Eppendorf (εφαρμογή υπερήχων)
SN	13,6	9,2	11,3
SCM	17,5	17,9	24
SDZ	14,2	10,5	10,1
STZ	12,5	9,05	12,8
SMZ	13,1	8,3	9,5
SMT	44,7	53	38,8

Πίνακας 11.5. Παράγοντας αποτύπωσης με πρότυπα διαλύματα των έξι σουλφοναμιδίων, με τρεις διαφορετικές εφαρμογές των MIP(6-sulfa) και NIP αντίστοιχα.

Ένωση	IF (Imprinted Factor)		
	SPE	Eppendorf	Eppendorf (εφαρμογή υπερήχων)
SN	1,56	0,83	1,1
SCM	2,7	1,52	1,95
SDZ	1,7	0,97	1,1
STZ	3,9	1,08	1,5
SMZ	1,13	0,77	0,8
SMT	4,52	1,53	2,3



Σχήμα 11.10. Απεικόνιση συσκευής SPE, με μικροστήλες πακτωμένες με MIP(6-sulfa), που χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο.



Σχήμα 11.11. Εφαρμογή του υλικού σε φιαλίδιο erpendorf.

11.4.2. Μελέτη MIP(6-sulfa) σε δείγματα γάλακτος

Οι δοκιμές που έγιναν στην Παράγραφο 11.4.1. σε πρότυπα διαλύματα, έγιναν στη συνέχεια και σε δείγματα γάλακτος. Τα δείγματα γάλακτος υπέστησαν αποπρωτεΐνωση, όπως αναφέρεται και στην Παράγραφο 11.3. Τα αποτελέσματα τόσο των ανακτήσεων, όσο και του παράγοντα αποτύπωσης που λήφθηκαν δίνονται στους Πίνακες 11.6. και 11.7.

Πίνακας 11.6. Ανακτήσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος με τις τρεις διαφορετικές εφαρμογές του MIP(6-sulfa).

Ένωση	Ανάκτηση %		
	SPE	Eppendorf	Eppendorf (εφαρμογή υπερήχων)
SN	6,8	4,2	5,6
SCM	5,3	5,8	2
SDZ	4,4	3,4	5,8
STZ	5,9	3,6	2,2
SMZ	6,2	4,2	2,5
SMT	10,3	10,5	10,7

Πίνακας 11.7. Παράγοντες αποτύπωσης σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος με τρεις διαφορετικές εφαρμογές των MIP(6-sulfa) και NIP αντίστοιχα.

Ένωση	IF (Imprinted Factor)		
	SPE	Eppendorf	Eppendorf (εφαρμογή υπερήχων)
SN	2,1	0,7	0,9
SCM	3,7	0,7	1,8
SDZ	1,2	0,8	2,7
STZ	3,3	0,4	2
SMZ	1,7	0,4	1,4
SMT	2,9	0,9	3

Τα αποτελέσματα της προκατεργασίας με τις τρεις διαφορετικές προσεγγίσεις, MIP(6-sulfa)SPE, MIP(6-sulfa)eppendorf, MIP(6-sulfa)eppendorf-sonicated, σε

πρότυπα διαλύματα και σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος έδειξαν ότι καλύτερες ανακτήσεις, ευκολότερο χειρισμό και πιο σύντομο χρόνο, έχει η τεχνική της MIP(6-sulfa)SPE. Επομένως, αυτός ο τρόπος παραλαβής των σουλφοναμιδίων από δείγματα γάλακτος, επιλέχθηκε για περαιτέρω βελτιστοποιήσεις, ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου σε δείγματα γάλακτος, σύμφωνα με την απόφαση 657/2002/ΕΕ.

12.ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ MIPSPE(6-sulfa)

Το αρχικό πρωτόκολλο, το οποίο έχρηζε περαιτέρω βελτιστοποίησης είναι το ακόλουθο:

1. Προσθήκη 30 mg MIP(6-sulfa) σε μικροστήλη της SPE.
2. Φόρτωση 500 μ L προτύπου διαλύματος μίγματος των έξι σουλφοναμιδίων 5 ng/ μ L ή αποπρωτεϊνωμένου δείγματος γάλακτος εμβολιασμένο με 500 μ L προτύπου διαλύματος μίγματος των έξι σουλφοναμιδίων 5 ng/ μ L.
3. Χρόνος φόρτωσης 15 min.
4. Απομάκρυνση δείγματος.
5. Προσθήκη 1 mL διαλύτη έκλουσης 1% CH₃COOH:MeOH:ACN-50:10:40% v/v.
6. Χρόνος έκλουσης 15 min.
7. Απομάκρυνση διαλύτη έκλουσης και παραλαβή εκλούσματος.
8. Εξάτμιση σε ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού.
9. Επαναδιάλυση σε 0,5 mL κινητής φάσης και μέτρηση στην HPLC.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν και αξιολογήθηκαν, ώστε να βελτιστοποιηθούν είναι οι ακόλουθες:

- Επίδραση ενεργοποίησης υλικού MIP(6-sulfa).
- Μάζα υλικού MIP(6-sulfa).
- Αποπρωτεϊνωση γάλακτος-κατεργασία γάλακτος.
- Χρόνος φόρτωσης.
- Τύπος διαλύτη έκλουσης.
- Όγκος διαλύτη έκλουσης.
- Χρόνος έκλουσης.

12.1. Επίδραση ενεργοποίησης

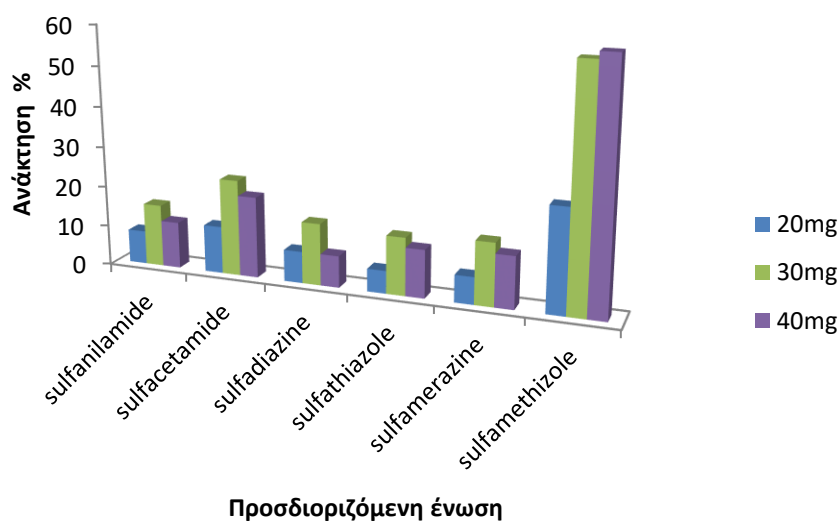
Από τα αποτελέσματα που λήφθηκαν, εκτιμήθηκε ότι η ενεργοποίηση δεν έπαιζε σημαντικό ρόλο στη διαδικασία, επομένως παραλήφθηκε αυτό το στάδιο, ώστε να μειωθεί και ο χρόνος προκατεργασίας. Οι τιμές της απόλυτης ανάκτησης με και χωρίς ενεργοποίηση φαίνονται στον Πίνακα 12.1.

Πίνακας 12.1. Επίδραση της ενεργοποίησης του υλικού στο ποσοστό της ανάκτησης.

Ένωση	Απόλυτη Ανάκτηση %	
	Με ενεργοποίηση	Χωρίς ενεργοποίηση
SN	12,5	13,6
SCM	15,6	17,5
SDZ	13,4	14,2
STZ	13,1	12,5
SMZ	12,8	13,1
SMT	42,6	44,7

12.2. Επίδραση μάζας υλικού MIP(6-sulfa)

Μελετήθηκε για βελτιστοποίηση η μάζα του υλικού για 20, 30 και 40 mg. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν παρουσιάζονται στο Σχήμα 12.1., όπως φαίνεται, για 30 mg MIP(6-sulfa), οι απόλυτες ανακτήσεις των έξι ενώσεων είναι σαφώς καλύτερες. Μόνο για την SMT, οι λαμβανόμενες ανακτήσεις, με ποσότητα 30 και 40 mg αντίστοιχα, είναι παρόμοιες. Ωστόσο, επιλέγεται ως βέλτιστη ποσότητα τα 30 mg, αφού για το σύνολο των ενώσεων δίνει υψηλότερες τιμές ανάκτησης.



Σχήμα 12.1. Επίδραση της ποσότητας MIP(6-sulfa) στο ποσοστό ανάκτησης της κάθε ένωσης.

12.3. Επίδραση χρόνου φόρτωσης δείγματος

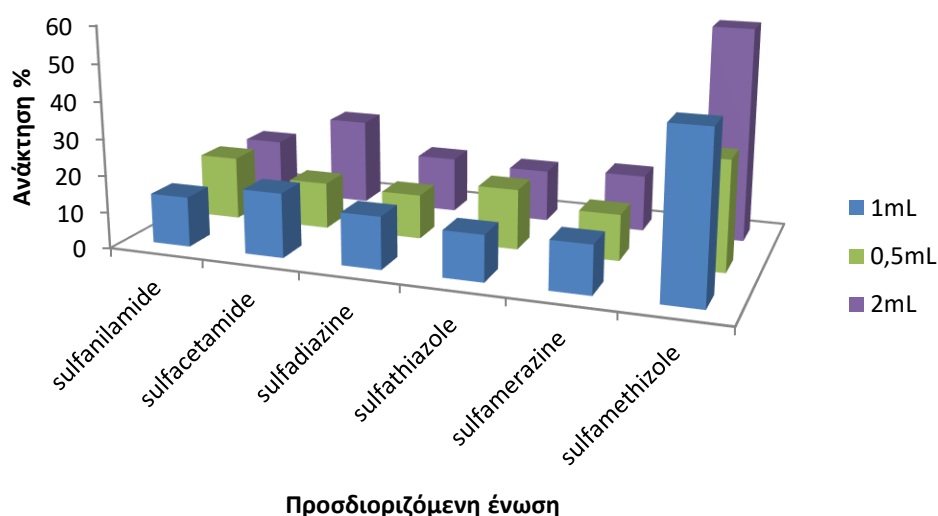
Η επίδραση του χρόνου φόρτωσης εκτιμήθηκε από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για το MIP(STZ). Το MIP(6-sulfa) έχει παρασκευαστεί με σκοπό να αναγνωρίζει εκλεκτικά έξι σουλφοναμίδια, ένα εκ των οποίων η STZ, είναι το μόριο-στόχος του MIP(STZ). Εξαιτίας αυτού, η συμπεριφορά των δύο υλικών ήταν παρόμοια και για την εκτίμηση της επίδρασης του χρόνου φόρτωσης χρησιμοποιήθηκαν τα αποτελέσματα που αναφέρονται στην Παράγραφο 11.2., όπου πραγματοποιήθηκαν επαναλαμβανόμενες δοκιμές για 0, 2, 5, 15 και 20 min. Από το Σχήμα 11.3., φαίνεται ότι τα 15 min είναι ο χρόνος, για τον οποίο η σουλφαθειαζόλη δίνει τα υψηλότερα ποσοστά απόλυτης ανάκτησης. Επομένως, τα 15 min επιλέχθηκαν ως καταλληλότερος χρόνος για τη διαδικασία της ρόφησης των συστατικών.

12.4. Επίδραση διαλύτη έκλουσης

Ο διαλύτης έκλουσης ήταν ακόμη μία παράμετρος που εκτιμήθηκε από την αρχική μελέτη για το MIP(STZ). Το βέλτιστο εκλουστικό σύστημα έχει ήδη εκτιμηθεί όπως φαίνεται στο Σχήμα 11.1. και είναι το 1% CH₃COOH:ACN:MeOH σε αναλογία όγκων 50:10:40% v/v.

12.5. Επίδραση όγκου διαλύτη έκλουσης

Το εκλουστικό σύστημα 1% CH₃COOH:MeOH:ACN σε αναλογία 50:10:40% v/v, εκτιμήθηκε ως το καταλληλότερο σύστημα διαλυτών, για το σκοπό που προοριζόταν. Ωστόσο υπολογίστηκε η ποσότητα του διαλύτη έκλουσης, για την οποία τα ποσοστά απόλυτης ανάκτησης είναι υψηλότερα. Έγιναν δοκιμές για 0,5, 1 και 2 mL και τα εξαγόμενα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 12.2. Τα 2 mL κρίνονται ως καταλληλότερος όγκος διαλύτη έκλουσης.



Σχήμα 12.2. Επίδραση όγκου διαλύτη έκλουσης.

12.6. Επίδρασης χρόνου έκλουσης

Η επίδραση του χρόνου έκλουσης εκτιμήθηκε από τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν για το MIP(STZ), όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 11.2. Πραγματοποιήθηκαν μελέτες για 0, 2, 5, 15 και 20 min. Από το Σχήμα 11.4., φαίνεται ότι τα 15 και τα 20 min δίνουν τις μέγιστες τιμές των απόλυτων ανακτήσεων για τη σουλφαθειαζόλη. Επιλέχθηκε ως βέλτιστος χρόνος έκλουσης τα 15 min, ώστε να είναι πιο σύντομος ο συνολικός χρόνος προκατεργασίας.

12.7. Κατεργασία γάλακτος

Τέλος, η παράμετρος που θα έπρεπε να μελετηθεί είναι ο τρόπος προκατεργασίας του γάλακτος, αφού η τελική μέθοδος προορίζεται για προσδιορισμό σουλφοναμιδίων σε δείγματα γάλακτος.

Αρχικά, εξετάστηκε η περίπτωση εφαρμογής της διαδικασίας εκχύλισης, χωρίς να γίνει αποπρωτεΐνωση στο γάλα. Αυτό όμως απορρίφθηκε, καθώς οι πρωτεΐνες του γάλακτος έφραζαν τη μικροστήλη της SPE και δε μπορούσε να συνεχιστεί και να ολοκληρωθεί η διαδικασία της εκχύλισης.

Επομένως, η αποπρωτεΐνωση του γάλακτος κρίθηκε απαραίτητη. Στη συνέχεια, έπρεπε να εκτιμηθεί εκείνο το σύστημα αποπρωτεΐνωσης που θα έδινε τις υψηλότερες απόλυτες ανακτήσεις. Η διαδικασία αποπρωτεΐνωσης έχει ως εξής:

1. Σε ένα falcon τοποθετήθηκαν 1 g γάλακτος, 500 μ L μίγματος των έξι ενώσεων 5 ng/ μ L και 2 mL από το μέσο αποπρωτεΐνωσης.
2. Πραγματοποιήθηκε ανάδευση στο vortex για 1 min.
3. Ακολούθησε φυγοκέντρηση για 15 min.
4. Παραλαβή υπερκειμένου.
5. Εξάτμιση σε ρεύμα N₂, μέχρι τελικό όγκο 1 mL.
6. Φόρτωση δείγματος στην SPE και συνέχεια πρωτοκόλλου.

Στον Πίνακα 12.2. φαίνονται τα διαφορετικά μέσα αποπρωτεΐνωσης που μελετήθηκαν και οι αντίστοιχες απόλυτες ανακτήσεις για κάθε μία από τις έξι ενώσεις.

Πίνακας 12.2. Απόλυτες ανακτήσεις για τις έξι ενώσεις, με διαφορετικά μέσα αποπρωτεΐνωσης του γάλακτος.

Μέσο αποπρωτεΐνωσης	Ανάκτηση %					
	SN	SCM	SDZ	STZ	SMZ	SMT
Ακετονιτρίλιο	6,8	5,3	4,4	5,9	6,2	10,3
Τριφθοροξικό οξύ 10% v/v	1,2	2	4,4	2,4	2,5	7,3
Τριχλωροξικό οξύ 20% v/v	-	2	1,5	1,7	2,5	2,5
Ακετόνη	1,4	0,7	3,4	1,4	0,6	1,5

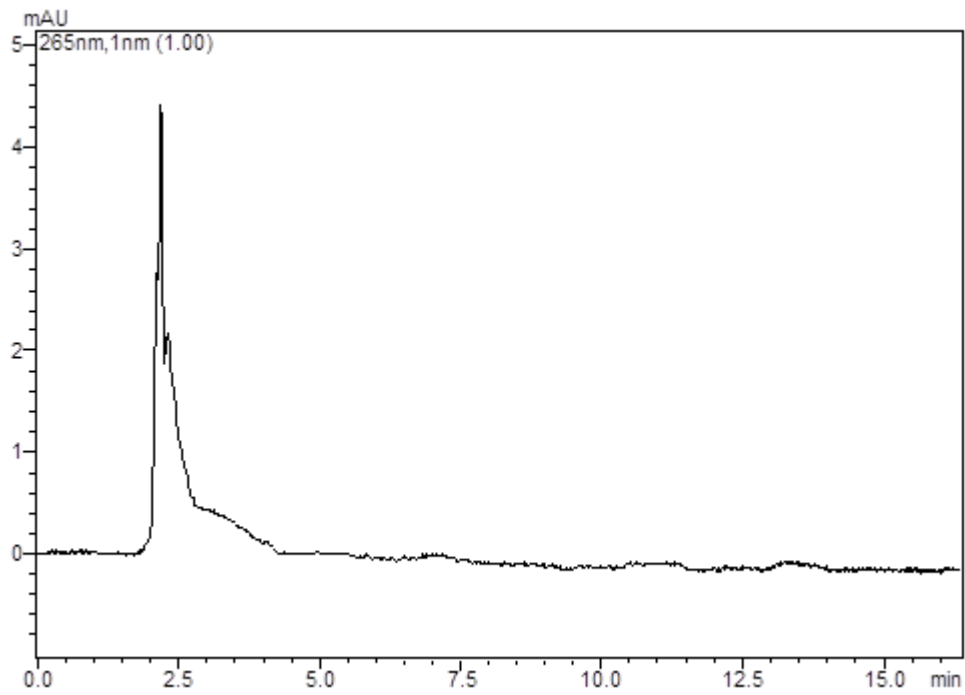
Το ακετονιτρίλιο είναι το μέσο αποπρωτεΐνωσης, με το οποίο εξάγονται τα υψηλότερα ποσοστά απόλυτης ανάκτησης για τα έξι προσδιοριζόμενα σουλφοναμίδια. Ακόμη αξίζει να σημειωθεί ότι από τη μελέτη της ποσότητας του γάλακτος σε 0,5, 1 και 2 g, εκτιμήθηκε ότι το 1 g είναι καταλληλότερη ποσότητα για τη διεξαγωγή έγκυρων αποτελεσμάτων.

12.8. Τελικό πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε για την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου

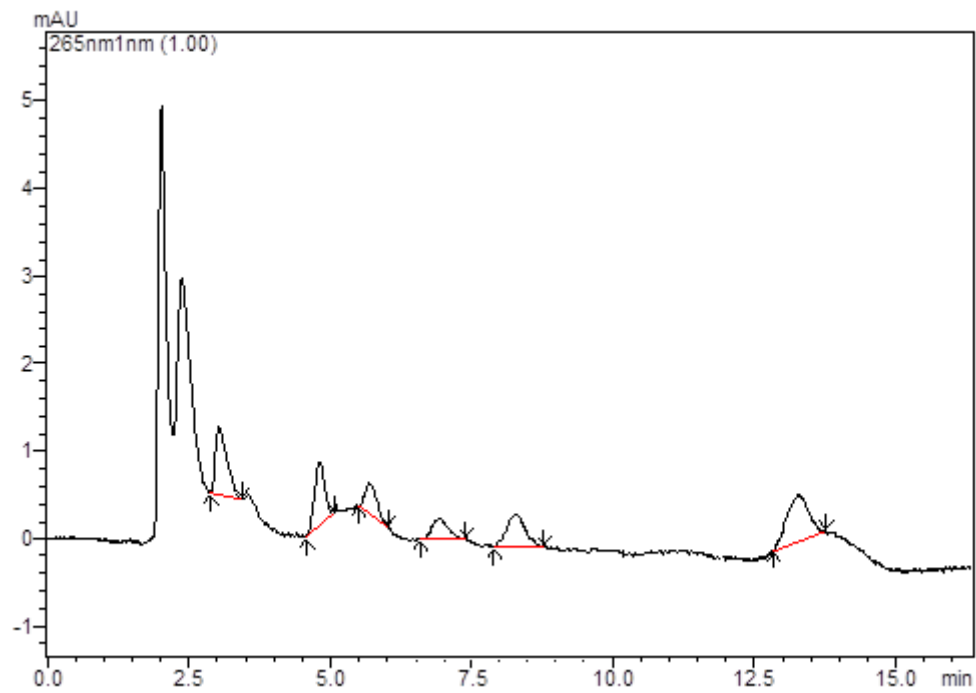
Το τελικό πρωτόκολλο για τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης με χρήση μοριακώς αποτυπωμένου πολυμερούς, MIPSPE (Molecular Imprinted Polymer Solid Phase Extraction) που επιλέχθηκε και εφαρμόστηκε για την επικύρωση της μεθόδου, έχει ως εξής:

- Προσθήκη 30 mg MIP(6-sulfa) σε μικροστήλη της SPE.
- Αποπρωτεϊνωμένο δείγμα γάλακτος (1 g γάλακτος φυγοκεντρείται με 2 mL ακετονιτρίλιο για 15 min και παραλαμβάνεται το υπερκείμενο), εμβολιασμένο με πρότυπο διάλυμα μίγματος των έξι σουλφοναμιδίων.
- Χρόνος φόρτωσης 15 min.
- Απομάκρυνση δείγματος.
- Προσθήκη 2 mL διαλύτη έκλουσης 1% CH₃COOH:MeOH:ACN-50:10:40% v/v.
- Χρόνος έκλουσης 15 min.
- Απομάκρυνση διαλύτη έκλουσης και παραλαβή εκλούσματος.
- Εξάτμιση σε ρεύμα N₂ μέχρι ξηρού.
- Επαναδιάλυση σε 0,5 mL κινητής φάσης και μέτρηση στην HPLC.

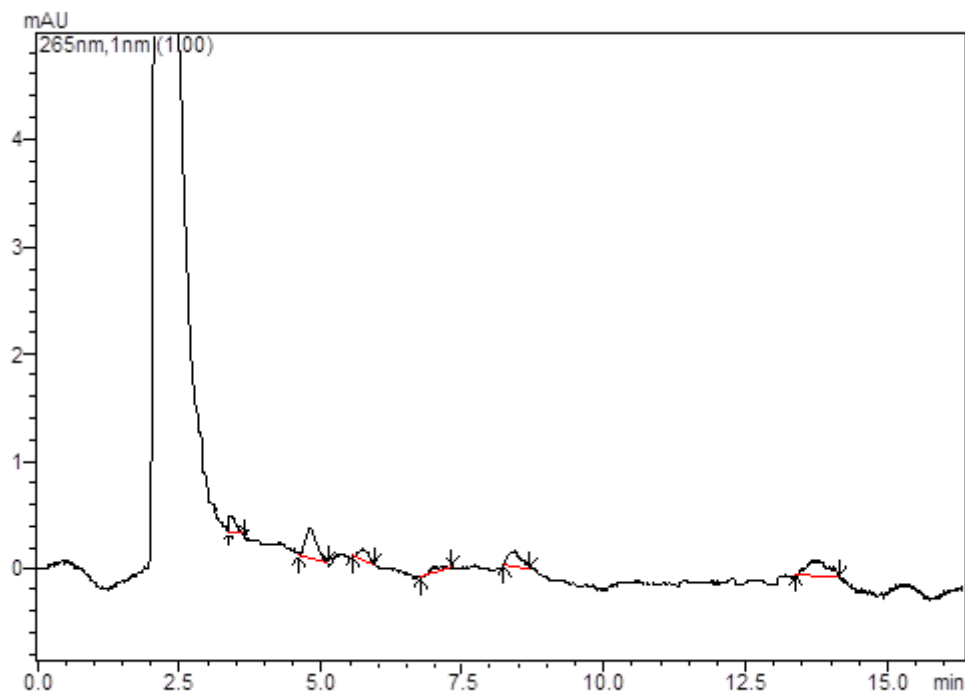
Στο Σχήμα 12.3. απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα λευκού δείγματος γάλακτος 0%, ενώ στο Σχήμα 12.4. ένα τυπικό χρωματογράφημα των έξι ενώσεων, σε εμβολιασμένο δείγμα γάλακτος στην τιμή του MRL, μετά από κατεργασία με τη μέθοδο MIPSPE που αναπτύχθηκε και στο Σχήμα 12.5. παρουσιάζεται ένα χρωματογράφημα με χρήση NIP υλικού.



Σχήμα 12.3. Χρωματογράφημα λευκού δείγματος γάλακτος 0%.



Σχήμα 12.4. Χρωματογράφημα των έξι ενώσεων σε εμβολιασμένο δείγμα γάλακτος στο MRL, με χρήση MIP(6-sulfa).



Σχήμα 12.5. Χρωματογράφημα των έξι ενώσεων σε εμβολιασμένο δείγμα γάλακτος στο MRL, με χρήση NIP.

12.9. Μελέτες που αναφέρονται στο υλικό MIP(6-sulfa)

12.9.1. Μελέτη εκλεκτικότητας του υλικού

Με σκοπό να διαπιστωθεί η εκλεκτικότητα του υλικού ως προς τα έξι μόρια-στόχους, πραγματοποιήθηκαν δοκιμές με εφαρμογή του πρωτοκόλλου για δομικά παρόμοιες, αλλά και διαφορετικές ενώσεις. Οι δοκιμές πραγματοποιήθηκαν για πρότυπα διαλύματα συγκέντρωσης 5 ng/μL. Οι ανακτήσεις, καθώς και οι ενώσεις που δοκιμάστηκαν, δίνονται στον Πίνακα 12.3. Όπως είναι εμφανές το MIP(6-sulfa), δεν είναι ικανό να αναγνωρίσει ενώσεις με τελείως διαφορετική δομή, ωστόσο φαίνεται να είναι εκλεκτικό και για άλλα σουλφοναμίδια πέρα από τα έξι, για τα οποία προορίζεται η χρήση του. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι όλα τα σουλφοναμίδια, έχουν μία κοινή δομική μονάδα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.1.

Πίνακας 12.3. Αποτελέσματα μελέτης εκλεκτικότητας MIP(6-sulfa).

Ένωση	Ανάκτηση %
Χλωραμφενικόλη	-
Θειαμφενικόλη	-
Φλορφενικόλη	-
Φλουμεκίνη	-
Οξακιλίνη	-
Σουλφαδιμεθοξίνη	18
Σουλφαμεθοξαζόλη	25
Σουλφισοξαζόλη	42

12.9.2. Μελέτη χωρητικότητας του υλικού

Η μέγιστη ποσότητα των έξι σουλφοναμιδίων που μπορεί να προσροφηθεί στη μονάδα μάζας, υπολογίζεται από τη χωρητικότητα σε κατάσταση ισορροπίας, η οποία δίνεται από τη σχέση 12.1:

$$Q_e = (C_e - C_i)V/m$$

Όπου,

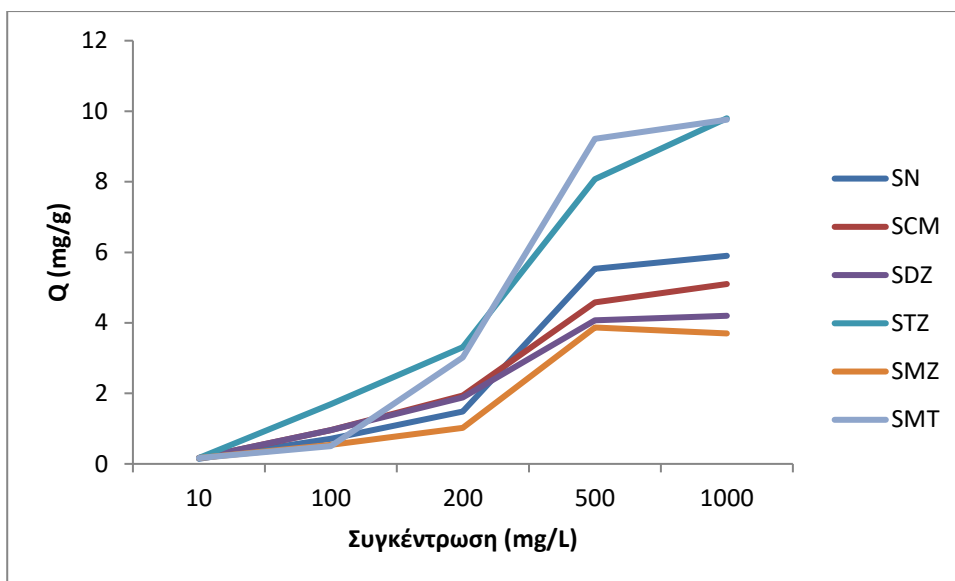
C_e η συγκέντρωση που υπολογίζεται (mg/L)

C_i η αρχική συγκέντρωση (mg/L)

V ο όγκος δείγματος (L)

m η μάζα του υλικού (mg). [38, 39]

Για την τελική εκτίμηση της χωρητικότητας, εφαρμόστηκε το βέλτιστο πρωτόκολλο εκχύλισης, όπου στην ίδια μικροστήλη έγινε φόρτωση προτύπων διαλυμάτων σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις 10, 50, 100, 200, 500 και 1000 mg/L. Διατηρήθηκαν σταθερές οι παράμετροι: όγκος και μάζα, 0,5 mL και 30 mg αντίστοιχα. Επομένως, μετά το πέρας των εκχυλίσεων, έγιναν μετρήσεις στην HPLC για τον υπολογισμό των τελικών συγκεντρώσεων και από τη σχέση 12.1 υπολογίστηκε η μέγιστη χωρητικότητα του MIP(6-sulfa), για κάθε μία από τις έξι ενώσεις, Σχήμα 12.6.



Σχήμα 12.6. Διάγραμμα μέγιστης χωρητικότητας του υλικού για τα έξι σουλφοναμίδια.

Από το Σχήμα 12.6. προκύπτει ποια είναι η μέγιστη ποσότητα του κάθε σουλφοναμιδίου που μπορεί να προσροφηθεί από το υλικό MIP(6-sulfa), οι τιμές δίνονται στον Πίνακα 12.4.

Πίνακας 12.4. Μέγιστη χωρητικότητα του υλικού για κάθε μία από τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

Ένωση	Q(mg/g)
SN	6
SCM	5,1
SDZ	4,2
STZ	9,8
SMZ	3,7
SMT	9,8

12.9.3 Μελέτη του χρόνου ζωής του υλικού

Σε μελέτες που χρησιμοποιούν υλικά για εκχύλιση των επιθυμητών συστατικών, σκόπιμο είναι να προσδιορίζεται η διάρκεια ζωής της ποσότητας υλικού που εφαρμόζεται στη διαδικασία. Δηλαδή, να εκτιμάται πόσες φορές μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ίδια ποσότητα υλικού για το σκοπό που προορίζεται, δίνοντας επαναλήψιμα και έγκυρα αποτελέσματα.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αξιολογήθηκε ότι το MIP(6-sulfa), μπορεί να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες από δεκαπέντε φορές για εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος, δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα για τα έξι σουλφοναμίδια. Μετά το πέρας της προκατεργασίας ενός δείγματος, το υλικό ξεπλένεται με ελάχιστη ποσότητα νερού και είναι ξανά έτοιμο για χρήση. Είναι σημαντικό ένα ροφητικό υλικό να είναι πολλαπλών χρήσεων, καθώς αυτό είναι και δαπανηρό, αλλά ταυτόχρονα η απόρριψή του επιβαρύνει το περιβάλλον.

13. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΕΝΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ 657/2002/ΕΕ

13.1. Κατασκευή εξισώσεων παλινδρόμησης σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος

Για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα των εξεταζόμενων σουλφοναμιδίων σε συγκεντρώσεις 0,5, 1, 1,5, 2,5 και 5 ng/μL, με τα οποία εμβολιάστηκαν τα δείγματα γάλακτος. Μετά την προκατεργασία των δειγμάτων με MIPSPE, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 12.8., έγιναν τρεις μετρήσεις, για κάθε επίπεδο συγκέντρωσης στο κάθε εκχύλισμα.

Από τα αποτελέσματα που ελήφθησαν, υπολογίστηκαν οι συντελεστές προσδιορισμού με εφαρμογή της μεθόδου ελαχίστων τετραγώνων σε κατάλληλο υπολογιστικό πρόγραμμα. Τα αποτελέσματα για τα εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.1.

Πίνακας 13.1. Εξισώσεις παλινδρόμησης και συντελεστές προσδιορισμού για τα εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος.

Προσδιοριζόμενη ένωση	Εξίσωση παλινδρόμησης	r ²
SN	$y = (10,733 \pm 0,7945)x + (153,94 \pm 124,04)$	0,9892
SCM	$y = (4,8776 \pm 0,3570)x + (683,48 \pm 95,2884)$	0,9894
SDZ	$y = (32,32 \pm 5,8319)x + (3700 \pm 1537,48)$	0,9325
STZ	$y = (4,1923 \pm 0,1119)x + (980,69 \pm 17,6956)$	0,9993
SMZ	$y = (7,1455 \pm 0,4119)x + (1115,5 \pm 117,4264)$	0,9934
SMT	$y = (12,852 \pm 0,5027)x + (1193,5 \pm 47,6419)$	0,9969

13.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης

Μετά την εύρεση των εξισώσεων των καμπυλών αναφοράς, ακολούθησε προσδιορισμός των ορίων ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικής αποτίμησης (LOQ).

Το όριο ανίχνευσης είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση συστατικού, η οποία μπορεί να ανιχνευθεί πάνω από τη βασική γραμμή θορύβου του ανιχνευτή, αλλά όχι απαραίτητα να προσδιοριστεί ποσοτικά. Στην πράξη, το όριο ανίχνευσης είναι η εισαγόμενη ποσότητα, που παρέχει κορυφή με ύψος διπλάσιο ή τριπλάσιο του ύψους θορύβου της βασικής γραμμής. Το LOQ υπολογίστηκε ως η μικρότερη συγκέντρωση που ανιχνεύθηκε και ποσοτικοποιήθηκε, με κορυφή δεκαπλάσια του S/N.

Το LOQ είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση που μπορεί να υπολογιστεί ποσοτικά με ορισμένη ακρίβεια και πιστότητα. Εναλλακτικά, το LOQ είναι η χαμηλότερη ποσότητα εισαγόμενου συστατικού, πάνω από το θόρυβο της βασικής γραμμής που παρέχει επαναλήψιμα εμβαδά κορυφής και μπορεί να προσδιοριστεί ποσοτικά.

Το ανώτατο επιτρεπόμενο όριο (MRL) που έχει θεσπίσει η Ευρωπαϊκή Ένωση για όλα τα σουλφοναμίδια στο αγελαδινό γάλα είναι τα 100 µg/kg. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα είναι φανερό ότι οι τιμές των LODs και LOQs που λήφθηκαν είναι χαμηλότερες από τις τιμές των MRLs, Πίνακας 13.2.

Πίνακας 13.2. Όρια ανίχνευσης και ποσοτικής αποτίμησης για τις έξι ενώσεις σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος.

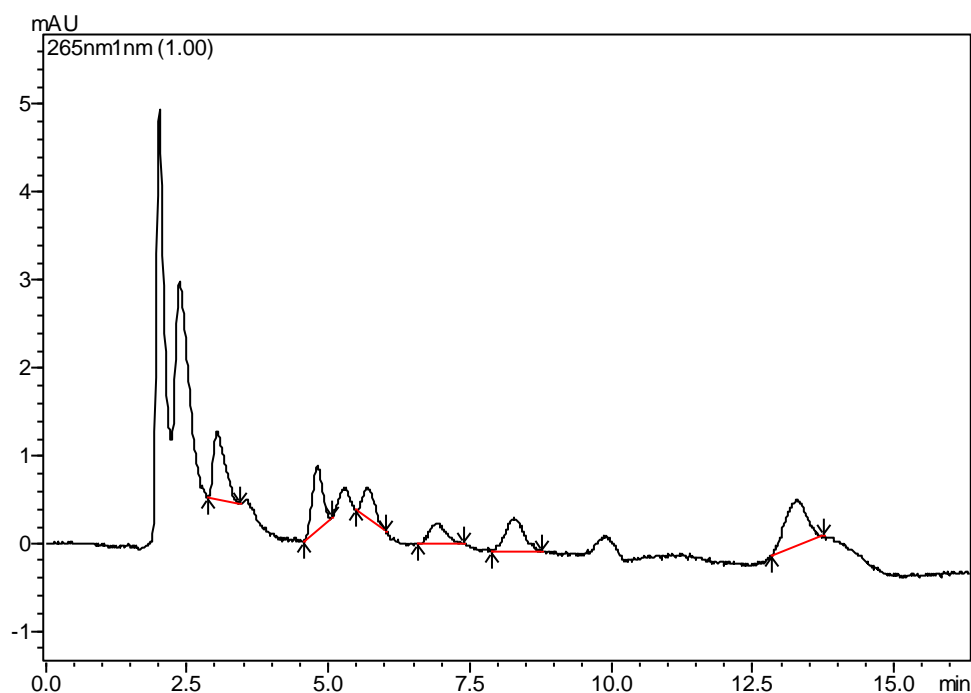
Ένωση	LOD (µg/kg)	LOQ (µg/kg)
SN	3,1	9,1
SCM	13,3	39,3
SDZ	14,1	42,2
STZ	1,9	5,6
SMZ	8,9	26,6
SMT	12,6	37,8

13.3. Υπολογισμός διαχωριστικής ικανότητας σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος

Τα αποτελέσματα για τη διακριτική ικανότητα που προέκυψαν ανά ζεύγη των ενώσεων, σύμφωνα με το βέλτιστο πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης, σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος στο MRL, δίνονται στον Πίνακα 13.3. Στο Σχήμα 13.1. απεικονίζεται ένα χρωματογράφημα των έξι σουλφοναμιδίων (5 ng/μL).

Πίνακας 13.3. Διαχωριστική Ικανότητα.

Ενώσεις	Διαχωριστική Ικανότητα
SN- SCM	1,1
SCM-SDZ	0,54
SDZ-STZ	1,23
STZ-SMZ	1,0
SMZ-SMT	2,65



Σχήμα 13.1. Χρωματογράφημα των έξι ενώσεων σε εμβολιασμένο δείγμα γάλακτος στο MRL.

13.4. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα (intra-day repeatability)

Για την εκτίμηση της επαναληψιμότητας, τρία δείγματα γάλακτος εμβολιάζονται με πρότυπο διάλυμα των εξεταζόμενων ενώσεων σε συγκεντρώσεις 0,5×MRL, 1×MRL και 1,5×MRL. Αφού υπέστησαν κατεργασία τα δείγματα με τη μέθοδο MIPSPE που αναπτύχθηκε, το εκχύλισμα που προέκυψε για κάθε δείγμα μετρήθηκε 4 φορές. Από τα αποτελέσματα που προκύπτουν, υπολογίζεται η μέση ευρεθείσα συγκέντρωση σε κάθε δείγμα και η τυπική απόκλιση της κάθε μέτρησης.

Η τυπική απόκλιση και η σχετική τυπική απόκλιση υπολογίζονται από τις σχέσεις:

$$SD = \sqrt{(\bar{x} - x_i)^2 / (n - 1)}$$

Και

$$RSD(100\%) = 100 \cdot SD / \bar{x}$$

Όπου: η μέση ευρεθείσα τιμή μιας σειράς μετρήσεων,

n: ο αριθμός των μετρήσεων

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν έπειτα από στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, δίνονται στον Πίνακα 13.4.

Πίνακας 13.4. Επαναληψιμότητα και ακρίβεια της μεθόδου για τον προσδιορισμό έξι σουλφοναμιδίων σε δείγματα γάλακτος.

Ακρίβεια και Επαναληψιμότητα (n=4)				
Ένωση	Προστέθηκαν ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Μετρήθηκαν \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD%	R%
	50	56,0 \pm 4,2	7,5	112%
SN	100	90,8 \pm 4,3	4,8	90,8%
	150	148,0 \pm 4,0	2,7	98,7%
	50	45,0 \pm 1,4	3,2	90%
SCM	100	97,1 \pm 11,3	11,6	97,1%
	150	173,5 \pm 8,1	4,7	115,7%
	50	42,9 \pm 0,7	1,6	85,8%
SDZ	100	103,5 \pm 0,5	0,5	103,5%
	150	137,9 \pm 4,2	3,1	91,9%
	50	52,3 \pm 1,2	2,3	104,6%
STZ	100	95,5 \pm 6,3	6,6	95,5%
	150	155,1 \pm 1,0	0,6	103,4%
	50	57,2 \pm 7,6	13,4	114,4
SMZ	100	102,7 \pm 5,9	5,8	102,7%
	150	157,8 \pm 1,6	1,0	105,2%
	50	51,6 \pm 3,2	6,1	103,2%
SMT	100	106,0 \pm 2,2	2,1	106%
	150	149,8 \pm 2,2	1,4	99,9%

13.5. Ακρίβεια και πιστότητα σε διάρκεια τεσσάρων ημερών (inter-day precision)

Για τον έλεγχο της πιστότητας της μεθόδου στη διάρκεια διαδοχικών ημερών, έγινε ανάλυση τριών δειγμάτων, μετά από την κατάλληλη προκατεργασία, εμβολιασμένα στις συγκεντρώσεις 0,5 \times MRL, 1 \times MRL, 1,5 \times MRL, για τέσσερις διαδοχικές ημέρες. Η ακρίβεια και η τυπική απόκλιση υπολογίσθηκαν ως τυπική

απόκλιση SD και σχετική τυπική απόκλιση RSD αντίστοιχα, όπως παρουσιάζεται στον Πίνακα 13.5.

Πίνακας 13.5. Πιστότητα και ακρίβεια της μεθόδου για τον προσδιορισμό έξι σουλφοναμιδίων σε δείγματα γάλακτος.

Ακρίβεια και Πιστότητα (n=3×4)				
Ένωση	Προστέθηκαν (μg/kg)	Μετρήθηκαν ± SD (μg/kg)	RSD%	R%
	50	53,9±2,6	4,9	107,8%
SN	100	90,2±3,9	4,4	90,2%
	150	150,0±6,8	4,6	100,0%
	50	49,5±4,9	9,9	99,0%
SCM	100	95,6±7,8	8,1	95,6%
	150	160,5±10,3	6,4	107,0%
	50	42,9±0,9	2,3	85,8%
SDZ	100	101,9±3,1	3,0	101,9%
	150	140,1±3,2	2,2	93,4%
	50	51,7±0,8	1,6	103,4%
STZ	100	98,9±2,	2,9	98,9%
	150	151,1±3,9	2,6	100,7%
	50	54,6±4,0	7,3	109,2%
SMZ	100	99,7±4,1	4,1	99,7%
	150	151,3±4,3	2,8	100,8%
	50	49,9±1,8	3,6	99,8%
SMT	100	103,5±1,4	1,3	103,5%
	150	151,3±4,3	2,8	100,8%

13.6. Όριο απόφασης (CC_α) και ικανότητα ανίχνευσης (CC_β)

Οι τιμές του CC_α υπολογίστηκαν με εμβολιασμό έξι δειγμάτων γάλακτος στις τιμές του ανώτατου επιτρεπόμενου ορίου του κάθε σουλφοναμιδίου που είναι κοινό

για όλα (100 µg/kg). Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, παρουσιάζονται στον πίνακα 13.6.

Για την αξιολόγηση της ικανότητας ανίχνευσης, CC_{β} , έξι δείγματα εμβολιάστηκαν με πρότυπο διάλυμα των έξι ενώσεων συγκέντρωσης, ως προς κάθε ένωση, ίδιας με το όριο απόφασης της κάθε μίας που υπολογίστηκε. Τα αποτελέσματα που ελήφθησαν από τη στατιστική επεξεργασία, δίνονται στους Πίνακες 13.6. και 13.7. αντίστοιχα.

Πίνακας 13.6. Όρια απόφασης της μεθόδου για τις έξι εξεταζόμενες ενώσεις.

Ένωση	Προστέθηκαν (µg/kg)	Μετρήθηκαν \pm SD (µg/kg)	Σφάλμα α SD*1,64	CC_{α} (µg/kg)
SN	100	92,5 \pm 4,1	6,7	106,7
SCM	100	97,1 \pm 8,2	13,4	113,4
SDZ	100	104,5 \pm 2,5	4,1	104,1
STZ	100	97,46 \pm 3,4	5,6	105,6
SMZ	100	102,7 \pm 1,2	1,9	101,9
SMT	100	107,2 \pm 1,8	2,9	102,9

Πίνακας 13.7. Ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου για τις έξι εξεταζόμενες ενώσεις.

Ένωση	Προστέθηκαν (µg/kg)	Μετρήθηκαν \pm SD (µg/kg)	Σφάλμα β SD*1,64	CC_{β} (µg/kg)
SN	106,7	71,3 \pm 8,4	13,7	120,7
SCM	113,4	99,8 \pm 1,7	2,8	115,8
SDZ	104,1	107,5 \pm 15,8	25,9	129,9
STZ	105,6	113,4 \pm 18,5	30,4	135,4
SMZ	101,9	166,8 \pm 10,9	17,9	119,9
SMT	102,9	114,1 \pm 6,9	11,4	114,4

13.7. Ανθεκτικότητα μεθόδου

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου αξιολογήθηκε με εφαρμογή του πειραματικού σχεδιασμού Youden, επιφέροντας στη μέθοδο μικρές σκόπιμες μεταβολές σε επτά παραμέτρους που μπορούν να επιδράσουν κατά την προκατεργασία και να επηρεάσουν το αποτέλεσμα. Οι παράμετροι που επιλέχθηκαν ήταν: η μάζα γάλακτος, η μάζα του προσροφητικού, ο όγκος του διαλύτη ελκούσης, ο χρόνος φόρτωσης, ο χρόνος έκλουσης, το εκλουστικό σύστημα και η ενεργοποίηση του υλικού. Λευκά δείγματα γάλακτος 0% εμβολιάστηκαν στο ανώτατο επιτρεπόμενο όριο και πραγματοποιήθηκαν τα οκτώ πειράματα s, t, u, v, w, x, y, z, όπως παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.8. [40]

Πίνακας 13.8. Πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη ανθεκτικότητας.

Παράγοντες	Μονάδες	Ονομαστικές Τιμές	Εναλλακτικές Τιμές	Αριθμός Πειράματος							
				1	2	3	4	5	6	7	8
Μάζα γάλακτος	g	1	0,5	A	A	A	A	a	a	a	a
Μάζα προσροφητικού	mg	30	40	B	B	b	b	B	B	b	b
Όγκος διαλύτη έκλουσης	mL	2	1	C	c	C	c	C	c	C	c
Χρόνος φόρτωσης	min	15	10	D	D	d	d	d	d	D	D
Χρόνος έκλουσης	min	15	10	E	e	E	e	e	E	e	E
Εκλουστικό σύστημα	Είδος συστήματος	1% CH ₃ COOH: MeOH:ACN (50:10:40% v/v)	H ₂ O:MeOH: ACN (50:10:40% v/v)	F	f	f	F	F	f	f	F
Ενεργοποίηση υλικού	Ναι/Όχι	Όχι	Ναι	G	g	g	G	g	G	G	g
Αποτέλεσμα				s	t	u	v	w	x	y	z

Τα αποτελέσματα που πρόεκυψαν για τις έξι προσδιοριζόμενες ενώσεις παρουσιάζονται στον Πίνακα 13.9. ως διαφορές εμβαδών των λαμβανόμενων μετρήσεων.

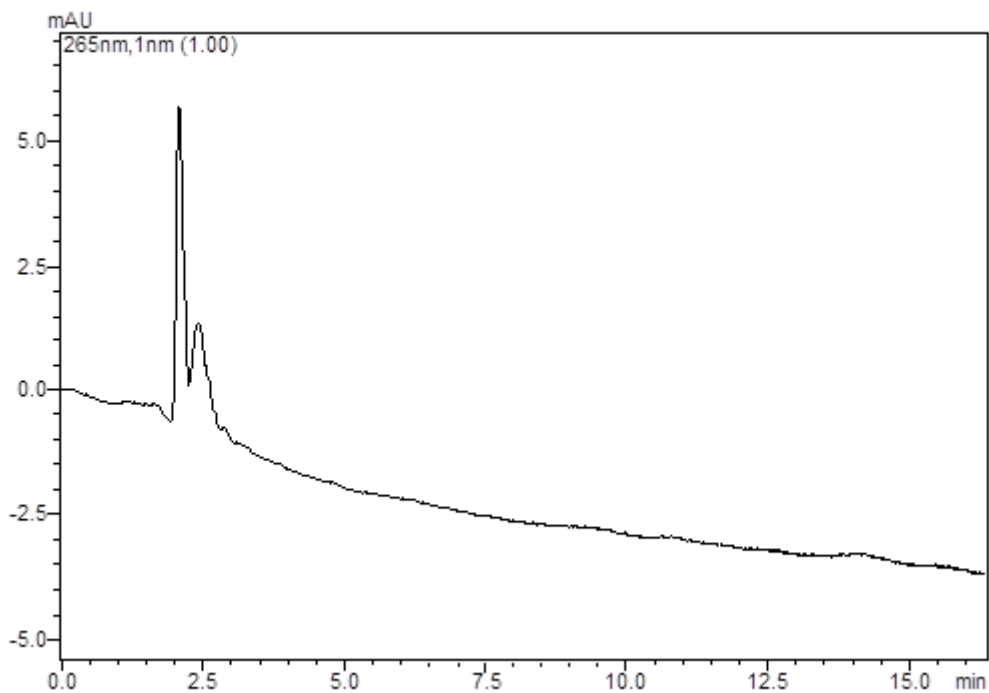
Πίνακας 13.9. Αποτελέσματα πειραματικού σχεδιασμού Youden.

Ένωση	A _A	A _A -A _a	A _B -A _b	A _C -A _c	A _D -A _d	A _E -A _e	A _F -A _f	A _G -A _g
SN	3930	3332	3267	3721	1964	1427	1293	2711
SCM	2298	1697	1212	1544	751	394	-2090	344
SDZ	7337	6475	7066	4028	2693	2955	1492	2696
STZ	1366	257	413	796	1252	-1480	148	-10
SMZ	4614	3589	3710	4043	2257	-3149	-711	1857
SMT	7649	171	2257	2214	-6241	-5533	-10204	1829

Από την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν, προκύπτει ότι για το σουλφανιλαμίδιο (SN), θετική επίδραση φαίνεται να έχει ο όγκος του εκλουστικού συστήματος, ενώ αρνητική επίδραση δεν έχει καμία παράμετρος. Για την SCM, μεγαλύτερη αρνητική επίδραση φαίνεται να έχει ο τύπος του εκλουστικού συστήματος. Για την SDZ, μεγαλύτερη θετική επίδραση έχει η μάζα του γάλακτος και η μάζα του προσροφητικού. Αντίστοιχα για την STZ, αρνητικά επιδρά ο χρόνος έκλουσης και λιγότερο η ενεργοποίηση. Για την SMZ, αρνητική επίδραση έχει ο χρόνος έκλουσης και το εκλουστικό σύστημα, ενώ μέγιστη θετική επίδραση έχει ο όγκος του διαλύτη έκλουσης. Για την SMT, αρνητική επίδραση έχει ο χρόνος φόρτωσης, ο χρόνος έκλουσης και ο τύπος του εκλουστικού συστήματος.

13.8. Εκλεκτικότητα της μεθόδου

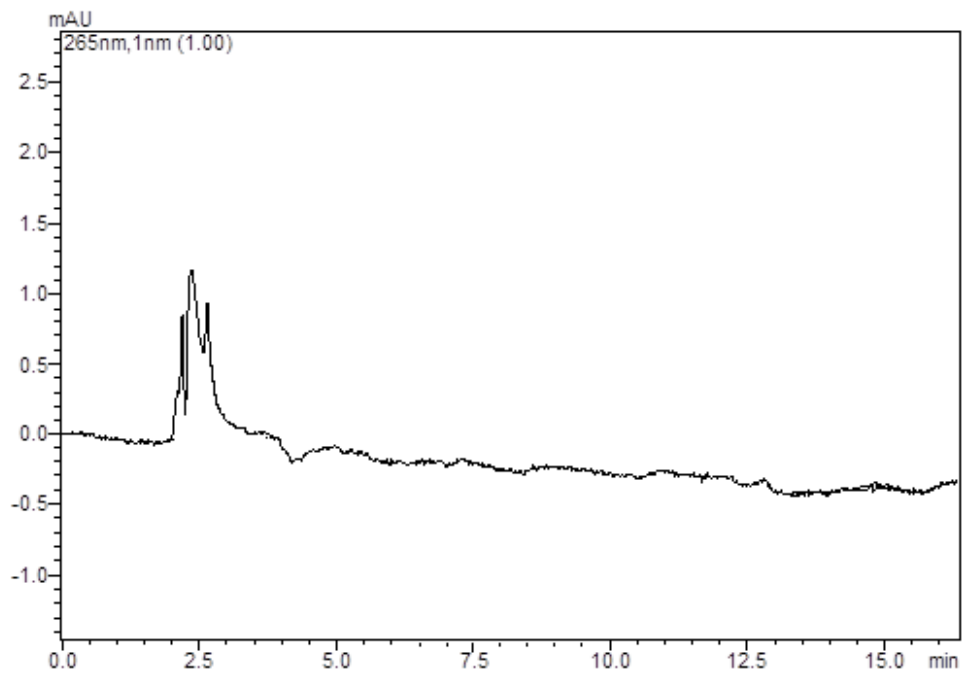
Προκειμένου να αξιολογηθεί η εκλεκτικότητα της μεθόδου, όσον αφορά στην ύπαρξη παρεμποδίσεων από ενδογενή συστατικά, έγινε εφαρμογή της σε δείγματα γάλακτος του εμπορίου με 0%, 1,5% και 3,5% λιπαρά. Έγιναν μετρήσεις σε λευκά δείγματα γάλακτος, αλλά και σε εμβολιασμένα και αποδείχθηκε ότι οι κορυφές του υποστρώματος εκλούστηκαν σε διαφορετικό χρόνο από τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, χωρίς να προκαλούν παρεμπόδιση, στο Σχήμα 13.2. δίνεται ένα χρωματογράφημα λευκού δείγματος γάλακτος 0%.



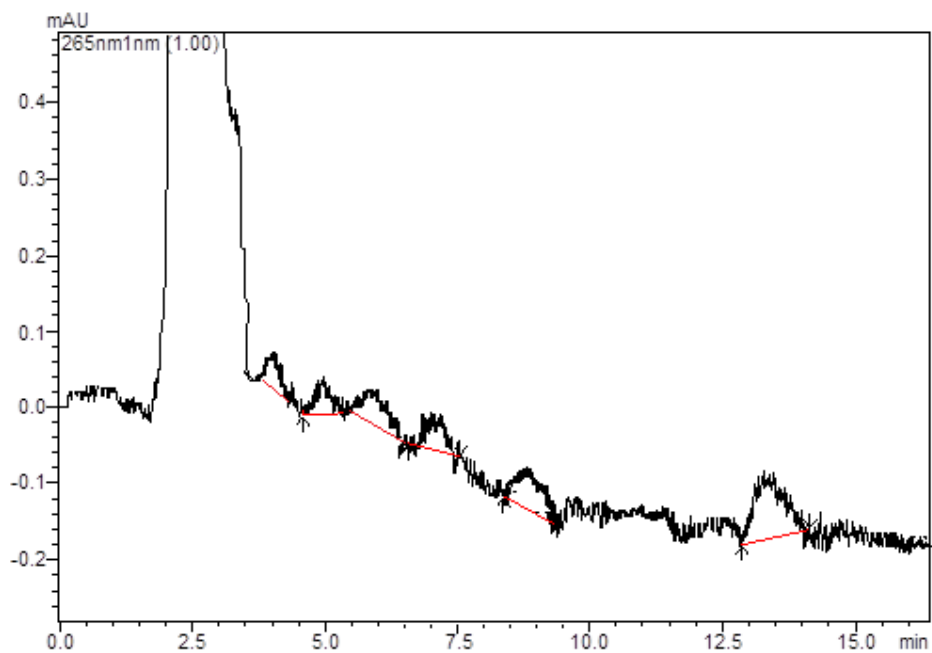
Σχήμα 13.2. Χρωματογράφημα λευκού δείγματος γάλακτος 0%.

13.9. Εφαρμογή της μεθόδου σε δείγματα μητρικού γάλακτος

Επίσης εκτιμήθηκε η αξιοπιστία της μεθόδου σε πραγματικό μητρικό γάλα. Διαπιστώθηκε ότι η μέθοδος MIPSPE που αναπτύχθηκε μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για προσδιορισμό των έξι σουλφοναμιδίων στο μητρικό γάλα, χωρίς να υπάρχουν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα. Στο Σχήμα 13.3. δίνεται το χρωματογράφημα ενός λευκού δείγματος μητρικού γάλακτος, ενώ στο Σχήμα 13.4. δίνεται ένα χρωματογράφημα εμβολιασμένου μητρικού γάλακτος με μίγμα των έξι σουλφοναμιδίων.



Σχήμα 13.3. Χρωματογράφημα λευκού δείγματος μητρικού γάλακτος.



Σχήμα 13.4. Χρωματογράφημα εμβολιασμένου μητρικού γάλακτος με μίγμα των έξι σουλφοναμιδίων (1 $\mu\text{g}/\text{kg}$).

14. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία μέθοδος για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και ποσοτικό προσδιορισμό έξι σουλφοναμιδίων (σουλφανιλαμιδίου (SN), σουλφακεταμίδης (SCM), σουλφαδιαζίνης (SDZ), σουλφαθειαζόλης (STZ), σουλφαμεραζίνης (SMZ), σουλφαμεθειζόλης (SMT)) σε δείγματα γάλακτος.

Ο διαχωρισμός και ο ποσοτικός προσδιορισμός πραγματοποιήθηκαν με εφαρμογή της τεχνικής Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων. Η αναλυτική στήλη που χρησιμοποιήθηκε για τον διαχωρισμό ήταν Merck-Lichrospher RP18e, 5 μm 250 \times 4 mm. Εφαρμόστηκε πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης με 0,1% HCOOH:ACN:MeOH, σε αναλογία όγκων 80:3:17% v/v, αντίστοιχα. Η ανίχνευση έγινε στα 265 nm του ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων, καθώς αυτό το μήκος κύματος έδινε το καλύτερο σήμα και για τα έξι σουλφοναμίδια. Τελικά, ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης διαρκεί σχεδόν 16 min, ενώ ο χρόνος έκλουσης των έξι ενώσεων είναι, SN 2,8 min, SCM 4,5 min, SDZ 5,5 min, STZ 6,6 min, SMZ 8,1 min και SMT 13,2 min.

Η προκατεργασία των δειγμάτων γάλακτος στηρίχτηκε στη χρήση μοριακώς αποτυπωμένου πολυμερούς. Αρχικά, δοκιμάστηκε το υλικό MIP(STZ), ειδικά σχεδιασμένο να δεσμεύει εκλεκτικά το μόριο της σουλφαθειαζόλης. Το υλικό αυτό δοκιμάστηκε στην τεχνική της SPE, αλλά και με την τεχνική της FPSE, όπως και της μαγνητικής ράβδου. Στις δυο τελευταίες, το υλικό ήταν ενσωματωμένο πάνω στο υλικό κυτταρίνης της FPSE και στο εσωτερικό της ράβδου, σε ίνες κυτταρίνης. Οι μικροστήλες της SPE παρασκευάστηκαν, στο εργαστήριο με χρήση φριτών, ώστε να συγκρατείται το υλικό στο εσωτερικό της μικροστήλης. Οι δοκιμές αυτές πραγματοποιήθηκαν, τόσο σε πρότυπα διαλύματα, όσο και σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος. Η τεχνική της SPE μετά από βελτιστοποίηση παραμέτρων που επηρεάζουν τη διαδικασία της εκχύλισης, όπως ο διαλύτης έκλουσης, ο χρόνος φόρτωσης και έκλουσης, κρίθηκε ως καταλληλότερη. Να σημειωθεί ότι οι ποσοτικοί προσδιορισμοί και η ανίχνευση της STZ, πραγματοποιήθηκαν στο ίδιο χρωματογραφικό σύστημα, με εφαρμογή κατάλληλων χρωματογραφικών συνθηκών για αυτό τον σκοπό.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε ένα υλικό MIP(6-sulfa), το οποίο διαθέτει τα χαρακτηριστικά της μοριακής αποτύπωσης για έξι δομικά παρόμοια σουλφοναμίδια, ένα εκ των οποίων ήταν η σουλφαθειαζόλη, για την οποία είχε προηγηθεί εκτενής μελέτη. Επομένως, αξιοποιήθηκε αυτή η δυνατότητα και εφαρμόστηκε το υλικό στην SPE, αλλά και σε φιαλίδιο erppendorf, ως μία προσέγγιση της τεχνικής dSPE, με εφαρμογή και μη υπερήχων, στα στάδια της φόρτωσης και έκλουσης. Ωστόσο και πάλι η εφαρμογή του υλικού στην SPE, δίνει καλύτερα ποσοστά ανάκτησης για πρότυπα και εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος.

Λαμβάνοντας υπόψη τις δοκιμές που έγιναν, ακολούθησε η βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου της εκχύλισης στερεάς φάσης, με χρήση μοριακώς αποτυπωμένου πολυμερούς, MIPSPE. Εκτιμήθηκε η επίδραση των ακόλουθων παραμέτρων: ενεργοποίηση του υλικού, μάζα του υλικού, χρόνος φόρτωσης δείγματος και χρόνος έκλουσης, ο τύπος και ο όγκος του διαλύτη έκλουσης και η κατεργασία γάλακτος. Από αυτές τις παραμέτρους, ο τύπος του διαλύτη έκλουσης, ο χρόνος φόρτωσης και ο χρόνος έκλουσης λήφθηκαν από την αρχική μελέτη του έγινε στο MIP(STZ). Διαπιστώθηκε ότι η ενεργοποίηση δε βελτιώνει τα αποτελέσματα, επομένως παραλήφθηκε, καταλληλότερη ποσότητα υλικού βρέθηκαν τα 30 mg, ενώ τα 15 min βρέθηκαν ως βέλτιστος χρόνος φόρτωσης δείγματος και έκλουσης, αντίστοιχα. Ως διαλύτης έκλουσης, επιλέχθηκε το μίγμα 1% CH₃COOH:ACN:MeOH, σε αναλογία όγκων 50:10:40% v/v και σε όγκο 2 mL. Τέλος, 1 g γάλακτος κατεργάστηκε με 2 mL ακετονιτριλίου, με σκοπό την κατακρήμιση των πρωτεϊνών. Το εμβολιασμένο-αποπρωτεϊνωμένο δείγμα γάλακτος, προκατεργάζεται σύμφωνα με τη μέθοδο MIPSPE που αναπτύχθηκε και ακολουθεί ανάλυση του δείγματος για ποσοτικό προσδιορισμό σύμφωνα με τη μέθοδο HPLC-DAD που αναπτύχθηκε.

Η επικύρωση της μεθόδου για τον προσδιορισμό σουλφοναμιδίων έγινε σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος 0% λιπαρά, σύμφωνα με την απόφαση 657/2002/EE. Για τη χάραξη των καμπυλών αναφοράς, λήφθηκαν μετρήσεις από έξι επίπεδα συγκέντρωσης και υπολογίστηκε ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης και για τις έξι καμπύλες μεγαλύτερος από 0,9325. Τα όρια ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) για τις έξι ενώσεις κυμαίνονται από 5,6 έως 42,2 µg/kg, ενώ τα όρια ανίχνευσης (LOD) από 1,9 έως 14,1 µg/kg. Τα όρια απόφασης CC_α βρίσκονται από 101,9 έως 106,7 µg/kg, ενώ οι τιμές για την ικανότητα ανίχνευσης CC_β δίνονται από 114,4 έως 135,4 µg/kg. Για τις μετρήσεις επαναληψιμότητας (intra day), σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, 0,5×MRL, 1×MRL και 1,5×MRL, η σχετική τυπική απόκλιση για

τις έξι ενώσεις βρέθηκε μικρότερη από 13,4% και οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν από 85,8% έως 115,7%. Ενώ για τις μετρήσεις πιστότητας, η σχετική τυπική απόκλιση είναι μικρότερη από 9,9% και οι ανακτήσεις κυμαίνονται από 85,8% έως 107,0%. Η μελέτη ανθεκτικότητας Youden, πραγματοποιήθηκε με μεταβολή επτά παραμέτρων, οι οποίες είναι: η μάζα γάλακτος, η μάζα του προσροφητικού, ο όγκος του διαλύτη ελκούσης, ο χρόνος φόρτωσης, ο χρόνος έκλουσης, το εκλουστικό σύστημα και η ενεργοποίηση του υλικού. Η μέθοδος δείχνει να είναι ανθεκτική για το σκοπό που προορίζεται.

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε δείγματα γάλακτος με 0%, 1,5% και 3,5% λιπαρά, αλλά και σε μητρικό γάλα δίνοντας αξιόπιστα αποτελέσματα και χωρίς να υπάρχουν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα.

Η προτεινόμενη MIPSPE μέθοδος που αναπτύχθηκε με σκοπό τον προσδιορισμό των έξι σουλφοναμιδίων σε δείγματα γάλακτος, φαίνεται να συνοψίζει τα εξής πλεονεκτήματα:

- Είναι *απλή* ως προς την προκατεργασία, αφού δεν απαιτούνται δύσκολοι χειρισμοί.
- Είναι πιο *γρήγορη* σε σχέση με την dispersive solid phase extraction που δοκιμάστηκε για τον ίδιο σκοπό.
- Η βέλτιστη προκατεργασία είναι συνάμα και όσο το δυνατόν πιο *φιλική στο περιβάλλον*, αφού δε χρησιμοποιούνται τοξικοί διαλύτες, όπως, τολουόλιο, βενζόλιο, χλωροφόρμιο, εξάνιο κ.ά.
- Το υλικό MIP(6-sulfa) που χρησιμοποιείται, είναι *εξαιρετικά εκλεκτικό* για σουλφοναμίδια. Επιπρόσθετα, έχει τη δυνατότητα να αναγνωρίζει και άλλα σουλφοναμίδια πέρα των έξι και αυτό οφείλεται στο ότι όλα τα σουλφοναμίδια έχουν μία κοινή δομική ομάδα, η οποία μπορεί να προσδεθεί στις κοιλότητες του υλικού.
- Η ποσότητα των 30 mg του υλικού MIP(6-sulfa), που εφαρμόστηκε στην προκατεργασία, μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό τουλάχιστον 15 φορές.
- Ο συνολικός χρόνος της ανάλυσης διαρκεί σχεδόν 16 min, χωρίς να υπάρχουν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα.
- Τελικά, η μέθοδος φαίνεται να είναι ακριβής, ευαίσθητη και να παρέχει επαναλήψιμα αποτελέσματα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC-DAD ΓΙΑ ΤΟΝ ΤΑΥΤΟΧΡΟΝΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΕΞΙ ΣΟΥΛΦΟΝΑΜΙΔΙΩΝ ΣΕ ΔΕΙΓΜΑΤΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΜΟΡΙΚΩΣ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΟΥ ΠΟΛΥΜΕΡΟΥΣ

Κεχαγιά Μαρία

Στην παρούσα διπλωματική εργασία αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μία εκλεκτική μέθοδος για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό έξι σουλφοναμιδίων σε δείγματα γάλακτος. Η προκατεργασία των δειγμάτων επιτεύχθηκε με εκχύλιση στερεάς φάσης, έπειτα από εφαρμογή μοριακώς αποτυπωμένου πολυμερούς, (Molecularly Imprinted Polymer Solid Phase Extraction, MIPSPE). Το MIP που χρησιμοποιήθηκε έχει το πλεονέκτημα να μπορεί να αναγνωρίζει εκλεκτικά έξι μόρια-στόχους, όπως και ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον ίδιο σκοπό περισσότερες από δεκαπέντε φορές.

Για την αποτελεσματική εφαρμογή της τεχνικής MIPSPE, διερευνήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν οι εξής παράμετροι: η ενεργοποίηση του υλικού, ο χρόνος φόρτωσης δείγματος, ο τύπος του διαλύτη έκλουσης, ο όγκος του διαλύτη έκλουσης, ο χρόνος της έκλουσης, όπως και ο τρόπος κατεργασίας του γάλακτος.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σύμφωνα με την απόφαση 657/2002/ΕΕ. Τα όρια απόφασης, CC_{α} , για τις έξι ενώσεις κυμαίνονται από 101,9 έως 106,7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης, CC_{β} , από 114,4 έως 135,4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Όπως φαίνεται, η μέθοδος είναι ικανή να εφαρμόζεται για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των σουλφοναμιδίων στο γάλα σε συγκεντρώσεις μικρότερες από το ανώτατο επιτρεπτό όριο που έχει θεσπιστεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση και είναι 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Η προτεινόμενη μέθοδος είναι ιδιαίτερα εκλεκτική, απλή ως προς την εφαρμογή, ευαίσθητη και δίνει επαναλήψιμα αποτελέσματα. Επομένως, κρίνεται κατάλληλη για το σκοπό που προορίζεται.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN HPLC-DAD METHOD FOR THE SIMULTANEOUS DETERMINATION OF SIX SULFONAMIDES IN MILK SAMPLES USING MOLECULARLY IMPRINTED POLYMER SOLID PHASE EXTRACTION

Kechagia Maria

In the present thesis, a selective method was developed and validated for the determination of six sulfonamides in milk samples. The sample's pretreatment was achieved with the use of molecularly imprinted polymer solid phase extraction, MIPSPE. The Molecularly Imprinted Polymer (MIP) that was used, has the advantage of being capable of identifying selectively six molecules-target and it can also be used for more than fifteen repetitions.

Several parameters as the conditioning of the material, the time of sample loading, the type of the elution solvent, the elution time and the steps of milk's treatment were investigated and optimized for the effective extraction of MIPSPE technique.

The developed method was validated according to the European Union Decision 657/2002/EE. The decision limits, CC_{α} , for these six compounds are in the range between 101.9 and 106.7 $\mu\text{g}/\text{kg}$, while the results for the detection capability, CC_{β} , are in the range between 114.4 and 135.4 $\mu\text{g}/\text{kg}$. In addition, the quantification limits (LOQ) for these six compounds are estimated between 5.6 and 42.2 $\mu\text{g}/\text{kg}$, while the detection limits (LOD) between 1.9 and 14.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$. As it is obvious, this method is capable of the quantitative determination and the identification of sulfonamides in milk samples which exist in lower concentrations than the maximum residue limit of 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ which is adopted from the European Union. The suggested method is highly selective, simple in usage, sensitive and gives repeatable results. Therefore, this method can be characterized as suitable for the desired purpose.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. <http://helios-eie.ekt.gr/EIE/handle/10442/524> (Μάιος 2017)
2. <https://en.wikipedia.org/wiki/Sulfonamide> (Μάιος 2017)
3. Τολίκα Ε., Ανάπτυξη και Επικύρωση Μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης για τον Προσδιορισμό Σουλφοναμιδίων σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης, 2011.
4. http://www.gcsf.gr/index.asp?a_id=99&txt=y&show_sub=1 (Μάιος 2017)
5. Haug A., Høstmark A. T., and Harstad O. M., Lipids in Health and Disease, 2007, **6**, 1-16.
6. <https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%93%CE%AC%CE%BB%CE%B1> (Μάιος 2017)
7. <http://medlabgr.blogspot.com/2014/06/blog-post.html> (Μάιος 2017)
8. <https://www.diatrofi.gr/food/food-food/607-γάλα-και-τύποι-γάλακτος> (Μάιος 2017)
9. Tasho R. P., and Cho J. Y., Science of the Total Environment, 2016, **563-564**, 366-374.
10. Nag S. K., Pesticides, veterinary residues and other contaminants in milk, Woodhead Publishing Limited, chapter 5, India, 2010.
11. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/EL/TXT/?uri=CELEX%3A32010R0037> (Μάιος 2017)
12. Παπαδογιάννης, Ι. Ν., Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2004.
13. Fumes B. H., Silva M. R., Andrade F.N., Domingues-Nazario C. E., and Lanças F.M., Trends in Analytical Chemistry, 2015, **71**, 9-25.
14. Gałuszka A., Migaszewski Z., and Namiesnik J., Trends in Analytical Chemistry, 2013, **50**, 78-84.

15. Armenta S., Garrigues S., and Guardia M., Trends in Analytical Chemistry, 2015, **71**, 2-8.
16. Vian M., Breil C., Vernes L., Chaabani E., and Chemat F., Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2017, **5**, 44-48.
17. Socas-Rodríguez B., Herrera-Herrera A. V., Asensio-Ramos M., and Hernández-Borges J., Analytical Separation Science, Wiley, chapter 6, 2015.
18. Alexander C., Andersson H. S., Andersson L. I., Ansell R. J., Kirsch N., Nicholls I. A., O'Mahony J., and Whitcombe M. J., Journal of Molecular Recognition, 2006, **19**, 106-180.
19. https://en.wikipedia.org/wiki/Molecularly_imprinted_polymer (Απρίλιος 2017)
20. Kabir A., Furton K. G., and Malik A., Trends in Analytical Chemistry, 2013, **45**, 197-218.
21. Amiri A., Trends in Analytical Chemistry, 2016, **75**, 57-74.
22. <https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatography> (Μάιος 2017)
23. Παπαδογιάννης, Ι. Ν., και Σαμανίδου, Β. Φ., Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2001.
24. [http://www.waters.com/waters/en GR/HPLC-Separation-Modes](http://www.waters.com/waters/en_GR/HPLC-Separation-Modes) (Μάιος 2017)
25. Saha P. K., R. Rao N., Cecchi N., Swain S., Patro C. S., and Pand J., Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 2017, in press, accepted manuscript.
26. <http://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EL/TXT/?uri=CELEX%3A32002D0657> (Μάιος 2017)
27. Ζαχαριάδης Γ., Γηρούση Σ., και Βουλγαρόπουλος Α., Έλεγχος και διασφάλιση ποιότητας με στοιχεία μετρολογίας και χημειομετρίας, Ζήτη, Θεσσαλονίκη, 2013.
28. Xu X., Duhoranimana E., and Zhanga X., Talanta, 2017, **163**, 31-38.
29. Yuan Y., Liu Y., Teng W., Tan J., Liang Y., and Tang Y., Journal of Chromatography A, 2016, **1462**, 2-7.

30. Soledad-Rodríguez B., Fernández-Hernando P., Garcinuño-Martínez R. M., and Durand-Alegria J. S., *Food Chemistry*, 2017, **224**, 432-438.
31. Zhu L., Xu G., Wei F., Yang J., and Hu Q., *Journal of Colloid and Interface Science*, 2015, **454**, 8-13.
32. Samanidou V., Kehagia M., Kabir A., and Furton K. G., *Analytica Chimica Acta*, 2016, **914**, 62-74.
33. Xu W., Su S., Jiang P., Wang H., Dong X., and Zhang M., *Journal of Chromatography A*, 2010, **1217**, 7198-7207.
34. Su S., Zhang M., Li B., Zhang H., and Dong X., *Talanta*, 2008, **78**, 1141-1146.
35. Guzman-Vazquez de Prada A., Martinez-Ruiz P., Reviejo A. J., and Pingarron J. M., *Analytica Chimica Acta*, 2005, **539**, 125-132.
36. Sadeghi S., and Motaharian A., *Materials Science and Engineering C*, 2013, **33**, 4884-4891.
37. Kabir A., and Furton K.G., *Fabric Phase Sorptive Extractor (FPSE)*. United States Patent and Trademark Office, 2014. 14/216,121.
38. Vijayakumar G., Tamilarasan R., and Dharmendirakumar M., *J. Mater. Environ. Sci.*, 2012, **3**, 157-170.
39. Saruchi, and Kumar V., *Arabian Journal of Chemistry*, 2016, in-press.
40. Karageorgou E., and Samanidou V., *Youden test application in robustness assays during method validation. Journal of Chromatography A*. 2014, **1353**, 131-139.