



**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 ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ DAD ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΓΑΛΑ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ
(QuEChERS) ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ
2002/657/ΕC ΤΗΣ ΕΕ**

**ΜΑΡΙΝΟΥ ΕΙΡΗΝΗ
ΧΗΜΙΚΟΣ ΑΠΘ**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018

ΑΡΙΣΤΟΤΕΛΕΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ DAD ΓΙΑ ΤΟΝ
ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΓΑΛΑ
ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ
(QuEChERS) ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ
2002/657/ΕC ΤΗΣ ΕΕ**

ΜΑΡΙΝΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

ΧΗΜΙΚΟΣ ΑΠΘ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Καθηγητής Ι. Ν. Παπαδογιάννης

ΜΕΛΗ ΤΡΙΜΕΛΟΥΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ

1. Παπαδογιάννης Ιωάννης, Καθηγητής
2. Σαμανίδου Βικτωρία, Καθηγήτρια
3. Θεοδορίδης Γεώργιος, Καθηγητής

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2018

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Σκοπός αυτής της εργασίας ήταν η ανάπτυξη μιας μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) για τον ταυτόχρονο διαχωρισμό και προσδιορισμό τεσσάρων αντιβιοτικών που ανήκουν στην οικογένεια των τετρακυκλινών [οξυτετρακυκλίνη (OTC), τετρακυκλίνη (TC), χλωροτετρακυκλίνη (CTC) και δοξυκυκλίνη (DC)] και η εφαρμογή της στον ποσοτικό προσδιορισμό καταλοίπων τους στο γάλα, με βάση τη νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης, όπως αυτή εκφράζεται μέσω της απόφασης 2002/657/EC, για την ανίχνευση και τον προσδιορισμό καταλοίπων οργανικών ενώσεων σε τρόφιμα.

Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική της HPLC, που είναι μια από τις πιο διαδεδομένες διαχωριστικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές στον τομέα των τροφίμων, χάρη στην απλότητα της λειτουργίας της και στην αυξημένη ευαισθησία και εκλεκτικότητα για το διαχωρισμό ευρέος φάσματος ενώσεων, σε συνδυασμό με το προσροφητικό υλικό QuEChERS, το οποίο είναι μια γρήγορη, απλή και αποτελεσματική εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος. Η μεθοδολογία QuEChERS αναπτύχθηκε ως ένας απλός τρόπος εκχύλισης και καθαρισμού φυτοφαρμάκων από μια πληθώρα υποστρωμάτων.

Οι τετρακυκλίνες αποτελούν μια από τις σημαντικότερες κατηγορίες αντιβιοτικών «ευρέος φάσματος». Η υψηλή δραστηριότητά τους έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, τόσο gram-θετικών, όσο και gram-αρνητικών, μικροοργανισμών, καθώς και έναντι πρωτόζωων παρασίτων, έχει ως αποτέλεσμα αυτές να χορηγούνται, τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική, για την αντιμετώπιση πληθώρας βακτηριακών και μη λοιμώξεων. Η χρήση τους όμως δεν περιορίζεται αποκλειστικά σε θεραπευτικούς σκοπούς, αλλά επεκτείνεται και στον τομέα της κτηνοτροφίας, όπου χορηγούνται για προληπτικούς σκοπούς, ενώ η χορήγησή τους ως αυξητικά πρόσθετα στις ζωοτροφές έχει απαγορευθεί τα τελευταία χρόνια, τουλάχιστον στις χώρες-μέλη της Ε. Ε. Η εκτεταμένη και αλόγιστη χορήγηση των τετρακυκλινών στην κτηνοτροφία τις τελευταίες δεκαετίες ενέχει τον κίνδυνο, ποσότητες αυτών να περνούν από τα ζώα στα προϊόντα τους και από εκεί στη διατροφική αλυσίδα, με αποτέλεσμα αφενός μεν την ανάπτυξη ανθεκτικών βακτηριακών στελεχών που εξουδετερώνουν τη δράση των συνταγογραφούμενων αντιβιοτικών στην ιατρική, αφετέρου τη δημιουργία κινδύνων

για τη δημόσια υγεία (αλλεργίες). Για την αντιμετώπιση του προβλήματος καθίσταται αναγκαίος ο έλεγχος της παρουσίας υπολειμμάτων τετρακυκλινών σε κάθε είδους κτηνοτροφικά προϊόντα, μεταξύ των οποίων και το γάλα.

Η εργασία χωρίζεται σε δύο μέρη, το θεωρητικό και το πειραματικό. Στο θεωρητικό μέρος δίνονται πληροφορίες σχετικά με τις τετρακυκλίνες, αλλά και το γάλα ως υπόστρωμα. Παρουσιάζονται, επίσης, οι βασικές αρχές της HPLC, των τεχνικών προκατεργασίας, καθώς και τα στάδια επικύρωσης μιας μεθόδου. Κλείνοντας το θεωρητικό μέρος, γίνεται επισκόπηση της υπάρχουσας βιβλιογραφίας για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών, με διάφορες τεχνικές, τόσο στο γάλα, όσο και σε άλλα υποστρώματα. Στο πειραματικό μέρος περιέχονται όλα τα στάδια της ανάπτυξης και βελτιστοποίησης της μεθόδου, η χρησιμοποιούμενη οργανολογία, η προκατεργασία του δείγματος και η επικύρωση της μεθόδου, σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Τέλος, συμπεριλαμβάνονται όλα τα αποτελέσματα και οι πίνακες που προέκυψαν από αυτά.

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, στο πλαίσιο του Διδρυματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημική Ανάλυση-Έλεγχος Ποιότητας», υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κυρίου Ι. Ν. Παπαδογιάννη, στον οποίο θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και καθοδήγησή του σε όλη την ακαδημαϊκή μου πορεία.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την Καθηγήτρια κυρία Β. Φ. Σαμανίδου για την άριστη συνεργασία που είχαμε, για την υπομονή, την καθοδήγηση και τις συμβουλές της, τόσο καθ'όλη τη διάρκεια της διεξαγωγής της πειραματικής διαδικασίας, όσο και για τη συγγραφή αυτής, όπως και τον καθηγητή κύριο Γ. Θεοδωρίδη, που αποτέλεσε μέλος της Τριμελούς Επιτροπής, για το χρόνο που διέθεσε και τις συμβουλές του.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου που με την απεριόριστη υπομονή και αγάπη της με στήριξε υλικά και ψυχολογικά σε όλη αυτήν την προσπάθεια και με βοήθησε να κατορθώσω τα ακατόρθωτα.

Θεσσαλονίκη, Ιούνιος 2018

Μαρίνου Ειρήνη

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ	1
1.1 ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ Η ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥΣ	1
1.2 Η ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ	2
1.3 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ	3
1.4 ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ	4
1.4.1 Χλωροτετρακυκλίνη (CTC)	4
1.4.2 Τετρακυκλίνη (TC)	5
1.4.3 Οξυτετρακυκλίνη (OTC)	6
1.4.4 Δοξυκυκλίνη (DC)	6
2. ΓΑΛΑ	8
2.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΑΛΑ	8
2.2 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	8
2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	10
2.4 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΠΟΙΟΤΗΤΕΣ	11
2.4.1 Συνήθεις έλεγχοι για υγειονομικά χαρακτηριστικά	12
3. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ	14
3.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ	14
3.2 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΚΑΤΑΛΟΠΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ	14
3.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	16
4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ	27
4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	27
4.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΙΔΗ HPLC	27
4.2.1 Χρωματογραφία Προσρόφησης (Adsorption Chromatography)	28
4.2.2 Χρωματογραφία Κατανομής (Partition Chromatography)	28
4.2.3 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography)	28
4.2.4 Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography)	29

4.2.5 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής (Size Exclusion SEC ή Gel Permeation Chromatography GPC)	29
4.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC	29
4.3.1 Διαλύτες κινητής φάσης	30
4.3.2 Αντλίες HPLC	32
4.3.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος	32
4.3.4 Αναλυτικές στήλες	33
4.3.5 Ανιχνευτές.....	34
4.3.6 Σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων	35
5. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	36
5.1 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	36
5.1.1 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού	37
5.1.2 Εκχύλιση Soxhlet.....	38
5.2 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	38
5.2.1 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης Υγρού (Solid Phase Extraction – SPE)	38
5.2.2 Εκχύλιση Διασποράς Στερεάς Φάσης Υποστρώματος (Matrix Solid Phase Dispersion – MSPD)	40
5.3 ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	42
5.3.1 Υλικά QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe	42
6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ	44
7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	48
8. ΣΥΣΚΕΥΕΣ-ΟΡΓΑΝΑ-ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	49
8.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΠΑΡΑΤΑΞΗΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ	49
8.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ	49
8.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ	50
9. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	51
9.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ	51

9.2	ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ	51
9.3	ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΗΛΗΣ ΚΑΙ ΕΚΛΟΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ	53
9.4	ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	55
9.5	ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ	57
10.	ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	58
10.1	ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	58
10.2	ΕΥΡΕΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	58
10.3	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ	59
10.4	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΓΑΛΑ	60
11.	ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ 2002/657 ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ	63
11.1	ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ	63
11.2	ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	65
11.3	ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ	65
11.4	ΟΡΙΟ ΑΠΟΦΑΣΗΣ (CCα) ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (CCβ)	67
11.5	ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ	68
11.6	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ	70
12.	ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	71
13.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	74
14.	ABSTRACT	75
15.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	76

1. ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ

1.1 ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΚΑΙ Η ΦΑΡΜΑΚΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥΣ

Οι τετρακυκλίνες (TCs) αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία «ευρέος φάσματος» αντιβιοτικών. Ανακαλύφθηκαν τη δεκαετία του 1940 και ήταν η πρώτη ομάδα αντιβιοτικών στην οποία αποδόθηκε ο χαρακτηρισμός «αντιβιοτικά ευρέος φάσματος», λόγω της υψηλής δραστηριότητάς τους έναντι διαφόρων τύπων βακτηρίων, τόσο gram-θετικών, όσο και gram-αρνητικών, μικροοργανισμών, καθώς και έναντι πρωτόζωων παρασίτων. Το ευρύ πεδίο της αντιμικροβιακής δραστηριότητας των τετρακυκλινών, το οποίο υπερκαλύπτει πολλές φορές αυτό άλλων ομάδων αντιβιοτικών, αλλά και η απουσία σημαντικών παρενεργειών, έχουν ως αποτέλεσμα οι τετρακυκλίνες να χρησιμοποιούνται ευρέως, τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική. Επιπλέον, βρίσκουν εφαρμογή και ως αυξητικά πρόσθετα σε ζωοτροφές στους τομείς της κτηνοτροφίας και ιχθυοτροφίας με στόχο την ταχεία αύξηση της παραγωγής. [1]

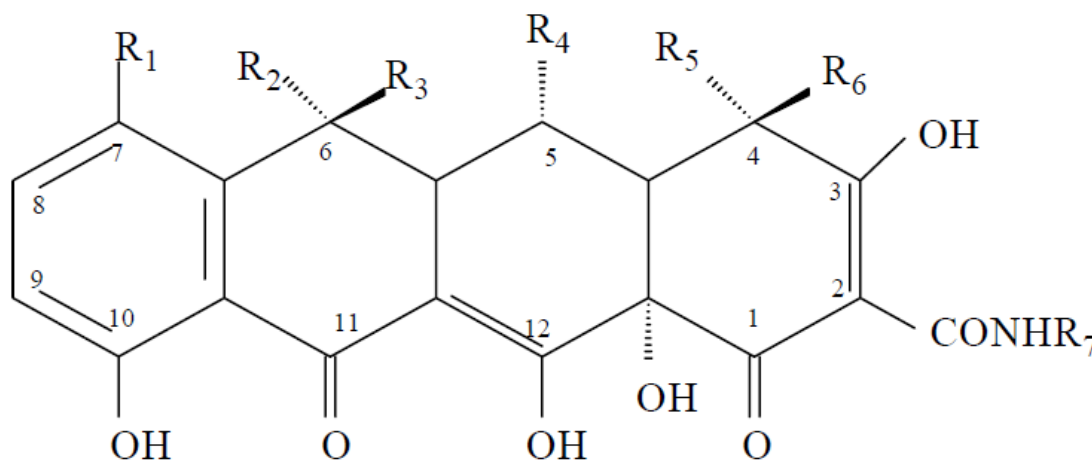
Η χορήγηση τετρακυκλινών αντενδείκνυται σε περιπτώσεις υπερευαισθησίας, βαριάς νεφρικής και ηπατικής ανεπάρκειας, εγκυμοσύνης, καθώς και σε παιδιά κάτω των 8 ετών. Στις παρενέργειες των τετρακυκλινών περιλαμβάνονται: γαστρεντερικές και νεφρικές διαταραχές (ανορεξία, ναυτία, έμετοι, διάρροια και σπανίως ψευδομεμβρανώδης κολίτιδα, στοματίτιδα, γλωσσίτιδα), ανάπτυξη μονιλίασης στην περιπρωκτική ή περιγεννητική περιοχή, ανάπτυξη επιγενών λοιμώξεων από ανάπτυξη ανθεκτικών στελεχών, ερυθματοβλατιδώδη εξανθήματα, φωτοευαισθησία, ονυχόλυση, φαία χρώση δέρματος και βλεννογόνων (κυρίως με μινοκυκλίνη), επιβάρυνση προϋπάρχουσας νεφρικής ανεπάρκειας, στεάτωση ήπατος (με μεγάλες συνήθως δόσεις), αντιδράσεις υπερευαισθησίας (κνίδωση, αγγειονευρωτικό οίδημα, πυρετός, αρθραλγίες κλπ.), αύξηση ενδοκράνιας πίεσης, κυρίως σε νεαρά άτομα, ίλιγγος (κυρίως με μινοκυκλίνη). [2]

Οι τετρακυκλίνες χορηγούνται συνήθως από το στόμα, αλλά μπορούν να χορηγηθούν και παρεντερικά. Η απορρόφησή τους λαμβάνει χώρα κυρίως στο στομάχι και επηρεάζεται από την παρουσία τροφών και ιδίως γαλακτοκομικών προϊόντων που είναι πλούσια σε ασβέστιο. Η συγκέντρωση που επιτυγχάνεται στο αίμα μετά από μια εφάπαξ από του στόματος δόση κυμαίνεται από 2 μέχρι 5 µg/mL

ανάλογα με την τετρακυκλίνη και η ημερήσια δόση για τις περισσότερες τετρακυκλίνες, ώστε να διατηρηθεί η συγκέντρωσή τους σε θεραπευτικά επίπεδα, περιλαμβάνει 4 εφάπαξ δόσεις. Εξαιρέση αποτελούν η δοξυκυκλίνη και η μινοκυκλίνη, οι οποίες λόγω του συγκριτικά μεγαλύτερου χρόνου ημίσειας ζωής που διαθέτουν, χορηγούνται μια ή δυο φορές ημερησίως. Οι τετρακυκλίνες, λόγω της λιποφιλικότητάς τους, κατανέμονται ικανοποιητικά σε όλα τα βιολογικά υγρά και στους ιστούς (ιδιαίτερα στο ήπαρ, τους νεφρούς, τα δόντια και τα οστά). Αποβάλλονται χωρίς προηγουμένως να μεταβολιστούν, κυρίως μέσω των ούρων.

1.2 ΧΗΜΕΙΑ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Από χημική άποψη, τα αντιβιοτικά που ανήκουν στην ομάδα των τετρακυκλινών περιλαμβάνουν έναν οκταϋδρόναφθακενικό κυκλικό σκελετό που αποτελείται από τέσσερις συμπυκνωμένους εξαμελείς δακτυλίους, όπως υποδηλώνει και το όνομά τους, στους οποίους είναι προσαρμοσμένοι διάφοροι υποκαταστάτες. (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Βασικός δομικός σκελετός των τετρακυκλινών.

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

Οι τετρακυκλίνες διαλύονται σε όξινα και βασικά υδατικά διαλύματα, αλλά και στη μεθανόλη, ενώ είναι μερικώς διαλυτές στο νερό και στην αιθανόλη και πρακτικά αδιάλυτες σε άπολους διαλύτες, όπως το χλωροφόρμιο και ο αιθέρας. Είναι αμφοτερικές ενώσεις και οι σταθερές ιοντισμού τους κυμαίνονται γύρω στο 3,3 για την pK_{a1} (ιονισμός υδροξυλομάδας στη θέση 3), στο 7,5 για την pK_{a2} (απώλεια H^+ από την πρωτονιωμένη διμεθυλάμινο ομάδα στη θέση 4) και στο 9,4 για την pK_{a3} (ιονισμός υδροξυλομάδας στη θέση 12). [3]

1.3 ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Η αντιμικροβιακή δραστηριότητα των τετρακυκλινών σχετίζεται άμεσα με τη χημική τους δομή, αλλά και με τη σταθερότητα αυτής της δομής. Οι τετρακυκλίνες θεωρούνται σχετικά ασταθή μόρια, ιδιαίτερα ευαίσθητα στο φως, φυσικό ή τεχνητό, ενώ κάτω από ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και pH σχηματίζουν διάφορα παραπροϊόντα. Πιο συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι σε μεθανολικά διαλύματα, οι τετρακυκλίνες αρχίζουν να αποσυντίθενται μετά από έκθεση στο φως για χρονικό διάστημα 4 μηνών, ενώ σε υδατικά διαλύματά τους και σε θερμοκρασία $100^{\circ}C$ εμφανίζουν χρόνο ημιζωής μόλις 2 min. Τα παραπροϊόντα των τετρακυκλινών που σχηματίζονται σε κάθε περίπτωση είναι πολλά (έχουν ανιχνευθεί, χωρίς να έχουν όλα ταυτοποιηθεί, τουλάχιστον 14). Αν και οι διεργασίες που λαμβάνουν χώρα κατά την αποσύνθεσή τους σε αυτές τις συνθήκες δεν έχουν πλήρως αποσαφηνιστεί, θεωρείται ότι σημαίνουντα ρόλο έχει η παρουσία μεταλλικών ιόντων που δρουν ως καταλύτες στις αντιδράσεις σχηματισμού των παραπροϊόντων. [4]

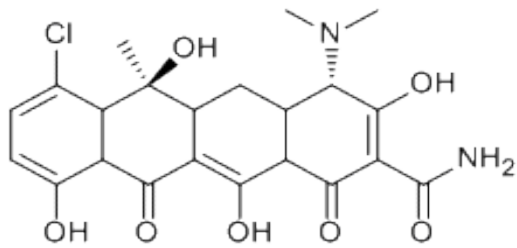
Ο σημαντικότερος όμως παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερότητα της δομής και επομένως και την αντιμικροβιακή δράση των τετρακυκλινών είναι το pH. Σε ακραίες τιμές pH οι τετρακυκλίνες υφίστανται μια σειρά από ριζικές αλλαγές στη δομή τους, οπότε σχηματίζονται διάφορα παραπροϊόντα. Η έκταση και το είδος των αλλαγών που λαμβάνουν χώρα και επομένως και τα σχηματιζόμενα παραπροϊόντα δεν είναι τα ίδια για όλες τις τετρακυκλίνες, καθώς εξαρτώνται από το είδος των υποκαταστατών που διαθέτουν.

1.4 ΟΙ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΕΣ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΤΗΝΟΤΡΟΦΙΑ

Το ευρύ πεδίο δραστηριότητας των τετρακυκλινών, η καλή απορροφητικότητα τους, η μικρή τοξικότητά τους σε υψηλές συγκεντρώσεις, καθώς και το σχετικά χαμηλό κόστος τους, έχουν ως αποτέλεσμα την ευρύτατα διαδεδομένη χρήση τους στην κτηνιατρική για την αντιμετώπιση βακτηριακών και μη λοιμώξεων των ζώων, αλλά και στην κτηνοτροφία για προληπτικούς λόγους και ως αυξητικά πρόσθετα στις ζωοτροφές, ανελλιπώς από τη δεκαετία του 1950 μέχρι σήμερα. Η παγκόσμια παραγωγή τετρακυκλινών υπολογίζεται σε χιλιάδες τόνους κάθε χρόνο, ενώ οι τετρακυκλίνες καταλαμβάνουν την πρώτη θέση στον κατάλογο των αντιβιοτικών που χορηγούνται στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία. Τέσσερις τετρακυκλίνες: η χλωροτετρακυκλίνη, η οξυτετρακυκλίνη, η τετρακυκλίνη και η δοξυκυκλίνη, κυκλοφορούν στην Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση ως κτηνιατρικά φάρμακα, με έγκριση του ΕΟΦ και του Ευρωπαϊκού Οργανισμού Φαρμάκων. [2]

1.4.1 Χλωροτετρακυκλίνη (CTC)

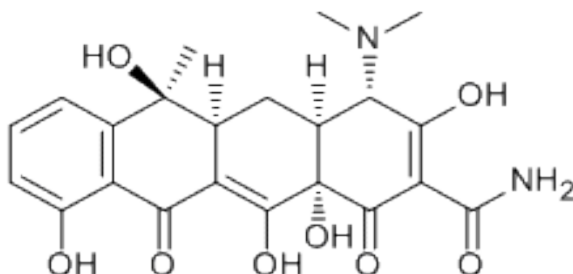
Η χλωροτετρακυκλίνη (Σχήμα 1.2) χορηγείται κυρίως σε μόσχους, ορνιθοειδή και χοίρους για την πρόληψη και θεραπεία βακτηριακών λοιμώξεων του αναπνευστικού (διάφορες πνευμονίες και ρινίτιδες) και του πεπτικού συστήματος (βακτηριακή εντερίτιδα, κολοβακτηριδίαση), αλλά και της χολέρας των πτηνών. Χορηγείται μόνο από το στόμα μαζί με την τροφή. Όπως όλες οι τετρακυκλίνες, η χλωροτετρακυκλίνη είναι αρκετά λιποδιαλυτή με αποτέλεσμα να κατανέμεται στους περισσότερους ιστούς. Τα μεγαλύτερα ποσοστά κατανομής εμφανίζονται κατά σειρά, στους νεφρούς, το ήπαρ, τους μύες και το λίπος, τόσο στους χοίρους, όσο και στα βοοειδή. Αποβάλλεται όπως και οι υπόλοιπες τετρακυκλίνες από το ουροποιητικό και το εντερικό σύστημα κατά κύριο λόγο, χωρίς προηγουμένως να μεταβολιστεί σε σημαντικό βαθμό. Ανεπιθύμητες παρενέργειες που ενδέχεται να προκληθούν είναι αντιδράσεις υπερευαισθησίας, καταστροφή της φυσιολογικής μικροχλωρίδας, δυσχρωματισμός των αναπτυσσόμενων δοντιών και γαστρεντερικές διαταραχές.



Σχήμα 1.2. Χημικός τύπος της Χλωροτετρακυκλίνης.

1.4.2 Τετρακυκλίνη (TC)

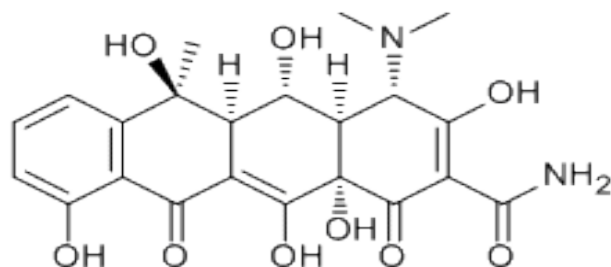
Η τετρακυκλίνη (Σχήμα 1.3) είναι η λιγότερο χρησιμοποιούμενη από τις τέσσερις τετρακυκλίνες. Χορηγείται, όπως και η χλωροτετρακυκλίνη, κυρίως σε μόσχους, ορνιθοειδή και χοίρους, με σκοπό την πρόληψη και θεραπεία της βακτηριακής πνευμονίας και εντερίτιδας, καθώς και για την αντιμετώπιση χρόνιων αναπνευστικών ασθενειών σε πτηνά. Μπορεί να χορηγηθεί τόσο από το στόμα, όσο και παρεντερικά, αλλά η απορρόφησή της από το γαστρεντερικό σύστημα είναι πολύ καλύτερη. Οι συγκεντρώσεις τετρακυκλίνης που επιτυγχάνονται στο αίμα με μια εφάπαξ δόση είναι πολύ υψηλότερες και διατηρούνται για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα από τις συγκεντρώσεις της οξυτετρακυκλίνης και χλωροτετρακυκλίνης που επιτυγχάνονται σε ανάλογες δόσεις. Η κατανομή της στους διαφόρους ιστούς είναι όμοια με αυτή της χλωροτετρακυκλίνης. Αποβάλλεται κυρίως από το ουροποιητικό σύστημα με τη μορφή συμπλόκου με μέταλλα, ενώ δεν έχει αναφερθεί η παρουσία άλλων μεταβολιτών. Οι ανεπιθύμητες παρενέργειες που έχουν παρατηρηθεί είναι παρόμοιες με αυτές της χλωροτετρακυκλίνης.



Σχήμα 1.3. Χημικός τύπος της Τετρακυκλίνης.

1.4.3 Οξυτετρακυκλίνη (OTC)

Η οξυτετρακυκλίνη (Σχήμα 1.4) χορηγείται σε βοοειδή, χοίρους, ορνιθοειδή, αιγοπρόβατα, ψάρια και ιπποειδή έχοντας ως στόχο τη θεραπεία λοιμώξεων του αναπνευστικού (βρογχοπνευμονία, ρινίτιδα), του πεπτικού (εντερίτιδα) και του ουρογεννητικού (μητρίτιδα, μαστίτιδα, σύνδρομο αγαλαξίας, πρόληψη αποβολών) συστήματος που προκαλούνται από gram θετικά ή αρνητικά βακτήρια και μικροοργανισμούς, ευαίσθητους στην οξυτετρακυκλίνη. Η χορήγηση μπορεί να γίνει τόσο από το στόμα, όσο και παρεντερικά (ενδομυϊκή έγχυση). Παρουσιάζει το ίδιο φάσμα κατανομής στους διαφόρους ιστούς με τις υπόλοιπες τετρακυκλίνες και ο χρόνος αποβολής της είναι μέτριος. Στις ανεπιθύμητες ενέργειες εντάσσονται αντιδράσεις υπερευαισθησίας, καταστροφή της μικροχλωρίδας, δυσχρωματισμός των αναπτυσσόμενων δοντιών και γαστρεντερικές διαταραχές μετά από του στόματος χορήγηση. Κατά την παρεντερική χορήγηση ενδέχεται να προκληθεί τοπικός ερεθισμός στην περιοχή της έγχυσης, ο οποίος παρέρχεται μέσα σε περίπου πέντε μέρες. Αντενδείκνυται η χορήγηση οξυτετρακυκλίνης με άλλα αντιβιοτικά και κυρίως με πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες.

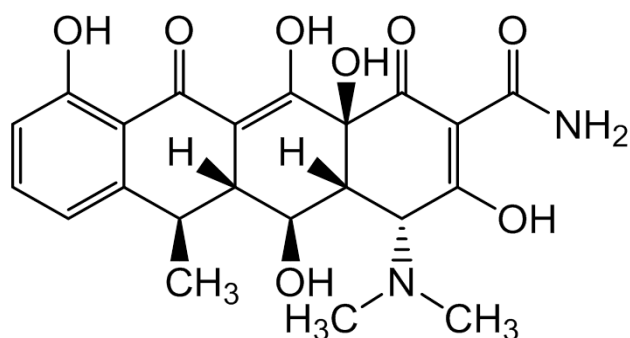


Σχήμα 1.4. Χημικός τύπος της Οξυτετρακυκλίνης.

1.4.4 Δοξυκυκλίνη (DC)

Η δοξυκυκλίνη (Σχήμα 1.5) παρουσιάζει παρόμοια φαρμακολογική δράση με την οξυτετρακυκλίνη και χορηγείται σε βοοειδή, χοίρους, ψάρια και ορνιθοειδή κατά κύριο λόγο. Σε αντίθεση όμως με την οξυτετρακυκλίνη, αλλά και τις άλλες δύο τετρακυκλίνες εμφανίζει μεγαλύτερη δραστηριότητα έναντι ορισμένων βακτηρίων. Το γεγονός αυτό οφείλεται αφενός μεν στο ότι απορροφάται καλύτερα και από τις τρεις άλλες τετρακυκλίνες, αφετέρου στο ότι αποβάλλεται με μικρότερο ρυθμό από ότι

αυτές. Η ταχύτερη απορρόφηση και η βραδύτερη αποβολή της δοξυκυκλίνης σχετίζεται με τη χημική της δομή, καθώς είναι η πιο λιπόφιλη από όλες τις τετρακυκλίνες και μια από τις πιο σταθερές. Επιπλέον, ενώ η απορροφητικότητα των τριών προαναφερθεισών τετρακυκλινών επηρεάζεται άμεσα από την παρουσία τροφής, λόγω των συμπλόκων με μέταλλα που σχηματίζονται, η δοξυκυκλίνη έχει μικρή τάση να σχηματίζει σύμπλοκα και έτσι η απορροφητικότητά της δε μειώνεται κατά την παρουσία τροφής. Χορηγείται από το στόμα. Λόγω της λιποφιλικότητάς της κατανέμεται πολύ καλά σε όλους τους ιστούς με τα μεγαλύτερα ποσοστά να εμφανίζονται στους νεφρούς και το ήπαρ. Αποβάλλεται κυρίως από το εντερικό σύστημα, χωρίς προηγουμένως να μεταβολιστεί. Είναι δυνατόν να παρατηρηθούν γαστρεντερικές διαταραχές και μεταβολές της εντερικής χλωρίδας με συνέπεια την πιθανή δραστηριοποίηση και άλλων παθογόνων μικροοργανισμών. Πρέπει να αποφεύγεται η ταυτόχρονη χορήγηση της δοξυκυκλίνης με πενικιλίνες και κεφαλοσπορίνες, καθώς υπάρχει ένας δυναμικός ανταγωνισμός μεταξύ της δοξυκυκλίνης και αυτών των αντιβιοτικών.



Σχήμα 1.5. Χημικός τύπος της Δοξυκυκλίνης.

2. ΓΑΛΛΑ

2.1 ΓΕΝΙΚΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΟ ΓΑΛΛΑ

Γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν του ολοσχερούς, χωρίς διακοπή αρμέγματος υγιούς γαλακτοφόρου ζώου, που ζει και τρέφεται υπό υγιεινούς όρους και που δε βρίσκεται σε κατάσταση υπερκόπωσης. Με τον όρο «γάλα» απλά, χωρίς να συνοδεύεται αυτό από κάποιο επίθετο, νοείται αποκλειστικά και μόνο το γάλα, το οποίο:

- A) Προέρχεται από αγελάδα.
- B) Είναι νωπό.
- Γ) Είναι πλήρες.
- Δ) Δεν έχει υποστεί αφυδάτωση ή συμπύκνωση.
- E) Δεν περιέχει άλλες ύλες που έχουν προστεθεί απ' έξω.

Νωπό χαρακτηρίζεται το γάλα που διατίθεται στην κατανάλωση χωρίς καμία άλλη επεξεργασία, εκτός από τη διήθηση και την ψύξη, καθώς και την ομογενοποίηση. [5]

2.2 ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ

Το γάλα είναι γαλάκτωμα ή κολλοειδές σωματιδίων λίπους σε υδατικό διάλυμα που περιέχει υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και μεταλλικά στοιχεία. Αποτελεί βασική τροφή για τα βρέφη και τα παιδιά, καθώς όλα τα συστατικά του παρέχουν σημαντικά οφέλη για την ανάπτυξη του οργανισμού. Οι κύριες απαιτήσεις ενός νεαρού οργανισμού που καλύπτονται από την κατανάλωση γάλακτος είναι ενέργεια (λιπίδια, λακτόζη και πρωτεΐνη), βιοσύνθεση των μη βασικών αμινοξέων που παρέχονται από τις πρωτεΐνες (απαραίτητα αμινοξέα και αμινομάδες), απαραίτητα λιπαρά οξέα, βιταμίνες, ανόργανα στοιχεία και νερό.

Η σύνθεση του γάλακτος διαφέρει σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των ειδών. Όπως φαίνεται και στον *Πίνακα 2.1*, παράγοντες, όπως οι τύποι και η αναλογία των πρωτεϊνών, του λίπους και της ζάχαρης, τα επίπεδα των διαφόρων βιταμινών και

ανόργανων συστατικών και το μέγεθος των σφαιριδίων βουτύρου είναι μεταξύ εκείνων που μπορούν να ποικίλουν.

Το ανθρώπινο (μητρικό) γάλα περιέχει, κατά μέσο όρο, 1,1% πρωτεΐνη, 4,2% λίπος, 7,0% του σακχάρου της λακτόζης και 72 kcal ενέργειας ανά 100 γραμμάρια. Το αγελαδινό γάλα περιέχει, κατά μέσο όρο, 3,4% πρωτεΐνη, 3,6% λίπος, 4,6% λακτόζη, 0,7% μεταλλικά στοιχεία και 66 kcal ενέργειας ανά 100 γραμμάρια.

Πίνακας 2.1. Σύσταση διαφόρων τύπων γάλακτος ανά 100g.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΟΝΑΔΕΣ	ΑΓΕΛΑΔΙΝΟ	ΚΑΤΣΙΚΙΣΙΟ	ΠΡΟΒΕΙΟ	ΒΟΥΒΑΛΙΣΙΟ
Νερό	g	87,8	88,9	83,0	81,1
Πρωτεΐνες	g	3,2	3,1	5,4	4,5
Λίπος	g	3,9	3,5	6,0	8,0
Κορεσμένα λιπαρά οξέα	g	2,4	2,3	3,8	4,2
Μονοακόρεστα λιπαρά οξέα	g	1,1	0,8	1,5	1,7
Πολυακόρεστα λιπαρά οξέα	g	0,1	0,1	0,3	0,2
Υδατάνθρακες	g	4,8	4,4	5,1	4,9
Χοληστερόλη	mg	14	10	11	8
Ασβέστιο	mg	120	100	170	195
Ενέργεια	kcal kJ	66 75	60 253	95 396	110 463

Είδη γάλακτος ανάλογα με το ποσοστό λίπους:

- Φυσικό πλήρες γάλα (νωπό ή επεξεργασμένο): Γάλα στο οποίο δεν έχει προστεθεί ή αφαιρεθεί τίποτα με 3,5-5% λιπαρά, ανάλογα με τη φυλή της αγελάδας.
- Τυποποιημένο ή κανονικό πλήρες γάλα: Γάλα τυποποιημένο σε 3,5 με 4% λιπαρά.

- Ημιαποβουτυρωμένο γάλα: Γάλα στο οποίο έχει αφαιρεθεί η μισή ποσότητα λίπους. Περιέχει 1,5-1,8% λιπαρά.
- Αποβουτυρωμένο (χαμηλών λιπαρών) γάλα: Γάλα από το οποίο έχει αφαιρεθεί όλο σχεδόν το λίπος. Περιέχει λιγότερο από 0,5% λιπαρά.
- Γάλα με μειωμένη λακτόζη ή γάλα ελεύθερο λακτόζης: Το σάκχαρο του γάλακτος (λακτόζη) έχει μερικώς ή ολικώς απομακρυνθεί. Προορίζεται για ανθρώπους με δυσανεξία στη λακτόζη.

2.3 ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Θερμικά επεξεργασμένο γάλα χαρακτηρίζεται το γάλα, κατάλληλο για ανθρώπινη κατανάλωση, που παράγεται με θερμική επεξεργασία άμεσα και αποκλειστικά από νοπό γάλα και το οποίο έχει τη μορφή γάλακτος παστεριωμένου, UHT και αποστειρωμένου.

Είδη γάλακτος ανάλογα με την επεξεργασία που έχουν υποστεί:

- Παστεριωμένο γάλα: Γάλα που έχει υποστεί ήπια θερμική επεξεργασία (72-75°C για 15-30 δευτερόλεπτα) για να θανατωθούν οι παθογόνοι μικροοργανισμοί.
- Γάλα υπερυψηλής θερμοκρασίας (UHT): Γάλα που θερμαίνεται σε υψηλότερη θερμοκρασία ($\geq 135^{\circ}\text{C}$ για τουλάχιστον 1 δευτερόλεπτο) για να καταστραφούν οι περισσότεροι μικροοργανισμοί που περιέχει.
- Αποστειρωμένο γάλα: Γάλα που υπόκειται σε επεξεργασία για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (περίπου 110°C, για 20-30 λεπτά) για να καταστραφούν όλοι οι μικροοργανισμοί που περιέχει.

Όσον αφορά στο παστεριωμένο γάλα, θα πρέπει να έχει κάποια χαρακτηριστικά. Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει:

- Να έχει υποβληθεί σε επεξεργασία που περιλαμβάνει την έκθεση σε υψηλή θερμοκρασία για μικρό χρονικό διάστημα (τουλάχιστον 71,7°C για 15 δευτερόλεπτα ή ισοδύναμος συνδυασμός) ή σε διαδικασία παστερίωσης που

χρησιμοποιεί διαφορετικούς συνδυασμούς χρόνου και θερμοκρασίας για την επίτευξη ισοδύναμου αποτελέσματος.

- Να παρουσιάζει αρνητική αντίδραση στη δοκιμασία φωσφατάσης και θετική αντίδραση στη δοκιμασία υπεροξειδάσης. Ωστόσο, επιτρέπεται η παραγωγή παστεριωμένου γάλακτος με αρνητική αντίδραση στη δοκιμασία υπεροξειδάσης, υπό την προϋπόθεση ότι η ετικέτα του γάλακτος φέρει ένδειξη «υψηλής παστερίωσης».
- Αμέσως μετά την παστερίωση, να ψύχεται το συντομότερο δυνατόν σε θερμοκρασία που δεν υπερβαίνει τους 60°C.
- Από τα παραπάνω, γίνεται προφανές ότι για την παρασκευή παστεριωμένου γάλακτος γίνεται η ελάχιστη δυνατή θερμική επεξεργασία για να καταστεί το γάλα ακίνδυνο για τους καταναλωτές. Με την ελάχιστη αυτή θερμική επεξεργασία γίνονται πολύ μικρές χημικές, φυσικές και οργανοληπτικές μεταβολές στο προϊόν.
- Η παστερίωση, επίσης, επιμηκύνει τη διάρκεια ζωής γάλακτος, αφού μαζί με τους παθογόνους καταστρέφεται και ένα μέρος από σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς που θα το αλλοιώσουν. Ωστόσο, είναι προφανές ότι με την παστερίωση, σε αντίθεση με την αποστείρωση, παραμένουν ζωντανοί μικροοργανισμοί και ένζυμα που προκαλούν μεταβολές στο προϊόν, γι' αυτό έχει περιορισμένη διάρκεια ζωής.
- Για να αυξηθεί, επομένως, η διάρκεια ζωής του παστεριωμένου γάλακτος, είναι αναγκαία η ταχεία ψύξη του γάλακτος αμέσως μετά την παστερίωση και η διατήρηση αυτού σε χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω των 10°C) κατά τη διάρκεια της διακίνησης και συντήρησης μέχρι την κατανάλωση αυτού. [6]

2.4 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΕΛΕΓΧΟΙ ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΟΥ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΣΕ ΠΟΙΟΤΗΤΕΣ

Οι έλεγχοι που γίνονται στο νωπό γάλα χωρίζονται σε δύο κατηγορίες βάσει ποιοτικών χαρακτηριστικών:

- 1) Στους ελέγχους που έχουν σχέση με τη σύσταση του γάλακτος (λίπος και πρωτεΐνη ή ολικά στερεά και στερεό υπόλειμμα άνευ λίπους) και σχετίζονται με την οικονομική αξία του γάλακτος. Οι έλεγχοι αυτοί δε χρησιμοποιούνται ή δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για την κατάταξη του γάλακτος σε ποιότητες. Οι έλεγχοι αυτοί, μάλιστα, σε αρκετές χώρες δε θεσμοθετούνται από το κράτος, ενώ το πλαίσιο διεξαγωγής τους καθορίζεται από τις βιομηχανίες.
- 2) Η δεύτερη κατηγορία ελέγχων έχει σχέση με την υγιεινή κατάσταση του γάλακτος. Για αυτή την κατηγορία ελέγχων ενδιαφέρεται άμεσα η Πολιτεία, αφού η υγιεινή κατάσταση του γάλακτος έχει άμεση σχέση με την υγεία των καταναλωτών. Συνήθως η Πολιτεία θέτει το πλαίσιο για το είδος των ελέγχων, τη συχνότητα και τον τρόπο κατάταξης του γάλακτος των παραγωγών σε ποιότητες. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να διευκρινισθεί ότι με τους ελέγχους αυτούς αξιολογείται ο παραγωγός με το νωπό γάλα που παράγει και τη στιγμή που το παραδίδει. Μετά την παράδοση τυχόν υποβάθμιση της ποιότητας δεν έχει καμία σχέση με τους ελέγχους και τα κριτήρια κατάταξης του νωπού γάλακτος. Για να γίνει πιο σαφές αυτό, αξίζει να αναφερθούν οι διάφοροι τρόποι παράδοσης του γάλακτος από τον παραγωγό.

Η συχνότητα των ελέγχων διαφέρει από χώρα σε χώρα. Στην Ελλάδα, επί χρόνια στον Κανονισμό Ποιότητας, προβλέπονταν για τη σύνθεση τέσσερις έλεγχοι το μήνα, από τους οποίους δύο απογευματινής παραλαβής, εφόσον πραγματοποιείτο διπλή παράδοση. Τα τελευταία χρόνια, στις χώρες με ανεπτυγμένη γαλακτοκομία και μεγάλες ποσότητες γάλακτος ανά παραγωγό, η δειγματοληψία γίνεται αυτόματα από τον οδηγό του βυτίου που παραλαμβάνει το γάλα, πράγμα που διευκολύνει την αύξηση του αριθμού των δειγματοληψιών.

2.4.1 Συνήθεις έλεγχοι για υγειονομικά χαρακτηριστικά

1) Έλεγχος της Ολικής Μικροβιακής Χλωρίδας (OMX)

Δίνει μια γενική εικόνα των συνθηκών παραγωγής του γάλακτος. Εναλλακτικά της OMX μπορεί να χρησιμοποιηθεί ο έλεγχος του Κυανού του Μεθυλενίου που είναι απλούστερος, οικονομικότερος και συντομότερος της OMX. Η

μέτρηση αλλαγής του χρώματος του Κυανού του Μεθυλενίου επιτρέπει να σχηματισθεί μια εικόνα για το βαθμό μόλυνσης. Αξίζει να αναφερθεί ότι το πρόβειο και το γίδινο γάλα συμπεριφέρονται εντελώς διαφορετικά από το αγελαδινό στον αποχρωματισμό του Κυανού του Μεθυλενίου.

2) Έλεγχος ουσιών που αναστέλλουν τη δράση μικροοργανισμών

Ο έλεγχος αυτός έχει ιδιαίτερη σημασία για τη βιομηχανία γάλακτος, γιατί σε περίπτωση που το γάλα χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή ζυμωμένων προϊόντων, θα παρεμποδισθεί η ανάπτυξη των καλλιέργειών με όλες τις δυσάρεστες συνέπειες. Από τους ανασταλτικούς αντιμικροβιακούς παράγοντες που μπορεί να βρεθούν στο γάλα, μερικοί υπάρχουν φυσιολογικά σε αυτό (φυσικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες), άλλοι δημιουργούνται, όταν τα ζώα είναι ασθενή (αντισώματα), ενώ άλλοι περιλαμβάνουν ουσίες που χορηγούνται στα ζώα και τελικά εκκρίνονται στο γάλα (αντιβιοτικά).

Από τους ανασταλτικούς παράγοντες, ο έλεγχος των αντιβιοτικών έχει τη μεγαλύτερη σπουδαιότητα, αφενός γιατί αυτά αποτελούν εξωγενή παράγοντα που δεν καταστρέφεται με τη συνηθισμένη θερμική επεξεργασία που γίνεται στο γάλα (οι φυσιολογικά υπάρχουσες αντιμικροβιακές ουσίες καταστρέφονται) και αφετέρου, πέρα από τα προβλήματα που δημιουργούν στη ζύμωση του γάλακτος, μπορεί να προκαλέσουν αλλεργία σε ορισμένους ανθρώπους, αλλαγές στην εντερική χλωρίδα και μπορούν να προκαλέσουν τη δημιουργία ανθεκτικών παθογόνων. Για όλους αυτούς τους λόγους, Ελεγκτικοί Μηχανισμοί παγκοσμίως επιτρέπουν την παρουσία μόνο των χαμηλότερων ανιχνεύσιμων ποσοτήτων. Οι παραγωγοί γάλακτος δεν επιτρέπεται να παραδίδουν γάλα από ζώα, στα οποία έχει χορηγηθεί αντιβιοτικό πριν την πάροδο 3-6 ημερών και τα προγράμματα ποιότητας προβλέπουν πιο αυστηρές ποινές, ακόμη κι από αυτές που επιβάλλονται για αυξημένη μικροβιακή χλωρίδα στο νωπό γάλα.

3) Έλεγχος καθαρότητας

Είναι γρήγορος και χρησιμοποιείται για τη διαπίστωση της φροντίδας των παραγωγών στο γάλα. Το γάλα διηθείται με ειδικά φίλτρα, τα οποία συγκρατούν τις ακαθαρσίες και ξένες ύλες, είναι δε τόσο απλός ο έλεγχος αυτός που μπορεί να γίνει και παρουσία του παραγωγού για εκπαιδευτικούς σκοπούς. [7]

3. ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ

3.1 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΓΙΑ ΤΑ ΚΤΗΝΙΑΤΡΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΑ

Σύμφωνα με την οδηγία 2001/82/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης [8], ως κτηνιατρικό φάρμακο ορίζεται κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που χαρακτηρίζεται από θεραπευτικές ή προληπτικές ιδιότητες που εμφανίζει έναντι ασθενειών ζώων. Επίσης, ως κτηνιατρικό φάρμακο θεωρείται επιπλέον κάθε ουσία ή σύνθεση ουσιών που μπορεί να χορηγηθεί σε ζώο για να γίνει ιατρική διάγνωση ή να επαναφέρει στο αρχικό τους στάδιο, να βελτιώσει ή να αλλάξει κάποιες φυσιολογικές λειτουργίες στο ζώο.

Πολύ συχνά όμως, τα όρια χρήσης κάποιων φαρμάκων είναι δυσδιάκριτα, καθώς αυτά χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία ανθρώπων και ταυτόχρονα μπορεί να χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία, και όχι μόνο, ζώων. Αποτέλεσμα αυτής της χορήγησης, λοιπόν είναι «ανακύκλωση» των φαρμακευτικών ενώσεων και όχι σπάνια η επιστροφή τους στον ανθρώπινο οργανισμό, μέσω της τροφής, που προέρχεται από ζώα που έχουν λάβει θεραπεία. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αυτής της κατηγορίας φαρμάκων είναι τα αντιβιοτικά.

Έχοντας αυτά υπόψη, δημιουργήθηκε η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (European Food Safety Authority – EFSA) από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή σε συνεργασία με τα κράτη-μέλη. Από αυτή προέκυψε η απαιτούμενη αναθεώρηση και οργάνωση της κοινοτικής νομοθεσίας, φτάνοντας σήμερα να έχουν εφαρμογή πολλές οδηγίες που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων, τις μεθόδους ανίχνευσης υπολειμμάτων στους ιστούς και την καθιέρωση ανώτατων επιτρεπόμενων ορίων για τα υπολείμματα αυτά.

Όλα τα κράτη-μέλη οφείλουν να εντάξουν τις εκάστοτε οδηγίες στο εθνικό νομικό πλαίσιο της κάθε χώρας μέσα σε προγραμματισμένα χρονοδιαγράμματα και να συμμορφώνονται σε αυτές.

3.2 ΝΟΜΟΘΕΣΙΑ ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ ΓΙΑ ΤΑ ΚΑΤΑΛΟΙΠΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΩΝ ΣΕ ΤΡΟΦΙΜΑ

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει ως στόχο της την πλήρη κάλυψη της ασφάλειας της υγείας των καταναλωτών που διαμένουν στα κράτη-μέλη αυτής. Με αυτό το σκεπτικό

εφαρμόζονται οδηγίες και κανονισμοί που διασφαλίζουν τη σωστή πρακτική ανάπτυξης, τόσο σε καλλιέργειες φυτών, όσο και σε κτηνοτροφικές μονάδες, εξασφαλίζοντας ακόμη και την ιχνηλασιμότητα των προϊόντων που φτάνουν στο πιάτο του καταναλωτή, με το Trade Control and Expert System (TRACES). Τα αυστηρά αυτά πρότυπα εφαρμόζονται στα είδη διατροφής, είτε αυτά παράγονται μέσα στην Ευρωπαϊκή Ένωση, είτε στοχεύουν στο να εισαχθούν σε χώρες αυτής.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, τα κράτη-μέλη οφείλουν να εισάγουν στο εθνικό νομικό τους πλαίσιο τους κανονισμούς και τις οδηγίες που εκδίδονται από την Ευρωπαϊκή Ένωση, καθώς έχουν δεσμευτικό χαρακτήρα. Ειδικά όργανα που συντονίζονται από την ΕΕ διενεργούν επιθεωρήσεις για την επιβεβαίωση της ορθής εφαρμογής των εκάστοτε οδηγιών. Οι επιθεωρήσεις αυτές είναι πιθανό να διεξαχθούν και σε χώρες εκτός Ευρωπαϊκής Ένωσης, καθώς, όπως γίνεται λόγος παραπάνω, μπορεί κάποια προϊόντα να παράγονται σε αυτές και μετέπειτα να εισάγονται σε χώρες της Ένωσης.

Αναφορικά με τον έλεγχο των τροφίμων, η οδηγία 89/397/EC [9] περιγράφει τον επίσημο τρόπο ελέγχου των τροφίμων και η οδηγία 96/23/EC [10] τις τεχνικές ελέγχου ύπαρξης ουσιών και καταλοίπων αυτών σε ζώα εν ζωή και σε προϊόντα ζωικής προέλευσης. Επίσης, έχουν θεσπιστεί ανώτατα όρια για την ύπαρξη φαρμακολογικά ενεργών ουσιών σε τρόφιμα ζωικής προέλευσης με τον κανονισμό 90/2377/EC [11], ο οποίος αντικαταστάθηκε αργότερα από τον κανονισμό 37/2010/EC [12]. Επιπλέον, η απόφαση 657/2002/EC [13] περιγράφει την επίδοση των αναλυτικών μεθόδων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό των ουσιών και των καταλοίπων αυτών, καθώς και τρόπο ερμηνείας των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από αυτές τις μεθόδους.

Στον κανονισμό 90/2377 καθορίζεται ο όρος «κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων» για πρώτη φορά ως όλες οι φαρμακολογικώς ενεργές ουσίες, είτε είναι ενεργά συστατικά, είτε έκδοχα, είτε προϊόντα αποικοδόμησης, όπως και επίσης προϊόντα μεταβολισμού που παραμένουν στα τρόφιμα ζωικής προέλευσης, μετά τη χορήγηση του κτηνιατρικού φαρμάκου.

Επιπλέον, στον ίδιο κανονισμό γίνεται εισαγωγή του όρου «ανώτατο όριο καταλοίπων» που καθορίζεται ως η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χορήγηση ενός κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφρασμένη σε mg/kg ή σε µg/kg με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος) και μπορεί να θεωρείται στην Κοινότητα νομίμως επιτρεπτή ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επάνω στο τρόφιμο. Το

όριο αυτό εξαρτάται από τον τύπο και την ποσότητα του εκάστοτε καταλοίπου υπό την προϋπόθεση ότι αυτό δεν αποτελεί τοξικολογικό κίνδυνο για την υγεία των ανθρώπων. Τέλος, για τον ορισμό της τιμής του ανωτάτου ορίου καταλοίπων, λαμβάνεται υπόψη η παρουσία αυτών σε τρόφιμα φυσικής προέλευσης και στο περιβάλλον, καθώς και οι κίνδυνοι που μπορεί να ελλοχεύουν για τη δημόσια υγεία.

Τα ανώτατα όρια καταλοίπων των ενώσεων (MRL) που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, σύμφωνα με τον κανονισμό 37/2010/EC παρατίθενται στον Πίνακα 3.1.

Πίνακας 3.1. *Ανώτατα επιτρεπτά όρια των τεσσάρων μελετώμενων τετρακυκλινών.*

Φαρμακολογικός δραστική ουσία	Κατάλοιπο- δείκτης	Ζωικά είδη	MRL
Οξυτετρακυκλίνη	Μητρικό φάρμακο	Όλα τα είδη παραγωγής τροφίμων	100 µg/kg
Τετρακυκλίνη			100 µg/kg
Χλωροτετρακυκλίνη			100 µg/kg
Δοξυκυκλίνη			απαγορευμένη

3.3 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ως επικύρωση νοείται η επιβεβαίωση κατόπιν εξέτασης και η προσκόμιση πραγματικών τεκμηρίων, για τα οποία πληρούνται οι ιδιαίτερες απαιτήσεις για μια συγκεκριμένη χρήση. [13] Η επικύρωση πρέπει να καταδεικνύει ότι η αναλυτική μέθοδος συμμορφώνεται με τα κριτήρια που εφαρμόζονται στα σχετικά χαρακτηριστικά επίδοσης. Διαφορετικές κατηγορίες μεθόδων απαιτούνται για διαφορετικούς σκοπούς ελέγχου.

Η επικύρωση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί με τη διεξαγωγή διεργαστηριακής μελέτης, όπως αυτή που καθορίζει ο Codex Alimentarius, ο ISO (International Organization for Standardization) ή η IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry) ή σύμφωνα με εναλλακτικές μεθόδους, όπως μελέτες ενός μόνο εργαστηρίου. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες προσεγγίσεις για να καταδειχθεί ότι η αναλυτική μέθοδος συμμορφώνεται με τα κριτήρια που ισχύουν για τα χαρακτηριστικά επίδοσης, υπό την προϋπόθεση ότι οι διαδικασίες αυτές επιτυγχάνουν το ίδιο επίπεδο και την ίδια ποιότητα πληροφόρησης. Τα

χαρακτηριστικά επίδοσης ως προς τα οποία πρέπει να εξετάζεται μια αναλυτική μέθοδος δίνονται στον Πίνακα 3.2.

Πίνακας 3.2. Παράμετροι που περιλαμβάνονται στη διαδικασία επικύρωσης.

Επικύρωση		
Παράμετροι επίδοσης ανεξάρτητες από το μοντέλο	Παράμετροι επίδοσης εξαρτώμενες από το μοντέλο	
Κοινά χαρακτηριστικά επίδοσης	Προσέγγιση συμβατικής επικύρωσης	Προσέγγιση εσωτερικής επικύρωσης
Ειδικότητα	Ανάκτηση	Ανάκτηση
Ορθότητα	Επαναληψιμότητα	Επαναληψιμότητα
Ανθεκτικότητα: Μεταβολές ήσσονος σημασίας	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα	Ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα
Σταθερότητα	Αναπαραγωγιμότητα	Αναπαραγωγιμότητα
	Όριο απόφασης (CCα)	Όριο απόφασης (CCα)
	Ικανότητα ανίχνευσης (CCβ)	Ικανότητα ανίχνευσης (CCβ)
	Καμπύλες βαθμονόμησης	Καμπύλες βαθμονόμησης
	Ανθεκτικότητα: Μεταβολές μείζονος σημασίας	Ανθεκτικότητα

Ειδικότητα είναι η ικανότητα μιας μεθόδου να διαχωρίζει την προσδιοριζόμενη ένωση από άλλες ενώσεις. Αυτό το χαρακτηριστικό είναι κατά κύριο λόγο συνάρτηση της χρησιμοποιούμενης τεχνικής μέτρησης, μπορεί όμως να ποικίλει ανάλογα με την κατηγορία της ένωσης ή του υποστρώματος.

Ως **ανθεκτικότητα** ορίζεται η επιδεκτικότητα μιας αναλυτικής μεθόδου σε αλλαγές των πειραματικών συνθηκών, των συνθηκών αποθήκευσης, των περιβαλλοντικών συνθηκών ή/και των συνθηκών προετοιμασίας του δείγματος, υπό τις οποίες η μέθοδος μπορεί να εφαρμοσθεί, όπως παρουσιάστηκε ή με συγκεκριμένες ήσσονος σημασίας μεταβολές. Για όλες τις πειραματικές συνθήκες, οι

οποιές μπορεί στην πράξη να υπόκεινται σε διακύμανση (π.χ. σταθερότητα των αντιδραστηρίων, σύνθεση του δείγματος, pH, θερμοκρασία), πρέπει να αναφέρεται κάθε μεταβολή που θα μπορούσε να επηρεάσει το αποτέλεσμα της ανάλυσης.

Δυνατότητα εφαρμογής/ ανθεκτικότητα (μεταβολές ήσσονος σημασίας): Στις μελέτες αυτού του είδους τα εργαστήρια εισάγουν σκόπιμα λογικές μεταβολές και παρατηρούν τις συνέπειες. Κατά τις προερευνητικές μελέτες πρέπει να επιλέγονται οι παράγοντες προεπεξεργασίας, καθαρισμού και ανάλυσης του δείγματος, που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα της μέτρησης. Οι παράγοντες αυτοί μπορεί να περιλαμβάνουν τον αναλυτή, την πηγή και την ηλικία των αντιδραστηρίων, τους διαλύτες, τα πρότυπα και τα εκχυλίσματα του δείγματος, το ρυθμό θέρμανσης, τη θερμοκρασία, την τιμή του pH, καθώς και πολλούς άλλους παράγοντες που μπορεί να εμφανιστούν στο εργαστήριο. Οι παράγοντες αυτοί πρέπει να μετατρέπονται στην τάξη μεγέθους που ταιριάζει στις αποκλίσεις που συναντάμε συνήθως ανάμεσα στα εργαστήρια.

- Εντοπίζονται οι πιθανοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα.
- Τροποποιείται ελαφρώς ο κάθε παράγοντας.
- Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του **Youden** [14], διεξάγεται μια δοκιμή ανθεκτικότητας. Στο σημείο αυτό μπορούν να χρησιμοποιηθούν και άλλες εγκεκριμένες μέθοδοι. Η προσέγγιση Youden, ωστόσο, περιορίζει στο ελάχιστο τον απαιτούμενο χρόνο και την απαιτούμενη προσπάθεια. Η προσέγγιση Youden είναι ένας κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός. Οι αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στους διαφόρους παράγοντες δε μπορούν να εντοπιστούν.
- Εάν βρεθεί ότι κάποιος παράγοντας επηρεάζει σημαντικά τα αποτελέσματα της μέτρησης, διεξάγονται περαιτέρω πειράματα για να αποφασιστούν τα όρια αποδοχής του παράγοντα αυτού.
- Οι παράγοντες που επηρεάζουν σημαντικά τα αποτελέσματα πρέπει να προσδιορίζονται σαφώς στο πρωτόκολλο της μεθόδου.

Η βασική ιδέα δεν είναι να εξετάζεται μια μεταβολή κάθε φορά, αλλά να εισάγονται πολλές μεταβολές ταυτόχρονα. Για παράδειγμα, ας υποθέσουμε 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 επιλέξουμε ένα υποσύνολο οκτώ συνδυασμών από τους παραπάνω που περιλαμβάνουν ίσο αριθμό κεφαλαίων και μικρών γραμμάτων (Πίνακας 3.3). Πρέπει να γίνουν οκτώ προσδιορισμοί που θα χρησιμοποιούν ένα συνδυασμό των επιλεγμένων παραγόντων (A-G). Τα αποτελέσματα των προσδιορισμών παρουσιάζονται στον Πίνακα 3.3 ως s-z.

Πίνακας 3.3. Σχεδιασμός πειράματος για μελέτες ανθεκτικότητας (μεταβολές ήσσονος σημασίας).

Τιμή Παράγοντα F	Αριθμός συνδυασμού προσδιορισμών							
	1	2	3	4	5	6	7	8
A/a	A	A	A	A	a	a	a	a
B/b	B	B	b	b	B	B	b	b
C/c	C	c	C	c	C	c	C	c
D/d	D	D	d	d	d	d	D	D
E/e	E	e	E	e	e	E	e	E
F/f	F	f	f	F	F	f	f	F
G/g	G	g	g	G	g	G	G	g
Παρατηρούμενο αποτέλεσμα R	s	t	u	v	w	x	y	z

Παράδειγμα υπολογισμού για τις δοκιμασίες ανθεκτικότητας σε μεταβολές ήσσονος σημασίας σύμφωνα με την προσέγγιση Youden: Για να βρεθεί το πώς επηρεάζει ο κάθε παράγοντας, για παράδειγμα ο παράγοντας A: Υπολογίζουμε το μέσο όρο των κεφαλαίων γραμμάτων και αφαιρούμε το μέσο όρο των μικρών γραμμάτων. Αυτό που θα προκύψει είναι το αποτέλεσμα, το οποίο εδώ ονομάζεται ως s.

$$\text{Υπολογισμός παράγοντα A} = (x_1+x_2+x_3+x_4)/4 - (x_5+x_6+x_7+x_8)/4 = s$$

Όπου x_1, x_2, \dots, x_8 είναι τα αποτελέσματα της μέτρησης για την κάθε ένωση και αντιστοιχούν x_1 για το πρώτο πείραμα, x_2 για το δεύτερο πείραμα και ούτω καθεξής. Εάν κάποιος παράγοντας επηρεάζει, η διαφορά θα είναι σημαντικά μεγαλύτερη από τις διαφορές των άλλων παραγόντων. Μια ανθεκτική μέθοδος δεν πρέπει να επηρεάζεται από τις αλλαγές που υπάρχουν ανάμεσα στα εργαστήρια. Εάν δεν υπάρχει σημαντική διαφορά, το πιο ρεαλιστικό μέτρο του τυχαίου σφάλματος δίνεται από τις επτά διαφορές. (Πίνακας 3.4)

Τυπική απόκλιση των διαφορών D_i (SD_i):

Εάν η SD_i είναι σημαντικά μεγαλύτερη από την τυπική απόκλιση της μεθόδου, όταν διεξάγεται υπό συνθήκες ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, μπορεί να προβλεφθεί με βεβαιότητα ότι, όλοι οι παράγοντες μαζί επηρεάζουν το αποτέλεσμα, ακόμα και αν ο κάθε παράγοντας από μόνος του δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση και ότι η μέθοδος δεν είναι αρκετά ανθεκτική στις μεταβολές που επιλέχθηκαν.

Πίνακας 3.4. Υπολογισμός ανθεκτικότητας κατά Youden.

Σύγκριση των μέσων όρων (A)	Διαφορές (D_i)	Τετράγωνα των διαφορών (D_i^2)
$A_A = \Sigma(A_i)/4$	$D_a = A-a = \Sigma(A_i)-\Sigma(a_i)$	$D_a^2 = \text{τιμή } a$
$A_B = \Sigma(B_i)/4$	$D_b = B-b = \Sigma(B_i)-\Sigma(b_i)$	$D_b^2 = \text{τιμή } b$
$A_C = \Sigma(C_i)/4$	$D_c = C-c = \Sigma(C_i)-\Sigma(c_i)$	$D_c^2 = \text{τιμή } c$
$A_D = \Sigma(D_i)/4$	$D_d = D-d = \Sigma(D_i)-\Sigma(d_i)$	$D_d^2 = \text{τιμή } d$
$A_E = \Sigma(E_i)/4$	$D_e = E-e = \Sigma(E_i)-\Sigma(e_i)$	$D_e^2 = \text{τιμή } e$
$A_F = \Sigma(F_i)/4$	$D_f = F-f = \Sigma(F_i)-\Sigma(f_i)$	$D_f^2 = \text{τιμή } f$
$A_G = \Sigma(G_i)/4$	$D_g = G-g = \Sigma(G_i)-\Sigma(g_i)$	$D_g^2 = \text{τιμή } g$
$A_a = \Sigma(a_i)/4$		
$A_b = \Sigma(b_i)/4$		
$A_c = \Sigma(c_i)/4$		
$A_d = \Sigma(d_i)/4$		
$A_e = \Sigma(e_i)/4$		
$A_f = \Sigma(f_i)/4$		
$A_g = \Sigma(g_i)/4$		

Έχει παρατηρηθεί ότι η ανεπαρκής **σταθερότητα** της προσδιοριζόμενης ένωσης ή των συστατικών του υποστρώματος στο δείγμα κατά την αποθήκευση ή την ανάλυση μπορεί να προκαλέσει σημαντικές αποκλίσεις στο αποτέλεσμα της ανάλυσης. Επιπλέον, πρέπει να ελέγχεται η σταθερότητα του προτύπου βαθμονόμησης στο διάλυμα. Συνήθως η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης είναι γνωστή για διάφορες συνθήκες αποθήκευσης.

Για τη μελέτη της σταθερότητας των προτύπων διαλυμάτων πρέπει να ετοιμάζονται φρέσκα διαλύματα παρακαταθήκης των προσδιοριζόμενων ενώσεων και να αραιώνονται για τη δημιουργία υποπολλαπλάσιων δειγμάτων.

Ο χρόνος αποθήκευσης των διαλυμάτων που έχουν παρασκευασθεί μπορεί να επιλεγεί ως 1, 2, 3 και 4 εβδομάδες ή περισσότερο εάν χρειάζεται, μέχρι να παρατηρηθούν τα πρώτα φαινόμενα αποικοδόμησης κατά την ταυτοποίηση ή/και τον ποσοτικό προσδιορισμό. Ο μέγιστος χρόνος αποθήκευσης και οι βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης πρέπει να καταγράφονται.

Ο υπολογισμός της συγκέντρωσης της προσδιοριζόμενης ένωσης σε κάθε υποπολλαπλάσιο δείγμα πρέπει να γίνεται χρησιμοποιώντας ως 100% το διάλυμα της προσδιοριζόμενης ουσίας που έχει μόλις παρασκευαστεί τη στιγμή της ανάλυσης.

$$\text{Προσδιοριζόμενη ένωση που παραμένει (\%)} = C_i \cdot 100 / C_{\text{fresh}}$$

C_i = συγκέντρωση τη χρονική στιγμή i

C_{fresh} = συγκέντρωση του φρέσκου διαλύματος

Για τη μελέτη της σταθερότητας της προσδιοριζόμενης ένωσης στο υπόστρωμα πρέπει, όπου είναι δυνατόν, να χρησιμοποιούνται δείγματα εργασίας. Εάν δεν υπάρχει υλικό εργασίας, τότε μπορεί να χρησιμοποιείται το υπόστρωμα εμβολιασμένο με την προσδιοριζόμενη ένωση.

Εάν υπάρχει υλικό εργασίας, η συγκέντρωση του υλικού πρέπει να καθορίζεται όταν το υλικό είναι ακόμα νωπό. Περαιτέρω υποπολλαπλάσια δείγματα του υλικού μπορούν να ληφθούν ύστερα από 1, 2, 4 και 20 εβδομάδες και οι συγκεντρώσεις πρέπει να προσδιορίζονται.

Για την κατασκευή των **καμπυλών βαθμονόμησης** πρέπει να λαμβάνονται μετρήσεις σε πέντε τουλάχιστον επίπεδα συγκεντρώσεων χρησιμοποιώντας διαλύματα των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Πρέπει να γίνεται περιγραφή του εύρους εργασίας της καμπύλης, του μαθηματικού τύπου της καμπύλης, καθώς και το εύρος αποδοχής για τις παραμέτρους της καμπύλης.

Ως **ανάκτηση** ορίζεται το ποσοστό της αληθούς συγκέντρωσης μιας ουσίας που ανακτάται κατά την αναλυτική διαδικασία. Προσδιορίζεται κατά την επικύρωση, εάν δε διατίθεται πιστοποιημένο υλικό αναφοράς.

Η **επαναληψιμότητα** αφορά στις συνθήκες, όπου ανεξάρτητα αποτελέσματα δοκιμών λαμβάνονται με την ίδια μέθοδο, οργανολογία, τα ίδια στοιχεία δοκιμών, στο ίδιο εργαστήριο και από τον ίδιο αναλυτή. Είναι η πιστότητα κάτω από επαναλήψιμες συνθήκες, εντός της ίδιας ημέρας. Επιλέγονται τρία επίπεδα συγκέντρωσης και για κάθε ένα, η ανάλυση πρέπει να γίνεται με έξι τουλάχιστον δείγματα. Μετά την ανάλυση των δειγμάτων, υπολογίζεται η συγκέντρωση κάθε δείγματος και στη συνέχεια η μέση συγκέντρωση, η τυπική απόκλιση και ο συντελεστής μεταβλητότητας των εμβολιασμένων δειγμάτων.

Ως **ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα** ορίζεται η πιστότητα στο ίδιο εργαστήριο υπό ρητώς καθορισμένες (προκαθορισμένες) συνθήκες (σχετικά π.χ. με μια μέθοδο, τα υλικά δοκιμής, τους χειριστές, το περιβάλλον) σε δικαιολογημένα μεγάλα χρονικά διαστήματα. Για τον προσδιορισμό της ακολουθούνται τα ίδια βήματα με αυτά για τον προσδιορισμό της επαναληψιμότητας, τα οποία επαναλαμβάνονται τουλάχιστον δύο φορές με διαφορετικούς χειριστές και διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, π.χ. διαφορετικές παρτίδες αντιδραστηρίων, διαλυτών κλπ., διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος, διαφορετικά όργανα, κλπ. Εάν υπάρχει δυνατότητα. Με την απόφαση αυτή καθορίζονται το **όριο απόφασης (CC_a)** και η **ικανότητα ανίχνευσης (CC_β)**, έτσι ώστε να γίνει ο εντοπισμός των δειγμάτων εκείνων που υπερβαίνουν τα καθορισμένα όρια υπολείμματος.

Ως **όριο απόφασης (CC_a)** ορίζεται το όριο στο οποίο και πάνω από το οποίο μπορεί να αποφασισθεί με πιθανότητα σφάλματος α ότι ένα δείγμα είναι «μη συμμορφούμενο». Ως **σφάλμα α** ορίζεται η πιθανότητα να είναι «συμμορφούμενο» το δοκιμασθέν δείγμα ακόμα και αν η μέτρηση κατέληξε σε «μη συμμορφούμενα» αποτελέσματα. («ψευδής απόφαση περί μη συμμόρφωσης»). Ως **ικανότητα**

ανίχνευσης (CC_β) ορίζεται η μικρότερη περιεκτικότητα σε συγκέντρωση που μπορεί να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί ή/και ποσοτικώς σε ένα δείγμα με πιθανότητα σφάλματος β. Στην περίπτωση των ουσιών, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, η ικανότητα ανίχνευσης είναι η χαμηλότερη συγκέντρωση, στην οποία μια μέθοδος είναι σε θέση να ανιχνεύσει αληθώς μολυσμένα 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. Ως *σφάλμα β*, θεωρείται η πιθανότητα να είναι αληθώς «μη συμμορφούμενο» το δοκιμασθέν δείγμα, ακόμα και αν η μέτρηση κατέληξε σε συμμορφούμενα αποτελέσματα («ψευδής απόφαση περί συμμόρφωσης»).

Ο τρόπος υπολογισμού του ορίου απόφασης εξαρτάται από το αν για την προσδιοριζόμενη ένωση έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο ή όχι. Στην περίπτωση ενώσεων, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_α μπορεί να καθοριστεί με δύο τρόπους.

Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί τυφλό υλικό, εμβολιασμένο στο ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο επίδοσης κι επάνω από αυτό με ισαπέχοντα βήματα και να ακολουθήσει η ανάλυση των δειγμάτων. Ύστερα από την ταυτοποίηση, χαράσσεται η καμπύλη «σήμα/προστεθείσα συγκέντρωση». Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο σημείο τομής του άξονα των y συν 2,33 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας του σημείου τομής ισούται με το όριο απόφασης.

Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει την ανάλυση τουλάχιστον 20 τυφλών δειγμάτων ανά υπόστρωμα, προκειμένου 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 το θόρυβο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως όριο απόφασης.

Στην περίπτωση ενώσεων, για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_α μπορεί να καθοριστεί επίσης με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843. Στην περίπτωση

αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί τυφλό υλικό, εμβολιασμένο κοντά στο επιτρεπόμενο όριο με ισαπέχοντα βήματα και να ακολουθήσει ανάλυση των δειγμάτων. Ύστερα από την ταυτοποίηση, χαράσσεται η καμπύλη «σήμα/προστεθείσα συγκέντρωση». Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο επιτρεπόμενο όριο συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ισούται με το όριο απόφασης. Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει την ανάλυση 20 τυφλών δειγμάτων ανά μήτρα, 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.

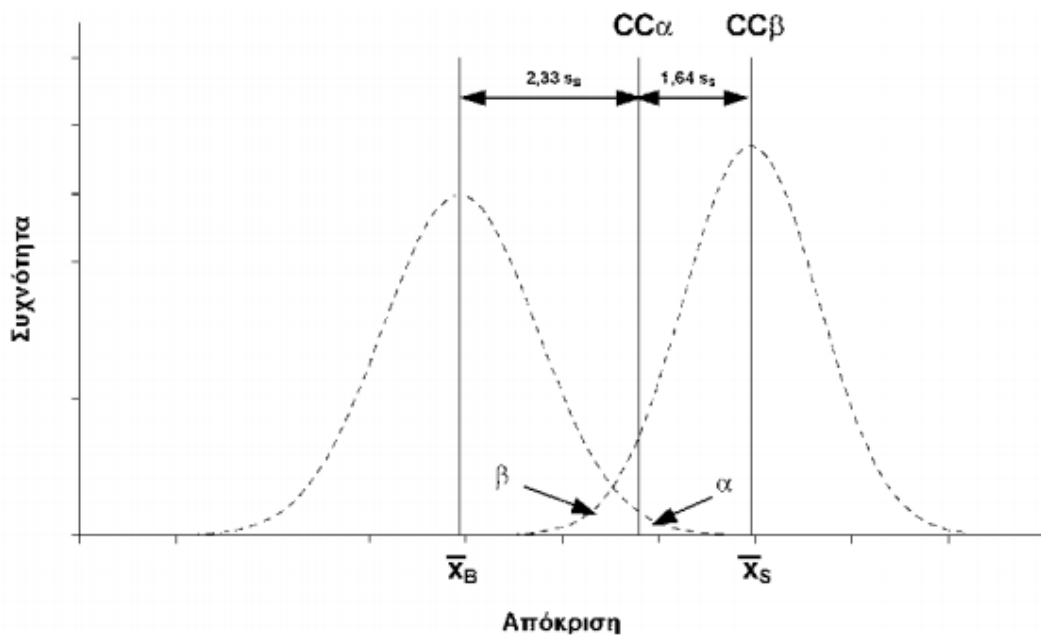
Ο τρόπος υπολογισμού της ικανότητας ανίχνευσης εξαρτάται από το αν για την προσδιοριζόμενη ένωση έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο ή όχι. Στην περίπτωση ουσιών, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_{β} μπορεί να καθοριστεί με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης σύμφωνα με το ISO 11843. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί αντιπροσωπευτικό τυφλό υλικό που να είναι εμβολιασμένο στο ελάχιστο απαιτούμενο επίπεδο επίδοσης και κάτω από αυτό με ισαπέχοντα βήματα και να ακολουθήσει ανάλυση των δειγμάτων. Ύστερα από την ταυτοποίηση, χαράσσεται η καμπύλη «σήμα/προστεθείσα συγκέντρωση». Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στο όριο απόφασης, συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μέσης μετρηθείσας περιεκτικότητας στο όριο απόφασης, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης. Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει την ανάλυση τουλάχιστον 20 τυφλών υλικών, ανά υπόστρωμα, εμβολιασμένων με την προσδιοριζόμενη ένωση ή ενώσεις στο όριο απόφασης. Ακολουθεί ανάλυση των δειγμάτων και ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Η τιμή του ορίου απόφασης, συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας της μετρηθείσας περιεκτικότητας, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης.

Στην περίπτωση ενώσεων, για τις οποίες έχει καθοριστεί επιτρεπόμενο όριο, το CC_{β} μπορεί να καθοριστεί επίσης με δύο τρόπους. Ο πρώτος τρόπος περιλαμβάνει τη διαδικασία της καμπύλης βαθμονόμησης, σύμφωνα με το ISO 11843. Στην περίπτωση αυτή πρέπει να χρησιμοποιηθεί αντιπροσωπευτικό τυφλό υλικό που να είναι εμβολιασμένο κοντά στο επιτρεπόμενο όριο με ισαπέχοντα βήματα. Ακολουθεί η ανάλυση των δειγμάτων και η ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Στη

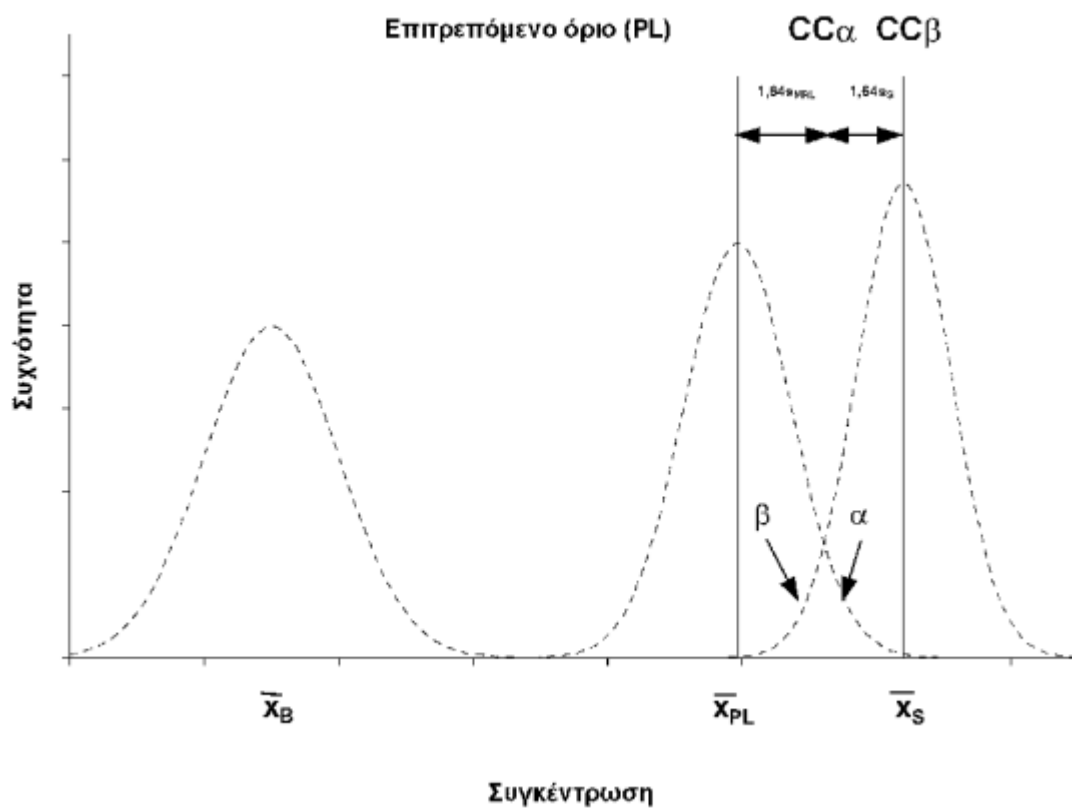
συνέχεια γίνεται υπολογισμός της τυπικής απόκλισης της μέσης μετρηθείσας περιεκτικότητας στο όριο απόφασης. Η συγκέντρωση που αντιστοιχεί στην τιμή του ορίου απόφασης, συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση της ενδοεργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης. Ο δεύτερος τρόπος περιλαμβάνει την ανάλυση τουλάχιστον 20 τυφλών δειγμάτων ανά υπόστρωμα, εμβολιασμένα με την προσδιοριζόμενη ένωση ή ενώσεις στο όριο απόφασης. Η τιμή του ορίου απόφασης συν 1,64 φορές την αντίστοιχη τυπική απόκλιση, ισούται με την ικανότητα ανίχνευσης.

Στα Σχήματα 3.1 και 3.2, φαίνονται οι γραφικές αναπαραστάσεις των δύο ορίων CC_{α} και CC_{β} για ενώσεις, για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί και για τις ενώσεις για τις οποίες έχει καθοριστεί ανώτατο επιτρεπόμενο όριο αντίστοιχα. Στο Σχήμα 3.1, 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 3.2, X_B είναι η μέση συγκέντρωση του τυφλού δείγματος, X_{PL} η μέση συγκέντρωση δείγματος που περιέχει την προσδιοριζόμενη ένωση στο επιτρεπόμενο όριο, 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 . [13]



Σχήμα 3.1. Γραφική αναπαράσταση των δύο ορίων CC_α και CC_β για ενώσεις για τις οποίες δεν έχει καθοριστεί ανώτατο επιτρεπόμενο όριο.



Σχήμα 3.2. Γραφική αναπαράσταση των δύο ορίων CC_α και CC_β για ενώσεις για τις οποίες έχει καθοριστεί ανώτατο επιτρεπόμενο όριο.

4. ΥΓΡΗ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΠΙΕΣΗΣ

4.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι διαχωριστικές τεχνικές αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ενόργανων μεθόδων χημικής ανάλυσης, που έχουν ως στόχο την ταυτόχρονη ποιοτική ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό πολλών συστατικών ενός δείγματος παρουσία ενδεχομένως άλλων ενώσεων που παρεμποδίζουν τον προσδιορισμό. Όταν στην τεχνική που χρησιμοποιείται για το διαχωρισμό των συστατικών ενός δείγματος, τα συστατικά του κατανέμονται ανάμεσα σε δύο μη αναμιγνυόμενες φάσεις, η μια από τις οποίες είναι στατική, ενώ η άλλη κινείται, τότε η τεχνική αυτή ορίζεται ως χρωματογραφική. Η στατική φάση μπορεί να είναι στερεή ή υγρή υποστηριζόμενη από ένα στερεό ή μια πηκτή. Η κινητή φάση μπορεί να είναι υγρή, αέρια ή υπερκρίσιμο ρευστό. Ανάλογα με τη φύση της κινητής φάσης, διακρίνονται τρεις κύριες κατηγορίες χρωματογραφίας: η υγρή, η αέρια και η υπερκρίσιμου ρευστού.

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ανήκει στην πρώτη κατηγορία και αποτελεί μια μετεξέλιξη της απλής υγρής χρωματογραφίας στήλης, στην οποία η κινητή φάση δε διέρχεται από τη στατική με την επίδραση της βαρύτητας, αλλά με την άσκηση πίεσης από κάποια αντλία. Η τεχνική της HPLC οφείλει την ανάπτυξή της στην πρόοδο της τεχνολογίας, καθώς άρχισαν να κατασκευάζονται χαλύβδινες στήλες ανθεκτικές στις μεγάλες πιέσεις και αντλίες υψηλής πίεσης σταθερής παροχής. Στη συνέχεια, ακολούθησε η ανάπτυξη γνωστών ή αγνώστων ανιχνευτών και η προσαρμογή τους στην HPLC, όπως φωτόμετρα, ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού, φθορισμομετρικοί ανιχνευτές, ανιχνευτές αγωγιμότητας κ.ά. Η πρόοδος σε όλους αυτούς τους τομείς, καθώς και στα υλικά πλήρωσης των στηλών, έχουν καταστήσει σήμερα την HPLC την κυριότερη χρωματογραφική τεχνική.

4.2 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΕΙΔΗ HPLC

Στην HPLC μπορούν να εφαρμοστούν όλα τα είδη των μηχανισμών που λαμβάνουν χώρα στους χρωματογραφικούς διαχωρισμούς, με την κατάλληλη χρήση

υλικού πλήρωσης της στήλης (στατική φάση) και του διαλύτη έκλουσης (κινητή φάση).

4.2.1 Χρωματογραφία Προσρόφησης (Adsorption Chromatography)

Ο διαχωρισμός των διαφόρων ενώσεων βασίζεται στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Οι κυριότερες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα είναι δυνάμεις διασποράς. Η χρωματογραφία προσρόφησης βρίσκει εφαρμογή στο διαχωρισμό ουσιών με παρόμοια δομή, αλλά διαφορετική πολικότητα.

Ανάλογα με τη σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και της κινητής φάσης διακρίνονται δύο είδη χρωματογραφίας προσρόφησης: *α) Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης*, όπου η στατική φάση (συνήθως SiO_2 ή Al_2O_3) είναι πολικότερη από την κινητή, η οποία αποτελείται από μη πολικούς διαλύτες, όπως εξάνιο, χλωροφόρμιο, κ.ά. *β) Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης*, στην οποία η στατική φάση που είναι λιγότερο πολική της κινητής αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου, συζευγμένο με διάφορες ομάδες, όπως αλκύλια (ακετύλιο, δεκαοκτύλιο), φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες, κυανομάδες, κ.ά., ενώ η κινητή φάση αποτελείται από μίγματα οργανικών διαλυτών (μεθανόλη, ακετονιτρίλιο, κ.ά.) με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα ή νερό.

4.2.2 Χρωματογραφία Κατανομής (Partition Chromatography)

Ο διαχωρισμός στηρίζεται στη διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μίγματος μεταξύ της κινητής και της υγρής στατικής φάσης και εφαρμόζεται στο διαχωρισμό ομόλογων, μη ιονικών ενώσεων.

4.2.3 Χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής (Ion Exchange Chromatography)

Ο διαχωρισμός οφείλεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των διαχωριζόμενων ιόντων και των φορτισμένων ομάδων της στατικής φάσης. Οι κυριότερες παράμετροι που καθορίζουν τη συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι το αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης, η ιονική ισχύς, το pH, ο τροποποιητής (οργανικός διαλύτης) της κινητής φάσης και η θερμοκρασία.

4.2.4 Χρωματογραφία Συγγένειας (Affinity Chromatography)

Για την επίτευξη διαχωρισμού, οι προσδιοριζόμενες ενώσεις δεσμεύονται εκλεκτικά σε υποκαταστάτες, οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου. Στην κατηγορία αυτή ανήκει η Χρωματογραφία Εναντιομερών, η οποία αποκτά αυξανόμενο ενδιαφέρον και με την οποία διαχωρίζονται εναντιομερείς μορφές ενώσεων που παρουσιάζουν χειρομορφία.

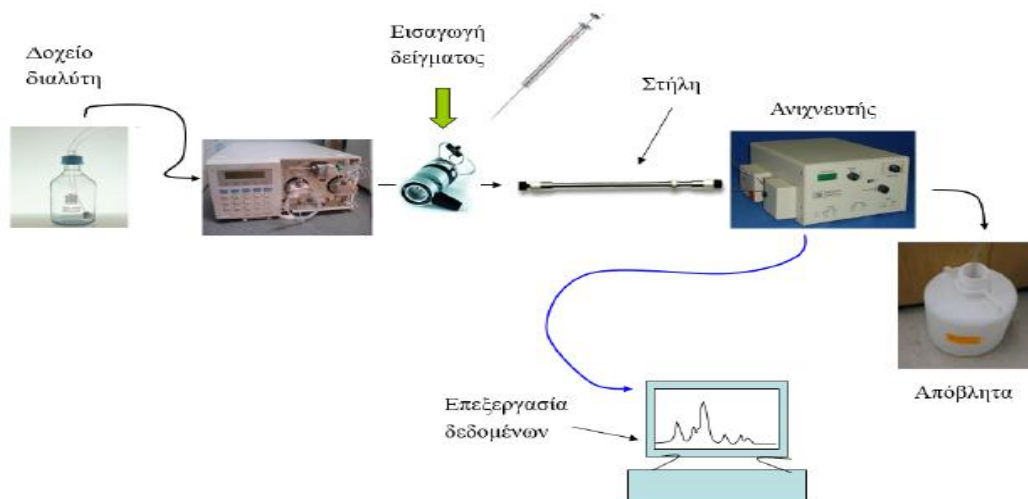
4.2.5 Χρωματογραφία Αποκλεισμού Μεγέθους ή Διάχυσης Πηκτής (Size Exclusion SEC ή Gel Permeation Chromatography GPC)

Ο διαχωρισμός γίνεται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων των διαχωριζόμενων ενώσεων και βρίσκει εφαρμογές στην ανάλυση και στο χαρακτηρισμό των πολυμερών. Τα μεγάλα μόρια εξέρχονται πρώτα από τη στήλη, ενώ τα μικρά μόρια, καθώς εισέρχονται και στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης, καθυστερούν και βγαίνουν αργότερα.

4.3 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΤΗΣ HPLC

Ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης περιλαμβάνει:

- ❖ Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών.
- ❖ Αντλία (σταθερής ροής και πίεσης)
- ❖ Μονάδα εισαγωγής δείγματος (βαλβίδα, αυτόματος δειγματολήπτης).
- ❖ Χρωματογραφική στήλη (αποτελεί την καρδιά του διαχωρισμού).
- ❖ Ανιχνευτή
- ❖ Σύστημα καταγραφής των ληφθέντων αποτελεσμάτων με χρήση κατάλληλου λογισμικού.



Σχήμα 4.1. Τυπική διάταξη HPLC.

Στην αναλυτική στήλη λαμβάνει χώρα ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, ενώ η προώθηση της κινητής φάσης διαμέσου του μικρόκοκκου υλικού πλήρωσης της στήλης επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας υψηλής πίεσης. Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας. Κάθε ένα από τα συστατικά του δείγματος εκλύεται και εμφανίζεται ως κορυφή (κωδωνοειδής καμπύλη Gauss) στο σύστημα καταγραφής. Η ανίχνευση των εκλουόμενων συστατικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο και μπορεί να είναι είτε εκλεκτική είτε όχι, ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ανιχνευτή. Η απόκριση του ανιχνευτή για καθένα από τα συστατικά του δείγματος είτε καταγράφεται σε χαρτί είτε απεικονίζεται στην οθόνη του υπολογιστή και αποτελεί το χρωματογράφημα του διαχωρισμού, ενώ η αποθήκευση των αναλυτικών δεδομένων γίνεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή.

4.3.1 Διαλύτες κινητής φάσης

Η κινητή φάση στην HPLC είναι συνήθως μίγμα διαφόρων αναλογιών κατ' όγκο ενός ή περισσότερων οργανικών διαλυτών και νερού ή ρυθμιστικού διαλύματος στην κατάλληλη τιμή pH, στην περίπτωση της HPLC αντίστροφης φάσης, ή μίγμα μη πολικών διαλυτών στην περίπτωση της HPLC κανονικής φάσης. Για να μπορεί ένας οργανικός διαλύτης να χρησιμοποιηθεί στην HPLC πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις:

- ✓ Να είναι υψηλής καθαρότητας και ειδικός για χρωματογραφία.

- ✓ Να είναι σχετικά φθηνός.
- ✓ Να έχει χαμηλή τοξικότητα.
- ✓ Να είναι δραστικός σε χαμηλές συγκεντρώσεις.
- ✓ Να μην καταστρέφει το δείγμα.
- ✓ Να μην αποσυντίθεται εύκολα.
- ✓ Να μην είναι πτητικός.
- ✓ Να έχει χαμηλό ιξώδες, χαμηλή πίεση επαναφοράς και μεγαλύτερη ικανότητα διαχωρισμού.

Ο οργανικός διαλύτης που συνήθως προτιμάται είναι η μεθανόλη, η οποία είναι οικονομικότερη σε σχέση με το ακετονιτρίλιο και έχει μικρότερο ιξώδες από την αιθανόλη.

Για την αποθήκευση των χρησιμοποιούμενων διαλυτών χρησιμοποιούνται γυάλινες σκοτεινόχρωμες φιάλες, οι οποίες συνοδεύονται από ειδικό πώμα που διαθέτει: α) μεταλλικό φίλτρο για την αναρρόφηση των διαλυτών, β) φίλτρο παροχής αερίου απαέρωσης των διαλυτών και γ) σωλήνα από Teflon για την έξοδο του αέρα.

Όταν γίνεται ανάμιξη διαλυτών ή όταν χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών, κυρίως υδατικά, είναι απαραίτητη η απαέρωσή τους γιατί δημιουργούνται φυσαλίδες αέρα από το διαλυμένο οξυγόνο και άζωτο του αέρα. Οι φυσαλίδες αυτές είναι δυνατό να προκαλέσουν θόρυβο στην ανίχνευση (αστάθεια στη βασική γραμμή) και απώλεια της διαχωριστικής ικανότητας της στήλης. Η απαέρωση γίνεται συνήθως με διαβίβαση ηλίου, το οποίο έχει την ιδιότητα να απομακρύνει το διαλυμένο οξυγόνο και άζωτο από τους διάφορους διαλύτες, χωρίς να διαλύεται το ίδιο και να δημιουργεί φυσαλίδες στο σύστημα. Εναλλακτικό τρόπο απαέρωσης αποτελεί η χρήση υπερήχων και η εφαρμογή κενού, η οποία όμως δεν αποτελεί μόνιμη λύση, αφού μετά την απομάκρυνση του διαλύτη από τη συσκευή κενού δημιουργούνται και πάλι φυσαλίδες από τον ατμοσφαιρικό αέρα.

Αρκετές φορές είναι απαραίτητη η διήθηση των διαλυτών πριν τη χρησιμοποίησή τους, μέσα από κατάλληλα φίλτρα, ώστε να απομακρυνθούν τυχόν

στερεά που μπορεί να φράξουν τη βαλβίδα εισαγωγής, τα έμβολα της αντλίας και να προκληθούν βλάβες στο σύστημα της ανάλυσης.

Η έκλυση των προσδιοριζόμενων συστατικών μπορεί να είναι «ισοκρατική», κατά την οποία διατηρείται σταθερή η σύσταση της κινητής φάσης σε όλη τη διάρκεια της ανάλυσης, ή «βαθμωτή», η οποία χαρακτηρίζεται από μεταβολή της κινητής φάσης με το χρόνο για το διαχωρισμό μιγμάτων ενώσεων, οι οποίες συνήθως παρουσιάζουν παρόμοια δομή και ιδιότητες.

4.3.2 Αντλίες HPLC

Χαρακτηριστικό των αντλιών που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι η επίτευξη υψηλών πιέσεων στη στήλη με τη διαβίβαση της κινητής φάσης. Οι αντλίες αυτές πρέπει να είναι ικανές να λαμβάνουν ακριβή όγκο διαλύτη, χωρίς παλμούς και με επαναλήψιμα σταθερή ταχύτητα ροής και πίεση. Οι αντλίες που διατίθενται στο εμπόριο είναι 1) αντλίες σταθερής ροής και 2) αντλίες σταθερής πίεσης. Τα σημαντικότερα κριτήρια για την επιλογή της κατάλληλης αντλίας είναι:

- ✓ Το υλικό κατασκευής να είναι αδρανές ως προς το διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί.
- ✓ Να μπορεί να παρέχει σταθερή, ακριβή και επαναλήψιμη ροή.
- ✓ Η κεφαλή να έχει μικρό όγκο, ώστε να διευκολύνονται οι ταχύτατες μεταβολές του εκκλουστικού.
- ✓ Να επιτυγχάνονται παροχές σε υψηλές πιέσεις περίπου 7000 psi.
- ✓ Να παρέχει ροή χωρίς διακυμάνσεις, ώστε να μη συνεισφέρει στο θόρυβο του ανιχνευτή.

4.3.3 Σύστημα εισαγωγής δείγματος

Η εισαγωγή του δείγματος μπορεί να γίνει με τρεις τρόπους:

- Με ειδική βαλβίδα εισαγωγής δείγματος
- Με μικροσύριγγα
- Με αυτόματο δειγματολήπτη

Η μονάδα εισαγωγής του δείγματος σε ένα σύστημα HPLC παρεμβάλλεται μεταξύ της αντλίας και της χρωματογραφικής στήλης. Η εισαγωγή με μικροσύριγγα, αν και δίνει τη δυνατότητα να εισάγουμε κατευθείαν το δείγμα μέσα στη στήλη,

δημιουργεί και προβλήματα, όπως μπλοκάρισμα της βελόνας από μικρά σωματίδια, αστάθεια στη βασική γραμμή, λόγω διακοπής της ροής του εκλουστικού. Η βαλβίδα εισαγωγής αποτελείται από έξι θέσεις και ένα βρόχο (loop). Το δείγμα εισάγεται στο βρόχο και στη συνέχεια μεταφέρεται με τη βοήθεια της κινητής φάσης με περιστροφή της βαλβίδας και οδηγείται στη στήλη. Όταν η βαλβίδα είναι στη θέση «πλήρωσης», το δείγμα γεμίζει το βρόχο και ό,τι περισσεύει διοχετεύεται στα απόβλητα. Στη συνέχεια, με την περιστροφή της βαλβίδας στη θέση «εισαγωγής», το δείγμα εισάγεται στο εκλουστικό σύστημα, το οποίο διαβιβάζεται κάτω από υψηλή πίεση στην αναλυτική στήλη. Σημαντικό μειονέκτημα της βαλβίδας εισαγωγής δείγματος είναι η αραίωση που υφίσταται το δείγμα πριν την εισαγωγή στη στήλη. Τέλος, ο αυτόματος δειγματολήπτης αποτελείται από αντλία τύπου σύριγγας για την αναρρόφηση του δείγματος με δυνατότητα εισαγωγής έως και 150 μL δείγματος. Για να αποφευχθεί η επιμόλυνση του δείγματος, η σύριγγα πλένεται στην αρχή και στο τέλος της διαδικασίας και το δείγμα προφυλάσσεται από φυσαλίδες αέρα.

4.3.4 Αναλυτικές στήλες

Η αναλυτική στήλη θεωρείται η «καρδιά» του χρωματογραφικού συστήματος. Με την πάροδο των χρόνων, οι στήλες έχουν βελτιωθεί σημαντικά, εξασφαλίζοντας καλύτερο διαχωρισμό, μεγαλύτερη ταχύτητα και αποτελεσματικότητα και βελτιωμένη σταθερότητα και επαναληψιμότητα. Οι στήλες, ανάλογα με τις διαστάσεις τους, διακρίνονται σε προστήλες, αναλυτικές στήλες, ημι-παρασκευαστικές και παρασκευαστικές. Ο ρόλος των προστηλών είναι συνήθως προστατευτικός, λόγω της ικανότητάς τους να συγκρατούν αιωρούμενα σωματίδια ή ενώσεις που προσροφώνται ισχυρά κατά την εισαγωγή ακατέργαστων δειγμάτων. Οι παρασκευαστικές στήλες έχουν μεγάλες διαστάσεις και χρησιμοποιούνται κυρίως για το διαχωρισμό και την παραλαβή ενώσεων μίγματος της τάξης των mg. Οι αναλυτικές στήλες αποτελούνται αρχικά από έναν εξωτερικό κύλινδρο και το υλικό πλήρωσης. Ο εξωτερικός κύλινδρος μπορεί να είναι κατασκευασμένος από μέταλλο, ανοξείδωτο ατσάλι, γυαλί ή πολυμερές. Το υλικό πλήρωσης βρίσκεται στο εσωτερικό του κυλίνδρου και επιλέγεται ανάλογα με τις ενώσεις που θα διαχωριστούν. Οι στήλες έχουν μήκος 3-30 cm και εσωτερική διάμετρο 0.4-0.8 mm. Τα περισσότερα υλικά πλήρωσης έχουν ως βάση την πηκτή διοξειδίου του πυριτίου (silica gel), γιατί έχει χαμηλό κόστος και δεν καταστρέφεται εύκολα. Η επιφάνειά του αποτελείται από σιλανολικές (ελεύθερες ή ενωμένες ανά δύο με δεσμούς υδρογόνου) και σιλοξανικές

ομάδες. Γενικά, τα υλικά πλήρωσης που χρησιμοποιούνται στην HPLC είναι πορώδη, μη πορώδη και διάχυσης.

4.3.5 Ανιχνευτές

Κάθε ανιχνευτής HPLC, ανεξάρτητα από την αρχή στην οποία βασίζεται η λειτουργία του, πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως:

- Χαμηλό επίπεδο θορύβου
- Υψηλή ευαισθησία και μεγάλο εύρος γραμμικής περιοχής
- Μικρό χρόνο απόκρισης
- Μικρό νεκρό όγκο
- Ανεξαρτησία στις μεταβολές θερμοκρασίας και της ροής
- Ευελιξία σε μεταβολές της σύστασης της κινητής φάσης
- Αξιοπιστία και ευκολία στη χρήση
- Δυνατότητα ανίχνευσης διαφορετικών ενώσεων και παροχή στοιχείων για την ταυτοποίησή τους
- Μη καταστροφή του προσδιοριζόμενου συστατικού

Μέχρι σήμερα έχουν αναπτυχθεί διάφοροι τύποι ανιχνευτών, όπως ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού, αγωγιμομετρικοί και φθορισμομετρικοί ανιχνευτές, ανιχνευτές δείκτη διάθλασης, ηλεκτροχημικοί ανιχνευτές, ανιχνευτές φασματομετρίας μάζας, κ.ά.

Ο τύπος του ανιχνευτή που έδωσε νέα διάσταση στις αναλυτικές δυνατότητες της HPLC, είναι ο ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (photodiode array detector) (Σχήμα 4.2), ο οποίος συλλέγει τα δεδομένα της απορρόφησης της προσδιοριζόμενης ένωσης, σε όλο το φάσμα του ορατού ή του υπεριώδους. Τα πλεονεκτήματα ενός τέτοιου ανιχνευτή είναι η συνεχής καταγραφή του ολικού φάσματος, καθώς και η δυνατότητα ποσοτικής εκτίμησης της ανάλυσης σε περισσότερα του ενός μήκη κύματος, γεγονός που αυξάνει την εκλεκτικότητα του προσδιορισμού. Επίσης, μπορεί να γίνει ταυτοποίηση των κορυφών ενός χρωματογραφήματος και να υπολογιστεί ο βαθμός καθαρότητάς τους, στοιχεία που βοηθούν στην ανάλυση αγνώστων και πολύπλοκων δειγμάτων.



Σχήμα 4.2. Ανιχνευτής παράταξης φωτοдиодων.

4.3.6 Σύστημα συλλογής και καταγραφής αποτελεσμάτων

Ο διαχωρισμός των ενώσεων ανιχνεύεται από τον ανιχνευτή και είναι υπό τη μορφή ηλεκτρονικού σήματος. Παλαιότερα, χρησιμοποιούνταν ευρέως ένα σύστημα καταγραφής χρωματογραφημάτων με μελάνι και χαρτί. Σήμερα χρησιμοποιείται κυρίως ένα απλό σύστημα που αποτελείται από επεξεργαστή και εκτυπωτή, όπως επίσης και έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή που αποτελείται από οθόνη, πληκτρολόγιο και εκτυπωτή. Επίσης, υπάρχουν πλέον λογισμικά που έχουν σχεδιαστεί ειδικά για το σύστημα HPLC. Τέτοια λογισμικά παρέχουν στο χρήστη όχι μόνο τη δυνατότητα απόκτησης δεδομένων, αλλά και τη δυνατότητα επεξεργασίας των χρωματογραφημάτων, όπως η διόρθωση της βασικής γραμμής, ο αυτόματος υπολογισμός της συγκέντρωσης ή ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους. [15]

5. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Κάθε αναλυτική διεργασία αποτελείται από διάφορα διακριτά στάδια, καθένα από τα οποία είναι κρίσιμο, για να λαμβάνονται ακριβή και επαναλήψιμα αποτελέσματα. Το πιο πολύπλοκο και χρονοβόρο είναι η προκατεργασία του δείγματος και αποτελεί τα δύο τρίτα του συνολικού χρόνου ανάλυσης. Κρίνεται παρ'όλα αυτά απαραίτητο για την απομάκρυνση και παραλαβή ή για την προσυγκέντρωση των συστατικών του αναλυόμενου δείγματος. Οι στόχοι της προκατεργασίας του δείγματος είναι:

- Η τροποποίηση του υποστρώματος.
- Ο καθαρισμός του δείγματος.
- Ο εμπλουτισμός / προσυγκέντρωση.
- Η απομόνωση των συστατικών που μας ενδιαφέρουν.

Μια τεχνική προκατεργασίας δείγματος πρέπει να πληροί ορισμένες προϋποθέσεις, όπως να είναι απλή, ταχεία, οικονομική, εκλεκτική για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, αποτελεσματική και να μπορεί να αυτοματοποιηθεί. Για την ανάπτυξη της καταλληλότερης μεθόδου προκατεργασίας πρέπει να λαμβάνονται υπόψη ορισμένες παράμετροι:

- Η χημική σύνθεση του δείγματος.
- Οι φυσικοχημικές ιδιότητες του δείγματος.
- Υπόστρωμα / παρεμποδίσεις.
- Η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- Η ανάκτηση, η οποία πρέπει να είναι ποσοτική.
- Η διαδικασία να είναι απλή.
- Η επαναληψιμότητα / η ακρίβεια. [16]

5.1 ΚΛΑΣΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

Η μεταφορά ενός συγκεκριμένου συστατικού από μια φάση (διάλυμα ή αιώρημα) σε μια άλλη (υγρή) λέγεται εκχύλιση και είναι η διαδικασία που χρησιμοποιείται κατ'εξοχήν για το διαχωρισμό, την απομόνωση και την παραλαβή ενός συστατικού από ένα χημικό σύστημα. Στις κλασικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος περιλαμβάνονται η εκχύλιση υγρού-υγρού και η εκχύλιση Soxhlet, οι

οποίες ήταν από τις πρώτες που χρησιμοποιήθηκαν για την προκατεργασία δειγμάτων στη χημική ανάλυση. Βασική αρχή στην οποία στηρίζονται και οι δυο είναι η επαφή του μίγματος που περιέχει το προσδιοριζόμενο συστατικό με κατάλληλο διαλυτικό μέσο, το οποίο διαλύει εκλεκτικά το συγκεκριμένο συστατικό.

5.1.1 Εκχύλιση Υγρού-Υγρού

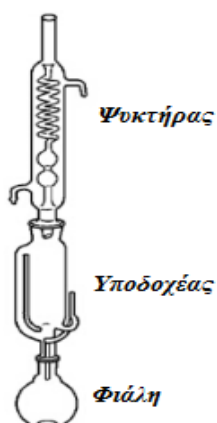
Η εκχύλιση υγρού-υγρού δίνει τη δυνατότητα στον αναλυτή να επιλύσει σημαντικό αριθμό προβλημάτων που υπεισέρχονται στη χημική ανάλυση, όπως είναι η απομάκρυνση παρεμποδίσεων, ο μεγαλύτερος χρόνος που απαιτείται για τη συγκεκριμένη χημική ανάλυση και άλλα. Είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται στην προκατεργασία δειγμάτων και περιλαμβάνει την ανάμιξη ενός υδατικού διαλύματος με ένα μη μιγνυόμενο με το νερό οργανικό διαλύτη, οπότε η προσδιοριζόμενη ουσία μεταφέρεται εκλεκτικά στην οργανική στοιβάδα, από την οποία μπορεί να παραληφθεί μετά την απομάκρυνση του διαλύτη. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η ανάμιξη των δυο φάσεων γίνεται σε ένα διαχωριστικό χωνί, όπου και αναταράσσονται, προκειμένου να έλθουν σε στενή επαφή και να αποκατασταθεί ισορροπία ανάμεσα στις δυο φάσεις. (Σχήμα 5.1) Ένας περιορισμός της τεχνικής αυτής είναι ότι οι πολικοί υδατοδιαλυτοί διαλύτες δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση. Άλλα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι το γεγονός ότι χρησιμοποιεί μεγάλους όγκους οργανικών διαλυτών, ο σχηματισμός γαλακτωμάτων, η συνεκχύλιση άλλων συστατικών του υποστρώματος, είναι δύσκολο να αυτοματοποιηθεί, κ.ά. [16]



Σχήμα 5.1. Αναπαράσταση εκχύλισης υγρού-υγρού σε διαχωριστική χοάνη.

5.1.2 Εκχύλιση Soxhlet

Η εκχύλιση από στερεά μίγματα γίνεται συνήθως με την εκχυλιστική διάταξη Soxhlet. Το προς εκχύλιση στερεό τοποθετείται στον ειδικό πορώδη χάρτινο ή γυάλινο υποδοχέα της διάταξης. Οι ατμοί του ζέοντος διαλύτη διέρχονται από τον πλευρικό υάλινο σωλήνα του επιθέματος, συμπυκνώνονται στον ψυκτήρα και επαναρρέουν στο χάρτινο υποδοχέα του στερεού μίγματος. Μόλις ο χώρος του επιθέματος πληρωθεί με το διαλύτη γίνεται αυτόματος σιφωνισμός, ο διαλύτης (εκχύλισμα) επαναρρέει στη φιάλη και ο κύκλος επαναλαμβάνεται. (Σχήμα 5.2) Με τον τρόπο αυτό γίνεται εμπλουτισμός του διαλύματος στη φιάλη με τα διαλυτά συστατικά του στερεού μίγματος. Η τεχνική αυτή με παρατεταμένη λειτουργία είναι κατάλληλη για την παραλαβή ακόμα και ελάχιστα διαλυτών ουσιών. [17]



Σχήμα 5.2. Σχηματική απεικόνιση συσκευής Soxhlet.

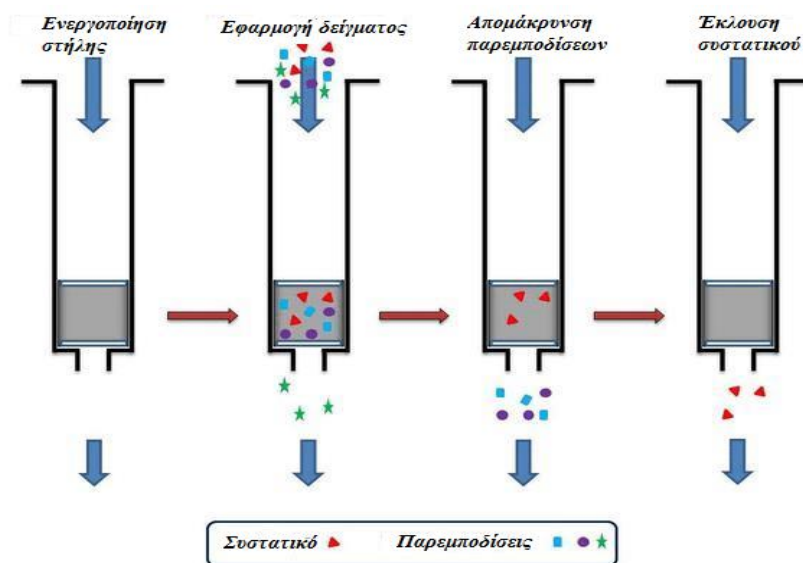
5.2 ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

5.2.1 Εκχύλιση Στερεάς Φάσης Υγρού (Solid Phase Extraction – SPE)

Η τεχνική αυτή αποτελεί μια μικρογραφία της χρωματογραφίας στήλης, καθώς χρησιμοποιεί μικροστήλες από πολυαιθυλένιο, πολυπροπυλένιο ή γυαλί μέσα στις οποίες είναι πακτωμένο το προσροφητικό υλικό. Η αρχή λειτουργίας της ως τεχνικής προκατεργασίας στηρίζεται στην εκλεκτική συγκράτηση στην επιφάνεια του προσροφητικού υλικού των προσδιοριζόμενων συστατικών του δείγματος, καθώς αυτό διαβιβάζεται μέσα από τη μικροστήλη.

Τα στάδια της SPE και οι διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα φαίνονται στο Σχήμα 5.3. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την ενεργοποίηση του προσροφητικού υλικού της μικροστήλης με το κατάλληλο διαλυτικό σύστημα. Η συγκράτηση των επιθυμητών συστατικών από το εξεταζόμενο δείγμα είναι αποτέλεσμα διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στα συστατικά αυτά και το υλικό της μικροστήλης. Σκοπός της ενεργοποίησης είναι η δημιουργία του κατάλληλου περιβάλλοντος για να αναπτυχθούν αυτές οι αλληλεπιδράσεις.

Στο δεύτερο στάδιο γίνεται η εισαγωγή του δείγματος στη μικροστήλη, οπότε τα προσδιοριζόμενα συστατικά, αλλά ίσως και κάποιες παρεμποδίσσεις από το υπόστρωμα, συγκρατούνται στο υλικό. Οι τελευταίες απομακρύνονται στο τρίτο στάδιο κατά το πλύσιμο του προσροφητικού υλικού, ενώ η έκλυση των επιθυμητών συστατικών πραγματοποιείται στο τέταρτο και τελευταίο στάδιο με τη διαβίβαση κατάλληλου διαλύτη. Η διέλευση του δείγματος και των διαλυτών από τη μικροστήλη πραγματοποιείται με διάφορους τρόπους, όπως: άσκηση πίεσης, εφαρμογή κενού ή φυγοκέντρωση.



Σχήμα 5.3. Διάταξη της SPE.

Γίνεται φανερό ότι η εκλεκτική παραλαβή των προσδιοριζόμενων συστατικών από το δείγμα, καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την επιλογή του κατάλληλου προσροφητικού υλικού και του κατάλληλου συστήματος έκλυσης. Στο εμπόριο κυκλοφορεί μια μεγάλη ποικιλία υλικών για SPE, ανάλογη με αυτή των χρωματογραφικών στηλών, το υλικό όμως που κυριαρχεί είναι το συζευγμένο με

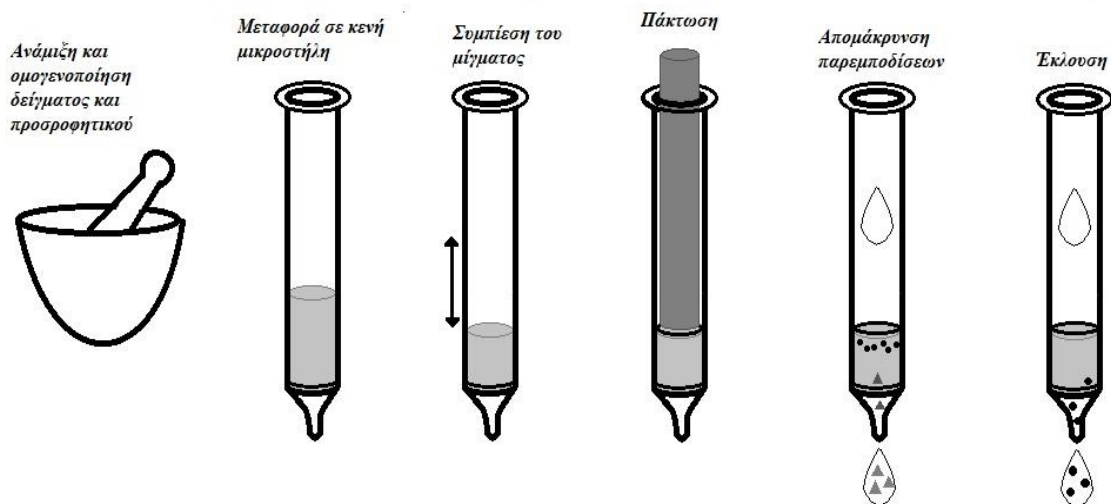
διάφορες αλκυλομάδες οξείδιο του πυριτίου. Ο διαλύτης έκλουσης, τέλος, πρέπει να είναι εκλεκτικός ως προς τα προσδιοριζόμενα συστατικά, ώστε να μη συνεκλούνται ενώσεις που πιθανώς παρεμποδίζουν την ανάλυση.

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της εκχύλισης στερεάς φάσης υγρού που την έχουν καταστήσει μια από τις πλέον δημοφιλείς τεχνικές προκατεργασίας είναι:

- ✓ Η μεγάλη εκλεκτικότητα και τα υψηλά ποσοστά ανακτήσεων.
- ✓ Η προσυγκέντρωση των προσδιοριζόμενων συστατικών.
- ✓ Η δυνατότητα εφαρμογής σε πολλά και διαφορετικά υποστρώματα.
- ✓ Η περιορισμένη κατανάλωση διαλυτών.
- ✓ Οι σύντομοι χρόνοι προκατεργασίας.
- ✓ Η δυνατότητα αυτοματοποίησης και ταυτόχρονης κατεργασίας πολλών δειγμάτων. [16]

5.2.2 Εκχύλιση Διασποράς Στερεάς Φάσης Υποστρώματος (Matrix Solid Phase Dispersion-MSPD)

Η τεχνική της διασποράς στερεάς φάσης υποστρώματος είναι μια τεχνική που έκανε την εμφάνισή της το 1989 και εφαρμόζεται κυρίως για την κατεργασία στερεών, ημιστερεών και υγρών δειγμάτων με υψηλό ιξώδες, σε πολύπλοκα υποστρώματα, όπως τα τρόφιμα και τα βιολογικά δείγματα. Η καινοτομία της τεχνικής έγκειται στο ότι το δείγμα έρχεται σε άμεση επαφή με το στερεό προσροφητικό και επομένως η παραλαβή των συστατικών γίνεται αποτελεσματικά αποφεύγοντας τις δυσκολίες μιας κλασικής προσέγγισης μέσω SPE. Είναι μια απλή τεχνική και τα βασικά στάδια εφαρμογής της έχουν ως εξής: το δείγμα αναμιγνύεται με το προσροφητικό υλικό και το μίγμα ομογενοποιείται, οπότε τα προσδιοριζόμενα συστατικά προσροφώνται σε αυτό. Το ομογενοποιημένο μίγμα πακτώνεται σε μια μικροστήλη μεταξύ δυο φριτών και τα επιθυμητά συστατικά εκλούνται με χρήση κατάλληλου διαλύτη. Το προϊόν της έκλουσης, είτε αναλύεται απευθείας, ή εφόσον κρίνεται απαραίτητο υπόκειται σε επιπλέον στάδιο καθαρισμού (Σχήμα 5.4).



Σχήμα 5.4. Στάδια προκατεργασίας με MSPD.

Εναλλακτικά, για την ενίσχυση τόσο της ομογενοποίησης του μίγματος, όσο και της εκχύλισης, μπορεί να χρησιμοποιηθεί η ενέργεια υπερήχων. Οι υπέρηχοι υποβοηθούν στην αποτελεσματική επαφή ανάμεσα στο στερεό προσροφητικό και το εκχύλισμα, γεγονός που οδηγεί σε υψηλότερες ανακτήσεις των εξεταζομένων ενώσεων. Η ενέργεια υπερήχων δημιουργεί πολυάριθμες μικρές φυσαλίδες υγρού και προκαλεί τη μηχανική διάσπαση των σωματιδίων του στερεού υλικού.

Η τεχνική της MSPD διαφέρει από την κλασική SPE σε δυο σημεία: 1) Τα δείγματα που χρησιμοποιούνται στην τεχνική της SPE πρέπει να βρίσκονται σε υγρή μορφή πριν περάσουν από τις μικροστήλες, ενώ η MSPD έχει σχεδιαστεί με τέτοιο τρόπο ώστε να χειρίζεται στερεά ή ιξώδη υποστρώματα. 2) Οι φυσικές και χημικές αλληλεπιδράσεις των συστατικών του συστήματος είναι εντονότερες στην MSPD.

Η απευθείας ανάμιξη του δείγματος στην MSPD, παρακάμπτει πολλά στάδια, όπως υγροποίηση, διαλυτοποίηση ή ομογενοποίηση των συστατικών του δείγματος, που πραγματοποιούνται είτε με φυγοκέντρωση είτε με διήθηση. Σε καθένα από αυτά τα βήματα μεγιστοποιείται ο κίνδυνος της απώλειας συστατικών του δείγματος και επιπλέον αυξάνεται ο όγκος του δείγματος.

Η MSPD πλεονεκτεί της συμβατικής SPE στην εκλεκτικότητα, την ευκολία του χειρισμού και στο γεγονός ότι μπορεί να ελαχιστοποιήσει τα στάδια πλύσης και

εκχύλισης, μειώνοντας δραστικά το χρόνο εκτέλεσής της και την κατανάλωση οργανικών διαλυτών. [17]

5.3 ΣΥΓΧΡΟΝΑ ΠΡΟΣΡΟΦΗΤΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

5.3.1 Υλικά QuEChERS – Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe

Τα προσροφητικά υλικά QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) είναι μια γρήγορη, απλή και αποτελεσματική εναλλακτική λύση στις συμβατικές τεχνικές προκατεργασίας δείγματος. Τα QuEChERS προτάθηκαν το 2003 από τον Anastassiades και τους συνεργάτες του. [18] Αναπτύχθηκαν ως ένας απλός και σχετικά χαμηλού κόστους τρόπος εκχύλισης και καθαρισμού φυτοφαρμάκων από μια πληθώρα υποστρωμάτων. Αρχικά, χρησιμοποιήθηκαν για τα υπολείμματα φυτοφαρμάκων στα φρούτα και τα λαχανικά σε συνδυασμό με μια μέθοδο καθαρισμού, η οποία αφαιρεί λιπίδια, σάκχαρα, οργανικά οξέα, στερόλες, πρωτεΐνες, χρωστικές ουσίες και την περίσσεια νερού.

Χρησιμοποιώντας τα υλικά QuEChERS, τα δείγματα είναι έτοιμα σε 3 απλά βήματα. Αρχικά, το δείγμα ομογενοποιείται με το προσροφητικό υλικό. Στη συνέχεια, με την κατάλληλη προσθήκη οργανικών διαλυτών και αλάτων, εκχυλίζονται τα συστατικά και τελικά με φυγοκέντρηση απομακρύνονται οι παρεμποδίσεις και το καθαρό υπερκείμενο συλλέγεται και είναι έτοιμο για απ' ευθείας εισαγωγή στο χρωματογράφο.

Με τη χρήση της τεχνικής εκχύλισης με διασπορά του υποστρώματος, η ποσότητα και το είδος των προσροφητικών μπορούν εύκολα να βελτιστοποιηθούν για την απομάκρυνση διαφόρων παρεμποδίσεων σε δύσκολα υποστρώματα, όπως τα τρόφιμα. Πιο συγκεκριμένα, η εκχύλιση διασποράς με τη χρήση προσροφητικού προσφέρει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα:

- ✓ Βελτιώνει την ολοκλήρωση των κορυφών των ενώσεων και βοηθά στην ταυτοποίηση των κορυφών μέσω φάσματος.
- ✓ Απομακρύνει τις παρεμποδίσεις υποστρώματος που συνεκλούνται με τις κορυφές των προσδιοριζόμενων συστατικών.

- ✓ Προστατεύει τις σωληνώσεις μικρής διαμέτρου, ιδιαίτερα στον αέριο χρωματογράφο, και τις στήλες χρωματογραφίας από επιμολύνσεις στο εσωτερικό τους.

Τα προσροφητικά υλικά QuEChERS υπάρχουν διαθέσιμα στο εμπόριο σε σωλήνες των 2 ή των 15 mL και αποτελούνται από τρία διαφορετικά συστατικά σε διάφορες ποσότητες και συνδυασμούς ανάλογα για ποια χρήση προορίζονται: οι πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες [primary and secondary amine (PSA)] είναι το βασικό συστατικό τους, διότι αφαιρεί πολλά οργανικά οξέα και σάκχαρα, το C₁₈ ή το γραφιτικό carbon black (graphitized carbon black – GCB) χρησιμοποιούνται για την αφαίρεση λιπιδίων ή χρωστικών ουσιών αντίστοιχα, και τέλος, χρησιμοποιείται θεικό μαγνήσιο που είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην αφαίρεση πρωτεϊνών, κυρίως από υποστρώματα τροφίμων. [17] (Σχήμα 5.5)



Σχήμα 5.5. Προσροφητικό υλικό QuEChERS.

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

Στο κεφάλαιο αυτό δίνεται μια βιβλιογραφική επισκόπηση των εργασιών που αφορούν τον προσδιορισμό των ενώσεων που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία. Στη βιβλιογραφία έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των τετρακυκλινών. Τα υποστρώματα επάνω στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι προσδιορισμοί, αναφορικά με τα τρόφιμα, ήταν ζωικός ιστός, βοδινού, χοίρου ή πουλερικών [19], [20], παράγωγα ζώων, όπως για παράδειγμα γάλα [21], [22], [23], αυγά [24], [25] και μέλι [25]. Επίσης, αρκετές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό τετρακυκλινών σε νερό [26], [27], καθώς και σε ιστό ψαριών [28], [29] και αρθροπόδων, όπως οι γαρίδες [30], [31]. Ενδεικτικά, παρακάτω, παρατίθενται κάποιες από τις μεθόδους που επικεντρώνονται στο γάλα ως υπόστρωμα.

Το 2007 προσδιορίστηκαν τρεις τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη και χλωροτετρακυκλίνη) σε δείγματα γάλακτος, μετά από εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE) με τη χρήση στηλών Oasis[®] HLB. Ο προσδιορισμός πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης και φθορισμομετρικό ανιχνευτή. Οι ανακτήσεις που επετεύχθησαν κυμαίνονταν από 68% μέχρι 110%, ενώ το όριο ανίχνευσης LOD από 5,0 έως 35 μg/kg.[32]

Για τον προσδιορισμό έξι τετρακυκλινών (τετρακυκλίνης, οξυτετρακυκλίνης, μινוקυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης, μετακυκλίνης και δοξυκυκλίνης) σε δείγματα γάλακτος και μελιού, αναπτύχθηκε το 2009 μια μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης με μοριακώς αποτυπωμένη μονολιθική στήλη. Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (HPLC-DAD). Για τα δείγματα γάλακτος, τα όρια ανίχνευσης LOD κυμάνθησαν από 10,2 έως 18,8 μg/L και οι ανακτήσεις από 73,3% έως 90,6%. [33]

Την ίδια χρονιά, μια άλλη ερευνητική ομάδα έκανε μια μελέτη με στόχο την ανάπτυξη μιας γρήγορης και απλής μεθόδου μικροεκχύλισης στερεάς φάσης (SPME) για τον προσδιορισμό τεσσάρων ευρέως χρησιμοποιούμενων τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνης, τετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης και δοξυκυκλίνης) σε γάλα και σε επιφανειακά ύδατα. Διαφορετικά πυριτικά και πολυμερικά προσροφητικά

υλικά αξιολογήθηκαν για την ικανότητα ταυτόχρονης προσυγκέντρωσης τετρακυκλινών σε υδατικά και οργανικά διαλύματα. Αφού έγινε εκχύλιση με ACN και κατανομή, οι τετρακυκλίνες προσροφήθηκαν σε ένα μικρό ποσοστό σε προσροφητικά υλικά διασποράς πυριτικών υλικών, πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες, εκροφήθηκαν με μικρό όγκο διαλύματος διασποράς και προσδιορίστηκαν με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων. Για τα δείγματα γάλακτος, τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 7,9 έως 35,3 ng/g και οι ανακτήσεις από 98,2% έως 102,4%. [26]

Το 2013 ένας ζεόλιθος μιδαζολικού σκελετού (ZIF-8) χρησιμοποιήθηκε ως καινοτόμο προσροφητικό υλικό για on-line εκχύλιση στερεάς φάσης και ακολούθως Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC) για τον προσδιορισμό οξυτετρακυκλίνης, τετρακυκλίνης και χλωροτετρακυκλίνης σε δείγματα νερού και γάλακτος. Ο διαχωρισμός επετεύχθη με στήλη C₁₈ (25 cm × 4,6 mm) σε συνθήκες ισοκρατικής έκλουσης. Για τα δείγματα γάλακτος, τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) κυμάνθηκαν από 1,5 έως 8,0 μg/L και από 5,0 έως 26,7 μg/L αντίστοιχα. Οι ανακτήσεις που βρέθηκαν κυμάνθηκαν από 70,3% έως 81,4%. [34]

Σε μια μελέτη ταυτόχρονου προσδιορισμού διαφορετικών τάξεων αντιβιοτικών, το 2016, συμπροσδιορίστηκαν τέσσερις τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη και δοξυκυκλίνη) σε διάφορα υποστρώματα, μεταξύ των οποίων και το γάλα. Η μέθοδος προκατεργασίας που εφαρμόστηκε ήταν η μικροεκχύλιση υγρής φάσης κοίλης ίνας (HF-LPME) και ο προσδιορισμός έγινε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (HPLC-DAD). Για τα δείγματα γάλακτος, τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 2 έως 10 ng/g και οι ανακτήσεις από 1,4% έως 7,5%. [35]

Το 2007, στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε μια μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (HPLC-DAD) για τον προσδιορισμό επτά τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνης, μινοκυκλίνης, τετρακυκλίνης, μετακυκλίνης, διμεθυλοχλωροτετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης και δοξυκυκλίνης) σε γάλα. Χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα οξαλικού οξέος (pH 4) μαζί με 20% TCA, ως διαλύτη αποπρωτεΐνωσης, για την εκχύλιση των

ενώσεων από το γάλα με τη μέθοδο της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE). Ο διαχωρισμός πραγματοποιήθηκε σε αναλυτική στήλη Inertsil ODS-3 (5 μm , 250 \times 4 mm^2) προσαρμοσμένη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η κινητή φάση αποτελούνταν από ένα μίγμα A: 0,01 M οξαλικού οξέος και B: ACN, με βαθμωτή έκλυση. Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης ως προς την εκλεκτικότητα, τη σταθερότητα, το CC α , το CC β , την ακρίβεια και την επαναληψιμότητα. Οι ανακτήσεις των τετρακυκλινών από εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος κυμάνθηκαν από 93,8% έως 107,2%. Όλες οι τιμές του RSD ήταν χαμηλότερες από 8,5%. Το CC α κυμάνθηκε από 101,25 έως 105,84 $\mu\text{g}/\text{kg}$ και το CC β από 103,94 έως 108,88 $\mu\text{g}/\text{kg}$. [36]

Επτά χρόνια αργότερα, το 2014, στο ίδιο εργαστήριο, εφαρμόστηκε μια μέθοδος εκχύλισης στερεάς φάσης σε διασπορά, υποβοηθούμενη από υπερήχους για την επιλεκτική απομόνωση και τον καθαρισμό πέντε τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνης, τετρακυκλίνης, επι-χλωροτετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης και δοξυκυκλίνης) σε δείγματα γάλακτος. Οι ενώσεις στόχοι προσδιορίστηκαν με μια ακριβή και ευαίσθητη χρωματογραφική μέθοδο, η οποία επικυρώθηκε με βάση τα κριτήρια που ορίζει η Ευρωπαϊκή Νομοθεσία. Ο διαχωρισμός έγινε σε αναλυτική στήλη LiChroCART-LiChrospher[®] 100 RP-18 (5 μm , 250 \times 4 mm), σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων. Τα όρια ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) των εξεταζομένων τετρακυκλινών κυμάνθηκαν από 14,5 έως 56,6 $\mu\text{g}/\text{kg}$, σημαντικά χαμηλότερα από τα αντίστοιχα ανώτερα όρια καταλοίπων, ενώ οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 82,0% έως 108%. [37]

Για τον προσδιορισμό τεσσάρων τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνης, τετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης και δοξυκυκλίνης) σε γάλα και αυγά, χρησιμοποιήθηκε ένα ιοντικό υγρό ναφθοϊκού οξέος ως μη οργανικός διαλύτης μικροεκχύλισης (FIL-NOSM). Ο προσδιορισμός έγινε με Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης και ανιχνευτή UV. Για τα δείγματα γάλακτος, οι ανακτήσεις που βρέθηκαν κυμάνθηκαν από 94,1% έως 102,1% και τα όρια ανίχνευσης από 0,08 έως 1,12 $\mu\text{g}/\text{kg}$. [38]

Το 2017 περιγράφηκε για πρώτη φορά η χρήση νανοσωλήνων περιορισμένης πρόσβασης (RACNTs) για τον προσδιορισμό τεσσάρων τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνης, τετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης και δοξυκυκλίνης) σε δείγματα γάλακτος σε ένα πολυδιάστατο σύστημα υγρής χρωματογραφίας. Οι

ανακτήσεις που βρέθηκαν κυμάνθηκαν από 46,98% έως 69,60%. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ) κυμάνθηκαν από 7,50 έως 13,20 µg/L και από 25,01 έως 44,00 µg/L αντίστοιχα, τιμές πολύ καλές σε σχέση με άλλες μεθόδους που χρησιμοποιούσαν ανιχνευτή UV ή DAD. [39]

7. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων, για το διαχωρισμό και τον ταυτόχρονο προσδιορισμό καταλοίπων τεσσάρων τετρακυκλινών, της οξυτετρακυκλίνης (OTC), της τετρακυκλίνης (TC), της χλωροτετρακυκλίνης (CTC) και της δοξυκυκλίνης (DC).

Η μέθοδος εφαρμόστηκε σε γάλα και η παραλαβή των ενώσεων από το υπόστρωμα επετεύχθη με εκχύλιση διασποράς με τη χρήση προσροφητικού QuEChERS. Τέλος, η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης, η οποία εντάσσεται στη νομοθεσία της ένωσης που αφορά στην ανίχνευση υπολειμμάτων οργανικών ενώσεων σε τρόφιμα.

8. ΣΥΣΚΕΥΕΣ – ΟΡΓΑΝΑ – ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

8.1 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ ΠΑΡΑΤΑΞΗΣ ΦΩΤΟΔΙΟΔΩΝ

- Αντλία υψηλής πίεσης με δυνατότητα μίξης τεσσάρων διαλυτών, LC-9AD_{VP}, Shimadzu (Kyoto, Japan)
- Αυτόματος δειγματολήπτης Shimadzu SIL-9A
- Βαλβίδα ανάμιξης διαλυτών κινητής φάσης Shimadzu FCV-9AL
- Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων SPD-M6A, Shimadzu
- Μονάδα ελέγχου συστήματος SCL-10AL_{VP}, Shimadzu
- Λογισμικό ελέγχου ανιχνευτή Shimadzu CLASS-M10A
- Φιάλη ηλίου και μονάδα απαέρωσης διαλυτών DGU-10B
- Χρωματογραφική στήλη Orbit 100C₄, 5 μm, 250 × 4.0 mm, MZ-Analysentechnik (Mainz, Germany)

8.2 ΟΡΓΑΝΑ ΚΑΙ ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Γυάλινη συσκευή διήθησης διαλυτών, Alltech Associates (Deerfield, IL, USA)
- Φίλτρα μεμβρανών νιτρικής κυτταρίνης WHATMAN, 0.2 μm (Maidstone, England)
- Φίλτρα σύριγγας (13 mm x 0.2 μm), Supelco (Bellefonte, PA, USA)
- Αναλυτικός ζυγός ακριβείας ±0.0001 g, Shimadzu AUX120
- Αναδευτήρας Small Vortexer Glass-col (Terre Haute, USA)
- Φυγόκεντρος Hermle Z230 (Gosheim, Germany)
- Συσκευή εξάτμισης αζώτου με εννιά κανάλια Reacti-VapTM (model 18780) PIERCE (Rockford, IL, USA)
- Σιφόνια σταθερού και μεταβλητού όγκου, Eppendorf (Hamburg, Germany)

- Προσροφητικό υλικό QuEChERS 250 mg στο σύνολο (50 mg PSA/50 mg C₁₈EC/150 mg θειικό μαγνήσιο), Agilent Technologies (Santa Clara, USA)

8.3 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

- Οξυτετρακυκλίνη (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany)
- Τετρακυκλίνη (Sigma-Aldrich)
- Χλωροτετρακυκλίνη (Sigma-Aldrich)
- Δοξυκυκλίνη (Sigma-Aldrich)
- Μεθανόλη για HPLC, Fischer Scientific (Loughborough, UK)
- Οξαλικό οξύ Merck (C₂H₂O₄, 100%), (Darmstadt, Germany)
- Δις απιονισμένο νερό
- Ακετονιτρίλιο για HPLC, Fischer Scientific (Loughborough, UK)
- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό νάτριο (Na₂EDTA), Merck

9. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΚΑΙ ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΠΡΟΤΥΠΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ

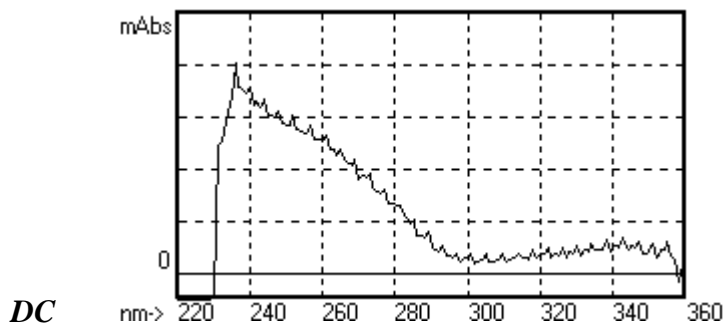
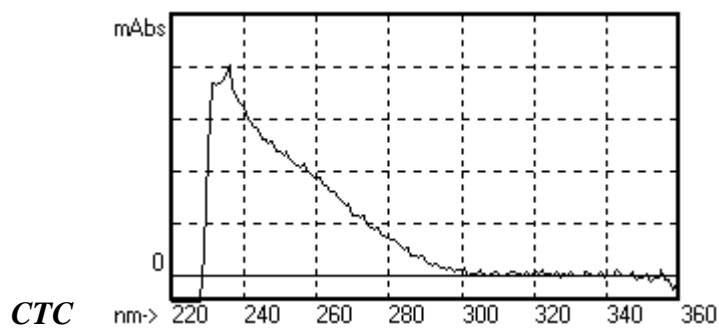
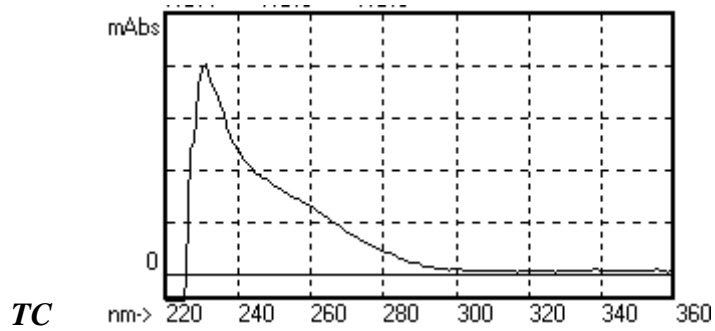
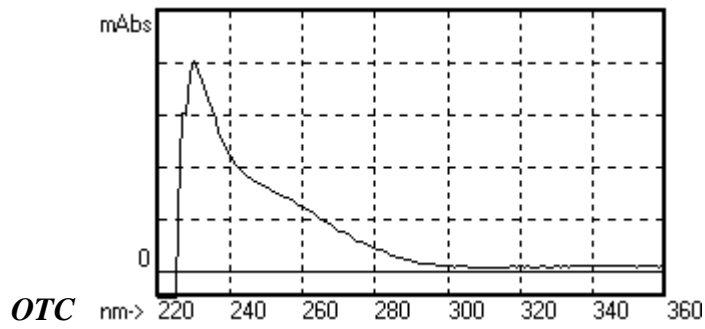
9.1 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΡΟΤΥΠΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ

Οι τετρακυκλίνες είναι διαλυτές σε όξινα και αλκαλικά υδατικά διαλύματα και στη μεθανόλη και μερικώς διαλυτές στο νερό και στην αιθανόλη. Για την παρασκευή προτύπων διαλυμάτων τους επιλέχθηκε ως διαλύτης η μεθανόλη και όχι κάποιο όξινο ή αλκαλικό υδατικό διάλυμα για να αποφευχθούν τυχόν προβλήματα σταθερότητας, λόγω της ευαισθησίας των TCs σε τιμές pH μικρότερες ή μεγαλύτερες του 7.

Αρχικά, παρασκευάστηκαν πυκνά μεθανολικά διαλύματα 100 ng/μL των τετρακυκλινών, οξυτετρακυκλίνη (OTC), τετρακυκλίνη (TC), χλωροτετρακυκλίνη (CTC) και δοξυκυκλίνη (DC) από τη στερεή κρυσταλλική μορφή τους. Από αυτά τα διαλύματα παρασκευάστηκαν τα μεθανολικά διαλύματα εργασίας σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 8 και 10 ng/μL για κάθε τετρακυκλίνη, αλλά και μίγματα των τεσσάρων τετρακυκλινών, με σκοπό να ληφθούν όλες οι προκαταρκτικές μετρήσεις και να βρεθούν οι βέλτιστες συνθήκες της μεθόδου. Τα μίγματα με τις ίδιες συγκεντρώσεις χρησιμοποιήθηκαν και για την κατασκευή της καμπύλης αναφοράς. Τα πρότυπα διαλύματα διατηρούνταν εντός ψυγείου σε θερμοκρασία 4°C.

9.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ

Ως σύστημα ανίχνευσης στην HPLC χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων. Για την επιλογή του βέλτιστου μήκους κύματος ανίχνευσης, όπου οι τετρακυκλίνες παρουσιάζουν μέγιστο απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας, ελήφθησαν τα φάσματά τους στο UV. Για το σκοπό αυτό χρησιμοποιήθηκαν μεθανολικά διαλύματα των τετρακυκλινών συγκέντρωσης 5 ng/μL και η καταγραφή του φάσματος έγινε από τα 200 μέχρι τα 360 nm. Τα ολικά φάσματα UV και των τεσσάρων TCs που ελήφθησαν φαίνονται στο *Σχήμα 9.1*.



Σχήμα 9.1. Φάσματα υπεριώδους (UV) των τεσσάρων τετρακυκλινών σε μεθανολικά διαλύματα συγκέντρωσης 5 ng/μL.

Αρχικά, ελήφθησαν χρωματογραφήματα σε δύο μήκη κύματος, 275 και 355 nm, με ταυτόχρονη ρύθμιση της λειτουργίας του ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων σε αυτά τα δύο κανάλια μηκών κύματος. Επειδή όμως στα 275 nm το φαινόμενο της ολίσθησης της βασικής γραμμής είναι ιδιαίτερα έντονο, τελικώς επιλέχθηκαν τα 355 nm ως το βέλτιστο μήκος κύματος παρατήρησης των χρωματογραφημάτων, καθώς εκπληρώνεται αφενός μεν η απαίτηση για ισχυρή απορρόφηση και αφετέρου η ανάγκη σταθερότητας της βασικής γραμμής.

9.3 ΕΠΙΛΟΓΗ ΣΤΗΛΗΣ ΚΑΙ ΕΚΚΛΟΥΣΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Η επιλογή του κατάλληλου εκκλουστικού συστήματος και της κατάλληλης στήλης είναι κεφαλαιώδους σημασίας για την επίτευξη ενός, όσο το δυνατό καλύτερου διαχωρισμού των ενώσεων σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα, διότι η βελτιστοποίηση των παραμέτρων N (αριθμός θεωρητικών πλακών), k' (παράγοντας συγκράτησης) και a (παράγοντας διαχωρισμού), από τους οποίους εξαρτάται η διαχωριστική ικανότητα R_s , καθορίζεται από την επιλογή της κατάλληλης στήλης και του εκκλουστικού συστήματος αντίστοιχα.

Όπως φαίνεται από τη χημική τους δομή, οι τετρακυκλίνες είναι ενώσεις αρκετά πολικές με διάφορες λειτουργικές ομάδες στο μόριό τους (υδροξυλομάδες, κετονομάδες, αμινομάδες), ενώ οι διαφορές στη δομή τους είναι πολύ μικρές, με αποτέλεσμα να διαχωρίζονται δύσκολα. Στην περίπτωση της HPLC αντίστροφης φάσης, χρησιμοποιούνται στη βιβλιογραφία, στήλες τόσο C_8 όσο και C_{18} με προσθήκη στην κινητή φάση κάποιου οργανικού τροποποιητή. Στην παρούσα εργασία επιλέχθηκε να δοκιμαστεί η χρησιμοποίηση μιας ακόμα πιο πολικής στήλης, της Orbit 100C₄, 5 μ m (250 \times 4 mm), και ως οργανικός τροποποιητής ακετονιτρίλιο, καθώς δίνει πιο συμμετρικές κορυφές.

Επιπλέον προβλήματα στο διαχωρισμό των τετρακυκλινών (διεύρυνση κορυφών, ελάττωση διαχωριστικής ικανότητας) δημιουργούνται από την τάση τους να συμπλέκονται με ίχνη μετάλλων που τυχόν υπάρχουν στις στήλες και να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τις ελεύθερες σιλανολικές ομάδες. Οι λύσεις που προτείνονται από τη βιβλιογραφία είναι: η προσθήκη στην κινητή φάση κάποιου οργανικού οξέος (συνήθως οξαλικό οξύ) ή η προσθήκη EDTA ή του άλατός του με

νάτριο, η δέσμευση των ελεύθερων σιλανολικών ομάδων της στήλης με τριμεθυλοχλωροσιλάνιο και η χρησιμοποίηση στηλών με πολυμερή υλικά πλήρωσης.

Αρχικά, εφαρμόστηκε πρόγραμμα ισοκρατικής έκλουσης. Το εκλουστικό σύστημα που επιλέχθηκε για την πρώτη δοκιμή αποτελούνταν από υδατικό διάλυμα οξαλικού οξέος 0,01 M ως υδατική φάση και ακετονιτρίλιο ως οργανική φάση, σε αναλογία 60%-40%. Οι συνθήκες αυτές δεν οδήγησαν σε επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς δεν παρατηρήθηκε καμία κορυφή.

Στην επόμενη δοκιμή, εφαρμόζοντας επίσης ισοκρατική έκλουση, χρησιμοποιήθηκε ως υδατική φάση, μίγμα υδατικού διαλύματος οξαλικού οξέος συγκέντρωσης 0,01 M και Na₂EDTA συγκέντρωσης 10⁻⁴ M και ως οργανική φάση ακετονιτρίλιο, σε αναλογία όγκων 60%-40%. Ούτε αυτή η δοκιμή έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, καθώς οι κορυφές των τεσσάρων τετρακυκλικών έβγαιναν σε πολύ κοντινούς χρόνους, γεγονός που δεν επέτρεπε τον ικανοποιητικό διαχωρισμό τους.

Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης ενός σταδίου με υδατική φάση, μίγμα υδατικού διαλύματος οξαλικού οξέος συγκέντρωσης 0,01 M και Na₂EDTA συγκέντρωσης 10⁻⁴ M και ως οργανική φάση ακετονιτρίλιο. Οι δοκιμές που πραγματοποιήθηκαν, καθώς και τα αποτελέσματά τους, φαίνονται στον *Πίνακα 9.1*:

Πίνακας 9.1. Δοκιμές προγραμμάτων βαθμωτής έκλουσης.

	Εκλουστικό σύστημα	Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης	Παρατηρήσεις
1	0,01M C ₂ H ₂ O ₄ και 10 ⁻⁴ M Na ₂ EDTA/ CH ₃ CN	0 min 85:15 v/v 10 min 60:40 v/v	Μη ικανοποιητικός διαχωρισμός CTC και DC, διευρυμένη κορυφή OTC
2		0 min 85:15 v/v 20 min 60:40 v/v	Ικανοποιητικός διαχωρισμός, μεγάλοι χρόνοι έκλουσης, βελτίωση της μορφής της OTC
3		0 min 85:15 v/v 15 min 60:40 v/v	Ικανοποιητικός διαχωρισμός, σημαντική βελτίωση χρόνων έκλουσης
4		0 min 82:18 v/v 20 min 60:40 v/v	Βέλτιστοι χρόνοι έκλουσης και βέλτιστος διαχωρισμός

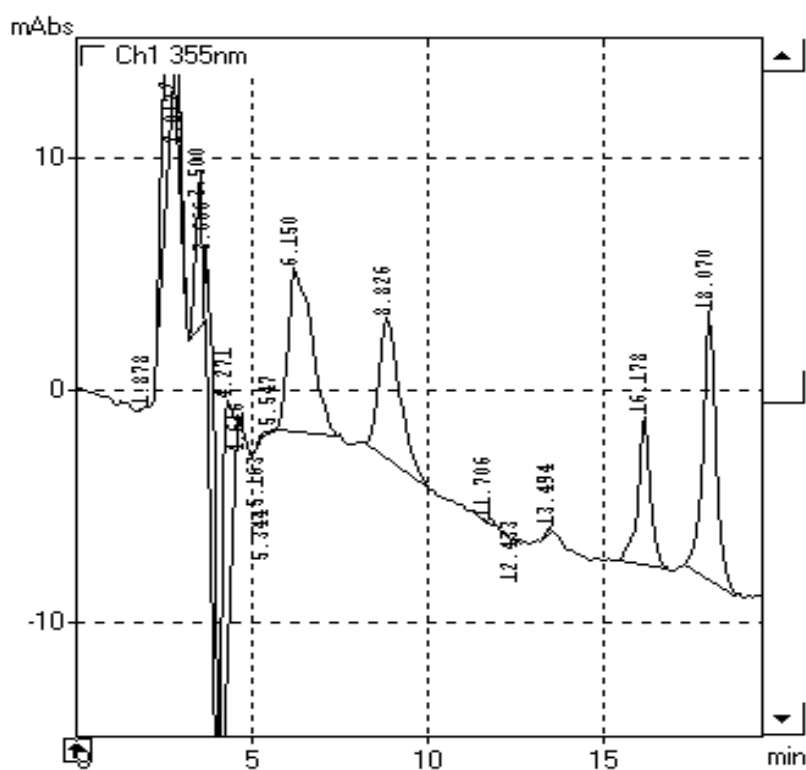
Τελικά, διαπιστώθηκε ότι ο βέλτιστος διαχωρισμός των τεσσάρων τετρακυκλινών επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση το σύστημα A: υδατικό διάλυμα 0,01 M οξαλικού οξέος και 10⁻⁴ M Na₂EDTA και B: CH₃CN, με βάση το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης: 0 min 82% A και 20 min 60% A.

9.4 ΒΕΛΤΙΣΤΕΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

Οι βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που επιλέχθηκαν για το διαχωρισμό των τεσσάρων τετρακυκλινών δίνονται στον Πίνακα 9.2, ενώ στο Σχήμα 9.2. δίνεται ένα τυπικό χρωματογράφημα που ελήφθη με τις συνθήκες αυτές.

Πίνακας 9.2. Βέλτιστες χρωματογραφικές συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό των τεσσάρων τετρακυκλινών.

Στήλη	Orbit 100C ₄ (5 μm, 250 × 4,0 mm)
Εκλουστικό σύστημα	0,01M C ₂ H ₂ O ₄ + 10 ⁻⁴ M Na ₂ EDTA / CH ₃ CN 0 min 82:18 v/v 20 min 60:40 v/v
Πίεση	215-230 bar
Θερμοκρασία στήλης	Περιβάλλοντος
Ανιχνευτής	Παράταξης Φωτοδιόδων (355 nm)
Εισαγόμενος όγκος	100 μL



Σχήμα 9.2. Χρωματογράφημα προτύπου διαλύματος των τεσσάρων ενώσεων, συγκέντρωσης 10 ng/μL. Χρόνοι έκλουσης: OTC 6,150 min, TC 8,826 min, CTC 16,178 min, DC 18,070 min, 355nm.

9.5 ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΣ ΔΙΑΚΡΙΤΙΚΗΣ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑΣ

Για τον υπολογισμό της διακριτικής ικανότητας των χρωματογραφημάτων γίνεται χρήση της σχέσης $RS = \frac{2 \times (t_2 - t_1)}{w_1 + w_2}$, όπου t_1 και t_2 είναι οι χρόνοι συγκράτησης δύο διαδοχικών κορυφών και w_1 και w_2 τα εύρη τους. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον Πίνακα 9.3.

Πίνακας 9.3. Διακριτική ικανότητα του συστήματος.

Ζεύγη ενώσεων	Διακριτική ικανότητα (Rs)
OTC-TC	2,1
TC-CTC	4,9
CTC-DC	1,4

10. ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ

10.1 ΕΠΙΛΟΓΗ ΜΕΘΟΔΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Μετά την ανάπτυξη της μεθόδου σε πρότυπα διαλύματα, ακολουθεί η εφαρμογή της σε δείγματα γάλακτος. Για την επίτευξη αυτού του σκοπού, είναι απαραίτητη η εφαρμογή μιας αποτελεσματικής, γρήγορης και απλής προκατεργασίας για τον καθαρισμό του πολύπλοκου αυτού υποστρώματος, έτσι ώστε να μην υπάρχουν παρεμποδίσεις από το υπόστρωμα στους χρόνους που εκλούνται οι προσδιοριζόμενες ενώσεις. Η προκατεργασία αυτή θα πρέπει να χαρακτηρίζεται από αξιοπιστία, εκλεκτικότητα, επαναληψιμότητα, καθώς και απλότητα στην εφαρμογή. Για το λόγο αυτό, επιλέχθηκε για την εκχύλιση η τεχνική QuEChERS.

10.2. ΕΥΡΕΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟΥ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Μετά από βιβλιογραφική επισκόπηση, επιλέχθηκε να δοκιμαστεί ένα πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε σε προηγούμενη ερευνητική εργασία που πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης και αφορούσε στον ταυτόχρονο προσδιορισμό μελαμίνης και κυρομαζίνης σε κρόκο αυγού με την τεχνική της HPLC μετά από προκατεργασία με εκχύλιση σε διασπορά QuEChERS. [40]

Σύμφωνα με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο, 1 mL MeOH και 1 mL ACN προστίθονταν ως διαλύτες εκχύλισης σε σωλήνα φυγοκέντρωσης (falcon) μαζί με 125 mg προσροφητικού υλικού QuEChERS και 0,5 g υποστρώματος και ακολουθούσε εμβολιασμός με 500 μ L πρότυπο μίγματος των προσδιοριζόμενων ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/mL. Το μίγμα αναδευόταν σε συσκευή Vortex για 30 s και στη συνέχεια γινόταν φυγοκέντρωσή του για 10 min στις 3500 στροφές/λεπτό για την παραλαβή του εκχυλίσματος. Ακολούθως, το εκχύλισμα που παραλαμβάνονταν, υποβαλλόταν σε εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου στους 40°C, γινόταν επαναδιάλυσή του σε 500 μ L δις απιονισμένου νερού, διήθηση σε φίλτρο σύριγγας και τέλος, εισαγωγή του στην HPLC.

10.3. ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗΣ

Στο πρωτόκολλο που εφαρμόστηκε σε πρότυπα διαλύματα, έγινε βελτιστοποίηση των διαλυτών εκχύλισης διασποράς με QuEChERS. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στον Πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1. Ανακτήσεις που προέκυψαν από τη διαδικασία βελτιστοποίησης των διαλυτών.

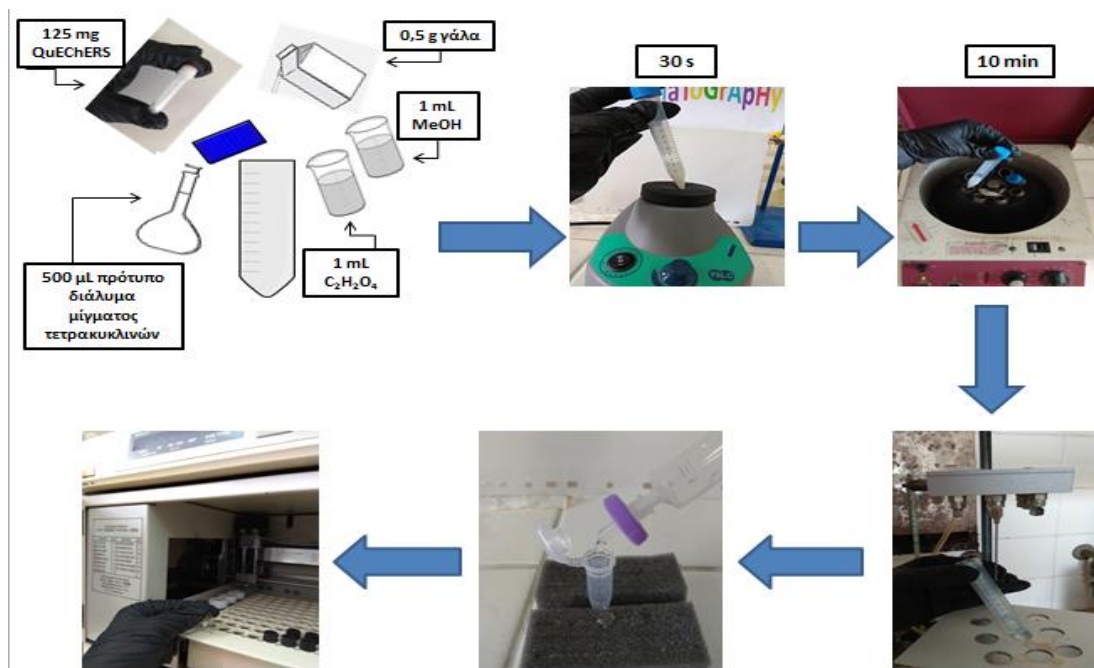
Διαλύτες εκχύλισης	Ανάκτηση (%)			
	OTC	TC	CTC	DC
MeOH/ACN (50:50) v/v	20,3	34,8	22,5	33,5
0,01M C ₂ H ₂ O ₄ /ACN/MeOH (40:30:30) v/v/v	27,6	82,4	56,6	63
MeOH/ACN/0,01M C ₂ H ₂ O ₄ + Na ₂ EDTA 10 ⁻⁴ M (30:30:40) v/v/v	30,5	91,7	64	72
MeOH/0,01M C₂H₂O₄ (50:50) v/v	44,3	102,7	85,5	80,2

Όπως είναι φανερό, τις καλύτερες ανακτήσεις και για τις τέσσερις προσδιοριζόμενες τετρακυκλίνες έδωσε ένα σύστημα διαλυτών εκχύλισης που αποτελούνταν από MeOH και διάλυμα οξαλικού οξέος (C₂H₂O₄) 0,01M σε αναλογία όγκων 1:1.

10.4. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΕ ΓΑΛΑ

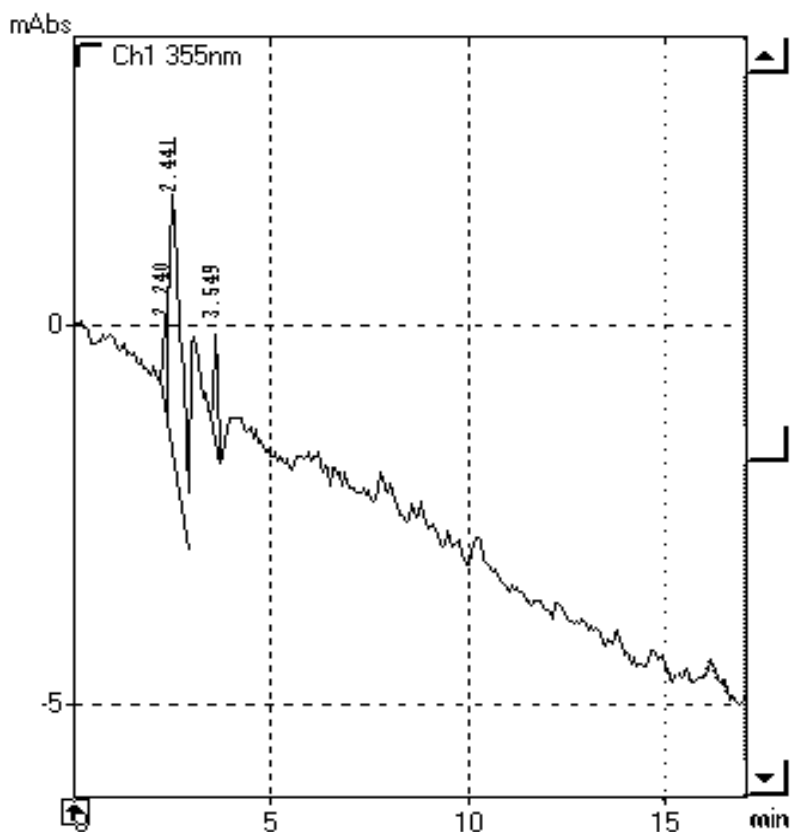
Η προκατεργασία εφαρμόστηκε σε δείγματα φρέσκου γάλακτος του εμπορίου, το οποίο διατηρούνταν στο ψυγείο στους 4°C. Η πορεία που ακολουθήθηκε και φαίνεται στο Σχήμα 10.1 είναι η εξής:

1. Προσθήκη 1 mL MeOH και 1 mL C₂H₂O₄ 0,01 M σε ένα σωλήνα φυγοκέντρωσης (falcon)
2. Προσθήκη 125 mg προσροφητικό υλικό QuEChERS
3. Προσθήκη 0,5 g δείγματος γάλακτος
4. Εμβολιασμός με 500 μL προτύπου διαλύματος μίγματος των τεσσάρων ενώσεων σε συγκέντρωση 10 ng/μL
5. Ανάδευση σε συσκευή Vortex για 30 s
6. Φυγοκέντρωση για 10 min στις 3500 στροφές/λεπτό για την παραλαβή του εκχυλίσματος
7. Παραλαβή του εκχυλίσματος και εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου στους 40°C
8. Επαναδιάλυση με 500 μL δις απιονισμένου νερού και διήθηση σε φίλτρο σύριγγας
9. Εισαγωγή του δείγματος στη στήλη HPLC

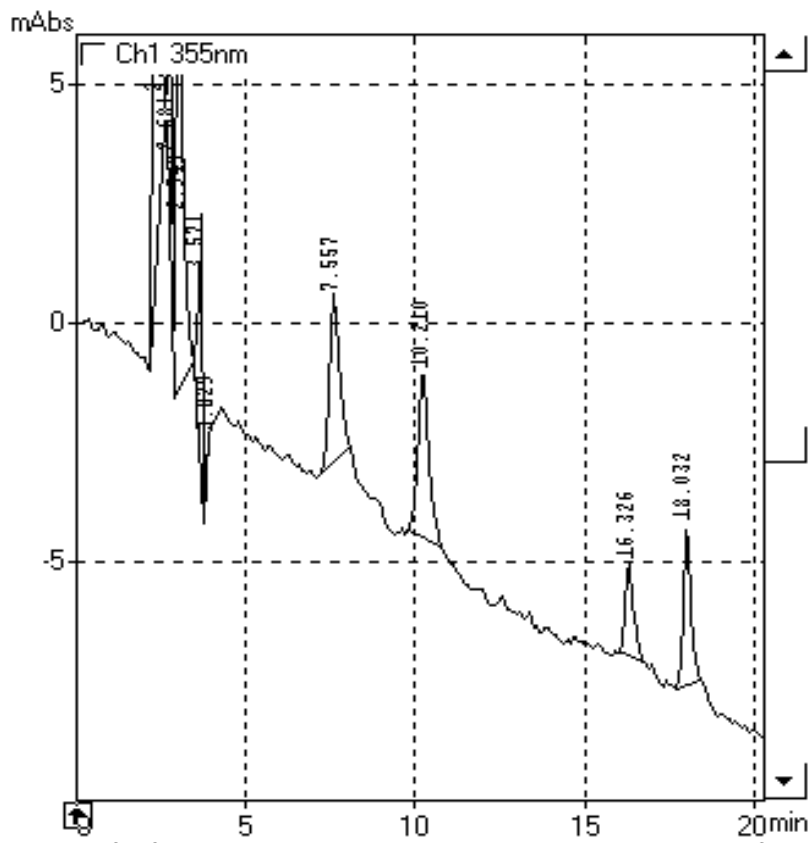


Σχήμα 10.1. Εφαρμογή της μεθόδου σε γάλα.

Στα Σχήματα 10.2 και 10.3 δίνονται αντίστοιχα τα χρωματογραφήματα του λευκού και του εμβολιασμένου δείγματος γάλακτος στα 10 ng/μL. Είναι φανερό ότι οι κορυφές του υποστρώματος δεν παρεμποδίζουν την ανάλυση, καθώς εκλούνται σε διαφορετικό χρόνο από τον αντίστοιχο των ενώσεων.



Σχήμα 10.2. Χρωματογράφημα λευκού δείγματος γάλακτος.



Σχήμα 10.3. Χρωματογράφημα εμβολιασμένου δείγματος γάλακτος στα 10 ng/μL.
Χρόνοι έκλουσης: OTC 7,557 min, TC 10,210 min, CTC 16,326 min και DC 18,032 min.

11. ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ 2002/657 ΤΗΣ ΕΥΡΩΠΑΪΚΗΣ ΕΝΩΣΗΣ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία επικυρώθηκε σύμφωνα με τις οδηγίες της απόφασης 2002/657 της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Εφόσον δεν υπήρχε διαθέσιμο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς για τις ενώσεις των τετρακυκλινών που μελετήθηκαν, έγινε χρήση εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος για τη διεξαγωγή των σταδίων της επικύρωσης. Συγκεκριμένα, έγινε έλεγχος ως προς τα κριτήρια της γραμμικότητας, της ευαισθησίας, την εκλεκτικότητα, της ακρίβειας, της επαναληψιμότητας, του ορίου απόφασης, της ικανότητας ανίχνευσης και της ανθεκτικότητας της μεθόδου, σύμφωνα με τις απαιτήσεις που ορίζονται στην απόφαση 2002/657/EC.

11.1 ΓΡΑΜΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΥΑΙΣΘΗΣΙΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Για να ελεγχθεί η γραμμικότητα της μεθόδου έγινε η κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς για τις τέσσερις εξεταζόμενες τετρακυκλίνες (οξυτετρακυκλίνη, τετρακυκλίνη, χλωροτετρακυκλίνη και δοξυκυκλίνη). Για την κατασκευή των προτύπων καμπυλών αναφοράς παρασκευάστηκαν 6 μεθανολικά μίγματα των ενώσεων από τα αρχικά πυκνά τους διαλύματα, σε συγκεντρώσεις 1, 2, 5, 8, 10 και 20 ng/μL. Για κάθε συγκέντρωση ελήφθησαν τρεις μετρήσεις. Κατασκευάστηκαν οι καμπύλες αναφοράς και υπολογίστηκαν οι εξισώσεις των ευθειών των ελαχίστων τετραγώνων. Οι εξισώσεις που προέκυψαν είναι του τύπου $y = ax + b$, όπου y είναι ο μέσος όρος (τριών μετρήσεων) του εμβαδού της κορυφής της κάθε ένωσης, x η συγκέντρωσή της σε ng/μL, a η κλίση της ευθείας και b η τεταγμένη επί την αρχή. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον Πίνακα 11.1.

Πίνακας 11.1. Εξισώσεις καμπυλών αναφοράς των ενώσεων σε πρότυπα διαλύματά τους.

Ένωση	Εξίσωση	Συντελεστής προσδιορισμού R ²
OTC	$y = 82511x - 61494$	0,9986
TC	$y = 90545x - 173029$	0,9999
CTC	$y = 39009x - 32087$	0,9802
DC	$y = 57256 - 50800$	0,9841

Προκειμένου να ελεγχθεί η γραμμικότητα μέσω χάραξης των καμπυλών αναφοράς σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος, ακολουθήθηκε η προκατεργασία που περιγράφηκε στην παράγραφο 10.4. Δείγματα γάλακτος εμβολιάστηκαν σε συγκεντρώσεις 50-1000 µg/kg. Το κάθε δείγμα αναλύοταν τρεις φορές. Όπως στα πρότυπα διαλύματα, οι εξισώσεις των καμπυλών αναφοράς υπολογίστηκαν με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν δίνονται στον Πίνακα 11.2.

Πίνακας 11.2. Καμπύλες αναφοράς των ενώσεων σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος.

Ένωση	Εξίσωση	Συντελεστής προσδιορισμού R ²
OTC	$y = 3,3763x + 26222$	0,9997
TC	$y = 6,0085 - 783,5$	0,9997
CTC	$y = 4,1561x + 6468,6$	0,9848
DC	$y = 4,5491x + 12389$	0,9869

Κατόπιν, υπολογίστηκε το όριο ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικής αποτίμησης (LOQ) της μεθόδου που αναπτύχθηκε. Ως όριο ανίχνευσης ορίζεται η μικρότερη συγκέντρωση μιας ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί, με βεβαιότητα 95%.

Οι υπολογισμοί για το LOD πραγματοποιήθηκαν με βάση το λόγο $3,3 \times S/N$, όπου S είναι το σήμα και N ο θόρυβος του ανιχνευτή. Το LOQ είναι τρεις φορές μεγαλύτερο του LOD. Συνεπώς, το LOQ της μεθόδου βρέθηκε στα 50 µg/kg και το LOD υπολογίστηκε στα 15 µg/kg.

11.2 ΕΚΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η εκλεκτικότητα της μεθόδου διερευνήθηκε κατά την ανάλυση λευκών δειγμάτων γάλακτος, με την ίδια διαδικασία. Όπως γίνεται εμφανές και από το *Σχήμα 10.2*, δε βρέθηκαν ενδογενείς κορυφές και συνεπώς, δεν υπήρξε καμία παρεμπόδιση που είχε τη δυνατότητα να εμπλακεί στον προσδιορισμό των μελετώμενων ενώσεων.

11.3 ΑΚΡΙΒΕΙΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΛΗΨΙΜΟΤΗΤΑ

Η ακρίβεια και η επαναληψιμότητα της μεθόδου εκφράζονται με τον υπολογισμό της ανάκτησης των ενώσεων από το γάλα. Οι τιμές αυτές προέκυψαν μετά από την ανάλυση εμβολιασμένων δειγμάτων γάλακτος σε συγκεντρώσεις $1 \times \text{MRL}$, $1,5 \times \text{MRL}$ και $2 \times \text{MRL}$.

Η επαναληψιμότητα της μεθόδου (intra-day repeatability) υπολογίστηκε κατόπιν ανάλυσης των τριών συγκεντρώσεων που αναφέρθηκαν, πέντε φορές μέσα στην ίδια μέρα. Η ενδιάμεση πιστότητα (inter-day precision) προέκυψε μετά από εφαρμογή της ίδιας διαδικασίας, τρεις φορές για κάθε συγκέντρωση, σε συνολικό χρονικό διάστημα τριών ημερών.

Οι ανακτήσεις υπολογίστηκαν ως το ποσοστό του λόγου της ευρεθείσας ποσότητας της κάθε τετρακυκλίνης, σε κάθε εμβολιασμένο δείγμα, προς τις αρχικές ποσότητες της ουσίας με τις οποίες αυτό εμβολιάστηκε.

Οι συγκεντρώσεις στο επίπεδο των οποίων έγινε ο εμβολιασμός ήταν 100, 150 και 200 µg/kg για κάθε τετρακυκλίνη. Οι ανακτήσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων υπολογίστηκαν συγκρίνοντας τους λόγους των εμβοδών των εκχυλισμένων ενώσεων με τις τιμές των αντίστοιχων καμπυλών αναφοράς.

Τα αποτελέσματα της επαναληψιμότητας μέσα στην ίδια μέρα, καθώς και οι τιμές της ενδιάμεσης πιστότητας σε διάστημα τριών ημερών, φαίνονται στον *Πίνακα 11.3*. Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης ήταν κάτω από 15,5% για κάθε ένωση.

Οι τιμές των ανακτήσεων, για καθεμιά ένωση, βρέθηκαν ότι κυμαίνονται ως εξής: για την OTC 82,4% - 101,8%, για την TC 93,8% - 105,9%, για τη CTC 83,07% - 106,3% και για τη DC 94,7% - 100,5%.

Πίνακας 11.3. Ακρίβεια και επαναληψιμότητα της μεθόδου για τον προσδιορισμό τεσσάρων τετρακυκλινών σε εμβολιασμένα δείγματα γάλακτος.

Ένωση	Προστέθηκαν ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	Επαναληψιμότητα (n=5)			Πιστότητα (n=3 ημέρες \times 3 προσδιορισμοί)		
		Βρέθηκαν \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD %	Ανάκτηση %	Βρέθηκαν \pm SD ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	RSD %	Ανάκτηση %
OTC	100	101,8 \pm 2,6	2,9	101,8	82,4 \pm 4,5	5,5	82,4
	150	151,1 \pm 0,9	1,1	100,7	143,4 \pm 1,6	1,8	95,6
	200	181,6 \pm 14,6	14,7	90,8	194,2 \pm 3,8	4,0	97,1
TC	100	105,9 \pm 0,2	10,4	105,9	93,8 \pm 0,2	1,3	93,8
	150	146,7 \pm 2,7	1,4	97,6	149,2 \pm 0,7	0,4	99,5
	200	192,6 \pm 0,3	15,4	96,3	192,9 \pm 0,5	0,2	96,4
CTC	100	106,3 \pm 1,6	1,9	106,3	100,2 \pm 6,9	6,9	100,2
	150	132,6 \pm 12,5	9,5	88,4	124,6 \pm 8,4	6,7	83,07
	200	206,2 \pm 13,1	2,4	103,1	193,6 \pm 9,9	8,0	96,8
DC	100	95,3 \pm 3,4	3,5	95,3	100,4 \pm 7,2	7,2	100,4
	150	142,1 \pm 4,7	4,6	94,7	150,3 \pm 3,7	3,9	100,2
	200	193,7 \pm 6,7	6,4	96,8	200,9 \pm 3,5	3,4	100,5

11.4 ΟΡΙΟ ΑΠΟΦΑΣΗΣ (CCα) ΚΑΙ ΙΚΑΝΟΤΗΤΑ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗΣ (CCβ)

Στο πλαίσιο της επικύρωσης της αναλυτικής μεθόδου που αναπτύχθηκε, με σκοπό να εξασφαλιστεί η αξιοπιστία των αποτελεσμάτων, υπολογίστηκαν επιπλέον το όριο απόφασης και η ικανότητα ανίχνευσης αυτής. Η οδηγία 2002/657/EC, της Ευρωπαϊκής Ένωσης, ορίζει ως όριο απόφασης το όριο στο οποίο και πάνω από το οποίο μπορεί να αποφασιστεί ότι ένα δείγμα είναι μη συμμορφούμενο, με πιθανότητα σφάλματος α. Ως ικανότητα ανίχνευσης θεωρείται η μικρότερη περιεκτικότητα μιας ένωσης που μπορεί να ανιχνευθεί, να ταυτοποιηθεί ή και να προσδιοριστεί ποσοτικώς σε ένα δείγμα, με πιθανότητα σφάλματος β.

Και το όριο απόφασης και η ικανότητα ανίχνευσης υπολογίστηκαν μετά από εμβολιασμό 20 δειγμάτων γάλακτος στη συγκέντρωση που ορίζεται από το MRL, δηλαδή στα 100 µg/kg.

Πιο συγκεκριμένα, το όριο απόφασης CCα υπολογίστηκε ως η μέση ευρεθείσα συγκέντρωση στο επίπεδο του MRL, κάθε ένωσης, συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση των μετρήσεων κάθε δείγματος. Η ικανότητα ανίχνευσης CCβ υπολογίστηκε ως το CCα συν 1,64 φορές την τυπική απόκλιση των μετρήσεων που προέκυψαν από τις μετρήσεις των εμβολιασμένων δειγμάτων στα επίπεδα συγκέντρωσης του CCα. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν εμφανίζονται συγκεντρωμένα στον Πίνακα 11.4.

Πίνακας 11.4. Όριο απόφασης CCα και ικανότητα ανίχνευσης CCβ στο MRL.

Ένωση	Ποσότητα που προστέθηκε (µg/kg)	Σφάλμα α (1,64 × SD)	CCα (µg/kg)	Σφάλμα β (1,64 × SD)	CCβ (µg/kg)
OTC	100	4,26	104,3	2,62	106,9
TC	100	0,33	100,3	0,32	100,6
CTC	100	2,62	102,6	4,76	107,4
DC	100	5,58	105,6	4,15	109,7

11.5 ΑΝΘΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε με την εφαρμογή της προσέγγισης Youden. Σύμφωνα με αυτήν την προσέγγιση, εντοπίζονται οι πιθανοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν τα αποτελέσματα και εισάγονται, σκόπιμα, μικρές μεταβολές σε αυτούς κατά τη διαδικασία της ανάλυσης, οπότε και παρατηρούνται τα αποτελέσματα που προκύπτουν.

Αρχικά, έγινε επιλογή επτά παραγόντων της αναλυτικής διαδικασίας, οι οποίοι μεταβλήθηκαν ελάχιστα σε σχέση με τις προεπιλεγμένες, για τη μέθοδο, τιμές τους. Οι παράγοντες που μελετήθηκαν ήταν: οι διαλύτες εκχύλισης, ο όγκος των διαλυτών εκχύλισης, η ποσότητα του προσροφητικού QuEChERS, ο χρόνος μηχανικής ανάδευσης (Vortex), ο χρόνος φυγοκέντρωσης, η ποσότητα του γάλακτος και η θερμοκρασία εξάτμισης. Σκοπός της προσέγγισης Youden είναι να μελετηθεί η εφαρμογή πολλών διαφοροποιήσεων των παραπάνω παραγόντων ταυτόχρονα σε κάθε δοκιμή, και όχι ένας παράγοντας κάθε φορά.

Οι παράμετροι που μελετήθηκαν παρατίθενται στον Πίνακα 11.5 με τα κεφαλαία λατινικά γράμματα A-G να συμβολίζουν τις ονομαστικές τιμές των μεταβλητών, δηλαδή τις τιμές που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο. Με τα αντίστοιχα μικρά γράμματα a-g συμβολίζονται οι εναλλακτικές τιμές που δόθηκαν σε κάθε μεταβλητή. Πραγματοποιήθηκαν οκτώ προσδιορισμοί, χρησιμοποιώντας κάθε φορά ένα διαφορετικό συνδυασμό των επιλεγμένων παραγόντων (A-G).

Τα παρατηρούμενα αποτελέσματα που προέκυψαν από κάθε πείραμα, συμβολίζονται με τα μικρά λατινικά γράμματα s-z. Οι τιμές των αποτελεσμάτων των οκτώ πειραμάτων ανθεκτικότητας δίνονται, επίσης, στον Πίνακα 11.5.

Πίνακας 11.5. Πειραματικός σχεδιασμός προσέγγισης Youden.

Παράμετρος	Μονάδες	Βέλτιστες συνθήκες	Τιμές κεφαλαίων γραμμάτων	Τιμές μικρών γραμμάτων	Αριθμός πειράματος							
					1	2	3	4	5	6	7	8
A = διαλύτης εκχύλισης	-	MeOH- 0,01M C ₂ H ₂ O ₄ (50:50) v/v	MeOH- 0,01M C ₂ H ₂ O ₄ (50:50) v/v	ACN	A	A	A	A	a	a	a	a
B = Όγκος διαλύτη εκχύλισης	mL	2	2	3	B	B	b	b	B	B	b	b
C = Βάρος QuEChERS	mg	125	125	62,5	C	c	C	c	C	c	C	c
D = Χρόνος ανάδευσης (Vortex)	s	30	30	0	D	D	d	d	d	d	D	D
E = Χρόνος φυγοκέντρωσης	min	10	10	8	E	e	E	e	e	E	e	E
F = Βάρος γάλακτος	g	0,5	0,5	1	F	f	f	F	F	f	f	F
G = Θερμοκρασία εξάτμισης	°C	40	40	50	G	g	g	G	g	G	G	g
Παρατηρούμενο αποτέλεσμα					s	t	u	v	w	x	y	z

Δείγματα γάλακτος εμβολιάστηκαν με πρότυπο διάλυμα που περιείχε τις τέσσερις τετρακυκλίνες σε συγκέντρωση 5 ng/μL και αυτά χρησιμοποιήθηκαν για τα οκτώ συνολικά πειράματα που διεξήχθησαν.

Ο διαλύτης εκχύλισης που χρησιμοποιήθηκε είχε αρνητική επίδραση μόνο για τη DC, η οποία παράλληλα ήταν η μόνη από τις τετρακυκλίνες που επηρεάστηκε

θετικά από την ποσότητα του προσροφητικού QuEChERS. Ο χρόνος μηχανικής ανάδευσης (Vortex) επηρέασε αρνητικά την OTC και τη DC, ενώ η ποσότητα του γάλακτος επηρέασε αρνητικά την OTC και τη CTC. Καμία αρνητική επίδραση δεν προκάλεσε ο όγκος του διαλύτη εκχύλισης, καθώς και η θερμοκρασία εξάτμισης. Τέλος, ο μόνος παράγοντας που επηρέασε αρνητικά όλες τις τετρακυκλίνες ήταν ο χρόνος φυγοκέντρωσης.

Τα αποτελέσματα της επίδρασης κάθε παράγοντα παρουσιάζονται στον Πίνακα 11.6.

Πίνακας 11.6. Αποτελέσματα προσέγγισης Youden

Ένωση	SD μεθόδου	SD	Da	Db	Dc	Dd	De	Df	Dg
OTC	0,0309	0,0238	0,0175	0,0163	-0,0057	-0,0401	-0,0181	-0,0185	0,0409
TC	0,0389	0,07	0,0503	0,0353	-0,0797	0,0401	-0,1441	0,0183	0,0453
CTC	0,0237	0,0382	0,0258	0,028	-0,0308	0,0042	-0,0662	-0,0124	0,0598
DC	0,0373	0,0442	-0,0507	0,0471	0,0215	-0,0575	-0,0469	0,0495	0,0187

11.6 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΕ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΑ ΔΕΙΓΜΑΤΑ

Η μέθοδος που αναπτύχθηκε στην παρούσα εργασία, εφαρμόστηκε για την ανάλυση δειγμάτων φρέσκου γάλακτος του εμπορίου, που προμηθεύτηκαν από την τοπική αγορά. Σε όλα τα δείγματα εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο προκατεργασίας που περιγράφηκε παραπάνω.

Δεν εντοπίστηκαν υπολείμματα κανενός εκ των τεσσάρων προσδιοριζόμενων τετρακυκλινών, σε κανένα από τα δείγματα που αναλύθηκαν.

12. ΑΝΑΚΕΦΑΛΑΙΩΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συνοψίζοντας, είναι σημαντικό να γίνει αναφορά στα βασικά σημεία της παρούσας εργασίας. Το γάλα αποτελεί βασική τροφή για τον άνθρωπο με μεγάλη διατροφική αξία, προσφέροντάς του πολλά από τα απαραίτητα συστατικά που χρειάζεται ο οργανισμός του.

Στη σύγχρονη εποχή, για τις ανάγκες της βιομηχανίας τροφίμων, αλλά και της κτηνοτροφίας χορηγούνται στα ζώα αντιβιοτικά φάρμακα για να καταπολεμηθούν διάφορες ασθένειες, αλλά και για να είναι πιο ανθεκτικά σε αυτές, με αποτέλεσμα, υπολείμματά τους να ανιχνεύονται και στο γάλα.

Για το λόγο αυτό, έχει εκδοθεί κατάλληλη νομοθεσία από την Ευρωπαϊκή Ένωση, που δίνει κατευθυντήριες γραμμές για την ασφάλεια των τροφίμων, παρέχοντας οδηγίες και αποφάσεις στις οποίες είναι υποχρεωμένα όλα τα κράτη-μέλη να υπακούσουν. Μέσα σε αυτές τις οδηγίες και τις αποφάσεις καθορίζονται τα ανώτατα επιτρεπτά όρια ανίχνευσης υπολειμμάτων ενώσεων, καθώς και οι μέθοδοι ανάλυσης που ενδείκνυνται για τον προσδιορισμό αυτών.

Οι τετρακυκλίνες είναι η πιο ευρέως διαδεδομένη ομάδα αντιβιοτικών που χρησιμοποιείται στην κτηνιατρική και στην κτηνοτροφία/ιχθυοτροφία για την αντιμετώπιση βακτηριακών λοιμώξεων, αλλά και για προληπτικούς λόγους και ως αυξητικά πρόσθετα, με αποτέλεσμα ο έλεγχος της παρουσίας μελών τους σε κτηνοτροφικά προϊόντα να κρίνεται απαραίτητος. Στην παρούσα εργασία αναπτύχθηκε μια μέθοδος Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων τετρακυκλινών, της οξυτετρακυκλίνης (OTC), της τετρακυκλίνης (TC), της χλωροτετρακυκλίνης (CTC) και της δοξυκυκλίνης (DC) σε γάλα.

Ο διαχωρισμός των τεσσάρων τετρακυκλινών επιτεύχθηκε με μια στήλη Orbit 100C₄ (5 μm, 250 × 4.0 mm), χρησιμοποιώντας ως κινητή φάση το μίγμα: A: υδατικό διάλυμα 0,01M C₂H₂O₄ και 10⁻⁴M Na₂EDTA /B: ACN με βαθμωτή έκλυση (0 min 82:18v/v, 20 min 60:40v/v, Ροή 0,9 mL/min). Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των τεσσάρων τετρακυκλινών πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια

ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων (DAD) και ρύθμιση του μήκους κύματος στα 355 nm για την παρατήρηση των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Ο συνολικά απαιτούμενος χρόνος για το διαχωρισμό των τετρακυκλινών με το παραπάνω σύστημα δεν ξεπερνά τα 19 min και η σειρά έκλουσής τους είναι: οξυτετρακυκλίνη (OTC): 6,150 min, τετρακυκλίνη (TC): 8,826 min, χλωροτετρακυκλίνη (CTC): 16,178 min και δοξυκυκλίνη (DC): 18,070 min. Η τεχνική προκατεργασίας δείγματος που εφαρμόστηκε ήταν η εκχύλιση διασποράς με προσροφητικά υλικά QuEChERS.

Η μέθοδος αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της απόφασης 2002/657/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Επειδή δεν υπήρχε διαθέσιμο πιστοποιημένο υλικό αναφοράς, στη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν εμβολιασμένα δείγματα. Ερευνήθηκε η γραμμικότητα, η ευαισθησία, η εκλεκτικότητα, η ακρίβεια, η επαναληψιμότητα και η ανθεκτικότητα της μεθόδου. Επιπλέον, υπολογίστηκαν τα όρια ανίχνευσης (LOD) και τα όρια ποσοτικής αποτίμησης (LOQ). Το LOQ της μεθόδου βρέθηκε στα 50 µg/kg και το LOD υπολογίστηκε στα 15 µg/kg.

Η σχετική τυπική απόκλιση ήταν χαμηλότερη από 15,5% για όλες τις ενώσεις και οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 82,4% έως 106,3%. Το όριο απόφασης (CCα) και η ικανότητα ανίχνευσης (CCβ) υπολογίστηκαν μετά από εμβολιασμό δειγμάτων γάλακτος στη συγκέντρωση του MRL.

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε είχε πολλά πλεονεκτήματα, τα οποία συνοψίζονται παρακάτω:

- Ικανοποιητικός διαχωρισμός των τεσσάρων τετρακυκλινών, με μεγάλη διακριτική ικανότητα.
- Χρήση καινοτόμων προσροφητικών υλικών (QuEChERS).
- Μικρός όγκος διαλυτών.
- Μικρός χρόνος ανάλυσης.
- Επικύρωση σύμφωνα με την απόφαση 2002/657/EC.
- Ικανοποιητικό RSD.
- Απλή, ταχεία και αποτελεσματική προκατεργασία δείγματος.
- Ικανοποιούνται τα νομοθετικά όρια.
- Δεν απαιτείται χρήση υψηλού κόστους εξοπλισμού.

- Μέθοδος φιλική προς το περιβάλλον.

13. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΜΕΘΟΔΟΥ HPLC ΜΕ ΑΝΙΧΝΕΥΤΗ DAD ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΚΑΤΑΛΟΙΠΩΝ ΤΕΤΡΑΚΥΚΛΙΝΩΝ ΣΕ ΓΑΛΑ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΠΡΟΚΑΤΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ (QuEChERS) ΚΑΙ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΗΝ ΑΠΟΦΑΣΗ 2002/657/EC ΤΗΣ ΕΕ

ΜΑΡΙΝΟΥ ΕΙΡΗΝΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε ανάπτυξη και επικύρωση μιας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τεσσάρων τετρακυκλινών (οξυτετρακυκλίνης, τετρακυκλίνης, χλωροτετρακυκλίνης και δοξυκυκλίνης), με την τεχνική της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης (HPLC) και ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων, μετά από προκατεργασία με εκχύλιση σε διασπορά QuEChERS. Η μέθοδος επικυρώθηκε σύμφωνα με τις απαιτήσεις της απόφασης 2002/657/EC της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Ο διαχωρισμός επετεύχθη χρησιμοποιώντας μια στήλη Orbit 100C₄ (5 μm, 250 × 4.0 mm) και κινητή φάση ένα μίγμα 0.01 M οξαλικού οξέος, 10⁻⁴ M Na₂EDTA και ακετονιτριλίου με βαθμωτή έκλουση. Για την εκχύλιση των προσδιοριζόμενων ενώσεων χρησιμοποιήθηκε ένα μίγμα μεθανόλης και 0,01M οξαλικού οξέος (1:1 v/v). Οι ανακτήσεις κυμάνθηκαν μεταξύ 82,4% και 106,3%. Η επαναληψιμότητα εντός της ίδιας μέρας, εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (RSD%) ήταν χαμηλότερη από 15,5%. Τα όρια απόφασης κυμάνθηκαν μεταξύ 100,3 μg/kg και 105,6 μg/kg και η ικανότητα ανίχνευσης μεταξύ 100,6 μg/kg και 109,7 μg/kg. Η ανθεκτικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε σύμφωνα με την προσέγγιση Youden ως προς το βάρος του γάλακτος, το βάρος του προσροφητικού, το χρόνο φυγοκέντρωσης, το χρόνο ανάδευσης vortex, το είδος και τον όγκο των οργανικών διαλυτών και τη θερμοκρασία εξάτμισης.

14. ABSTRACT

DEVELOPMENT OF AN HPLC-DAD METHOD FOR THE DETERMINATION OF TETRACYCLINE RESIDUES IN MILK BY USING QuEChERS DISPERSIVE EXTRACTION AND VALIDATION ACCORDING TO THE DECISION 2002/657 OF THE EU

MARINOUEIRINI

A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe (QuEChERS) dispersive extraction method was applied for the selective isolation and clean-up of tetracyclines (oxytetracycline, tetracycline, chlorotetracycline and doxycycline) from milk. Target analytes were determined by an accurate and sensitive chromatographic analytical method, which was validated in terms of 657/2002/EC decision. The separation was achieved using an Orbit 100C₄ (5 μm, 250 × 4.0 mm) analytical column with a gradient mobile phase consisting of a mixture of 0.01 M oxalic acid, 10⁻⁴ M Na₂EDTA and acetonitrile. Extraction of isolated compounds was achieved by methanol and 0.01M oxalic acid mixture (1:1 v/v). Recovery rates ranged between 82.4% and 106.3%. The within-laboratory reproducibility, expressed as a relative standard deviation, was <15.5%. Decision limits ranged between 100.3 μg/kg and 105.6 μg/kg and the detection capability between 100.6 μg/kg and 109.7 μg/kg. Ruggedness was estimated according to the Youden approach studying milk mass, sorbent mass, centrifugation time, vortex time, type and volume of organic solvents and evaporation temperature.

15. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] www.sitemaker.umich (Απρίλιος 2018)
- [2] www.EOF.gr (Απρίλιος 2018)
- [3] www.FDA.com (Απρίλιος 2018)
- [4] Y. Liang, M. Centon, R. Bates, J. Chromatogr. A. 1998, 827, 45-55
- [5] <https://el.wikipedia.org> (Ιούνιος 2018)
- [6] <https://www.diatrofi.gr> (Ιούνιος 2018)
- [7] cdev.teilar.gr (Ιούνιος 2018)
- [8] 2001/82/EC. Directive 2001/82/EC of the European parliament and of the council of 6 November 2001 on the Community code relating to veterinary medicinal products. Off. J. Eur. Commun. L 311, 28/11/2001, 1-66
- [9] 89/397/EC. Directive 89/397/EC of the European parliament and of the council of 14 June 1989 on the official foodstuffs. Off. J. Eur. Commun. L 186, 30/6/1989, 23-26
- [10] 96/23/EC. Council Directive of 29 April 1996 on measures to monitor certain criteria substances and residues thereof in live animals and animal products and repealing Directives 85/358/EC and 84/469/EEC and Decisions 89/187/EEC and 91/664/EEC. Off. J. Eur. Commun. L 125, 1996, 10-32
- [11] 2377/90/EC. Council Regulation (EEC) of 26 June 1990 laying down a Community procedure for the establishment of maximum residue limits of veterinary medicinal products in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun. L 224, 1990, 1-124
- [12] Commission Regulation No 37/2010 of 22 December 2009 on pharmacologically active substances and their classification regarding maximum residue limits in foodstuffs of animal origin. Off. J. Eur. Commun. L 15, 2009, 1-72

- [13] 2002/657/EC. Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. Off. J. Eur. Commun. L 221, 2002, 8-36
- [14] W. J. Youden, E. H. Steiner, "Statistical manual of AOAC", Rockville, MD: AOAC, 1975, 33-36
- [15] I. N. Παπαδογιάννης, Β. Φ. Σαμανίδου, Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πήγασος 2000, Θεσσαλονίκη, 2001
- [16] I. N. Παπαδογιάννης, Σύγχρονες Διαχωριστικές Τεχνικές στην Ενόργανη Χημική Ανάλυση, Πήγασος 2000, Θεσσαλονίκη, 2004
- [17] Ευτυχία Καραγεώργου, «Ανάπτυξη μεθόδων για τον προσδιορισμό διαφόρων κατηγοριών αντιβιοτικών στο γάλα με τεχνικές προκατεργασίας και χρωματογραφίας ανάλυσης με χρήση υλικών και στηλών συμβατικής και νέας τεχνολογίας», Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη, 2013
- [18] M. Anastassiades, S.J. Lehotay, D. Stajnbaher, F. J. Schenck, "Fast and easy multi-residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and "dispersive solid-phase extraction" for the determination of pesticide residues in produce". JAOAC.Int, 2003, 86, 412-431
- [19] Κωνσταντίνα Νικολαΐδου, «Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδων Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Πίεσης για τον προσδιορισμό τετρακυκλινών σε διάφορα δείγματα τροφίμων ζωικής προέλευσης», Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη, 2008
- [20] S. O. S. Mookantsa, S. Dube, M. M. Nindi, "Development and application of a dispersive liquid-liquid microextraction method for the determination of tetracyclines in beef by liquid chromatography mass spectrometry", Talanta, 2016, 148, 321-328
- [21] J. William Fritz, Yuegang Zuo, "Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4-epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography", Food Chem., 2007, 105, 1297-1301

- [22] Hui Xu, Hong-Yu Mi, Ming-Ming Guan, Hong-Yan Shan, Qiang Fei, Yan-Fu Huan, Zhi-Quan Zhang, Guo-Dong Feng, “Residue analysis of tetracyclines in milk by HPLC coupled with hollow fiber membranes-based dynamic liquid-liquid micro-extraction”, *Food Chem.*, 2017, 232, 198-202
- [23] M. Mesgari Abbasi, H. Babaei, M. Ansarin, Ashraf-o-sadat Nourdadgar, M. Nemati, “Simultaneous Determination of Tetracyclines Residues in Bovine Milk Samples by Solid Phase Extraction and HPLC-FL Method”, *Adv. Pharm. Bull.*, 2011, 1(1), 34-39
- [24] M. E. Dasenaki, N. S. Thomaidis, “Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and farmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Anal. Chim. Acta*, 2015, 880, 103-121
- [25] G. Alfredsson, C. Branzell, K. Granelli, A. Lundström, “Simple and rapid screening and confirmation of tetracyclines in honey and egg by a dipstick test and LC-MS/MS”, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 529, 47-51
- [26] Wen-Hsien Tsai, Tzou-Chi Huang, Joh-Jong Huang, Yi-Huu Hsue, Hung-Yi Chuang, “Dispersive solid-phase microextraction method for sample extraction in the analysis of four tetracyclines in water and milk samples by high-performance liquid chromatography with diode-array detection”, *J. Chrom. A*, 2009, 1216, 2263-2269
- [27] N. Phiroonsoontorn, S. Sansuk, Y. Santaladchaiyakit, S. Srijaranai, “The use of dissolvable layered double hydroxide components in an in situ solid-phase extraction for chromatographic determination of tetracyclines in water and milk samples”, *J. Chrom. A*, 2017, 1519, 38-44
- [28] E. Adilson Orlando, A. V. C. Simionato, “Extraction of tetracyclenic antibiotic residues from fish fillet: Comparison and optimization of different procedures using liquid chromatography with fluorescence detection”, *J. Chrom. A*, 2013, 1307, 111-118

- [29] A. Grande-Martínez, D. Moreno-González, F. J. Arrebola-Liébanas, A. Garrido-Frenich, A. M. García-Campaña, “Optimization of a modified QuEChERS method for the determination of tetracyclines in fish muscle by UHPLC-MS/MS”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2018, 155, 27-32
- [30] W.C. Andersen, J. E. Roybal, S. A. Gonzales, S. B. Turnipseed., A. P. Pfenning, L.R. Kuck, “Determination of tetracycline residues in shrimp and whole milk using liquid chromatography with ultraviolet detection and residue confirmation by mass spectrometry”, *Anal. Chim. Acta*, 2005, 529, 145-150
- [31] M. C. Carson, M. A. Ngoh, S. W. Hadley, “Confirmation of multiple tetracycline residues in milk and oxytetracycline in shrimp by liquid chromatography-particle beam mass spectrometry”, *J. Chrom. B*, 1998, 712, 113-128
- [32] B. F. Spisso, A. L. de Oliveira e Jesus, M. A. Gonçalves de Araújo Júnior, M. Alves Monteiro, “Validation of a high-performance liquid chromatographic method with fluorescence detection for the simultaneous determination of tetracyclines residues in bovine milk”, *Anal. Chim. Acta*, 2007, 581, 108-117
- [33] Xiangli Sun, Xiwen He, Yukui Zhang, Langxing Chen, “Determination of tetracyclines in food samples by molecularly imprinted monolithic column coupling with high performance liquid chromatography”, *Talanta*, 2009, 79, 926-934
- [34] Xue-Qing Yang, Cheng-Xiong Yang, Xiu-Ping Yan, “Zeolite imidazolate framework-8 as sorbent for on-line solid-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography for the determination of tetracyclines in water and milk samples”, *J. Chrom. A*, 2013, 1304, 28-33
- [35] F. Tajabadi, M. Chambarian, Y. Yamini, N. Yazdanfar, “Combination of hollow fiber liquid phase microextraction followed by HPLC-DAD and multivariate curve resolution to determine antibacterial residues in foods of animal origin”, *Talanta*, 2016, 160, 400-409

- [36] K. I. Nikolaidou, V.F. Samanidou, I. N. Papadoyannis, “Development and validation of an HPLC confirmatory method for the determination of seven tetracycline antibiotics residues in milk according to the European Union decision 2002/657/EC”, *J. Sep. Sci.*, 2007, 30 (15), 2430-2439
- [37] E. Karageorgou, M. Armeni, I. Moschou, V. Samanidou, “Ultrasound-assisted dispersive extraction for the high pressure liquid chromatographic determination of tetracyclines residues in milk with diode array detection”, *Food Chem.*, 2014, 150, 328-334
- [38] Jiajia Gao, Hui Wang, Jingang Qu, Huili Wang, Xuedong Wang, “Development and optimization of a naphthoic acid-based ionic liquid as a “non-organic solvent microextraction” for the determination of tetracycline antibiotics in milk and chicken eggs”, *Food Chem.*, 2017, 215, 138-148
- [39] H. Dipe de Faria, M. Azevedo Rosa, A. Thalison Silveira, E. Costa Figueiredo, “Direct extraction of tetracyclines from bovine milk using restricted access carbon nanotubes in a column switching liquid chromatography system”, *Food Chem.*, 2017, 225, 98-106
- [40] N. Tsartsali, V. F. Samanidou, “Sample Preparation of Eggs from Laying Hens Using QuEChERS Dispersive Extraction for the Simultaneous Determination of Melamine and Cyromazine Residues by HPLC-DAD”, *Anal. Chem. Ins.*, 2015, 10, 53-58

