



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ « Αναλυτική Χημεία »**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC και LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμακικών ενώσεων, φλουμεκίνης και εμαμεκτίνης, σε σκευάσματα ιχθυοτροφών

**Τριγώνης Γεώργιος-Ελευθέριος
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ

ΙΟΥΝΙΟΣ 2019

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC και LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμακικών ενώσεων, φλουμεκίνης και εμαμεκτίνης, σε σκευάσματα ιχθυοτροφών

Τριγώνης Γεώργιος-Ελευθέριος

A.M.: 11613

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

Θωμαΐδης Νικόλαος, Καθηγητής ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

1. Θωμαΐδης Νικόλαος, καθηγητής
2. Οικονόμου Αναστάσιος, καθηγητής
3. Γκίκας Ευάγγελος, επίκουρος καθηγητής

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ:24/06/2019

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν να αναπτυχθεί μία ταχεία μέθοδος υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography, RP-HPLC) για τον ποσοτικό προσδιορισμό φλουμεκίνης σε σκευάσματα ιχθυοτροφών, καθώς και μία μέθοδος υγροχρωματογραφίας συζευγμένη με ανιχνευτή διαδοχικής φασματομετρίας μαζών, LC-ESI-MS/MS (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry-Mass Spectrometry) για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό εμαμεκίνης σε ιχθυοτροφές. Για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό τους χρησιμοποιήθηκαν αντίστοιχα 2 στήλες C₁₈, ενώ πραγματοποιήθηκε και μία εκτενής σειρά πειραμάτων για τη βελτιστοποίηση πειραματικών και χρωματογραφικών παραμέτρων (pH, μείωση χρόνου έκλουσης, ανιχνευσιμότητα και εκχυλισιμότητα). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης και της επικύρωσης των μεθόδων τόσο για τη φλουμεκίνη όσο και για την εμαμεκίνη, διενεργήθηκαν πειράματα γραμμικότητας (linearity), ακρίβειας (accuracy), πιστότητας (precision), ανθεκτικότητας (robustness) και πειράματα για τον προσδιορισμό των ορίων ποσοτικοποίησης και ανίχνευσης (LOQ και LOD) αντίστοιχα.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Φαρμακευτική ανάλυση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Φαρμακούχες ενώσεις, HPLC, LC-MS/MS, επικύρωση, ανιχνευσιμότητα

ABSTRACT

The purpose of the present study was to develop a rapid Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC) method for quantification of flumequine in fish feed formulations and a rapid LC-ESI-MS / MS method (Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometry Mass Spectrometry) for the detection and quantification of emamectin in fish feeds formulations. Their detection and quantification were carried out using two C₁₈ columns and an extensive series of experiments was performed to improve experimental and chromatographic parameters (pH, elution time, traceability and extractability). During the development and validation of the methods for both flumequine and emamectin were carried out the following experiments such as linearity, accuracy, precision, robustness and experiments for the determination of quantification limits and detection limits (LOQ and LOD) respectively.

SUBJECT AREA: Pharmaceutical Analysis

KEYWORDS: Pharmaceutical compounds, HPLC, LC-MS / MS, validation, traceability

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΡΟΛΟΓΟΣ	17
1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	18
1.1 Οι φαρμακούχες ενώσεις ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε ιχθυοτροφές	18
1.2 Παραγωγή ιχθυοκαλλιεργειών και χρήση φαρμακούχων ενώσεων.....	22
1.3 Ενσωμάτωση των δραστικών στις ιχθυοτροφές και τα βασικότερα προβλήματα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία.....	28
1.3.1. Συνεισφορά και επιμόλυνση στην γραμμή παραγωγής	30
1.4 Βιοδιαθεσιμότητα και Φαρμακολογική δράση	31
1.4.1. Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα κατάλοιπα αντιβιοτικών σε ιχθυοτροφές.....	33
1.4.2. Φαρμακολογικές ιδιότητες φλουμεκίνης.....	36
1.4.3. Φαρμακοτεχνικά χαρακτηριστικά εμαμεκτίνης	38
2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ.....	40
2.1 Ιστορική αναδρομή.....	40
2.2 Οργανολογία της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	41
2.3 Εφαρμογές της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	42
2.4 Μελλοντικές τάσεις της HPLC	43
3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Μέθοδος Ανάλυσης.....	44
3.1 Πρότυπα και αντιδραστήρια	44
3.2 Οργανολογία HPLC	44
3.3 Χρωματογραφικές συνθήκες για τον ποσοτικό προσδιορισμό φλουμεκίνης	44
3.4 Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό φλουμεκίνης.....	46
3.5.....	51
4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	52

4.1	ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ	52
4.1.1.	Γραμμικότητα (Linearity)	52
4.1.2.	Ακρίβεια (Accuracy)	54
4.1.3.	Πιστότητα (Precision)	56
4.1.4.	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)	58
4.1.5.	Όριο ανίχνευσης (LOD)	58
5.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ	59
5.1	Γενικά	59
5.2	Αναλυτές Μάζας	60
5.2.1.	Τετραπολικός αναλυτής	61
5.2.2.	Αναλυτής Παγίδας Ιόντων (Ion Trap)	62
5.2.3.	Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight, TOF)	63
5.2.4.	Υβριδικός αναλυτής Orbitrap	64
5.3	ESI	66
5.4	MS/MS	67
5.4.1.	Ανασκόπηση μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού εμαμεκτίνης	68
6.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	69
6.1	Υγροχρωματογραφικά συστήματα με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας	69
6.2	Διαλύτες και αντιδραστήρια	70
6.3	Βοηθητικός εργαστηριακός εξοπλισμός	70
6.4	Πρότυπες ουσίες	71
6.5	Μέθοδος Ανάλυσης	71
7.	ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ	74
7.1	Γραμμικότητα (Linearity)	74
7.2	Ειδικότητα (Specificity)	80

7.3	Όριο ανίχνευσης (LOD).....	81
7.4	Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ).....	81
7.5	Ακρίβεια (Accuracy)	82
7.6	Πιστότητα (Precision).....	87
7.7	Σταθερότητα (Stability).....	94
7.8	Ανθεκτικότητα (Robustness).....	97
8.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	102
	ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ	104
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ	105
	ΑΝΑΦΟΡΕΣ	106

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Σκέυασμα φλουμεκίνης σε μορφή σκόνης.....	18
Σχήμα 2:Χημική δομή φλουμεκίνης.....	25
Σχήμα 3:Χημική δομή εμαμεκτίνης.....	27
Σχήμα 4:Σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης.....	29
Σχήμα 5:Ένα τυπικό χρωματογράφημα προτύπου φλουμεκίνης.....	35
Σχήμα 6:Γραφική Παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της φλουμεκίνης.....	37
Σχήμα 7:Οργανολογία ενός απλού φασματόμετρου μάζας.....	44
Σχήμα 8:Τετραπολικός αναλυτής.....	45
Σχήμα 9:Κλασική δομή ενός τριπλού τετραπόλου.....	46
Σχήμα 10:Αναλυτής παγίδας Ιόντων.....	46
Σχήμα 11:Αναλυτής μάζας TOF.....	47
Σχήμα 12:Οργανολογία Q-TOF.....	48
Σχήμα13:LTQ Orbitrap Velos.....	49
Σχήμα 14:Αρχή Λειτουργίας του LTQ Orbitrap.....	50
Σχήμα 15:Απεικόνιση οργανολογίας ηλεκτροψεκασμού με ESI.....	51
Σχήμα 16:Στήλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάπτυξη της μεθόδου emamectin...54	
Σχήμα 17: Γραφική παράσταση καμπύλης αναφοράς εμαμεκτίνης.....	58
Σχήμα 18: Χημική δομή δοραμεκτίνης.....	59
Σχήμα 19: Γραφική παράσταση εμαμεκτίνης με χρήση εσωτερικού προτύπου δοραμεκτίνης 100 ppb.....	60

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Ιδιότητες ενός υψηλής ποιότητας φαρμακευτικού σκευάσματος για ιχθυοκαλλιέργειες	26
Πίνακας 2: Βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης.....	45
Πίνακας 3: Διαλύματα παρακαταθήκης της φλουμεκίνης.....	52
Πίνακας 4: Αποτελέσματα Ακρίβειας φλουμεκίνης.....	55
Πίνακας 5: Αποτελέσματα πιστότητας φλουμεκίνης	57
Πίνακας 6: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό εμαμεκτίνης.....	72
Πίνακας 7: Βέλτιστοι παράμετροι στο διπλό τετράπολο	73
Πίνακας 8: Παρουσίαση συγκεντρώσεων και εντάσεων κορυφών κύριου θραύσματος εμαμεκτίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις.....	74
Πίνακας 9: Παρουσίαση συγκεντρώσεων και εντάσεων κορυφών κύριου θραύσματος δοραμεκτίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις	76
Πίνακας 10: Καμπύλη αναφοράς προτύπων δοραμεκτίνης	77
Πίνακας 11: Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων καμπύλης βαθμονόμησης εμαμεκτίνης με χρήση εσωτερικού προτύπου δοραμεκτίνης 100 ppb	79
Πίνακας 12: Αποτελέσματα ακρίβειας της εμαμεκτίνης πριν τη χρήση εσωτερικού προτύπου	83
Πίνακας 13: Αποτελέσματα ακρίβειας μετά την προσθήκη εσωτερικού προτύπου	86
Πίνακας 14: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά την επαναληψιμότητα.....	88
Πίνακας 15: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά την επαναληψιμότητα από 2 ^ο αναλυτή	89
Πίνακας 16: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά την επαναληψιμότητα από 2 ^ο αναλυτή 2 ^η μέρα	90
Πίνακας 17: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά τα δείγματα και την επαναληψιμότητά τους	91

Πίνακας 18: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά τα δείγματα και την επαναληψιμότητά τους από 2 ^ο αναλυτή	92
<i>Πίνακας 19: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά τα δείγματα και την επαναληψιμότητά τους από 2^ο αναλυτή 2^η μέρα</i>	<i>93</i>
Πίνακας 20: Αποτελέσματα σταθερότητας σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης για 24h	94
Πίνακας 21: Αποτελέσματα σταθερότητας σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης για 72h	95
Πίνακας 22: Αποτελέσματα σταθερότητας σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης για 7 μέρες	96
Πίνακας 23: Αποτελέσματα σταθερότητας σε συνθήκες φύλαξης 30 βαθμών Κελσίου με 75% σχετική υγρασία.....	97
Πίνακας 24: Μελέτη Ανθεκτικότητας και επίδραση του pH της κινητής φάσης.....	98
Πίνακας 25: Μελέτη Ανθεκτικότητας και επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης.....	98
Πίνακας 26: Μελέτη ανθεκτικότητας όσον αφορά την επίδραση που μπορεί να έχει η ποσότητα χλωριούχου νατρίου κατά την προκατεργασία	99
Πίνακας 27: Μελέτη ανθεκτικότητας και επίδραση σε αυτήν όσον αφορά τον αριθμό των εκχυλίσεων κατά τη προκατεργασία του δείγματος.....	99
Πίνακας 28: Μελέτη ανθεκτικότητας και επίδραση ή μη της ψύξης κατά την προκατεργασία του δείγματος	100
Πίνακας 29: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	104
Πίνακας 30: Πίνακας με ακρωνύμια και τη σημασία τους	105

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Το σύνολο των πειραμάτων που απαιτήθηκαν για τη διπλωματική εργασία <<Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HPLC και LC-MS/MS για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φαρμακικών ενώσεων, φλουμεκίνης και εμαμεκτίνης, σε σκευάσματα ιχθυοτροφών>>, και αφορούσαν τη βελτιστοποίηση, ανάπτυξη και επικύρωση των μεθόδων της φλουμεκίνης και της εμαμεκτίνης, διενεργήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Νικόλαου Θωμαΐδη.

Στο σημείο αυτό θα ήθελα πολύ να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα για τη μεγάλη κατανόηση και εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου, παρέχοντας μου την ευχέρεια να εκτελώ τις πειραματικές μου εργασίες κατά τις απογευματινές ώρες, ελέω πρωινής μου απασχόλησης, ούτως ώστε να ολοκληρωθεί η ανωτέρω διπλωματική εργασία.

Ιδιαίτερη μνεία οφείλω να κάνω στον Δρ. Μάριο Κωστάκη για τον πολύτιμο προσωπικό χρόνο που διέθεσε, τόσο στο να με εκπαιδεύσει όσον αφορά το LC-MS/MS όργανο, όσο και να με βοηθήσει σημαντικά με τις εύστοχες υποδείξεις του κατά τη διάρκεια του συνόλου των πειραμάτων συνδράμοντας ηθικά και ουσιαστικά καθόλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας μέχρι την περάτωσή της.

Τέλος, ευχαριστώ τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που διέθεσαν για τη μελέτη και εξέταση της εργασίας μου.

1. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Οι φαρμακώχες ενώσεις ως αντιμικροβιακοί παράγοντες σε ιχθυοτροφές

Η έρευνα για τα φάρμακα που χρησιμοποιούνται σε ιχθυοτροφές επικεντρώθηκε κυρίως σε λίγα αντιβιοτικά ευρείας χρήσης που βρίσκουν εφαρμογή στην υδατοκαλλιέργεια και, κατά συνέπεια, η ανάπτυξη και παραγωγή νέων φαρμάκων για τη θεραπεία των υδρόβιων ασθενειών, αυτή τη στιγμή βρίσκεται σε πρώιμο στάδιο. Ο όρος αντιβιοτικό, που έχει επικρατήσει μέχρι σήμερα, αφορά σε φυσικά παράγωγα διαφόρων μικροοργανισμών (βακτηρίων, μυκήτων), τα οποία έχουν τη δυνατότητα να αναστέλλουν την ανάπτυξη άλλων μικροοργανισμών και να τους καταστρέφουν. Με την παραγωγή ημισυνθετικών παραγώγων, ο όρος αντιβιοτικά έχει σήμερα αντικατασταθεί από τον περιεκτικότερο όρο <<αντιμικροβιακά>>, που περιλαμβάνει φυσικές, ημισυνθετικές ή συνθετικές ουσίες ικανές να αναστέλλουν τον πολλαπλασιασμό των μικροβίων και να τα καταστρέφουν. Τα αντιβιοτικά δεν είναι δραστικά στους ιούς, διότι προϋπόθεση για τη δράση τους είναι η ικανότητα του παθογόνου μικροοργανισμού να έχει το δικό του μεταβολισμό, ενώ οι ιοί αποτελούν παράσιτα σε βάρος του ανθρώπινου κυττάρου [1]. Οι πρώτες αντιβιοτικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στη σύγχρονη ιατρική παρήχθησαν και απομονώθηκαν από ζωντανούς οργανισμούς, όπως η κατηγορία των αντιβιοτικών της πενικιλίνης που παρασκευάστηκε από τους μύκητες του γένους *Penicillium*. Η σύγχρονη έρευνα για την αντιβιοτική θεραπεία άρχισε στη Γερμανία με την ανάπτυξη του στενού φάσματος αντιβιοτικού Salvarsan από τον Paul Ehrlich το 1909, επιτρέποντας για πρώτη φορά αποδοτική θεραπεία της διαδεδομένης τότε σύφιλης. Το φάρμακο αυτό, που ήταν επίσης αποτελεσματικό και ενάντια σε άλλες μολύνσεις, δεν είναι πλέον σε εφαρμογή στη σύγχρονη ιατρική. Τα αντιβιοτικά αναπτύχθηκαν περαιτέρω στη Μεγάλη

Βρετανία, μετά από την πρώτη ανακάλυψη της πενικιλίνης, το 1928 από τον Φλέμινγκ. Ο όρος «αντιβιοτικό» χρησιμοποιήθηκε αρχικά για ουσίες που εξήχθησαν από έναν μύκητα ή άλλο μικροοργανισμό, αλλά σήμερα συμπεριλαμβάνει επίσης πολλά συνθετικά και ημισυνθετικά φάρμακα που έχουν αντιβακτηριδιακά αποτελέσματα [2]. Παρόλα αυτά, υπάρχει μια αυξημένη ζήτηση και ανάγκη, για βελτίωση της τεχνογνωσίας στις φαρμακούχες ενώσεις και τη διαθεσιμότητα ποιοτικών φαρμακευτικών και βιολογικών προϊόντων κατάλληλων, τόσο για την πρόληψη όσο και για τη θεραπεία νόσων των καλλιεργούμενων ψαριών. Η διαδικασία της παραγωγής περιλαμβάνει συνήθως τη διαλογή ενός μεγάλου φάσματος μικροοργανισμών, της δοκιμής και της τροποποίησής τους. Η παραγωγή πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας τη ζύμωση, μια διαδικασία που είναι σημαντική σε αναερόβιες συνθήκες όταν δεν υπάρχει η οξειδωτική φωσφορυλίωση, για να διατηρήσει την παραγωγή του τριφωσφορικού άλατος αδενοσίνης (ATP) με γλυκόλυση. Η ικανότητα των αντιβιοτικών να θεραπεύουν λοιμώδεις ασθένειες που ήταν προηγουμένως μοιραίες δημιούργησε την εντύπωση ότι είναι «θαυματουργά φάρμακα» με δυνατότητες που υπερβαίνουν σε μεγάλο βαθμό εκείνες που μπορούν να αποδοθούν στις πραγματικές φαρμακευτικές ιδιότητές τους. Στις περισσότερες ευρωπαϊκές χώρες, τα αντιβιοτικά αποτελούν τη δεύτερη ευρύτερα χρησιμοποιούμενη κατηγορία φαρμάκων μετά από τα απλά αναλγητικά. Δυστυχώς όμως, σήμερα η ανθρωπότητα καταβάλλει ένα ιδιαίτερα υψηλό τίμημα εξαιτίας αυτής της προσέγγισης, όσον αφορά στη χρήση των αντιβιοτικών. Μία υπερβολική, και σε πολλές περιπτώσεις ακατάλληλη χρήση τους στην ανθρώπινη ιατρική και την κτηνιατρική, καθώς και στη γεωργία, οδήγησε στην ταχεία αύξηση της εξάπλωσης ανθεκτικών μικροοργανισμών στα φάρμακα. Πράγματι, ορισμένα από τα παλαιότερα αντιβιοτικά έχουν καταστεί αναποτελεσματικά ή κατά πολύ λιγότερο αξιόπιστα από ό,τι ήταν στο παρελθόν. Από τις αρχές της δεκαετίας του '50, οι κτηνοτρόφοι άρχισαν να χρησιμοποιούν τα αντιβιοτικά ως εργαλείο στην εκτροφή των ζώων. Προσθέτουν αντιβιοτικά στην τροφή των ιχθύων για να αντιμετωπίσουν τα δυσμενή αποτελέσματα της διαβίωσης τους σε συνωστισμό, τη φτωχή υγιεινή, και να αυξήσουν το σωματικό βάρος τους.

Μόνο στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής το 40% της συνολικής κατανάλωσης αντιβιοτικών προορίζεται για τα εκτρεφόμενα ψάρια. Η ευρεία όμως χρήση αντιβιοτικών προκαλεί την ανάπτυξη της αντίστασης των παθογόνων μικροβίων σε αυτά. Τα ψάρια αποικίζουν τις χλωρίδες τους με ανθεκτικά στα αντιβιοτικά μικρόβια τα οποία, κυρίως με την επαφή και πολύ λιγότερο με τη βρώση κρέατος, είναι δυνατό να μεταφερθούν στον άνθρωπο. Η κατανάλωση από τον άνθρωπο, ιχθύος που περιέχει αντιβιοτικά, μειώνει την αποτελεσματικότητα των αντιβιοτικών στην αντιμετώπιση των λοιμώξεων. Οι κίνδυνοι από τη χρήση αντιβιοτικών στην υδατοκαλλιέργεια είναι οι εξής:

- Ανάπτυξη ανθεκτικών παθογόνων βακτηρίων που προκαλούν νόσους στα ψάρια
- Ανάπτυξη αντοχής σε μη παθογόνα βακτήρια.
- Δημιουργία «δεξαμενής» γονιδίων αντιβιοαντοχής.
- Μεταφορά ανθεκτικών γονιδίων σε βακτήρια παθογόνα για τον άνθρωπο [4,5]. Η ανθεκτικότητα στα αντιβιοτικά προέρχεται από τη μεταβίβαση γενετικής ανθεκτικών χαρακτηριστικών μεταξύ των βακτηρίων του ίδιου ή διαφορετικών ειδών. Γενικά, όσο περισσότερο χρησιμοποιείται ένα συγκεκριμένο αντιβιοτικό, τόσο περισσότερο υπάρχει ο κίνδυνος εμφάνισης και εξάπλωσης της ανθεκτικότητας εναντίον του, με αποτέλεσμα το φάρμακο να καταστεί όλο και πιο αναποτελεσματικό. Για να αποφευχθεί μία τέτοιου είδους ανθεκτικότητα, νέα αντιβιοτικά με παρόμοιες, αλλά όχι ταυτόσημες, χημικές ιδιότητες αναπτύχθηκαν και παρέμειναν αποτελεσματικά, μέχρι να εμφανισθεί και να εξαπλωθεί η ανθεκτικότητα και σε αυτά τα νέα φάρμακα. Το χειρότερο σενάριο, το οποίο δυστυχώς δεν είναι απίθανο, είναι ότι αυτά τα επικίνδυνα παθογόνα μικρόβια μπορεί να αποκτήσουν ανθεκτικότητα σε όλα τα προηγούμενα αποτελεσματικά αντιβιοτικά, προκαλώντας κατ' αυτόν τον τρόπο ανεξέλεγκτες επιδημίες βακτηριακών ασθενειών που δε θα μπορούν να θεραπευθούν. Είναι επιτακτική η ανάγκη ανάπτυξης νέων φαρμάκων για να διασφαλισθεί η πρόσβαση σε αποτελεσματικές θεραπείες εναντίον επιθετικών βακτηριακών λοιμώξεων. Επιπλέον, τα μισά περίπου από όλα τα αντιβιοτικά που καταναλώνονται χρησιμοποιούνται για τη θεραπεία και πρόληψη

άρρωστων ή μη ιχθύων, ως παράγοντες για την ανάπτυξη της υδατοκαλλιέργειας. Η εμφάνιση της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά, τόσο στην κτηνιατρική, όσο και στην εκτροφή των ιχθύων παρουσιάζεται παρόμοια με εκείνη στην περίπτωση των ανθρώπων. Μεγάλες ποσότητες αντιβιοτικών δε χρησιμοποιούνται μόνο για τη θεραπεία άρρωστων ιχθύων, αλλά και ως τακτικά συμπληρώματα για την πρόληψη λοιμώξεων. Μία σημαντική πρόοδος, η οποία τοποθετεί την Ευρωπαϊκή Ένωση στην παγκόσμια πρωτοκαθεδρία στο πλαίσιο αυτό, είναι η πρόσφατη νομοθεσία, η οποία προβλέπει ότι τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται από τους ανθρώπους δε μπορούν να χρησιμοποιούνται ως αυξητικοί παράγοντες κατά την εκτροφή των ψαριών. Η σημερινή γνώση είναι ανεπαρκής για την πρόβλεψη ή την πρόληψη της εμφάνισης και της εξάπλωσης της ανθεκτικότητας στα αντιβιοτικά που αναπτύσσεται σε όλα τα κράτη μέλη της Ευρωπαϊκής Ένωσης και παγκοσμίως. Η καλύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών που βρίσκονται πίσω από αυτά τα φαινόμενα είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη μίας μακροχρόνιας στρατηγικής κατά της ανθεκτικότητας στα φάρμακα. Το φάρμακο για ιχθυοτροφές, επωφελήθηκε σε μεγάλο βαθμό από την σημαντική ανάπτυξη που σημειώθηκε στη φαρμακευτική βιομηχανία με μερικές καινοτόμες τεχνικές, όπως η βιοκαψουλοποίηση. Παρά το γεγονός ότι πάνω από 100 υδρόβια είδη καλλιεργούνται σε σημαντικό επίπεδο παγκοσμίως, οι περισσότερες φαρμακοκινητικές μελέτες έχουν διεξαχθεί μόνο σε λίγα είδη, όπως σολομοειδή ψάρια. Ωστόσο, υπάρχουν σημαντικές παραλλαγές στη φαρμακοκινητική των αντιβακτηριακών ενώσεων, με αποτέλεσμα να απαιτούνται πάντοτε οι αντίστοιχες πληροφορίες για τα είδη πριν καθοριστεί το κατάλληλο προϊόν που θα χρησιμοποιηθεί. Αν και η μεσογειακή ιχθυοκαλλιέργεια έχει επεκταθεί κατά την τελευταία δεκαετία και αποτελεί μεγάλο χώρο δράσης προς μελέτη, ελάχιστες έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί μέχρι στιγμής για φαρμακούχες ενώσεις σε θαλάσσια είδη όπως η τσιπούρα και το λαβράκι, με τη φλουμεκίνη και την βενζοϊκή εμαμεκτίνη να αποτελούν τις κύριες ενώσεις της κατηγορίας των φαρμακούχων, αφού έχουν γίνει γύρω από αυτές οι περισσότερες μελέτες [6].

1.2 Παραγωγή ιχθυοκαλλιεργειών και χρήση φαρμακικών ενώσεων

Τα αλιεύματα είναι η μοναδική πηγή τροφίμων του ανθρώπου που συνεχίζει να «υφαρπάζεται» από τη φύση, αντί να καλλιεργείται και να εκτρέφεται, όπως συμβαίνει αιώνες τώρα με όλα τα υπόλοιπα τρόφιμα. Ταυτόχρονα, οι παγκόσμιες ανάγκες για ψάρια και θαλασσινά αυξήθηκαν ραγδαία τις τελευταίες δεκαετίες (συνέπεια και της αύξησης του πληθυσμού του πλανήτη) και συνεχίζουν να αυξάνονται, με αποτέλεσμα η αλιεία να μη μπορεί να καλύψει τη συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση. Σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Γεωργίας και Τροφίμων (F.A.O.) του Οργανισμού Ηνωμένων Εθνών (Ο.Η.Ε.) η παγκόσμια κατανάλωση ψαριών θα αυξηθεί κατά 25% έως το 2030, ανεβάζοντας τη ζήτηση στους 150-160 εκατομμύρια τόνους. Ταυτόχρονα, το παγκόσμιο ετήσιο αλιευτικό αποτέλεσμα, προκειμένου η αλιεία να παραμένει βιώσιμη, δε μπορεί να ξεπερνά τους 100 εκατομμύρια τόνους. Η διαφορά επομένως θα πρέπει να καλυφθεί από την ιχθυοκαλλιέργεια. Εκτός όμως των παραπάνω, η παγκόσμια ανάπτυξη της ιχθυοκαλλιέργειας δε σχετίζεται μόνο με την αυξημένη ζήτηση των αλιευμάτων, αλλά και με παράγοντες, όπως είναι η ελεγχόμενη και άριστη ποιότητα των προϊόντων ιχθυοκαλλιέργειας, η ιχνηλασιμότητα στις διαδικασίες παραγωγής και η κατά τις ανάγκες προγραμματισμένη παραγωγή. Ως ιχθυοκαλλιέργεια νοείται η εκτροφή υδρόβιων οργανισμών, μεταξύ των οποίων συμπεριλαμβάνονται τα ψάρια, τα μαλάκια, τα καρκινοειδή και τα υδρόβια φυτά. Ο κλάδος της ιχθυοκαλλιέργειας στη διευρυμένη Ευρωπαϊκή Ένωση των 28 χωρών παράγει συνολικά 1,3 εκατομμύρια τόνους αλιευτικών προϊόντων κάθε χρόνο, συνολικής αξίας 3 δισεκατομμυρίων ευρώ περίπου. Αυτό το ποσό αντιστοιχεί περίπου στο ένα τρίτο της συνολικής αξίας της αλιευτικής παραγωγής της Ευρωπαϊκής Ένωσης και το ένα πέμπτο του όγκου της [7,8]. Η χορήγηση φαρμάκων μέσω της τροφής είναι γενικά μία ευρέως υιοθετημένη μέθοδος για τη θεραπεία ενός μεγάλου αριθμού ψαριών, όπου είναι δυνατόν, όντας ένας πολύ λιγότερο δαπανηρός τρόπος χορήγησης από το φάρμακο μέσω του νερού. Επιπλέον, τα ψάρια που πάσχουν σχεδόν από κάθε είδους ασθένεια εμφανίζουν την τάση να παύουν τη σίτιση. Έτσι, η φαρμακευτική αγωγή σε ιχθυοτροφές θεωρείται περισσότερο ως μια μέθοδος πρόληψης παρά θεραπείας, με κύριο στόχο να ληφθεί το φάρμακο από τα

υγιή ψάρια και εκείνα εν συνεχεία να έρθουν σε επαφή με τα νοσούντα συμβάλλοντας έτσι στην καταπολέμηση της ασθένειας. Τέλος, η αποτελεσματικότητα ενός φαρμάκου, δια μέσου του στόματος εξαρτάται επίσης από το αν το συγκεκριμένο φάρμακο απορροφάται πριν το στάδιο της πέψης, διότι σε αντίθετη περίπτωση οι δραστικές ουσίες μετασχηματίζονται σε ανενεργούς μεταβολίτες. Τα φάρμακα υδατοκαλλιέργειας σε ιχθυοτροφές απαντώνται κατά κύριο λόγο σε μορφή σκόνης που περιλαμβάνει την δραστική ένωση και ένα ή περισσότερα έκδοχα που μπορούν να ενεργούν ως δραστικοί φορείς ή και μέσα διαλυτοποίησης της ίδιας της δραστικής [9].



Σχήμα 1: Σκεύασμα φλουμεκίνης σε μορφή σκόνης

Αν και η παρασκευή προμίγματος μπορεί προφανώς να μοιάζει με απλή διαδικασία, ωστόσο η μεγάλη εξέλιξη στις τεχνικές πρόμιξης επέτρεψε την εμφάνιση αποτελεσματικών και ποιοτικών προϊόντων, που πραγματικά προσαρμόστηκαν στην από του στόματος χορήγηση. Μερικοί τεχνικές παρασκευής και επεξεργασίας, που συνήθως συναντώνται στα φαρμακευτικά προϊόντα του ανθρώπου, έχουν εφαρμογές στην παραγωγή προμίγματος φαρμακικών ενώσεων υδατοκαλλιέργειας. Η διαθεσιμότητα νέων

λειτουργικών εκδόχων, καθώς και κοκκιοποιητών υψηλής διάτμησης και απόδοσης έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη πολύ ισχυρών και ομοιογενών προμίξεων δραστικών ουσιών, ακόμη και σε αρκετά χαμηλά επίπεδα συγκεντρώσεων. Τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας τρέφονται με τεχνητές ισορροπημένες πλήρεις ιχθυοτροφές που έχουν σύσταση ανάλογη των διατροφικών συνηθειών του κάθε είδους ψαριού στη φύση. Ανήκουν στην κατηγορία των ξηρών τροφών και παράγονται σε δυο μορφές αναλόγως του μεγέθους του εκτρεφόμενου ψαριού: σύμπηκτων (pellets) για τα μεγαλύτερα μεγέθη και κόκκου (granulated meal) για τις μικρές ηλικίες. Η διαδικασία παραγωγής τους περιλαμβάνει την προκατεργασία των νωπών πρώτων υλών που είναι κυρίως ιχθυάλευρα, ιχθυέλαια (fish meal & fish oil) και δημητριακά, την προσθήκη βιταμινών και ιχνοστοιχείων (απαραίτητων για τη φυσιολογική ανάπτυξη των ψαριών) και τέλος αμύλου (starch) για τη συγκόλληση των συστατικών μεταξύ τους. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης πλήρων τεχνητών ιχθυοτροφών είναι ότι:

- Παράγονται σε εξειδικευμένες βιομηχανικές εγκαταστάσεις με χρήση σταθερών συνθηκών παραγωγής και πιστοποιημένων πρώτων υλών, με αποτέλεσμα να είναι όσον αφορά στην υγεία των καταναλωτών ασφαλείς.
 - Διαθέτουν ελεγχόμενα φυσικά χαρακτηριστικά (σχήμα, μέγεθος, πυκνότητα, χρώμα).
 - Η σύνθεσή τους είναι ελεγχόμενη και άρα έχουν σταθερή και γνωστή διατροφική αξία και οργανοληπτικές ιδιότητες.

Τέλος, ακριβώς επειδή οι τεχνητές ιχθυοτροφές έχουν ως κύρια πρώτη ύλη το ιχθυάλευρο, το οποίο προέρχεται πάλι από ψάρια με αντίστοιχο προφίλ θρεπτικών ουσιών, πρωτεϊνών και κύρια πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, διατηρούν στο ακέραιο τις πολύτιμες ιδιότητες που έχει το ψάρι ως τρόφιμο, οι οποίες με τη σειρά τους μεταφέρονται αυτούσιες στο ψάρι ιχθυοκαλλιέργειας. Η σύγχρονη τεχνολογία και τεχνογνωσία στους τομείς παρασκευής ιχθυοτροφών και εκτροφής ψαριών, εξασφαλίζει σταθερότητα στην ύπαρξη αυτών των θετικών ιδιοτήτων στα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας και πολλές φορές βελτίωσή τους για ακόμα μεγαλύτερο όφελος στον άνθρωπο [10]. Η παρασκευή ενός φαρμακευτικού προμίγματος βασίζεται στην επιλογή λειτουργικών εκδόχων που πρέπει να είναι συμβατά με τη χρησιμοποιούμενη χημική δραστική ουσία καθώς και το σχεδιασμό μιας σταθερής διαδικασίας παραγωγής της εν λόγω φαρμακούχου ιχθυτροφής. Τα προμίγματα έχουν σχηματιστεί κατά κύριο λόγο από φυσικούς φορείς λαχανικών όπως αλεσμένα αραβοσίτου, φρυγανισμένο αλεύρι σόγιας ή κονιοποιημένα ορυκτά

(βερμικουλίτης, άργιλος και ασβεστόλιθος) [3]. Η χρήση αυτών των προϊόντων που απαντώνται στη φύση έχει αμφισβητηθεί από εργοστάσια με προδιαγραφές GMP, λόγω των μεγάλων διακυμάνσεων της ποιότητας τους και του ενδεχόμενων μεγάλου μικροβιακού τους φορτίου. Κατά συνέπεια, συνήθως αντικαθίστανται από επιφανειακά έκδοχα που λειτουργούν ως φορείς για λεπτά σωματίδια φαρμάκου. Αυτά περιλαμβάνουν άμυλο αραβοσίτου, μαλτοδεξτρίνες, φωσφορικό διασβέστιο, λακτόζη ή κρυσταλλική κυτταρίνη. Οι μαλτοδεξτρίνες είναι παράγωγα από μερικώς υδρολυμένο άμυλο και έχουν το πλεονέκτημα ότι είναι υψηλής ροής προϊόντα. Μια άλλη βασική παράμετρος που πρέπει να βελτιστοποιηθεί στα προμείγματα είναι το επίπεδο σκόνης τους, επειδή η σκόνη που παράγεται κατά τη διάρκεια της διαδικασίας παρασκευής και συσκευασίας, χρησιμοποιείται εν συνεχεία από γεωργούς προκαλώντας ανησυχίες για την ασφάλεια. Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια είναι τα κυριότερα συστατικά των ιχθυοτροφών με τις οποίες τρέφονται τα ψάρια της ιχθυοκαλλιέργειας. Οι ιχθυοτροφές πρέπει να προσδίδουν στο εκτρεφόμενο ψάρι τις απαραίτητες για την ανάπτυξή του πρωτεΐνες και λίπη. Ως πηγή πρωτεϊνών και λιπών χρησιμοποιούνται τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια. Τα ιχθυάλευρα και τα ιχθυέλαια προκύπτουν από την επεξεργασία (άλεσμα) ορισμένων ειδών πελαγικών ψαριών, τα οποία αλιεύονται κυρίως στο νότιο Ειρηνικό και βόρειο Ατλαντικό και είναι ακατάλληλα για ανθρώπινη κατανάλωση, κυρίως λόγω του μικρού τους μεγέθους και της σκληρής σάρκας τους. Τα είδη αυτά των ψαριών, σχηματίζουν τεράστιους πληθυσμούς, πολλαπλασιάζονται πολύ γρήγορα και σε μεγάλους αριθμούς, μεγαλώνουν ταχύτατα και έχουν μικρή διάρκεια ζωής. Διάφορα προϊόντα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειώσουν το δυναμικό της σκόνης του ξηρού στα σύνθετα σκευάσματα. Τα ορυκτά ή φυτικά έλαια χρησιμοποιούνται στο 1 έως 3%, αλλά μπορούν να οδηγήσουν σε συσσωμάτωση των σωματιδίων ειδικά σε υψηλά επίπεδα ενσωμάτωσης. Προπυλενογλυκόλες ή πολυαιθυλενογλυκόλες των διαφόρων μοριακών βαρών (PEGs) έχουν μικρότερη τάση συσσωμάτωσης, αλλά ταυτόχρονα υπόκεινται σε αυτοοξειδωση με το χρόνο και επομένως δεν πρέπει να χρησιμοποιούνται για παρασκευή φαρμακούχων προϊόντων όντας επιρρεπής στην οξειδωση [6]. Οι βασικοί εξοπλισμοί για την προετοιμασία των προμίξεων είναι οι κοκκοποιητές υψηλής διάτμησης. Υψηλή διάτμηση οι συσκευές εκπληρώνουν μέσω διπλής δράσης ανάμιξης και κοπής και είναι πιο αποτελεσματικές στην ομοιογενή διασπορά των ενώσεων σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (έως 0,1%) στο μείγμα προμείγματος. Οι κύριες

ιδιότητες που πρέπει να επιτευχθούν είναι η ομοιογένεια του φαρμάκου στο τελικό στάδιο της συμβατότητάς του με την τυπική τροφή με την ταυτόχρονη σταθερότητά του μετά την αποθήκευση και τη μεταφορά. Η ομοιογένεια του φαρμάκου στην τελική ιχθυοτροφή πρέπει να μετρηθεί με επαρκή αριθμό δειγμάτων, και τα όσον αφορά το μέγεθος και τον όγκο. Λαμβάνονται έτσι τρία δείγματα από την κορυφή, το μεσαίο και το κάτω μέρος του μίγματος. Το μέγεθος του δείγματος πρέπει να αντικατοπτρίζει την ημερήσια πρόσληψη του στοχευμένου είδους αλλά χωρίς να είναι μεγαλύτερη από 50 g. Η συμβατότητα του φαρμάκου με όλα τα συστατικά και τα πρόσθετα της ιχθυοτροφής (μέταλλα, βιταμίνες, αντιοξειδωτικά, κ.λπ.) πρέπει να αξιολογηθεί. Η σταθερότητα του φαρμάκου σε φαρμακευτική τροφή πρέπει να αξιολογείται σε τρία δείγματα, κατά προτίμηση σε εμπορικά μεγέθη παρτίδων. Οι φαρμακευτικές τροφές πρέπει να συσκευάζονται στις συνήθεις σακούλες και να αποθηκεύονται υπό διάφορες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτός ή έκθεσης στον ήλιο. Η διάρκεια ζωής που προτείνεται για τη φαρμακευτική τροφή θα πρέπει να βασίζεται στα αποτελέσματα των μελετών αυτών. Τελικά ένα σωστά σχεδιασμένο προμίγμα για την υδατοκαλλιέργεια θα πρέπει να φέρει όλες τις ιδιότητες που περιγράφονται στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1: Ιδιότητες ενός υψηλής ποιότητας φαρμακευτικού σκευάσματος για ιχθυοκαλλιέργειες

Παράμετρος	Ποιότητα	Σχόλιο
-------------------	-----------------	---------------

Φυσική	Προϊόν υψηλής ποιότητας, μεγάλης σταθερότητας, απαλλαγμένο από σκόνες	Εύκολη η διενέργεια μετρήσεων, ενώ ταυτόχρονα υπάρχει μικρή έκθεση των εργαζομένων με τη δραστική ουσία
Χημική	Καλή σταθερότητα και ομοιογένεια της δραστικής ουσίας τόσο του προμίγματος όσο και του τελικού φαρμακευτικού σκευάσματος	Απαιτείται συμβατότητα της δραστικής ουσίας με τα έκδοχα που χρησιμοποιούνται για την τελική μορφή του φαρμακευτικού σκευάσματος.
Αποτελεσματικότητα	Καλή βιοδιαθεσιμότητα και υψηλή αποτελεσματικότητα	
Περιβαλλοντική Επίδραση	Φιλικές δραστικές προς το περιβάλλον με μικρό χρόνο ημιζωής στα υδατικά οικοσυστήματα	Χαμηλή επίδραση σε οργανισμούς που δεν είναι "στόχοι" της δραστικής ουσίας σε υδάτινο περιβάλλον
Οικονομία	Οικονομική ως προς την παρασκευή	

1.3 Ενσωμάτωση των δραστικών στις ιχθυοτροφές και τα βασικότερα προβλήματα που προκύπτουν από αυτή τη διαδικασία

Οι κυριότερες φαρμακευτικές ουσίες που χρησιμοποιούνται στην ιχθυοκαλλιέργεια, έχουν να κάνουν με την πρόληψη και προφύλαξη από ασθένειες και δεν είναι τίποτα περισσότερο από εμβόλια και ανοσοενισχυτικά. Η χρήση εμβολίων (πάντοτε εγκεκριμένων από τον Εθνικό Οργανισμό Φαρμάκων, Ε.Ο.Φ.) είναι πλέον ρουτίνα στις ιχθυοκαλλιέργειες. Η συγκεκριμένη κατηγορία ουσιών, εκτός του ότι δεν παρουσιάζει καμία επικινδυνότητα για τον καταναλωτή, παράλληλα καθιστά τα ψάρια περισσότερο ανθεκτικά σε βακτήρια και μικροοργανισμούς που δυνητικά θα τα προσέβαλαν. Με τη χρήση εμβολίων, μειώνονται τα περιστατικά νόσου, προστατεύεται η ευζωία των εκτρεφόμενων ψαριών και εξαλείφεται η ανάγκη για χρήση αντιβιοτικών ή άλλων φαρμάκων. Έτσι λοιπόν, λόγω της ευρείας χρήσης εμβολίων στις ιχθυοκαλλιέργειες, οι ασθένειες είναι πλέον ελάχιστες και συνήθως δεν υφίσταται λόγος για χρήση άλλων φαρμάκων. Όσον αφορά τον όγκο, η ημερήσια δόση του φαρμακευτικού προϊόντος που πρέπει να περιέχεται σε μια ποσότητα τροφής πρέπει να αντιστοιχεί τουλάχιστον στο ήμισυ της ημερήσιας δόσης της τροφής που κατανέμεται. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την ενσωμάτωση αυτής της δόσης στην ουσία τροφοδοσίας. Το προμίγμα μπορεί να είναι ενσωματωμένο στην αρχή της γραμμής παραγωγής (pelleted medicated feeds) ή μπορεί να προστίθεται στο τέλος της διαδικασίας παραγωγής. Στην περίπτωση αυτή το προμίγμα ψεκάζεται στην επιφάνεια των σφαιριδίων (επικαλυμμένες με επιφανειακή φαρμακευτική τροφή). Προκειμένου να επιτευχθεί η βέλτιστη ομοιογένεια της συγκέντρωσης του φαρμάκου, ο ιδανικός τρόπος για να αναμειχθεί το φάρμακο είναι να το προστεθεί στην αρχή της παρασκευής προμίγματος, που προστίθεται στο μίγμα μαζί με άλλα μικροσυστατικά, ακριβώς πριν από τη σφαιροποίηση. Προφανώς, αυτό μπορεί να γίνει μόνο στο εργοστάσιο παραγωγής ιχθυοτροφών, ωστόσο η διαδικασία σφαιροποίησης πραγματοποιείται σε υψηλές συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας με αποτέλεσμα η μέθοδος αυτή να βρίσκει εφαρμογή μόνο σε ενώσεις με ανθεκτικότητα στη θερμότητα [9]. Από την άλλη πλευρά, το κύριο μειονέκτημα αυτής της "αρχικής ενσωμάτωσης" είναι ο κίνδυνος επιμόλυνσης των τροφοδοσιών με παραμονή ποσότητας της δραστικής ουσίας στην γραμμή παραγωγής. Στις

Ιχθυοκαλλιέργειες, η ανάμιξη γίνεται σύμφωνα με την παρακάτω διαδικασία: τα σφαιρίδια φορτώνονται πρώτα και το κονιοποιημένο φάρμακο χύνεται και αναμειγνύεται επιμελώς με την τροφοδοσία, ακολουθούμενο από έναν συνδετικό παράγοντα. Στις περισσότερες περιπτώσεις αυτός ο συνδετικός παράγοντας είναι ένα εδώδιμο λαχανικό ή κάποιο ιχθυέλαιο. Η φαρμακευτική τροφή στη συνέχεια αφήνεται να παραμείνει μέχρις ότου τα σφαιρίδια απορροφήσουν το προστιθέμενο έλαιο. Το μεγαλύτερο εμπόδιο στην επιφανειακή επικάλυψη είναι ότι είναι δύσκολο να επιτευχθεί μια επαρκής ομοιογένεια του μίγματος. Αυτός είναι ο λόγος για τον οποίο οι διοικητικές αρχές στις περισσότερες χώρες απαιτούν εγκαταστάσεις που να πληρούν GMP προδιαγραφές για να διασφαλίζεται η ποιότητα. Οι ιχθυοκαλλιέργειες είναι ίσως η μοναδική ανθρώπινη βιομηχανική δραστηριότητα που εξαρτάται τόσο άμεσα από το θαλάσσιο περιβάλλον, αφού τα ψάρια ζουν και αναπτύσσονται μέσα σε λίγα κυβικά μέτρα θάλασσας που έχει στη διάθεσή του το ιχθυοτροφείο. Έτσι, για να συνεχίζουν να υπάρχουντα ψάρια, οι άνθρωποι οφείλουν να μην καταστρέφουν ούτε να ρυπαίνουν, μα αντιθέτως, να διαφυλάττουν καθαρό το θαλάσσιο περιβάλλον τους για το δικό τους πρωτίστως συμφέρον. Από την άλλη μεριά, δεν υπάρχει βιομηχανική δραστηριότητα που να μην επιβαρύνει έστω και στο ελάχιστο το φυσικό περιβάλλον. Η επίδραση της ιχθυοκαλλιέργειας στην ποιότητα του νερού γύρω από αυτή, δεν είναι τίποτα περισσότερο από τη σταδιακή συσσώρευση στο βυθό υπολειμμάτων τροφής και κυρίως περιττωμάτων των ψαριών, η οποία εκφράζεται μέσω της αύξησης των συγκεντρώσεων αζώτου και φωσφόρου στο νερό και στα ιζήματα του βυθού. Ωστόσο, η συσσώρευση αυτή, αφενός περιορίζεται σε έκταση λίγων εκατοντάδων μέτρων γύρω από τις πλωτές εγκαταστάσεις και αφετέρου η αύξηση των επιπέδων αζώτου και φωσφόρου, λόγω αυτής της συσσώρευσης είναι αμελητέα σε σύγκριση με τις ποσότητες που επίσης καταλήγουν στις θάλασσες, από άλλες βιομηχανικές δραστηριότητες στην ξηρά. Επίσης, έχει αποδειχτεί ότι το θαλάσσιο περιβάλλον γύρω από μια ιχθυοκαλλιέργεια αποκαθίσταται πλήρως και επανέρχεται στην αρχική του κατάσταση, μέσα σε λίγους μόνο μήνες μετά την απομάκρυνση της ιχθυοκαλλιέργειας από μια συγκεκριμένη περιοχή. Οι σύγχρονες μονάδες ιχθυοκαλλιέργειας στην Ελλάδα, εγκαθίστανται, ούτως ή άλλως, σε περιοχές με μεγάλα βάθη, έντονα ρεύματα και ως εκ τούτου ταχύτερη διάλυση και διάχυση των οργανικών υλών που αποβάλλονται από τη μονάδα, με συνέπεια η συσσώρευσή τους στο βυθό να είναι όλο και μικρότερη τα τελευταία χρόνια. Ταυτοχρόνως, οι σύγχρονες ιχθυοτροφές είναι

ειδικής σύνθεσης και ιδιαίτερα εύπεπτες, με αποτέλεσμα να είναι πλήρως εκμεταλλεύσιμες από το ψάρι, και τα παραγόμενα υποπροϊόντα πολύ λιγότερα. Η μεγαλύτερη όμως απόδειξη ότι η επιβάρυνση του θαλασσίου περιβάλλοντος από τις ιχθυοκαλλιέργειες είναι μικρή και απολύτως αναστρέψιμη, είναι η αφθονία ζωής και ιχθυοπανίδας που παρατηρείται γύρω από κάθε μονάδα. Χιλιάδες ψάρια κάθε είδους, από αθερίνα, σαρδέλες, γόπες, και κέφαλοι, μέχρι παλαμίδες, τοννάκια, γοφάρια, μαγιάτικα, έως και τεράστιες τούνες, συνωστίζονται γύρω από τους ιχθυοκλωβούς αναζητώντας τροφή και ασφάλεια, αφού η αλιεία απαγορεύεται γύρω από τις εγκαταστάσεις των ιχθυοτροφείων.

1.3.1. Συνεισφορά και επιμόλυνση στην γραμμή παραγωγής

Με τον όρο συνεισφορά εννοούμε μια ποσότητα προϊόντος που κατά τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας παραμένει στη γραμμή παραγωγής και εισέρχεται στην επόμενη παρτίδα, φέρνοντας έτσι τον κίνδυνο επιμόλυνσης. Η ανάμιξη διάφορων στερεών είναι το πρώτο στάδιο της σύνθεσης των ζωοτροφών και τα διασκορπισμένα στερεά μίγματα που υπάρχουν σε αυτή είναι σχετικά ασταθή, λόγω δομικών διαφορών των συστατικών. Τα μικροσυστατικά ειδικά τείνουν να διαχωρίζονται, με αποτέλεσμα να παρουσιάζονται ετερογενή μίγματα με απώλειες ονομαστικής περιεκτικότητας, μεταφορά υπολειμμάτων στη γραμμή επεξεργασίας και διασταυρούμενη μόλυνση των ακόλουθων παρτίδων. Η συνεισφορά μπορεί να συμβεί κατά την επεξεργασία, τον χειρισμό ή την παράδοση της τροφής. Δεν υπάρχει μηδενική ανοχή, ούτε υπάρχει νομικά καθορισμένο ποσοτικό όριο για την επιτρεπόμενη ή μη συνεισφορά και διασταυρούμενη μόλυνση επειδή η απόλυτη αποφυγή της συνεισφοράς είναι τεχνικά αδύνατη κατά την παρασκευή σύνθετων φαρμακούχων ιχθυοτροφών. Ωστόσο, η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει ρυθμιστικές κατευθυντήριες γραμμές απαιτώντας την χρήση τεχνικών εργαλείων και οργανωτικών μέτρων για την ελαχιστοποίηση της εν λόγω επιμόλυνσης που προκύπτει ούτως ώστε να αποφεύγονται όσο το δυνατόν

περισσότερο τα σφάλματα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, η διασταυρούμενη μόλυνση μπορεί να προκαλέσει σοβαρά προβλήματα [11]. Για παράδειγμα, τα εσωτερικά πρότυπα ποιότητας μπορούν να οριστούν έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθεί σε λιγότερο από 4% έως 7% η συνεισφορά για μια σύνθετη ιχθυοτροφή (ανάλογα με το μήκος της δοκιμασμένης γραμμής παραγωγής) και λιγότερο από 1% για μια μονάδα προμίσγατος. Μόλις η μεταφορά έχει ελεγχθεί και ελαχιστοποιηθεί, ο κίνδυνος επιμόλυνσης μπορεί να αποφευχθεί μόνο μέσω της αλληλουχίας παραγωγής, της έκπλυσης και του πλήρους καθαρισμού της επεξεργασίας των ιχθυοτροφών και του εξοπλισμού παράδοσης. Μετά την παρασκευή μιας φαρμακευτικής τροφής, μία παρτίδα έκπλυσης πρέπει να χρησιμοποιηθεί όσο το δυνατόν λιγότερο. Εντούτοις, τα μέτρα αυτά δεν μπορούν να αντισταθμίσουν τον κάθε τύπο επιμόλυνσης.

1.4 Βιοδιαθεσιμότητα και Φαρμακολογική δράση

Τα αντιβιοτικά που χρησιμοποιούνται συχνά στην ιχθυοκαλλιέργεια, ως πρόσθετες ουσίες των ιχθυοτροφών, και επίσης ως προφυλακτικοί και θεραπευτικοί παράγοντες, συνιστούν πιθανό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία. Ο κύριος κίνδυνος προκύπτει από τη συνεχώς αυξανόμενη βακτηριακή αντίσταση σε ολόένα και περισσότερα αντιβιοτικά καθώς και από την εμφάνιση αλλεργικών αντιδράσεων σε αυτά. Έτσι, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή καθώς και τα επιμέρους κράτη-μέλη, προσπαθώντας να διασφαλίσουν την ασφάλεια και την υγιεινή των τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου και των αλιευμάτων, καθώς και την προστασία της υγείας του Ευρωπαίου καταναλωτή, προχώρησαν αρχικά στη δημιουργία της Ευρωπαϊκής Αρχής για την ασφάλεια των τροφίμων (European Food Safety Authority-EFSA), καθώς και στην αναδιοργάνωση της κοινοτικής νομοθεσίας και των εθνικών νομοθεσιών. Επί του παρόντος βρίσκονται σε ισχύ διάφορες κοινοτικές οδηγίες περί ασφάλειας των τροφίμων, μερικές από τις οποίες σχετίζονται με τη χρήση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες και την ανίχνευση των καταλοίπων τους σε εδώδιμους ιστούς στους ιχθύες. Επίσης προχώρησαν

στη δημιουργία οργανισμών υπεύθυνων για την ασφάλεια των τροφίμων σε κάθε κράτος-μέλος, οι οποίοι είναι υποχρεωμένοι να συνεργάζονται μεταξύ τους. Η βιοδιαθεσιμότητα ενός φαρμάκου αντιπροσωπεύει το κλάσμα μιας στοματικής δόσης η οποία είναι αποτελεσματική και απορροφάται στο κυκλοφορικό σύστημα. Καθορίζεται με τη σύγκριση των επιπέδων του αίματος μετά από μία από του στόματος και ενδοφλέβιας χορήγησης του φαρμάκου. Για τα προμίγματα, η βιοδιαθεσιμότητα πρέπει να προσδιορίζεται με χορήγηση πλήρους φαρμακούχου τροφής που παρασκευάζεται σύμφωνα με τη διαδικασία που συνιστάται από τον κατασκευαστή. Ιδιαίτερη μέριμνα για τη θαλάσσια καλλιέργεια είναι η μειωμένη βιοδιαθεσιμότητα πολλών αντιβιοτικών στο θαλάσσιο νερό σε σύγκριση με το γλυκό νερό. Είναι γνωστό ότι οι κινολόνες και οι αβερμεκτίνες συνδέονται με τα ιόντα Mg^{2+} και Ca^{2+} που φέρονται με θαλασσινό νερό, ιδιαίτερα με τα ιόντα Mg^{2+} , των οποίων τα υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης έχουν ως άμεση επίδραση στην αύξηση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας [3]. Φυσικά, ένα τέτοιο αποτέλεσμα είναι ιδιαίτερα σημαντικό όταν η τροφή υποβάλλεται σε φαρμακευτική αγωγή. Όποια και αν είναι η βιοδιαθεσιμότητα της χρησιμοποιούμενης χημικής δραστικής ουσίας, ένα σημαντικό σημείο είναι ότι το φάρμακο σε ιχθυοτροφές στοχεύει περισσότερο στην πρόληψη παρά στη θεραπεία και αυτό έχει βαθιές επιπτώσεις στα φαρμακοκινητικά προφίλ των ουσιών [9]. Οι υψηλές συγκεντρώσεις του φαρμάκου δεν είναι απαραίτητως αυτές που χρειάζονται τα όργανα και οι ιστοί που έχουν προσβληθεί από τη νόσο, αλλά οι κανονικές πύλες εισόδου του παθογόνου. Οι κυριότερες πύλες εισόδου για τους παθογόνους παράγοντες είναι τα βράγχια και το έντερο, και σε μικρότερο βαθμό το δέρμα. Εάν η είσοδος γίνεται μέσω του τοιχώματος του εντέρου, τότε ακόμη και το τμήμα του φαρμάκου το οποίο θα παραμείνει στην περιοχή του εντέρου χωρίς να απορροφηθεί μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο για να εμποδίσει την εισροή των παθογόνων μικροοργανισμών [11].

1.4.1. Νομοθεσία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τα κατάλοιπα αντιβιοτικών σε ιχθυοτροφές

Η Ευρωπαϊκή Ένωση διαθέτει μια ολοκληρωμένη στρατηγική για την ασφάλεια των τροφίμων, η οποία καλύπτει επίσης την υγεία και την καλή μεταχείριση των ψαριών. Η στρατηγική αυτή διασφαλίζει τη δυνατότητα ιχθυηλασιμότητας των τροφίμων σε όλη την πορεία τους, από τη μονάδα παραγωγής, μέχρι το τραπέζι του καταναλωτή. Αυστηρά πρότυπα εφαρμόζονται, τόσο στα προϊόντα που παράγονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση, όσο και σε αυτά που εισάγονται από άλλες χώρες. Οι βασικές συνιστώσες της στρατηγικής της Ευρωπαϊκής Ένωσης για τις ιχθυοτροφές είναι:

- η νομοθεσία για την ασφάλεια των τροφίμων και των ιχθυοτροφών,
- οι έγκυρες επιστημονικές συμβουλές, στις οποίες βασίζονται οι αποφάσεις και τα μέτρα επιβολής και ελέγχου.

Η νομοθεσία καλύπτει ένα ευρύ πεδίο από τις ιχθυοτροφές και τα τρόφιμα, έως την υγιεινή των τροφίμων. Εφαρμόζει δε τα ίδια αυστηρά πρότυπα σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση. Οι γενικοί κανόνες για όλα τα τρόφιμα και τις ιχθυοτροφές συμπληρώνονται από μέτρα σε τομείς, στους οποίους απαιτείται ιδιαίτερη προστασία για τον καταναλωτή, όπως είναι και η χρήση αντιβιοτικών ουσιών [12]. Αν και το πλαίσιο για την ασφάλεια των τροφίμων είναι κοινό σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης, λαμβάνει, ωστόσο, υπόψη τη μεγάλη ποικιλία προϊόντων κάθε χώρας. Ωστόσο, σε αυτό το διάστημα, τα τρόφιμα που δεν πληρούν τα πρότυπα της Ευρωπαϊκής Ένωσης δε μπορούν να εξαχθούν σε άλλες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης. Για την έγκαιρη επίλυση προβλημάτων που προκαλούν τα ανασφαλή τρόφιμα, η Ευρωπαϊκή Ένωση εφαρμόζει ένα σύστημα έγκαιρης προειδοποίησης, ώστε να προλαμβάνεται ο κίνδυνος τροφικών δηλητηριάσεων των καταναλωτών. Το σύστημα αυτό εντοπίζει επίσης τα τρόφιμα που περιέχουν απαγορευμένες ουσίες ή υπερβολικές ποσότητες ουσιών υψηλού κινδύνου, όπως κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων στα κτηνοτροφικά προϊόντα (εδώδιμοι ιστοί, γαλακτοκομικά, αυγά) και προϊόντα ιχθυοκαλλιέργειας [13]. Όταν εντοπίζεται κίνδυνος, σήματα κινδύνου εκπέμπονται σε όλη την Ευρωπαϊκή Ένωση. Σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να αρκεί η διακοπή μιας μόνο παρτίδας προϊόντος, αλλά, αν χρειαστεί, αναστέλλονται όλες οι αποστολές ενός συγκεκριμένου προϊόντος, ή ακόμη αποσύρονται προϊόντα που βρίσκονται ήδη σε αποθήκες και καταστήματα. Η Επιτροπή ελέγχει την εφαρμογή της κοινοτικής νομοθεσίας για τις ιχθυοτροφές και τα τρόφιμα, εξετάζοντας αν η

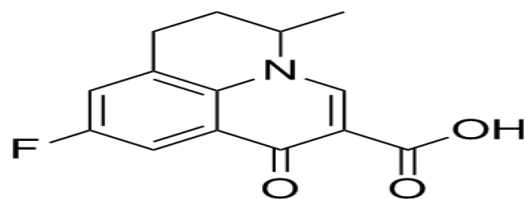
κοινοτική νομοθεσία έχει ενσωματωθεί ορθά στην εθνική νομοθεσία και εφαρμόζεται σε όλες τις χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης και διενεργώντας επιτόπιες επιθεωρήσεις, τόσο στις χώρες της Ένωσης, όσο και σε άλλες χώρες [14]. Έτσι, με βάση την οδηγία 90/2377/EC, η Ευρωπαϊκή Επιτροπή εκτιμώντας:

- ότι η επιστημονική και τεχνική πρόοδος επιτρέπει να ανιχνεύεται η παρουσία καταλοίπων αντιβιοτικών σε ιχθυοτροφές σε όλο και χαμηλότερες συγκεντρώσεις, με αποτέλεσμα να πρέπει κατά συνέπεια να θεσπιστούν ανώτατα όρια καταλοίπων των φαρμακολογικώς ενεργών ουσιών που χρησιμοποιούνται στα κτηνιατρικά φάρμακα, για όλα τα τρόφιμα ζωϊκής προέλευσης, συμπεριλαμβανομένου και των ιχθύων,
- ότι η θέσπιση των ανώτατων ορίων καταλοίπων θα διευκολύνει την εμπορία των τροφίμων ζωϊκής προέλευσης,
- ότι πρέπει να θεσπισθούν διατάξεις για το συστηματικό καθορισμό ανώτατων ορίων καταλοίπων για τις νέες ουσίες με φαρμακολογική δράση, οι οποίες χορηγούνται στα ψάρια ιχθυοκαλλιιεργειών, από τα οποία παρασκευάζονται τρόφιμα,
- ότι, μετά από την επιστημονική τους αξιολόγηση από την επιτροπή κτηνιατρικών φαρμάκων, τα ανώτατα όρια καταλοίπων πρέπει να θεσπίζονται με μια σύντομη διαδικασία που θα εγγυάται στενή συνεργασία της Επιτροπής με τα κράτη μέλη στο πλαίσιο της επιτροπής που συστήθηκε με την οδηγία 81/852/EC, περί προσεγγίσεως των νομοθεσιών των κρατών μελών σχετικά με τα αναλυτικά, φαρμακοτοξικολογικά και κλινικά πρότυπα και πρωτόκολλα στον τομέα του ελέγχου των κτηνιατρικών φαρμακευτικών προϊόντων, όπως τροποποιήθηκε τελευταία από την οδηγία 87/20/EC [15]
- ότι απαιτείται, επίσης, μια επείγουσα διαδικασία για να εξασφαλίζεται η ταχεία επανεξέταση κάθε ορίου ανοχής που αποδεικνύεται ανεπαρκές για την προστασία της δημόσιας υγείας,
- ότι η ανοσολογική αντίδραση που προκαλείται από τη χρήση φαρμάκων δε διαφέρει συνήθως από την αντίστοιχη αντίδραση που προκαλείται φυσιολογικά και δε μπορεί να επηρεάσει τους καταναλωτές τροφίμων ζωϊκής προέλευσης,
- ότι οι πληροφορίες που είναι αναγκαίες για την αξιολόγηση της ασφάλειας των καταλοίπων πρέπει να υποβάλλονται σύμφωνα με τις αρχές που καθορίζονται στην οδηγία 81/852/EC, - 97 - εξέδωσε τον παρόντα κανονισμό, για τους σκοπούς του οποίου, εφαρμόζονται οι ακόλουθοι ορισμοί: Ως «κατάλοιπα κτηνιατρικών φαρμάκων», ορίζονται όλες οι φαρμακολογικώς

ενεργές ουσίες, είτε πρόκειται για ενεργά συστατικά, είτε για έκδοχα, είτε για προϊόντα αποικοδόμησης, καθώς και τα προϊόντα μεταβολισμού τους που παραμένουν στα τρόφιμα που λαμβάνονται από ζώα, στα οποία χορηγήθηκε το εν λόγω κτηνιατρικό φάρμακο. Ως «ανώτατο όριο καταλοίπων» (Maximum Residue Limit, MRL) ορίζεται η μέγιστη συγκέντρωση καταλοίπων που προκύπτει από τη χρήση κτηνιατρικού φαρμάκου (εκφραζόμενη σε mg/kg ή σε µg/kg με βάση το βάρος του νωπού προϊόντος), η οποία μπορεί να θεωρείται ως νομίμως επιτρεπτή από την Κοινότητα ή να αναγνωρίζεται ως αποδεκτή εντός ή επί τροφίμου. Το εν λόγω όριο βασίζεται στον τύπο και την ποσότητα καταλοίπων που θεωρείται ότι δε συνεπάγονται τοξικολογικό κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία, όπως εκφράζονται με την παραδεκτή ημερήσια δόση, ή σε προσωρινή παραδεκτή ημερήσια δόση που χρησιμοποιεί πρόσθετο παράγοντα ασφαλείας. Το όριο αυτό λαμβάνει επίσης υπόψη άλλους κινδύνους για τη δημόσια υγεία, καθώς και την τεχνολογία τροφίμων και επίσης μπορεί να μειώνεται, ώστε να συμβιβάζεται με την ορθή πρακτική κατά τη χρήση αντιβιοτικών σε ιχθυοτροφές και στο βαθμό που υφίστανται πρακτικές αναλυτικές μέθοδοι. Για φαρμακολογικώς ενεργή ουσία που χρησιμοποιείται σε ιχθυοκαλλιέργειες κατά την ημερομηνία έναρξης της ισχύος του παρόντος κανονισμού, μπορεί να θεσπίζεται προσωρινό ανώτατο όριο καταλοίπων εφόσον δεν υπάρχουν υπόνοιες, ότι τα κατάλοιπα της συγκεκριμένης ουσίας, στο προτεινόμενο επίπεδο, αποτελούν κίνδυνο για την υγεία των καταναλωτών. Ένα προσωρινό ανώτατο όριο καταλοίπων εφαρμόζεται για καθορισμένη χρονική περίοδο που δε μπορεί να υπερβαίνει τα πέντε έτη, μπορεί δε να παρατείνεται εξαιρετικά μόνο μία φορά, για χρονική περίοδο που δεν υπερβαίνει τα δύο έτη, εφόσον αυτό κρίνεται χρήσιμο για την ολοκλήρωση διεξαγόμενων επιστημονικών μελετών. Σε εξαιρετικές περιπτώσεις, είναι δυνατό να θεσπίζεται προσωρινό ανώτατο όριο καταλοίπων για φαρμακολογικώς ενεργή ουσία που δε χρησιμοποιείται σε ιχθυοτροφές [16].

1.4.2. Φαρμακολογικές ιδιότητες φλουμεκίνης

Η φλουμεκίνη ή αλλιώς 9-φθορο-6,7-διυδρο-5-μεθυλο-1-οξο- 1-υδρο, 5-υδρο-βενζο [ij] κινολιζινο- 2-καρβοξυλικό οξύ ανήκει σε μία μεγάλη κατηγορία φαρμακικών ενώσεων με θεραπευτική δράση, τις κινολόνες. Οι κινολόνες και οι φθοροκινολόνες είναι συνθετικοί αντιμικροβιακοί παράγοντες με μικροβιοκτόνο δράση που βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στο πεδίο των ιχθυοκαλλιεργειών [17]. Η πρώτη κινολόνη χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1964. Πρόκειται για το ναλιδιξικό οξύ (nalidixic acid), που αποτέλεσε τη βάση σύνθεσης μιας σειράς νέων αντιμικροβιακών ουσιών με παραπλήσια χημική δομή, αλλά με σημαντικά καλύτερες φαρμακοκινητικές και φαρμακοδυναμικές ιδιότητες. Το ναλιδιξικό οξύ, χορηγήθηκε κυρίως στη θεραπεία των λοιμώξεων του κατώτερου ουροποιητικού συστήματος, η χρήση του όμως περιορίστηκε γρήγορα ως συνέπεια της μη ικανοποιητικής φαρμακοκινητικής του και της ταχείας ανάπτυξης αντοχής των παθογόνων μικροβίων. Ανάλογα με το ναλιδιξικό οξύ, είναι το οξολινικό οξύ, το πιπεμιδικό οξύ και η σινοξακίνη, ενώσεις με παρόμοιες ενδείξεις, αλλά και μειονεκτήματα σε σχέση με το ναλιδιξικό οξύ. Σήμερα οι κινολόνες ταξινομούνται με βάση το χρόνο εμφάνισης και τις φαρμακολογικές τους ιδιότητες σε δύο γενεές, την πρώτη και τη δεύτερη. Οι κινολόνες της δεύτερης γενεάς (σιπροφλοξακίνη, οφλοξακίνη, πεφλοξακίνη, νορφλοξακίνη) προήλθαν από τροποποίηση του χημικού δακτυλίου του ναλιδιξικού οξέος και χαρακτηρίζονται από φθορίωση του βασικού δακτυλίου, γι' αυτό και αποκαλούνται φθοροκινολόνες. Η προσθήκη του φθορίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της δραστηριότητας έναντι των Gram θετικών, ενώ η προσθήκη ενός δακτυλίου πιπεραζίνης, έναντι των Gram αρνητικών μικροοργανισμών. Η φλουμεκίνη, ο συντακτικός τύπος της οποίας δίνεται στο σχήμα 2, έχει το ίδιο αντιμικροβιακό φάσμα με το οξολινικό οξύ. Χορηγείται κυρίως στα ψάρια με το νερό (90 ppm) για την αντιμετώπιση των κολοβακτηριδιακών λοιμώξεων και της σαλμονέλλωσης. Η αντοχή που αναπτύσσεται σχετικά εύκολα εναντίον της είναι διασταυρούμενη με τις υπόλοιπες κινολόνες. Η φλουμεκίνη δεν πρέπει να συνδυάζεται με τις τετρακυκλίνες, τις σουλφοναμίδες και τη νιτροφουραντοΐνη [18].

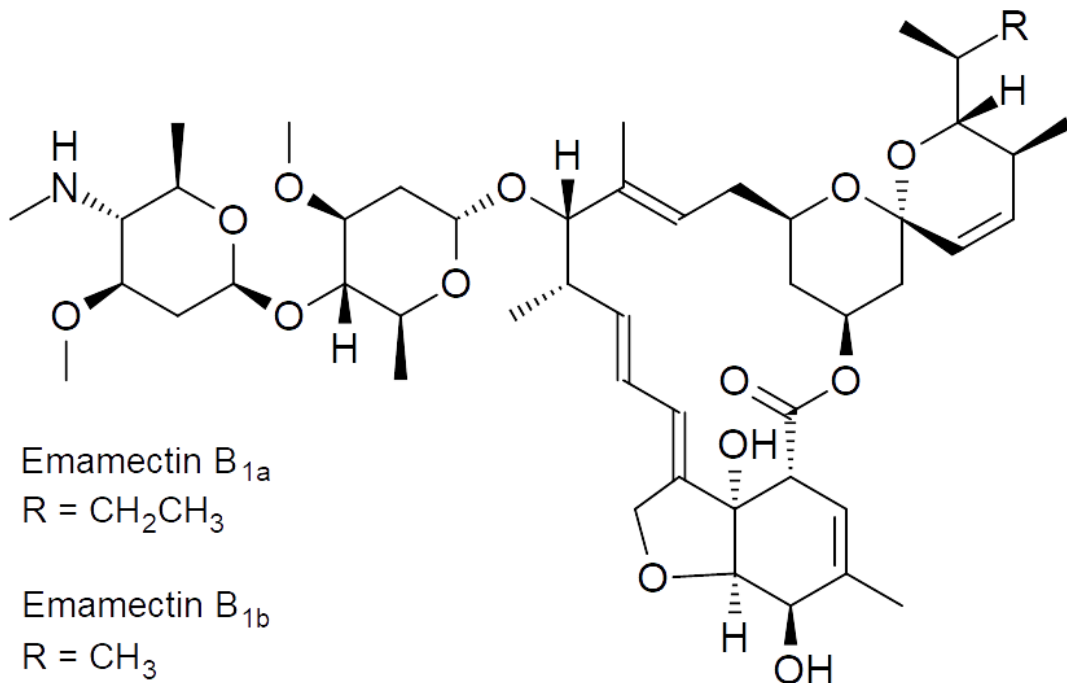


Σχήμα 2: Χημική δομή φλουμεκίνης

Αυτά τα φάρμακα δρουν αναστέλλοντας τη βακτηριακή DNA-γυράση. Η εισαγωγή των φθοριωμένων κινολονών αντιπροσωπεύει σημαντικά θεραπευτικά πλεονεκτήματα, επειδή αυτή η ομάδα αντιβιοτικών εμφανίζει υψηλότερη αντιβακτηριακή δράση από τις μητρικές ενώσεις [19,22]. Η φλουμεκίνη ως φθοροκινολόνη επιδεικνύει αντιμικροβιακή δραστηριότητα έναντι του Gram(-) σε οργανισμούς. Οι φθοροκινολόνες είναι ταχείες και εξαρτώνται από τη συγκέντρωση. Ωστόσο, η δραστηριότητα αναστέλλεται πολύ σε υψηλές συγκεντρώσεις μέσω άμεσης αναστολής της σύνθεσης RNA, που μπορεί να ανταγωνιστεί αναστολείς σύνθεσης πρωτεϊνών και αναστολείς σύνθεσης RNA [20,21]. Η φλουμεκίνη χρησιμοποιείται στη θεραπεία εντερικών λοιμώξεων σε ζωοτροφές και στη θεραπεία των βακτηριακών λοιμώξεων στα εκτρεφόμενα ψάρια. Η φλουμεκίνη έχει επίσης περιορισμένη χρήση στον άνθρωπο για τη θεραπεία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος. Παρόλα αυτά, λόγω της εκτεταμένης χρήσης της σε ψάρια, υπάρχει κίνδυνος να παραμείνουν υπολείμματα της σε βρώσιμους ζωικούς ιστούς, με άμεση συνέπεια να επιφέρει τοξική δράση τον ανθρώπινο οργανισμό μαζί και με άλλες κινολόνες. Γι' αυτό το λόγο ο παγκόσμιος οργανισμός υγείας κατά την 60^η συνεδρίαση [24] θέσπισε ως ανώτατο επιτρεπόμενο όριο υπολείμματος τα 500 μg/kg. Το συγκεκριμένο όριο προέκυψε μετά από μελέτη που πραγματοποιήθηκε σε διάφορες ποικιλίες γαρίδων, στις οποίες χορηγούνταν δια μέσω στόματος φλουμεκίνη συγκέντρωσης 12 mg ανά kg σωματικού βάρους στην τροφή για 5 συνεχόμενες μέρες. Με βάση την παραπάνω μελέτη αποδείχθηκε ότι δοσολογία 12 mg ανά kg σωματικού βάρους ως φαρμακευτική τροφή είναι σχεδόν αδύνατο να φέρει τοξική επίδραση στις γαρίδες, αφού το υπόλειμμα που παρέμενε στους ιστούς ήταν της τάξης των 29,8 έως 45,5 μg/ kg σωματικού βάρους, μετά το πέρας 96 ωρών [23].

1.4.3. Φαρμακοτεχνικά χαρακτηριστικά εμαμεκτίνης

Η εμαμεκτίνη ανήκει στην ομάδα των αβερμεκτινών, ένα σύνολο ενώσεων που χρησιμοποιούνται ως ακαρεοκτόνα και παρασιτοκτόνα στα φυτά και στα ζώα. Στην υδατοκαλλιέργεια κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται η εμαμεκτίνη και η ιβερμεκτίνη για τον περιορισμό των θαλάσσιων ψειρών σε εκτρεφόμενο σολωμό [25]. Η εμαμεκτίνη είναι ένα παρασκεύασμα εντομοκτόνου φυλλώματος αβαμεκτίνης, το οποίο απομονώνεται από τη ζύμωση του *Streptomyces avermitilis*, ενός φυσικώς απαντώμενου μύκητα του εδάφους. Λειτουργεί με την τόνωση της απελευθέρωσης του γ-αμινοβουτυρικού οξέος, ενός ανασταλτικού νευροδιαβιβαστή, προκαλώντας έτσι παράλυση εντόμων μέσα σε ώρες από την κατάποση και τον επακόλουθο θάνατο των εντόμων 2-4 ημέρες αργότερα. Έχει καταχωρηθεί χρήσεις σε πολλές χώρες σε φρούτα, λαχανικά, δημητριακά, καρύδια, ελαιούχους σπόρους, βότανα και τσάι. Η εμαμεκτίνη συναντάται σε διάφορες μορφές: ως εμαμεκτίνη (ελεύθερη βάση), ως βενζοϊκό άλας της εμαμεκτίνης και ως υδροχλωρική εμαμεκτίνη. Η βενζοϊκή εμαμεκτίνη υπάρχει ως άνυδρο και διάφορα ενυδατωμένες μορφές που έχουν διαφορετικές μορφολογίες κρυστάλλων. Η ποσότητα του νερού είναι μη στερεομετρική.



Σχήμα 3: Χημική δομή εμαμεκτίνης

Το βενζοϊκό άλας της εμαμεκτίνης έχει αναπτυχθεί για την θεραπεία όλων των σολομοειδών, το οποίο όπως βλέπουμε παραπάνω αποτελεί μίγμα της μορφής B_{1a} και B_{1b} σε αναλογία 9 προς 1. Η εμαμεκτίνη με μορφή B_{1a} είναι αυτή που κατά κύριο λόγο προσδιορίζεται με ανώτατο επιτρεπόμενο όριο τα 100 μg/kg, όριο που έχει προκύψει από μία ευρεία μελέτη σε διάφορα σολομοειδή από τον παγκόσμιο οργανισμό υγείας και με βάση το πως μεταβολίζεται αυτή σε αυτά [26]. Η βενζοϊκή εμαμεκτίνη σε σύγκριση με την αβαμεκτίνη, ως προς την εντομοκτόνο δράση αυξήθηκε κατά 3 τάξεις μεγέθους και η εντομοκτόνος δραστηριότητα των προνυμφών των λεπιδοπτέρων παρασίτων και πολλών άλλων παρασίτων ήταν εξαιρετικά υψηλή τόσο γαστρική όσο και δηλητηριώδης. Με πολύ χαμηλές δόσεις (0,084 ~ 2g / ha), έχει καλή επίδραση και δεν βλάπτει τα ευεργετικά έντομα κατά τη διαδικασία καταπολέμησης παρασίτων, γεγονός που είναι επωφελές για την ολοκληρωμένη πρόληψη και έλεγχο των παρασίτων. Επιπλέον, οι εντομοκτόνες δραστηριότητες αυξάνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας, αλλά οι αυξήσεις είναι διαφορετικές. Για παράδειγμα στην κλίμακα από 16 βαθμούς Κελσίου έως 22 βαθμούς Κελσίου, η ίδια ποσότητα βενζοϊκής εμαμεκτίνης είναι 2 έως 3 φορές πιο δραστική από την αβαμεκτίνη, ενώ όταν η θερμοκρασία αυξάνεται από τους 16 βαθμούς Κελσίου στους 22 βαθμούς Κελσίου, η μολυσματικότητα της αβαμεκτίνης θα αυξηθεί 6 φορές υψηλότερα. Η μολυσματικότητα της βενζοϊκής εμαμεκτίνης είναι μόνο 2-3 φορές υψηλότερη. Έτσι, η ίδια ποσότητα αβαμεκτίνης και βενζοϊκής εμαμεκτίνης έχουν σχεδόν το ίδιο εντομοκτόνο αποτέλεσμα στους 16 βαθμούς Κελσίου έως τους 22 βαθμούς Κελσίου. Μπορεί να αναφερθεί ότι σε αυτό το εύρος θερμοκρασιών, η επίδραση της εφαρμογής της αβαμεκτίνης είναι καλύτερη από αυτή της βενζοϊκής εμαμεκτίνης. Εν τούτοις, σε θερμοκρασία άνω των 25 βαθμών Κελσίου, η μολυσματικότητα της βενζοϊκής εμαμεκτίνης θα βελτιωθεί σημαντικά και ακόμη και έως 1000 φορές, αλλά η μολυσματικότητα της αβαμεκτίνης αυξάνεται μέχρι δέκα. Πολλές φορές, αυτή τη στιγμή, το εντομοκτόνο αποτέλεσμα της βενζοϊκής εμαμεκτίνης είναι καλύτερο από την αβαμεκτίνη. Επομένως, όταν επιλέγουμε αβαμεκτίνη ή επιλέγουμε βενζοϊκή εμαμεκτίνη, πρέπει να προσέξουμε την εύλογη επιλογή ανάλογα με τη θερμοκρασία μέσα στο θερμοκήπιο, ενώ οφείλουμε να λάβουμε υπ' όψιν ότι η υψηλή δραστηριότητα της βενζοϊκής εμαμεκτίνης είναι πιο ανθεκτική από την αβαμεκτίνη [27].

2. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

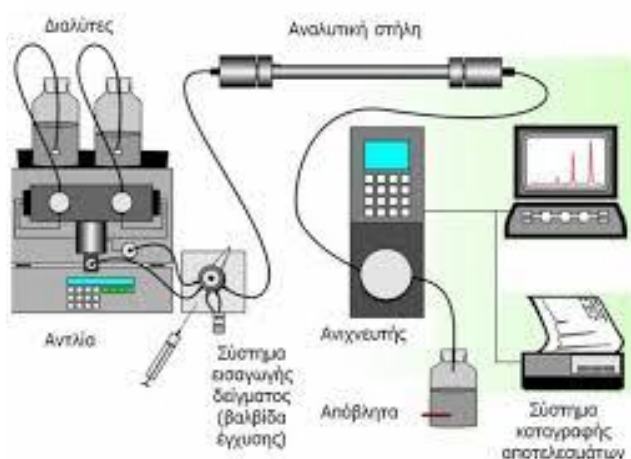
ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ ΥΨΗΛΗΣ ΑΠΟΔΟΣΗΣ

2.1 Ιστορική αναδρομή

Οι πρώτες διαθέσιμες χρωματογραφικές μέθοδοι εμφανίστηκαν τη δεκαετία του 1970. Η Χρωματογραφία Λεπτής στοιβάδας και Ανοιχτής Στήλης αποτέλεσαν τις πρώτες χρωματογραφικές τεχνικές επιτυγχάνοντας αρχικά ένα σημαντικό αριθμό χρωματογραφικών διαχωρισμών. Εν τούτοις, παρουσίασαν πολλές αδυναμίες με βασικότερη την ανεπάρκεια για ποσοτικό προσδιορισμό ορισμένων ενώσεων και το διαχωρισμό παρόμοιων συστατικών. Το γεγονός αυτό συντέλεσε στην ανάπτυξη της Υγρής Χρωματογραφίας Υψηλής Απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), με την οποία επιτυγχάνονται μικρότεροι χρόνοι ανάλυσης. Η HPLC αποτελεί εξέλιξη της κλασικής χρωματογραφίας με τη διαφορά ότι χρησιμοποιούνται μικρόκοκκα υλικά πληρώσεως, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη υψηλών πιέσεων. Με το τέλος της δεκαετίας του 1970 αναπτύχθηκε η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης Αντίστροφης Φάσης (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography, HPLC), μέσω της οποίας λύθηκε το πρόβλημα του διαχωρισμού παρόμοιων ενώσεων. Οι ανιχνευτές που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο είναι: φασματοφωτόμετρα, ανιχνευτές παράταξης φωτοδιόδων, φθορισμομετρικοί ανιχνευτές, αγωγιμομετρικοί ανιχνευτές καθώς και άλλοι. Οι κύριοι λόγοι για την τόσο ευρεία αποδοχή της HPLC, είναι η ευαισθησία της, η εύκολη προσαρμογή της σε ποσοτικούς προσδιορισμούς και βασικά το γεγονός ότι βρίσκει εφαρμογή σε προσδιορισμούς τόσο για τη βιομηχανία όσο και για άλλα πολλά επιστημονικά πεδία [28]. Στη συνέχεια της παρούσας διπλωματικής θα γίνει μία επιγραμματική αναφορά στην οργανολογία, τις εφαρμογές και τις μελλοντικές τάσεις της HPLC, αφενός γιατί η συγκεκριμένη τεχνική έχει αναλυθεί σε πληθώρα μεταπτυχιακών και διδακτορικών μελετών.

2.2 Οργανολογία της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Ένα τυπικό σύστημα HPLC έχει ως βασικά μέρη (Σχήμα 1): α) τις φιάλες αποθήκευσης διαλυτών, β) την αντλία υψηλής πίεσης, γ) το σύστημα εισαγωγής δείγματος, δ) τη χρωματογραφική στήλη, ε) τον ανιχνευτή και στ) τη μονάδα επεξεργασίας και καταγραφής δεδομένων [29].



Σχήμα 4: Σύστημα υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η διεργασία του χρωματογραφικού διαχωρισμού αρχίζει με την εισαγωγή του δείγματος στη στήλη με τη βοήθεια ειδικής βαλβίδας. Ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος επιτυγχάνεται με τη χρήση αντλίας υψηλής πίεσης διαμέσου του μικρόκοκκου υλικού πληρώσεως. Καθένα από τα συστατικά του δείγματος εκλούεται και εμφανίζεται ως κορυφή στο σύστημα καταγραφής, αποτελώντας το χρωματογράφημα του διαχωρισμού ενώ η αποθήκευση των υπόλοιπων αναλυτικών δεδομένων γίνεται στον ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η ανίχνευση των εκλουόμενων συστατικών αποτελεί μια πολύ σημαντική παράμετρο και μπορεί να είναι είτε εκλεκτική είτε όχι, ανάλογα με το τι ανιχνευτή χρησιμοποιούμε. Τέλος, η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης είναι μια ευαίσθητη ποιοτική και ποσοτική αναλυτική τεχνική, η οποία

εμφανίζει μια σειρά από πλεονεκτήματα, τα οποία την καθιστούν σήμερα μια από τις πλέον εφαρμοζόμενες διαχωριστικές τεχνικές που υπερέχει σαφώς έναντι των υπολοίπων, μερικά από τα οποία είναι:

- Πολύ καλή ακρίβεια και επαναληψιμότητα.
- Υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα.
- Χαμηλά όρια ανίχνευσης και μικροί χρόνοι ανάλυσης, της τάξης των μερικών λεπτών.
- Απλότητα και ευκολία εφαρμογής.
- Δυνατότητα εφαρμογής σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων τόσο για αναλύσεις ρουτίνας όσο και για ερευνητικούς σκοπούς. [30]

2.3 Εφαρμογές της υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας στον τομέα των ανιχνευτών σε συνδυασμό με τη συστηματική βελτίωση της οργανολογίας της υγροχρωματογραφίας, την καθιστά σήμερα ταχύτερη και πιο αυτοματοποιημένη διευρύνοντας συνεχώς το πεδίο της. Έτσι, τομείς όπως η βιοτεχνολογία, η φαρμακευτική βιομηχανία και η βιοχημική έρευνα που αποτελούσαν το κύριο πεδίο εφαρμογών της HPLC, αποτελούν πλέον μόλις το 50% των συνολικών εφαρμογών της. Τα τελευταία χρόνια βρίσκει εφαρμογή και σε άλλου τομείς, όπως η βιομηχανία τροφίμων.

2.4 Μελλοντικές τάσεις της HPLC

- Νανοτεχνολογία: Οι περισσότερες βιομηχανίες που ασχολούνται με HPLC (Waters, Agilent, Shimadzu) εστιάζουν την προσοχή τους στην ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας, όσον αφορά συστήματα και όργανα της υγροχρωματογραφίας, τα οποία συνήθως συνδυάζονται με φασματοόμετρα μαζών.
- Πολλαπλά ταυτόχρονα συστήματα: παρατηρείται πλέον η ανάπτυξη πολλαπλών συστημάτων υγροχρωματογραφίας ταυτόχρονα και παράλληλα με στόχο την αύξηση της αναλυτικής ικανότητας. Επίσης, στο στάδιο της προκατεργασίας των δειγμάτων γίνεται ένας συνδυασμός διαφόρων τεχνικών, από ηλεκτροφόρηση μέχρι υπερκρίσιμη εκχύλιση υγρής φάσης σε σειρά, με στόχο τη βελτιστοποίηση του ζητούμενου διαχωρισμού.
- Αύξηση της θερμοκρασίας της στήλης: Έχει παρατηρηθεί ότι με την αύξηση της θερμοκρασίας μπορεί να μειωθεί δραστικά ο χρόνος έκλουσης των ουσιών και κατ' επέκταση των αναλύσεων.
- Νέες στήλες: Νέες στατικές φάσεις αναπτύσσονται με στόχο την αύξηση της εκλεκτικότητας. Οι κύριες τάσεις είναι οι ρυθμιζόμενες στατικές φάσεις, οι πολυμερικές φάσεις μοριακής αποτύπωσης, οι νέες μορφές μονολιθικών πυριτικών σηλών, καθώς και η χρήση νέων βασικών υλικών.

3. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Οργανολογία, Αντιδραστήρια και Μέθοδος Ανάλυσης

3.1 Πρότυπα και αντιδραστήρια

Χρησιμοποιήθηκε πρότυπο φλουμεκίνης από το οποίο παρασκευάστηκαν διαλύματα συγκέντρωσης 10000 mg /L (stock solutions) από τη Sigma-Aldirch το οποίο ήταν καθαρότητας >99,8 %. Το ακετονιτρίλιο ήταν από τη Merck (HPLC Grade), το χλωριούχο νάτριο, το υδροξείδιο του νατρίου και το κιτρικό οξύ από τη Honeywell, η μεθανόλη από τη Fischer Scientific (HPLC Grade) και τέλος το κιτρικό νάτριο που ήταν από τη Merck.

3.2 Οργανολογία HPLC

Η υγροχρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε χρωματογραφικό σύστημα 1100 series της εταιρείας Agilent, όντας εξοπλισμένο με απαερωτή κινητής φάσης, αντλία 4 πιστονιών, βαλβίδα με χειροκίνητο δειγματολήπτη εφοδιασμένο με 20μL loop και ανιχνευτή UV-Visible. Ο έλεγχος του συστήματος και η συλλογή / επεξεργασία των δεδομένων πραγματοποιήθηκε από έναν ηλεκτρονικό υπολογιστή με εγκατεστημένο το λογισμικό Chemstation. Τέλος, για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε η στήλη Zorbax XDB-ECLIPSE C₁₈, από την Agilent, διαστάσεων 150 mm x 4,6 mm, 5μm.

3.3 Χρωματογραφικές συνθήκες για τον ποσοτικό προσδιορισμό φλουμεκίνης

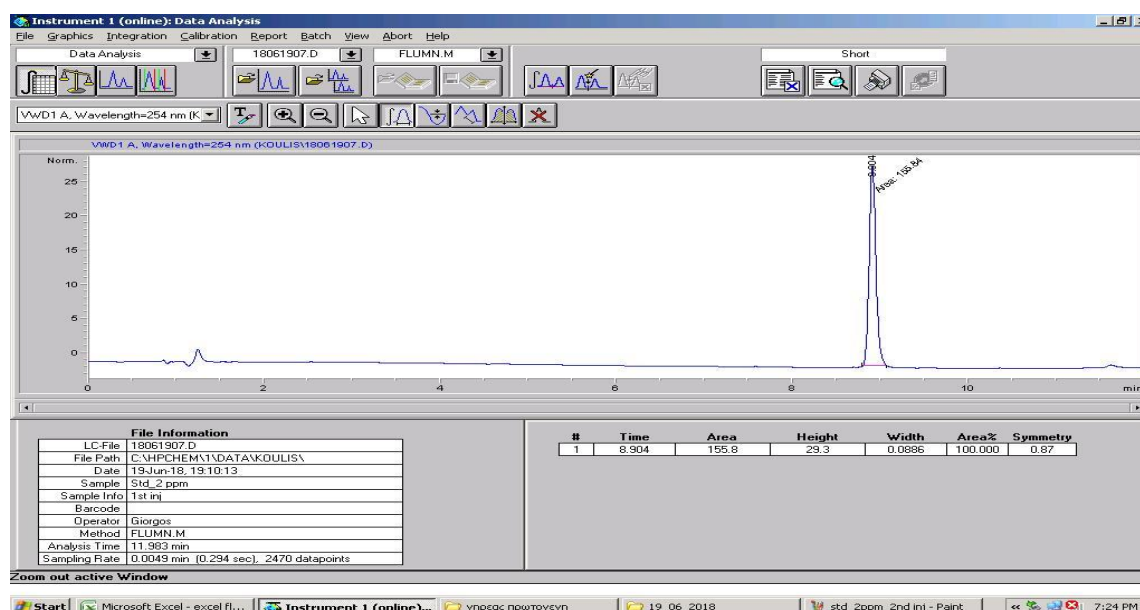
Για τον ποσοτικό της προσδιορισμό μία μέθοδο απλή και εύκολα εφαρμόσιμη με μοναδικό μειονέκτημα τον μεγάλο χρόνο έκλουσης της ανωτέρω κινολόνης, αφού η συγκεκριμένη μέθοδος προέβλεπε τον προσδιορισμό 14 κινολονών [31]. Έτσι, προβαίνοντας σε κάποιες βελτιώσεις, με βάση την ανωτέρω μέθοδο, στο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον προσδιορισμό φλουμεκίνης καταλήξαμε στις παρακάτω χρωματογραφικές συνθήκες:

Πίνακας 2: Βέλτιστο πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (per cent V-V)	Κινητή φάση B (per cent V-V)	Κινητή φάση C (per cent V-V)
0	82	8	10
12	40	50	10

- **Χρωματογραφική στήλη:** XDB-Eclipse, C₁₈ Zorbax, 150 mm x 4,6 mm, 3μm
- **Κινητή φάση A 10 mM κιτρικού άλατος με pH = 4,5:**
Μεταφέρονται 2.94 g κιτρικού άλατος σε κωνική φιάλη του 1 L. Αφού γίνει διαλυτοποίηση σε νερό με προσθήκη περίπου 800 mL, ακολουθεί ρύθμιση του pH = 4,5 με περίπου 7 mL υδατικού διαλύματος κιτρικού οξέος συγκεντρώσεως 1M, το οποίο παρασκευάζεται ως εξής: 4.20 g κιτρικού οξέος διαλυτοποιούνται σε 20 mL H₂O. Μετά τη ρύθμιση του pH, το διάλυμα μεταφέρεται σε ογκομετρική φιάλη του 1 L και γίνεται αραίωση μέχρι τη χαραγή.
- **Κινητή φάση B:** ACN
- **Κινητή φάση C:** MeOH
- **Όγκος ένεσης :** 20 μL
- **Θερμοκρασία δειγματολήπτη :** 25°C
- **Θερμοκρασία στήλης :** 25°C

- Μήκος κύματος : 254 nm



Σχήμα 5: Ένα τυπικό χρωματογράφημα προτύπου φλουμεκίνης

3.4 Βιβλιογραφική ανασκόπηση μεθόδων για τον ποσοτικό προσδιορισμό φλουμεκίνης

Τις τελευταίες δύο δεκαετίες παρατηρείται συνεχώς η αύξηση της χρήσης των αντιβιοτικών φαρμάκων, τόσο στην ιατρική, όσο και στην κτηνιατρική, για τη θεραπεία βακτηριακών κυρίως μολύνσεων. Όσο όμως αυξάνεται η χορήγηση αντιβιοτικών στις ιχθυοκαλλιέργειες, είτε για θεραπευτικούς, είτε για προληπτικούς λόγους, τόσο πιο επιτακτική γίνεται η ανάγκη για την ανάπτυξη γρήγορων και εκλεκτικών αναλυτικών μεθόδων προσδιορισμού τέτοιων ενώσεων σε δείγματα ιχθύων, για την προάσπιση της υγείας των καταναλωτών. Στη συνέχεια δίνεται η βιβλιογραφική επισκόπηση διάφορων

αντιβιοτικών ενώσεων την τελευταία εικοσαετία, όσον αφορά τις χρωματογραφικές μεθόδους που έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό τους σε διάφορα δείγματα ιχθύων και σε ιχθυοτροφές. Συνοψίζοντας, έχουμε από το 1990 έως και σήμερα 13 συνολικά δημοσιευμένες εργασίες για τον προσδιορισμό (φθορο)κινολονών με τη τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) σε διάφορα δείγματα ιχθύων. Εδώ θα παρατεθούν οι βασικότερες μέθοδοι ανάλυσης για προσδιορισμό φλουμεκίνης σε ιχθυοτροφές υδατοκαλλιέργειας, με βασικό εκπροσώπο την HPLC, τεχνική που αναλυθήκε θεωρητικά στην παρούσα εργασία και χρησιμοποιήθηκε ως τεχνική για τον προσδιορισμό της φλουμεκίνης.

- Χρωματογραφική στήλη Ultracarb 5 ODS (30, 5 μm , 150 \times 4.6 mm) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της φλουμεκίνης σε δείγματα ιστού, συκωτιού, δέρματος και οστών τσιπούρας. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε το οξολινικό οξύ. Μετά από εκχύλιση υγρού-υγρού με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH = 10) και n-εξανίου, η φλουμεκίνη εκχυλίστηκε από την υπερκείμενη φάση των δειγμάτων με διχλωροομεθάνιο και κατόπιν έγινε πλύση με διάλυμα McIlvaine (pH = 3,6), εξάτμιση μέχρι ξηρού και επαναδιάλυση με 0,1 M NaOH. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα KH_2PO_4 , H_3PO_4 με ακετονιτρίλιο και τετραϋδοφουράνιο (55:26,5:18,5 v/v/v) και φθορισμομετρικός ανιχνευτής σε $\lambda_{\text{ex}} = 324 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{em}} = 363 \text{ nm}$. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 73,0–86,3% [32].
- Χρωματογραφική στήλη PLRP-S (150 \times 4,6 mm, 5 μm , 100 \AA) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του οξολινικού οξέος, της φλουμεκίνης και της σαραφλοξακίνης σε δείγματα ιστού σολομού και πέστροφας. Μετά από εκχύλιση υγρού-υγρού με ρυθμιστικό διάλυμα ακετονιτριλίου και n-εξανίου (pH = 9), η υδατική φάση που περιείχε τις τρεις ενώσεις εισήχθη στην αναλυτική στήλη. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα ακετονιτριλίου και 0,02M φωσφορικού οξέος (pH = 2,2) με βαθμωτή έκλυση. Η θερμοκρασία της στήλης ήταν στους 50 $^\circ\text{C}$, ενώ ως ανιχνευτής χρησιμοποιήθηκε φθορισμόμετρο αρχικά στα $\lambda_{\text{ex}} = 280 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{em}} = 450 \text{ nm}$, ενώ κατέληγε στα $\lambda_{\text{ex}} =$

320 nm και $\lambda_{em} = 360$ nm. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 56,9–71,0% ενώ τα όρια ανίχνευσης ήταν τα 2, 5 and 7 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ιστού για τις τρεις ενώσεις αντίστοιχα [33].

- Μέθοδο HPLC με στήλη C_5 LUNA για τον προσδιορισμό 13 κινολονών μεταξύ των οποίων και φλουμεκίνης σε μυ γαρίδας για τον προσδιορισμό τους σε δείγματα ιστού, ήπατος, νεφρού, δέρματος και οστών τσιπούρας. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα 30% μίγματος ακετονιτριλίου και μεθανόλης (3 + 2 v/v) και 70% τριφθοροοξικό οξύ 0,1% (pH = 2,15) σε θερμοκρασία 60 °C. Ο ανιχνευτής ήταν φθορισμομετρικός με μήκη κύματος $\lambda_{ex} = 278$ nm και $\lambda_{em} = 450$ nm. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 76,6–82,1% ενώ το όριο ανίχνευσης ήταν 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ιστού. [34]
- Χρωματογραφική στήλη Intersil C_8 (250 x 4 mm, 5 μm) για τον προσδιορισμό 5 κινολονών με απορρόφηση στα 275 nm χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της φλουμεκίνης σε δείγματα πλάσματος, ιστού, δέρματος, ήπατος και χολής τσιπούρας και μυτακίου (sharpshout sea bream). Για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού με οξικό αιθυλεστέρα και άνυδρο Na_2SO_4 . Τα δείγματα έπειτα από εξάτμιση μέχρι ξηρού επαναδιαλύθηκαν στην κινητή φάση, η οποία ήταν 50% μίγμα ακετονιτριλίου και μεθανόλης (3:2 v/v) και 50% τριφθοροοξικό οξύ 0,1% (pH = 2,15) και στην οποία είχαν προστεθεί και 2 mL εξανίου. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 69–75% [35].
- Χρωματογραφική στήλη ZORBAX SB- C_{18} , 5 μm (250 x 4,6 mm), θερμοστατούμενη στους 60°C χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της φλουμεκίνης σε δείγματα ιστού τσιπούρας. Για την προκατεργασία των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε η εκχύλιση υγρού-υγρού με ακετόνη και φωσφορικό οξύ 3M. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε 50% μίγματος ακετονιτριλίου-μεθανόλης (3 + 2 v/v) και 50% τριφθοροοξικού οξέος 0,1% (pH = 2,15) και φθορισμομετρικός ανιχνευτής σε $\lambda_{ex} = 327$

nm και $\lambda_{em} = 369$ nm. Οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 78–82% και το όριο ανίχνευσης ήταν τα 15 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ιστού [36].

- Χρωματογραφική στήλη PLRP-S 100 Å (5 μm , 150 × 4,6 mm) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σιπροφλοξακίνης, της ενροφλοξακίνης και της φλουμεκίνης σε δείγματα ιστού θαλάσσιου ψαριού. Για την προκατεργασία των δειγμάτων με εκχύλιση υγρού-υγρού προστέθηκαν στα δείγματα ρυθμιστικό διάλυμα (pH = 9,1) και ακετονιτρίλιο. Η οργανική φάση εξατμίστηκε μέχρι ξηρού και επαναδιαλύθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα (pH = 9,1) και n-εξάνιο, για να εισαχθεί στην αναλυτική στήλη. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα φωσφορικού οξέος 0,02 M, ακετονιτρίλιου και τετραϋδοφουρανίου, ενώ η ανίχνευση έγινε με φθορισμό στα $\lambda_{ex} = 280$ nm και $\lambda_{em} = 450$ nm για την ενροφλοξακίνη και την σιπροφλοξακίνη και τα $\lambda_{ex} = 326$ nm και $\lambda_{em} = 355$ nm για τη φλουμεκίνη. Οι ανακτήσεις ήταν 62,78% και τα όρια ανίχνευσης ήταν τα 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ιστού [37].
- Χρωματογραφική στήλη Kromasil C₁₈ (Scharlab 150 × 4,6 mm, 5 μm) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του οξολινικού οξέος, της φλουμεκίνης, της ενροφλοξακίνης, της ντιφλοξακίνης και της σαραφλοξακίνης σε δείγματα ιστού τσιπούρας, σολομού, πέστροφας, λαβρακιού, μυδιών και γαρίδας. Για την προκατεργασία των δειγμάτων με εκχύλιση υγρού-υγρού προστέθηκαν στα δείγματα διάλυμα δωδεκυλο-σουλφονικού νατρίου (SDS) 0,05 M (pH = 3,0). Μετά από φυγοκέντρηση και αραίωση του υπερκείμενου 10 φορές στο ίδιο διάλυμα, το δείγμα οδηγήθηκε στην αναλυτική στήλη. Ως κινητή φάση χρησιμοποιήθηκε μίγμα SDS 0,065 M και προπανόλης, που περιείχε και 0,5% τριαιθυλαμίνη, ενώ η ανίχνευση έγινε με φθορισμό στα $\lambda_{ex} = 260$ nm και $\lambda_{em} = 366$ nm για το οξολινικό οξύ και τη φλουμεκίνη και τα $\lambda_{ex} = 280$ nm και $\lambda_{em} = 450$ nm για την ενροφλοξακίνη, τη ντιφλοξακίνη και τη σαραφλοξακίνη. Οι ανακτήσεις ήταν της τάξης του 87-110% και τα όρια ανίχνευσης ήταν τα 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ για τη ντιφλοξακίνη,

το 1 µg/kg για την ενροφλοξακίνη, τα 7 µg/kg για τη φλουμεκίνη, τα 6 µg/kg για το οξολινικό οξύ και τα 3 µg/kg για τη σαραφλοξακίνη [38].

- Η ντανοφλοξακίνη, η ενροφλοξακίνη, η φλουμεκίνη, η οφλοξακίνη και το πιπεμιδικό οξύ προσδιορίστηκαν σε δείγματα ιστού ιχθύων με τριχοειδή ηλεκτροφόρηση. Στα δείγματα προστέθηκε NaH_2PO_4 50 mM (pH = 7,0), εκχυλίστηκαν με διχλωρομεθάνιο και στην οργανική - 148 - φάση προστέθηκε NaOH 0,5 M. Στην υδατική φάση κατόπιν φωσφορικού οξέος 200 mM για τη ρύθμιση του pH στη τιμή 7, προστέθηκε n-εξάνιο για την απομάκρυνση από τα δείγματα των λιπαρών. Έπειτα στην υδατική φάση εφαρμόστηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης σε μικροστήλες C_{18} . Η έκλουση των ενώσεων έγινε αρχικά με μίγμα 4% υδατικού διαλύματος τριφθοροοξικού οξέος και ακετονιτριλίου (25:75 v/v) και κατόπιν με ακετονιτρίλιο. Ο ηλεκτρολύτης ήταν $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ 60 mM (pH = 9,2), ενώ ο τριχοειδής σωλήνας που χρησιμοποιήθηκε ήταν από τηγμένο οξείδιο του πυριτίου, μήκους 75 cm, τα 50 πρώτα των οποίων θερμοστατούνταν, ενώ τα τελευταία 25 cm βρισκόταν σε θερμοκρασία δωματίου. Για την ανίχνευση των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε ανιχνευτής μάζας. Τα όρια ανίχνευσης που επιτεύχθηκαν ήταν τα 20 ng/g ιστού και οι ανακτήσεις κυμαίνονταν από 52-90% [39].
- Μία μέθοδος προσδιορισμού κινολονών βρέθηκε στη βιβλιογραφία με την τεχνική της ELISA. Με τη μέθοδο αυτή προσδιορίστηκαν σε δείγματα ιστού ψαριού και γαρίδας οι ενώσεις: σαραφλοξακίνη, νορφλοξακίνη, ντιφλοξακίνη, σιπροφλοξακίνη, περφλοξακίνη, οφλοξακίνη, κινολοξακίνη, ντανοφλοξακίνη, ενροφλοξακίνη, μαρμποφλοξακίνη, λομεφλοξακίνη, ενοξακίνη, φλουμεκίνη, οξολινικό και ναλιδιξικό οξύ. Τα δείγματα ομογενοποιήθηκαν με μίγμα μεθανόλης και PBS (NaCl , $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{KH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, pH = 7,4 με HCl) σε αναλογία όγκων 1:1 v/v. Μετά την εκχύλιση στα δείγματα προστέθηκε ρυθμιστικό διάλυμα NaCl 0,15 M, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,056 M, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,009 M, 0,2% ζελατίνης, 0,05% Tween 20, 0,01% αμμωνιακό άλας του 8-αμινο-1-ναφθαλενοσουλφονικού οξέος και ασκορβικό οξύ

0,0028 M. Η ικανότητα ανίχνευσης της μεθόδου (CCβ) ήταν τα 10 µg/kg για όλες τις ενώσεις, εκτός της σαραφλοξακίνης (4 µg/kg), του οξολινικού οξέος (25 µg/kg), της φλουμεκίνης (100 µg/kg) και της κινοξακίνης (200 µg/kg) [40].

Από τις δημοσιευμένες εργασίες που αναφέρθηκαν μπορούν να παρατηρηθούν τα εξής: Η πλειοψηφία των δημοσιευμένων εργασιών χρησιμοποιούν την HPLC [31-37] για την ανάλυση των δειγμάτων φλουμεκίνης και τον ποσοτικό προσδιορισμό της, δύο μόνο την τριχοειδή ηλεκτροφόρηση [38,39] και μία την τεχνική της ELISA [40]. Σε όλες τις εργασίες, με εξαίρεση αυτή της ELISA [40], οι ενώσεις που προσδιορίζονται στα διάφορα δείγματα ιχθύων είναι λιγότερες από 5. Για την εκλεκτική παραλαβή των αντιβιοτικών ενώσεων από τα δείγματα χρησιμοποιείται, τόσο η εκχύλιση υγρού-υγρού, με διαλύτες, όπως το ακετονιτρίλιο, το διχλωρομεθάνιο, η ακετόνη, το n-εξάνιο, ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών σε διάφορες τιμές pH, το χλωροφόρμιο, το χλωροοξικό οξύ κ.α, όσο και η εκχύλιση στερεάς φάσης, με την έκλουση των ενώσεων να πραγματοποιείται με μεθανόλη, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, ακετονιτρίλιο ή οξαλικό οξύ.

3.5 Προκατεργασία δειγμάτων φλουμεκίνης στις διάφορες μορφές της

4. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥΔΙΑΔΙΚΑΣΙΕΣ ΕΠΙΚΥΡΩΣΗΣ

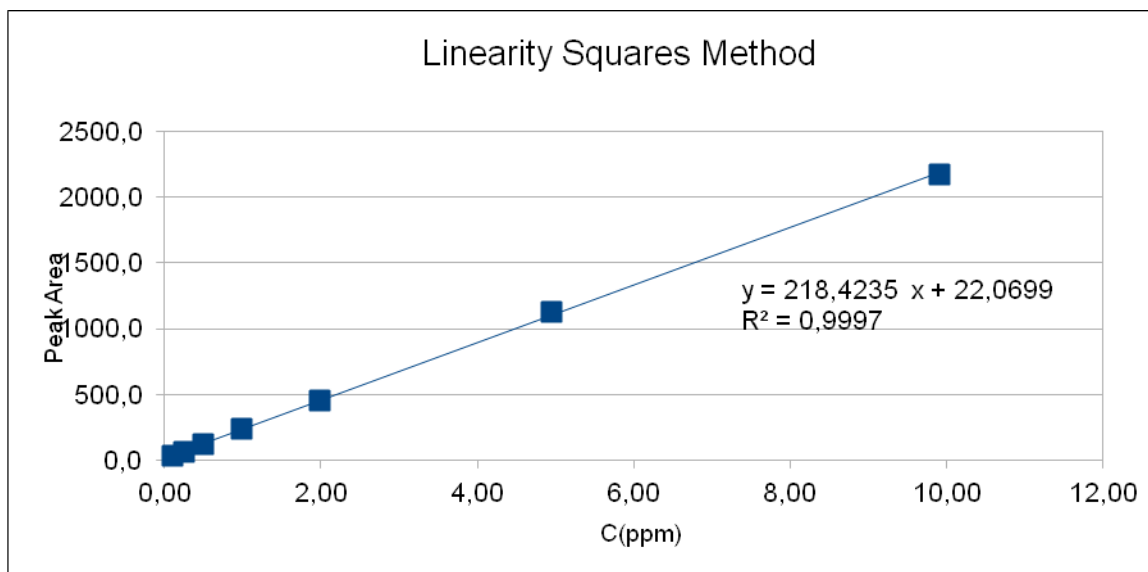
4.1.1. Γραμμικότητα (Linearity)

Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης φλουμεκίνης

Χρησιμοποιήθηκε πρότυπο διάλυμα φλουμεκίνης (stock solution) 20,2 mg διαλυμένο σε 20 mL MeOH και παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα πρότυπα διαλύματα σε ξεχωριστές φιάλες των 50 mL, αραιούμενα σε μίγμα ακετονιτριλίου/νερού 1/1.

Πίνακας 3: Διαλύματα παρακαταθήκης της φλουμεκίνης

C_{std} (ppm) προτύπων φλουμεκίνης	Αραιώσεις (μL από stock solution σε 50 mL διαλύτη)	Εμβαδό (Μέσος όρος 3 ενέσεων)	% Rsd για κάθε 3αδα ενέσεων σε κάθε επίπεδο συγκέντρωσης
0,10	5	35,3	1,81
0,25	12,5	67,4	0,94
0,51	25	126,0	1,01
1,01	50	244,2	0,64
2,02	100	458,7	0,14
5,05	250	1127,9	0,16
10,1	500	2171,3	0,37



Σχήμα 6: Γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης της φλουμεκίνης

Από την εφαρμογή της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων και με βάση τη γραφική παράσταση που ακολουθεί παρατηρούμε ο συντελεστής συσχέτισης είναι $r = 0,999$ και κατ' επέκταση η μέθοδος επιδεικνύει γραμμική συσχέτιση.

4.1.2. Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια υπολογίστηκε παρασκευάζοντας τρία ενισχυμένα διαλύματα σε placebo (περιέχουν τις πρώτες ύλες και τα έκδοχα) σε τρία διαφορετικά επίπεδα και χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Ενισχυμένο διάλυμα Α φλουμεκίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 400 μL διαλύματος φλουμεκίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας-εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 3.3. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 120 μL σε ογκομετρική φιάλη των 10mL.

Ενισχυμένο διάλυμα Β φλουμεκίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 500 μL διαλύματος φλουμεκίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας-εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 3.3. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 120 μL σε ογκομετρική φιάλη των 10mL.

Ενισχυμένο διάλυμα Γ φλουμεκίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 600 μL διαλύματος φλουμεκίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας-εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 3.3. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 120 μL σε ογκομετρική φιάλη των 10mL.

Υπολογίζεται από τα ανωτέρω η % ανάκτηση κάθε αμινοξέος για κάθε διάλυμα και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων.

Η επί τοις εκατό ανάκτηση ορίζεται ως το πηλίκο της πειραματικής συγκέντρωσης προς τη θεωρητική συγκέντρωση $\times 100$

Κριτήρια αποδοχής: Η % ανάκτηση θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 90-110% και το %RSD σε ένα δεδομένο επίπεδο θα πρέπει να είναι $\leq 2,0$.

Εδώ παρουσιάζεται ένας αντιπροσωπευτικός πίνακας για την ακρίβεια της φλουμεκίνης.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα Ακρίβειας φλουμεκίνης

Επίπεδο Ενίσχυσης	Συγκέντρωση Υπολογισμένη από την καμπύλη αναφοράς	Θεωρητική τιμή συγκέντρωσης	%Ανάκτηση	Μέση τιμή (\pm SD)/ %RSD
Α	1,57	1,58	97,83	98,75 ($\pm 0,005$) 0,64
	1,60	1,58	99,60	
	1,60	1,58	98,81	
Β	1,99	1,98	99,00	98,62 ($\pm 0,012$) 0,52
	1,98	1,98	98,47	
	1,98	1,98	98,38	
Γ	2,37	2,34	100,47	100,97 ($\pm 0,017$) 1,48
	2,40	2,34	100,96	
	2,39	2,34	101,47	

% Ανάκτηση = 98,6-101,0

%RSD \leq 1,5

Τα κριτήρια αποδοχής που είχαν οριστεί εξ αρχής πληρούνται.

4.1.3. Πιστότητα (Precision)

A) Πιστότητα συστήματος

Η πιστότητα του συστήματος καθορίζεται μετρώντας εις τριπλούν κάθε πρότυπο διάλυμα. Εκφράζεται από %RSD του εμβαδού της κορυφής.

Κριτήρια αποδοχής: Θα πρέπει %RSD \leq 1,5

B) Επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα ελέγχου και ένα πρότυπο διάλυμα. Από τα αποτελέσματα υπολογίζεται η %περιεκτικότητα και το %RSD.

Κριτήρια αποδοχής: Θα πρέπει %RSD \leq 2,0

Γ) Ενδιάμεση Πιστότητα

Εκτελούνται δύο επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας τρία ανεξάρτητα διαλύματα ελέγχου: α) σε διαφορετική ημέρα, β) από διαφορετικό αναλυτή και χρησιμοποιώντας άλλο σύστημα HPLC.

Εδώ θα παρουσιαστεί αντιπροσωπευτικός πίνακας για τη φλουμεκίνη όσον αφορά την Επαναληψιμότητα / Ενδιάμεση πιστότητα

Υπολογίζεται η % περιεκτικότητα για τη φλουμεκίνη και το αντίστοιχο % RSD. Τα αποτελέσματα αναλύονται με χρήση του One Way Anova. Η τυπική απόκλιση SR της ενδιάμεσης πιστότητας

Πίνακας 5: Αποτελέσματα πιστότητας φλουμεκίνης

Αναλυτής/Ημέρα	Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	Εμβαδόν κορυφής στο διάλυμα ελέγχου	C test (μg/mL)	%Περιεκτικότητα	Μέσος όρος (±SD)/%RSD
Αναλυτής 1 Ημέρα 1	438,2 438,0 444,1 440,0 437,4 443,4 Μέσος όρος 440,2 Cstd (μg/mL)=1,98	440,6 444,9 440,6 441,0 441,9 438,3	2	98,50 99,46 98,42 98,51 98,67 97,86	98,6 (±0,005) 0,52
Ημέρα 2	Μέσος όρος 440,0 Cstd (μg/mL)=1,96	442,5 444,5 445,6	2	98,72 99,11 99,88	99,2 (±0,007) 0,68

Ημέρα	Μέσος όρος	460,8		99,80	99,3
3	459,1	457,6	2	98,96	(±0,008)
	Cstd	457,1		99,25	0,80
	(μg/mL)=2,03				

% περιεκτικότητα= 97,9-99,9 %

Επαναληψιμότητα: %RSDr =0,5

Συνολική Επαναληψιμότητα: %RSD =0,6

Συνολική Επαναληψιμότητα: %RSDR =0,8

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται

4.1.4. Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ισούται με το πηλίκο της τυπικής απόκλισης σ του πιο αραιωμένου πρότυπου διαλύματος της καμπύλης βαθμονόμησης προς την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης πολλαπλασιαζόμενο επί 10. Το όριο ανίχνευσης για τη φλουμεκίνη είναι 0,40 $\mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,25% της συγκεντρωσης του διαλύματος ελέγχου.

4.1.5. Όριο ανίχνευσης (LOD)

Ισούται με το πηλίκο της τυπικής απόκλισης σ του πιο αραιωμένου πρότυπου διαλύματος της καμπύλης βαθμονόμησης προς την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης πολλαπλασιαζόμενο επί 3,3. Το όριο ανίχνευσης για τη φλουμεκίνη είναι 0,13 $\mu\text{g/mL}$, το οποίο αντιστοιχεί στο 0,08% της συγκεντρωσης του διαλύματος ελέγχου.

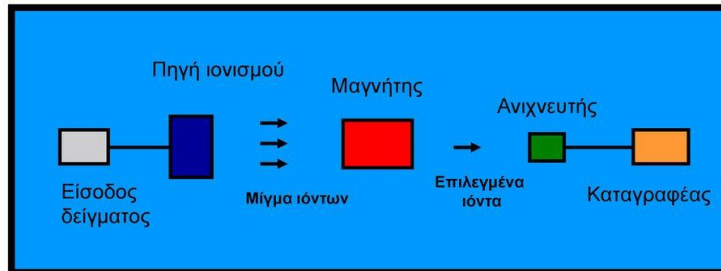
5. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑ ΜΑΖΩΝ Γενικά

Η φασματομετρία μάζας είναι ίσως η τεχνική που μπορεί να βρει τη μεγαλύτερη ποικιλία εφαρμογών, σε σχέση με όλες τις άλλες αναλυτικές τεχνικές που διαθέτει ένας επιστήμονας. Σήμερα, η φασματομετρία μάζας χρησιμοποιείται ευρύτατα, κυρίως για την επαλήθευση ή διερεύνηση της δομής οργανικών ενώσεων κατά τη σύνθεση, για την εξακρίβωση δομών φυσικών προϊόντων, για την διερεύνηση παρουσίας ισοτόπων και για την ποιοτική και ποσοτική ανάλυση ενώσεων [19,20]. Στο Σχήμα 3 παρουσιάζονται τα κύρια τμήματα ενός φασματομέτρου μάζας. Στο παρόν κεφάλαιο θα αναφερθούμε μόνο στα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα είδη αναλυτών μάζας (ανιχνευτή οργάνου).

Διάγραμμα ενός απλού φασματομέτρου μάζας

Απεικόνιση των βασικών στοιχείων ενός συστήματος φασματομετρίας μάζας.



Σχήμα 7: Οργανολογία ενός απλού φασματομέτρου μάζας

Επίσης, θα αναπτυχθεί η λειτουργία μόνο της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI), διότι αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα της παρούσας μελέτης. Το πρώτο στάδιο στη φασματομετρία μάζας είναι η δημιουργία αέριων ιόντων των αναλυτών, που πραγματοποιείται στη πηγή ιοντισμού. Υπάρχουν διάφορα είδη πηγών ιοντισμού και η επιλογή της σωστής πηγής εξαρτάται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες των αναλυτών [21].

5.2 Αναλυτές Μάζας

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενοι τύποι αναλυτών μάζας είναι [22] :

Τετραπολικός αναλυτής

Αναλυτής παγίδας ιόντων

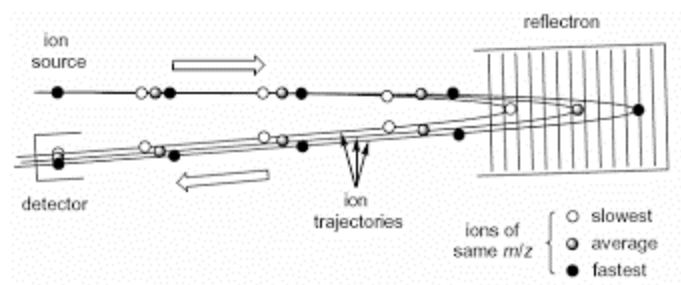
Αναλυτής Χρόνου πτήσης

Υβριδικός αναλυτής Orbitrap

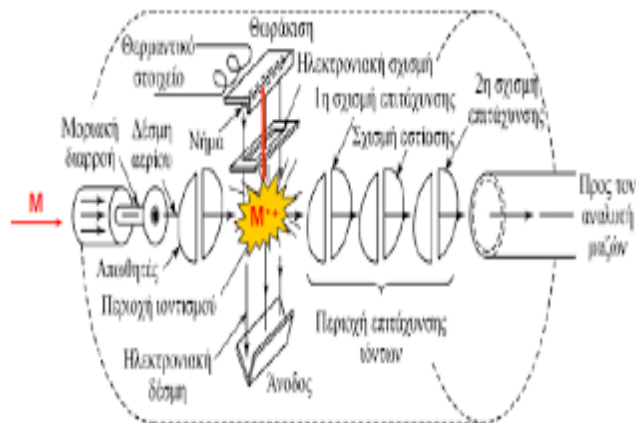
5.2.1. Τετραπολικός αναλυτής

Οι τετραπολικοί αναλυτές είναι οι πιο διαδεδομένοι αναλυτές μάζας γιατί παρουσιάζουν μία σειρά από πλεονεκτήματα, όπως χαμηλό κόστος, συμπαγή κατασκευή, μεγαλύτερες ανοχές, ταχύτερη σάρωση (<100 ms), δυνατότητα συνδυασμών σε υβριδικά όργανα (όργανα με άνω του ενός αναλυτή μάζας π.χ. QTOF) και τέλος αμεσότερη συμβατότητα με χρωματογραφικές τεχνικές.

Ο τετραπολικός αναλυτής λειτουργεί ανάλογα με τα οπτικά φίλτρα επιτρέποντας σε ιόντα μίας μόνο τιμής m/z να περάσουν και να φτάσουν στον ανοχνευτή. Όλα τα άλλα ιόντα εξουδετερώνονται και απομακρύνονται. Ένα απλοποιημένο διάγραμμα τετραπολικού αναλυτή δίνεται στο Σχήμα 4. Τέσσερις μεταλλικές κυλινδρικές ράβδοι (πόλοι) βρίσκονται φορτισμένες ανά απέναντι ζεύγη στο ίδιο συνεχές ηλεκτρικό ρεύμα. Στο σύστημα εφαρμόζεται με διαφορά τάσης 180 μοίρες εναλλασσόμενο ρεύμα υψηλής συχνότητας (ραδιοσυχνότητα) [22,23].



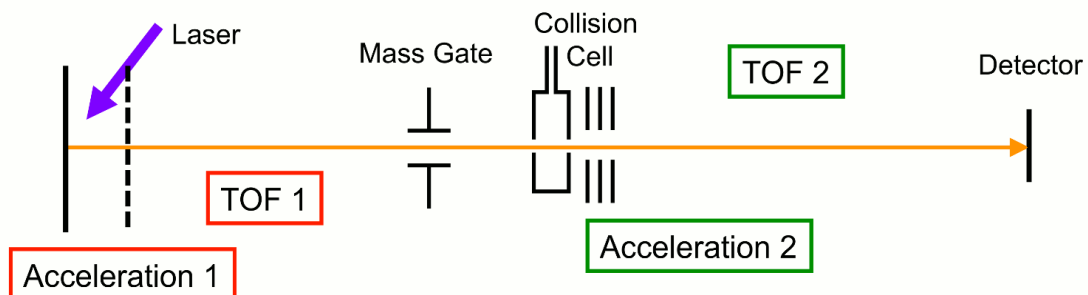
Σχήμα 8: Τετραπολικός Αναλυτής



Σχήμα 10: Αναλυτής παγίδας Ιόντων

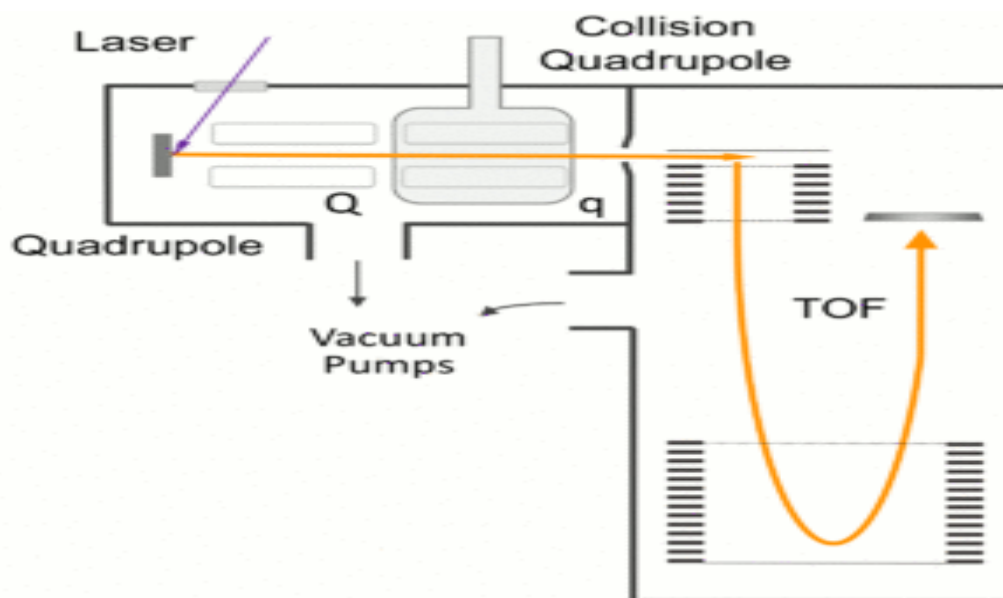
5.2.3. Αναλυτής Χρόνου Πτήσης (Time of Flight, TOF)

Στον αναλυτή χρόνου πτήσης, TOF, ο λόγος m/z ενός ιόντος προσδιορίζεται με μέτρηση του χρόνου της πτήσης του. Τα ιόντα που σχηματίζονται σε ακροσωλήνα, επιταχύνονται προς το γειωμένο μεταλλικό πλέγμα και περνώντας από διατάξεις εστίασης (ion lens), εισέρχονται σε ελεύθερο πεδίο ευθύγραμμο σωλήνα μήκους D . Κατά την κίνηση τους στο σωλήνα, τα ιόντα διαχωρίζονται σε ομάδες που κινούνται με διαφορετική ταχύτητα χαρακτηριστική του m/z και τελικά ανιχνεύονται στο τέλος της διαδρομής (Σχήμα 11) [22]



Σχήμα 11: Αναλυτής μάζας TOF

Οργανολογικά ο αναλυτής μάζας Q-TOF μπορεί να θεωρηθεί ως προσθήκη ενός τετραπόλου σε ένα TOF ή ως αντικατάσταση του Q3 ενός τριπλού τετραπόλου με ένα TOF (Σχήμα 12)



Σχήμα 12: Οργανολογία Q-TOF

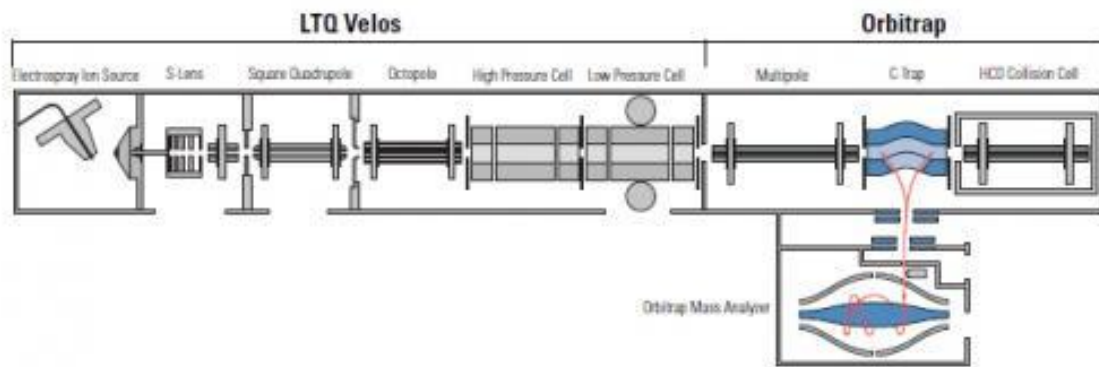
5.2.4. Υβριδικός αναλυτής Orbitrap

Ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap είναι συνδυασμός γραμμικής και ηλεκτροστατικής παγίδας ιόντων. Πρόκειται για καινοτόμο αναλυτή μάζας που κατασκεύασε η Thermo Electron παρουσιάζοντας το σύστημα LTQ Orbitrap, Σχήμα 13.



Σχήμα 13: LTQ Orbitrap Velos

Ο αναλυτής μάζας είναι τεχνολογίας τροχιακής παγίδας ιόντων (Orbitrap Analyzer). Προσφέρει υψηλή ευαισθησία, υψηλή διαχωριστική ικανότητα, ακρίβεια μάζας , δυναμικό εύρος και υψηλή σταθερότητα. Η αρχή λειτουργίας του υβριδικού αναλυτή μάζας είναι εν συντομία η εξής: Τα ιόντα συσσωρεύονται στη γραμμική παγίδα ιόντων (linear ion trap), επιταχύνονται ευθύγραμμα και οδηγούνται στην C-παγίδα ιόντων (C-trap), όπου παγιδεύονται. Στη συνέχεια συμπιέζονται σε ένα μικρό νέφος και εισέρχονται στο Orbitrap (Σχήμα 14).



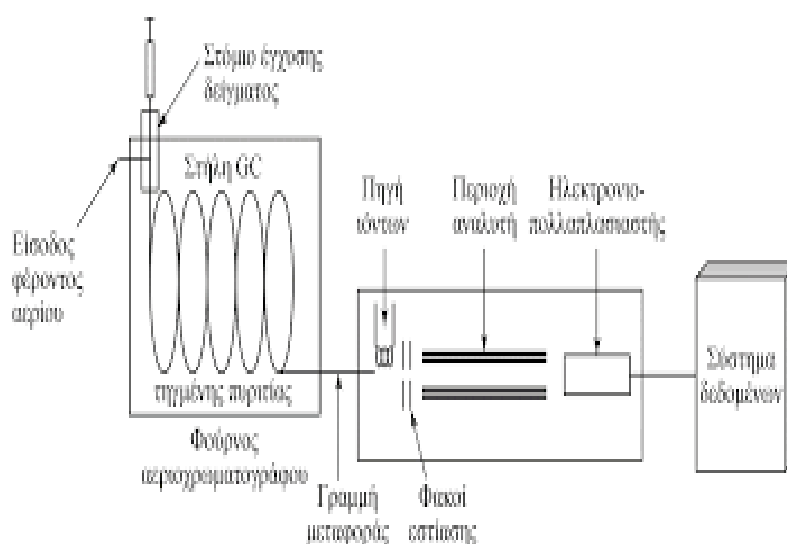
Σχήμα 14: Αρχή Λειτουργίας του LTQ Orbitrap

Τα ιόντα πραγματοποιούν περιστροφική κίνηση γύρω από το κεντρικό ηλεκτρόδιο και ταυτόχρονα πραγματοποιείται ταλάντωση στον άξονα z. Η ταλάντωση μπορεί να θεωρηθεί αρμονική και είναι ανεξάρτητη από τις γωνίες κίνησης των ιόντων.

5.3 ESI

Ο John Bennett Fenn συνέβαλε αποφασιστικά στην ανάπτυξη του ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό και τιμήθηκε με βραβείο Nobel το 2002 μαζί με την Koichi Tanaka για τις εργασίες τους στη φασματομετρία μάζας και μοιράστηκαν το βραβείο με τον Kurt Wuthrich για τις μελέτες του στο πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό (NMR). Ο ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό πραγματοποιείται με εφαρμογή ενός ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου. Το ηλεκτρικό πεδίο παράγεται με εφαρμογή διαφοράς δυναμικού μεταξύ ενός τριχοειδούς σωλήνα και ενός αντιηλεκτροδίου. Το υψηλό δυναμικό προκαλεί στην άκρη του τριχοειδούς ένα αερόλυμα πολλαπλά φορτισμένων σταγόνων (θύσανο ιόντων), οι οποίες υπόκεινται σε αποδιαλύτωση καθώς διασχίζουν την πηγή ιοντισμού και οδηγούνται προς τον ανιχνευτή. Καθώς το μέγεθος των σταγόνων μειώνεται, φτάνουν σε σημείο που οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων στην επιφάνεια κάθε σταγόνας υπερνικούν τις συνεκτικές δυνάμεις της επιφανειακής τάσης και πραγματοποιείται κουλομβική έκρηξη, σχηματίζοντας

μικρότερα φορτισμένα σταγονίδια. Ακολουθεί, μία αλληλουχία τέτοιων εκρήξεων και έτσι παράγονται τα αέρια ιόντα των προσδιοριζόμενων ουσιών. Καθώς τα φορτισμένα σταγονίδια οδηγούνται προς τον ανιχνευτή, διασχίζουν μία σπή δειγματοληψίας και μετά σε ένα σημείο που έχει θερμαινόμενο αδρανές αέριο (συνήθως N_2) ή σε θερμαινόμενο τριχοειδές για την απομάκρυνση και των τελευταίων μοριών διαλύτη. Τα τελικά αέρια ιόντα μεταφέρονται προς τον ανιχνευτή με τη βοήθεια φακών εστίασης. Στο Σχήμα 11 απεικονίζεται μία διάταξη [21].



Σχήμα 15: Απεικόνιση οργανολογίας ηλεκτροψεκασμού με ESI

5.4 MS/MS

Η φασματομετρία μάζας MS/MS είναι γενικά κάθε μέθοδος που περιλαμβάνει τουλάχιστον δύο στάδια ανάλυσης μάζας. Η θραυσματοποίηση είναι μία διαδικασία που μπορεί να γίνει μέσω συγκρούσεων με μόρια αργού. Αν τα πρόδρομα ιόντα υποστούν μία ενεργοποίηση λόγω σύγκρουσης, διαδικασία καλείται διάσπαση προκαλούμενη από σύγκρουση (Collision Induced Dissociation, CID). Η ενέργεια σύγκρουσης παίζει σημαντικό ρόλο στη θραυσματοποίηση και υπάρχει δυνατότητα για χαμηλή και υψηλή ενέργεια σύγκρουσης (Low-Energy Collision High-Energy Collision) [20].

5.4.1. Ανασκόπηση μεθόδων ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού εμαμεκτίνης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό εμαμεκτίνης σε δείγματα ιχθυοτροφών δεν υπάρχει μεγάλη ποικιλία μεθόδων, αφού το πλήθος των περισσότερων άρθρων για μεθόδους ανάλυσης χρησιμοποιούν την τεχνική LC/MS/MS με ESI, τεχνική την οποία θα χρησιμοποιήσουμε στην παρούσα εργασία. Παρόλα αυτά, υπάρχουν μερικές άλλες τεχνικές, όπως:

1. Επικύρωση μεθόδου με χρήση HPLC με φθορισμό για τον προσδιορισμό εμαμεκτίνης σε λαχανικά και φρούτα [24].
2. Επικύρωση μεθόδου με χρήση HPLC για τον προσδιορισμό εμαμεκτίνης σε δείγματα γάλακτος κασίκας και αγελάδας.[25]

Παρατηρούμε ότι το σύνολο των μεθόδων ανάλυσης κατά κύριο λόγο, βασίζονται στην τεχνική LC/MS/MS με ESI και ο βασικότερος λόγος είναι ότι μέσω της ανωτέρω τεχνικής, έχουμε τη δυνατότητα ανίχνευσης της εμαμεκτίνης σε δείγματα με επίπεδα συγκεντρώσεων $\mu\text{g}/\text{kg}$, παρέχοντας μας υψηλή ευαισθησία, τη στιγμή που μπορούμε να ταυτοποιήσουμε με ευκολία, μέσω συγκεκριμένων θραυσμάτων, τα 2 βασικά ιόντα της εμαμεκτίνης [10,11]. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της εμαμεκτίνης σε σκευάσματα ιχθυοτροφών. Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί τα 2 κύρια θραύσματα της εμαμεκτίνης, καθώς και να διαθέτει το εργαστήριο μία σταθερή και αξιόπιστη μέθοδο που να διασφαλίζει τόσο την ταυτοποίηση όσο και την έγκυρη ποσοτικοποίηση εμαμεκτίνης σε δείγματα πρώτης ύλης, ιχθυοτροφών και γραμμής καθαρισμού.

6. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ, ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΣ

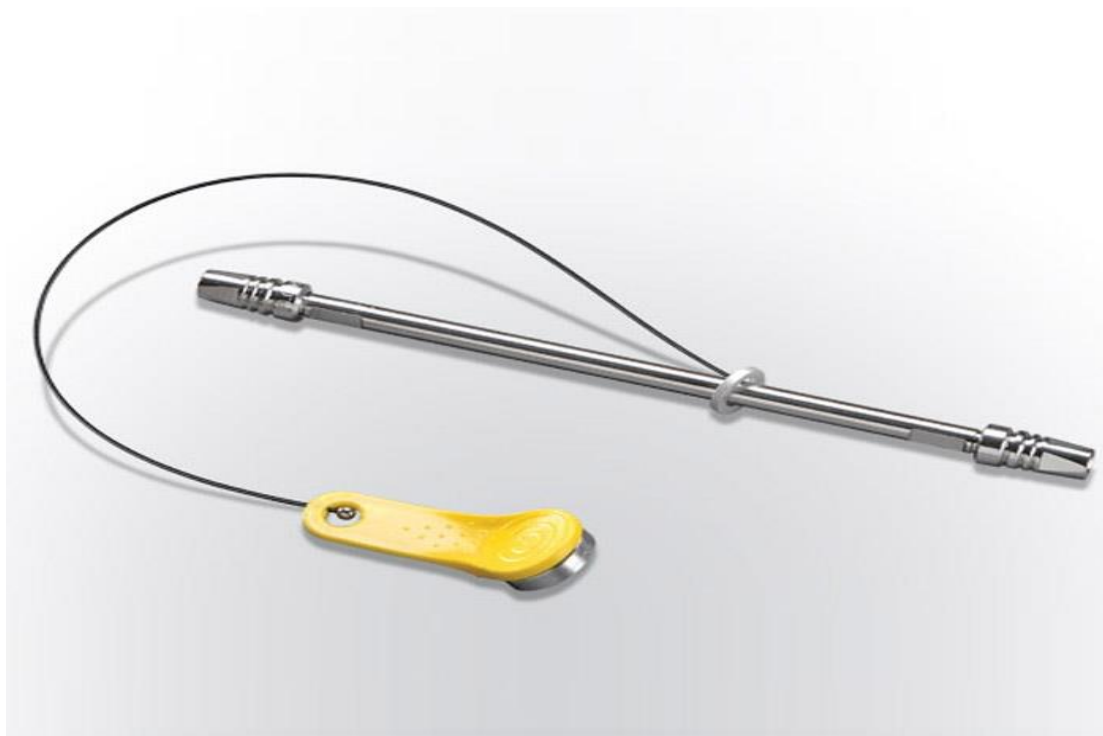
ΑΝΑΛΥΣΗΣ Υγροχρωματογραφικά συστήματα με ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε υγροχρωματογραφικό σύστημα της Thermo, το οποίο αποτελείται από τα παρακάτω τμήματα:

- Φασματόμετρο μάζας με δύο τετράπολα (double stage quadrupole analyzer) TSQ Quantum Access
- Αντλία υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης Accela Pump UPLC 2 εμβόλων , με δυνατότητα βαθμιδωτής έκλουσης τεσσάρων διαλυτών
- Αυτόματο δειγματολήπτη Accela Autosampler με ενσωματωμένο θερμοστάτη στηλών
- Γεννήτρια αζώτου Peak Scientific
- Οβίδα Αργού

Η καταγραφή και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με το λογισμικό πρόγραμμα Xcalibur Data System 2.06

Η χρωματογραφική ανάλυση έγινε με την στήλη Acquity UPLC BEH C18 διαστάσεων 100 mm x 2.1 mm , 1.7 μm



Σχήμα 16 Στήλη που χρησιμοποιήθηκε κατά την ανάπτυξη της μεθόδου emamectin

6.2 Διαλύτες και αντιδραστήρια

- ACN υψηλής καθαρότητας για MS (Labscan, Merck)
- MeOH υψηλής καθαρότητας για MS (Merck)
- Συσκευή υπερκάθαρου νερού Millipore ειδικής αντίστασης 18.2 MΩ
- Οξικό Αμμώνιο (Merck)
- Οξικό οξύ (Fluka)

6.3 Βοηθητικός εργαστηριακός εξοπλισμός

- Ογκομετρικές φιάλες των 10 mL
- Ποτήρι ζέσεως των 500 mL

- Σιφώνια πληρώσεως 10 mL class A
- Φυγοκεντρικοί σωλήνες των 50 mL
- Πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-10 μL , 10-100 μL , 100-1000 μL
- Γυάλινες και πλαστικές Pasteur
- Διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων
- Συσκευή περιδίνισης τύπου Vortex (Velp Scientifica)
- ρΗμετρο (HACH)
- Συσκευή διήθησης υπό κενό

6.4 Πρότυπες ουσίες

Για την ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου ανάλυσης παρασκευάστηκαν 1000 mg/L (stock solutions) για την εμαμεκτίνη και την δοραμεκτίνη, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως εσωτερικόμ πρότυπο για την παρούσα εργασία.

6.5 Μέθοδος Ανάλυσης

Για την εμαμεκτίνη, επιλέξαμε για τον ποσοτικό της προσδιορισμό και την ανίχνευσή της μία μέθοδο απλή και εύκολα εφαρμόσιμη, αφού η συγκεκριμένη μέθοδος προέβλεπε τον προσδιορισμό διαφόρων αβερμεκτιμών [18]. Έτσι, προβαίνοντας σε κάποιες βελτιώσεις, με βάση την ανωτέρω μέθοδο, πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον προσδιορισμό φλουμεκτίνης καταλήξαμε στις παρακάτω χρωματογραφικές συνθήκες.

Πίνακας 6: Πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για τον ποσοτικό προσδιορισμό εμαμεκτίνης

Χρόνος (min)	Κινητή φάση A (per cent V-V)	Κινητή φάση B (per cent V-V)	Κινητή φάση C (per cent V-V)
0	50	45	5
2	0	95	5
8	0	95	5
12	50	45	5

- **Χρωματογραφική στήλη:** XDB-Eclipse,C₁₈ Zorbax, 150 mm x 4,6 mm,3μm
- **Κινητή φάση A :** H₂O
- **Κινητή φάση B:** ACN
- **Κινητή φάση C:** Μεταφέρονται 3,85 g οξικού αμμωνίου σε κωνική φιάλη του 1 L. Αφού γίνει διαλυτοποίηση σε νερό , ακολουθεί ρύθμιση του pH = 5.0 με μικρή ποσότητα οξικού οξέος . Μετά τη ρύθμιση του pH, το διάλυμα μεταφέρεται σε συσκευή διήθησης υπό κενό και φιλτράρεται/
- **Όγκος ένεσης :** 10 μL
- **Θερμοκρασία δειγματολήπτη :** 25° C
- **Θερμοκρασία στήλης :** 40° C

Πίνακας 7: Βέλτιστοι παράμετροι στο διπλό τετράπολο

Ion Mode	ESI +
Capillary	3,00 kV
Cone Voltage	50-80 V
Ion energy	2 eV
Source Temperature	120° C
Desolvation temperature	400° C
Cone Gas	100 L/hr
Desolvation Gas	500 L/hr

Οι ανωτέρω παράμετροι προέκυψαν κατόπιν infusion που διενεργήθηκε στο χρωματογραφικό μας σύστημα ούτως ώστε να προκύψουν τέτοιες κατάλληλες συνθήκες για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό της εμαμεκτίνης και δοραμεκτίνης στο τετράπολο. Αυτό είχε θετικές επιδράσεις στις μεθόδους επικύρωσης που διενεργήθηκαν.

7. ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΕΠΙΚΥΡΩΣΗ ΜΕΘΟΔΟΥ

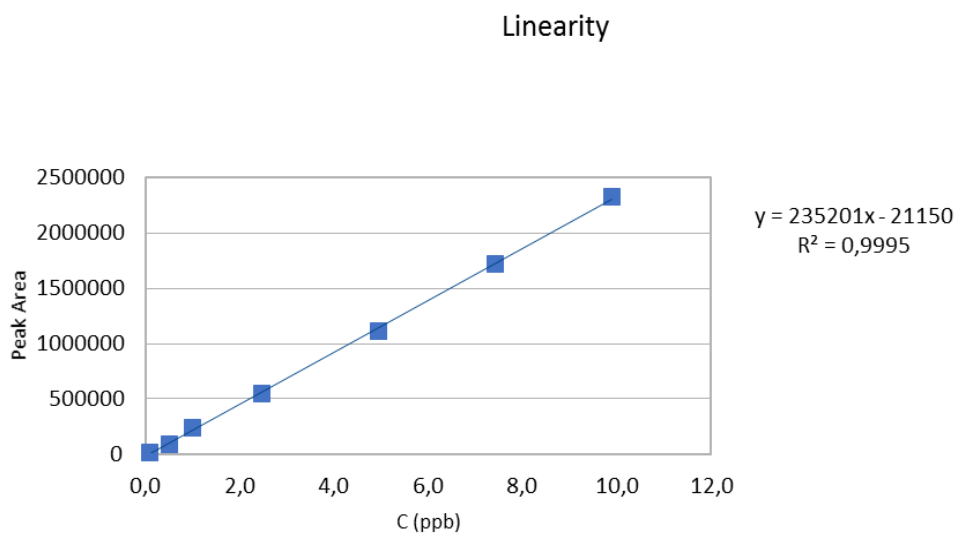
7.1 Γραμμικότητα (Linearity)

Πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης εμαμεκτίνης:

Αρχικά ζυγίστηκε ποσότητα από πρότυπο εμαμεκτίνης 10 mg/mL και έγινε αραίωση σε 10 mL ACN. Από το συγκεκριμένο πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης έγιναν αραιώσεις με μίγμα διαλύτη ακετονιτριλίου-νερού σε αναλογία 1 προς 1. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από το συγκεκριμένο πείραμα ήταν τα εξής:

Πίνακας 8: Παρουσίαση συγκεντρώσεων και εντάσεων κορυφών κύριου θραύσματος εμαμεκτίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις

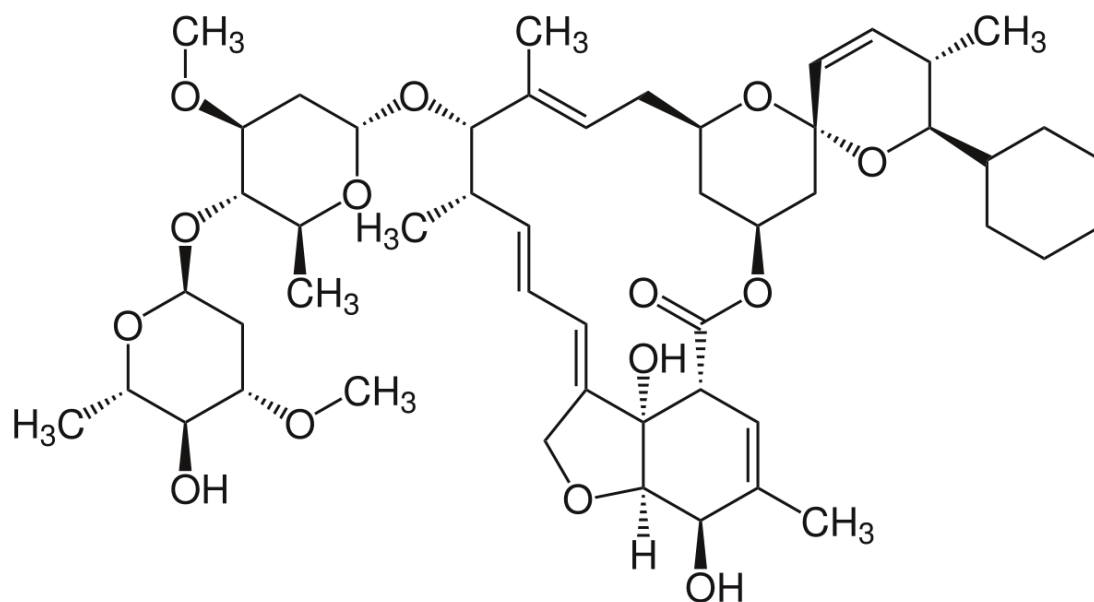
C(ppb) Emamcetin	Sum of Peak Area 3 injections
0,1	14957
0,5	85379
1,0	236807
2,5	549880
5,0	1108544
7,4	1724025
9,9	2326135



Σχήμα 17 Γραφική παράσταση καμπύλης ανάφοράς εμαμεκτίνης

Παρατηρούμε ότι ο συντελεστής συσχέτισης της καμπύλης αναφοράς αναφοράς είναι $(r) = 0,9995$. Επομένως, μέθοδος αποδεικνύει γραμμική συσχέτιση.

Παρόλα αυτά λόγω οργανολογικής αστάθειας την οποία θα τεκμηριώσουμε παρακάτω, παρατηρήθηκε μεγάλη διακύμανση στα επίπεδα ανάκτησης η οποία θα παρουσιαστεί παρακάτω. Επομένως, αναζητήθηκε βιβλιογραφικά [26] τρόπος για να μειωθεί η οργανολογική επίδραση στις ανακτήσεις εμαμεκτίνης με αποτέλεσμα να χρησιμοποιήσουμε εσωτερικό πρότυπο δοραμεκτίνης.



Σχήμα 18 Χημική δομή δοραμεκτίνης

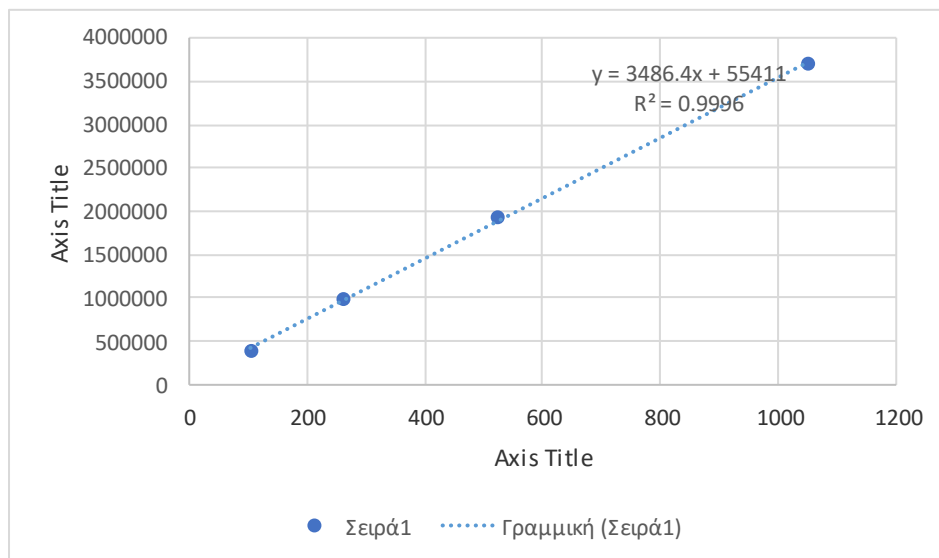
Παρασκευάστηκε λοιπόν αντίστοιχα πρότυπο διάλυμα παρακαταθήκης δοραμεκτίνης, ζυγίζοντας 10 mg και κάνοντας αραιώση σε 10 mL ACN. Επομένως πραγματοποιήθηκε καμπύλη αναφοράς για μία σειρά προτύπων δοραμεκτίνης με βάση τις χρωματογραφικές συνθήκες και παραμέτρους του τετραπόλου που υπάρχουν στην εμαμεκτίνη. Έτσι έχουμε:

Πίνακας 9: Παρουσίαση συγκεντρώσεων και εντάσεων κορυφών κύριου θραύσματος δοραμεκτίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις

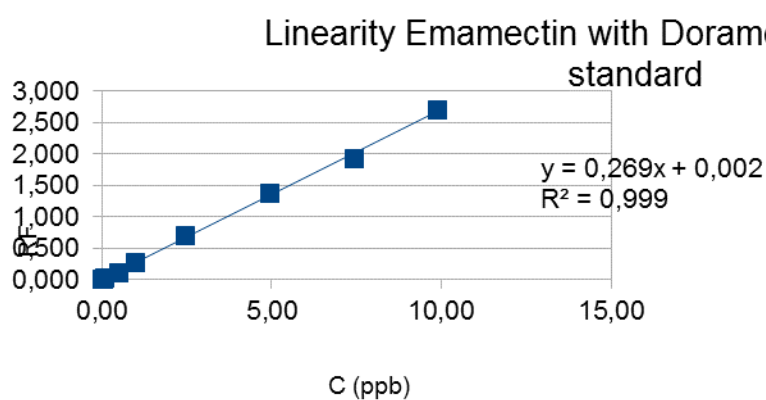
C(ppb) Emamcetin	Sum of Peak Area 3 injections
105	464217
263	393797
525	978593
1050	1923642

Ακολουθεί γραφική παράσταση της καμπύλης βαθμονόμησης.

Πίνακας 10: Καμπύλη αναφοράς προτύπων δοραμεκτίνης



Επομένως, διενεργήθηκε εκ νέου καμπύλη αναφοράς όπου έγινε προσθήκη προτύπου δοραμεκτίνης 100 ppb σε κάθε συγκέντρωση εμαμεκτίνης.



Σχήμα 19 Γραφική παράσταση εμαμεκτίνης με χρήση εσωτερικού προτύπου δοραμεκτίνης 100 ppb

Εδώ θα παρουσιάσουμε συνοπτικά τις συγκεντρώσεις της εμαμεκτίνης και της δοραμεκτίνης.

Πίνακας 11: Παρουσίαση πειραματικών δεδομένων καμπύλης βαθμονόμησης εμαμεκτίνης με χρήση εσωτερικού προτύπου δοραμεκτίνης 100 ppb

C(ppb) Emamectin	RF	Sum of Peak Area of 3 injections emamectin	Sum of Peak Area of 3 injections doramectin
0,01	0,004	1385	375608
0,05	0,006	2297	360851
0,1	0,025	8996	362406
0,5	0,111	39927	360948
1,0	0,275	100079	363403
2,5	0,708	254356	359307
5,0	1,376	505490	367310
7,4	1,929	712358	369316
9,9	2,694	923011	342563

7.2 Ειδικότητα (Specificity)

Μετά την απόφαση για χρήση εσωτερικού προτύπου στην μέθοδο ανάλυσης της εμαμεκτίνης, πραγματοποιήσαμε εκτίμηση της ειδικότητας και παρασκευάσαμε τα ακόλουθα:

- **Διάλυμα placebo** : Παρασκευή ενός λευκού διαλύματος ελέγχου (βασισμένο στην τελική σύνθεση του προϊόντος, αλλά με μηδενική συγκέντρωση εμαμεκτίνης και δοραμεκτίνης. Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων 5 g περίπου σε πλαστικό φυγοκεντρικό των 50 mL και αφού διενεργήθηκε εκχύλιση με ACN ποσότητας 10 mL, προσθήκης 0.5 g χλωριούχου νατρίου και οξίνιση με οξικό οξύ, το δείγμα μεταφέρθηκε στους υπερήχους για 15 λεπτά. Εν συνεχεία, το δείγμα μεταφέρθηκε στους -80 βαθμούς κελσίου για 30 λεπτά και μετά το πέρας του συγκεκριμένου χρόνου έγινε αραίωση 100μL σε 5 mL.
- **Πρότυπο διάλυμα μίγματος εμαμεκτίνης και δοραμεκτίνης:** η Παρασκευή των ανωτέρω διαλυμάτων περιγράφεται στο εδάφιο 7.1.1

Κριτήρια Αποδοχής:

- i) Δεν πρέπει να καταγράφεται καμία κορυφή στο χρόνο κατακράτησης των αμινοξέων
- ii) Η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ εμαμεκτίνης και μιάς άγνωστης κορυφής πρέπει να είναι πάνω από 1,0, Η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ δοραμεκτίνης και μιάς άγνωστης κορυφής πρέπει να είναι πάνω από 1,0 και τέλος ο μεταξύ τους διαχωρισμός πάνω από 1,5
- iii) Τέλος, η φασματική καθαρότητα των κορυφών των ανωτέρω ενώσεων θα πρέπει να είναι $\geq 0,98$.

Από τα πειραματικά δεδομένα της ειδικότητας προέκυψαν τα ακόλουθα συμπεράσματα:

- Η εξέταση του χρωματογράφηματος του λευκού διαλύματος (placebo) επιβεβαίωσε ότι καμία κορυφή δεν εμφανίζεται στο χρόνο κατακράτησης της εμαμεκτίνης και της δοραμεκτίνης
- Η καθαρότητα των κορυφών της της εμαμεκτίνης και της δοραμεκτίνης ήταν μεγαλύτερη του 0,98
- Η διαχωριστική ικανότητα μεταξύ γειτονικών κορυφών της εμαμεκτίνης, μεταξύ γειτονικών κορυφών της δοραμεκτίνης και των 2 αυτών ενώσεων μεταξύ τους βρέθηκε 1,4, 1,7 και 1,9 αντίστοιχα

7.3 Όριο ανίχνευσης (LOD)

Ισούται με το πηλίκο της τυπικής απόκλισης του πιο αραιωμένου προτύπου διαλύματος προς την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης πολλαπλασιαζόμενο επί 3,3.

Στην παρούσα μελέτη φτιάχτηκαν 10 δείγματα με spike συγκέντρωσης 0,17 ppb και η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία μας έδωσε αυτό ως όριο ανίχνευσης.

7.4 Όριο ποσοτικοποίησης (LOQ)

Ισούται με το πηλίκο της τυπικής απόκλισης του πιο αραιωμένου προτύπου διαλύματος προς την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης πολλαπλασιαζόμενο επί 10.

Στην παρούσα μελέτη φτιάχτηκαν 10 δείγματα με spike συγκέντρωσης 0,5 ppb και η συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία μας έδωσε αυτό ως όριο ποσοτικοποίησης, γεγονός που καθιστά την μέθοδό μας υψηλής ευαισθησίας ενώ είναι εναρμονισμένο και με τη νομοθεσία.

7.5 Ακρίβεια (Accuracy)

Η ακρίβεια υπολογίστηκε παρασκευάζοντας τρία ενισχυμένα διαλύματα σε placebo (περιέχουν τις πρώτες ύλες και τα έκδοχα) σε τρία διαφορετικά επίπεδα και χρησιμοποιώντας τις καμπύλες αναφοράς προέκυψαν τα ακόλουθα αποτελέσματα.

Ενισχυμένο διάλυμα Α εμαμεκτίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 40 μL διαλύματος εμαμεκτίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας-εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 6.4. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 100 μL σε ογκομετρική φιάλη των 5mL.

Ενισχυμένο διάλυμα Β εμαμεκτίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 50 μL διαλύματος εμαμεκτίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας-εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 6.4. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 100 μL σε ογκομετρική φιάλη των 5mL.

Ενισχυμένο διάλυμα Γ εμαμεκτίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 120% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 60 μL διαλύματος εμαμεκτίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας-εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 6.4. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 100 μL σε ογκομετρική φιάλη των 5mL.

Υπολογίζεται από τα ανωτέρω η % ανάκτηση κάθε αμινοξέος για κάθε διάλυμα και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων.

Η επί τοις εκατό ανάκτηση ορίζεται ως το πηλίκο της πειραματικής συγκέντρωσης προς τη θεωρητική συγκέντρωση x 100

Κριτήρια αποδοχής: Η % ανάκτηση θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 80-120% και το %RSD σε ένα δεδομένο επίπεδο θα πρέπει να είναι $\leq 5,0$.

Πίνακας 12: Αποτελέσματα ακρίβειας της εμαμεκτίνης πριν τη χρήση εσωτερικού προτύπου

Επίπεδο Ενίσχυσης	Συγκέντρωση Υπολογισμένη από την καμπύλη αναφοράς (ppb)	Θεωρητική τιμή συγκέντρωσης	%Ανάκτηση
A (80%)	2,05	1,98	95,41
	2,08	1,98	96,98
	2,17	1,98	101,41
	1,98	1,98	92,02
	1,27	1,98	56,21
	1,32	1,98	59,00
B(100%)	2,35	2,48	88,22
	2,29	2,48	85,77
	2,30	2,48	86,13
	2,50	2,48	94,20

	2,34	2,48	87,88
	2,30	2,48	86,25
Γ(120%)	2,17	2,98	64,94
	1,70	2,98	49,70
	2,00	2,98	59,48
	2,53	2,98	76,51
	2,47	2,98	74,56
	2,57	2,98	77,67

Από τα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα παρατηρήσαμε τιμές στην ακρίβεια εκτός της προδιαγραφής του 80-120 %, με αποτέλεσμα να επαναλάβουμε το ανωτέρω πείραμα με τη χρήση εσωτερικού προτύπου δοραμεκτίνης συγκέντρωσης 100 ppb. Επομένως παρασκευάστηκαν τα παρακάτω διαλύματα παρακαταθήκης:

Ενισχυμένο διάλυμα Α εμαμεκτίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 40 μL διαλύματος εμαμεκτίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και προσυήκης 200 μL από πρότυπο 1000ppm δοραμεκτίνης και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας- εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 6.4. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 100 μL σε ογκομετρική φιάλη των 5mL.

Ενισχυμένο διάλυμα Β εμαμεκτίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 100% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 50 μL διαλύματος εμαμεκτίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και 200 μL από πρότυπο 1000ppm δοραμεκτίνης και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας- εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 6.4. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 100 μL σε ογκομετρική φιάλη των 5mL.

Ενισχυμένο διάλυμα Γ εμαμεκτίνης (το οποίο αντιστοιχεί στο 80% της συγκέντρωσης εργασίας): Μεταφέρθηκε ποσότητα εκδόχων (περίπου 2 g) και 60 µL διαλύματος εμαμεκτίνης συγκέντρωσης 10000 ppm και 200 µL από πρότυπο 1000ppm δοραμεκτίνης και πραγματοποιήθηκε στο συγκεκριμένο διάλυμα η μέθοδος προκατεργασίας- εκχύλισης που αναφέρεται στο εδάφιο 6.4. Εν συνεχεία, πάρθηκαν από το ανωτέρω εκχύλισμα 100 µL σε ογκομετρική φιάλη των 5mL.

Υπολογίζεται από τα ανωτέρω η % ανάκτηση κάθε αμινοξέος για κάθε διάλυμα και το %RSD μεταξύ των ανακτήσεων.

Η επί τοις εκατό ανάκτηση ορίζεται ως το πηλίκο της πειραματικής συγκέντρωσης προς τη θεωρητική συγκέντρωση $\chi 100$

Κριτήρια αποδοχής: Η % ανάκτηση θα πρέπει να κυμαίνεται μεταξύ 80-120% και το %RSD σε ένα δεδομένο επίπεδο θα πρέπει να είναι $\leq 5,0$. Μετά την παρασκευή των ανωτέρω διαλυμάτων διενεργήθηκε το πείραμα της ακρίβειας και είχαμε τα εξής αποτελέσματα:

Πίνακας 13: Αποτελέσματα ακρίβειας μετά την προσθήκη εσωτερικού προτύπου

Επίπεδο Ενίσχυσης	Συγκέντρωση Υπολογισμένη από την καμπύλη αναφοράς (ppb)	Θεωρητική τιμή συγκέντρωσης	%Ανάκτηση
A (80%)	2,09	1,98	103,94
	2,15	1,98	106,63
	2,15	1,98	106,70
	2,22	1,98	110,35
	1,99	1,98	98,67
	1,94	1,98	96,11
	2,36	2,48	93,60
	2,70	2,48	107,41

Β(100%)	2,47	2,48	98,18
	2,60	2,48	103,35
	2,97	2,48	118,29
	2,96	2,48	
Γ(120%)	3,15	2,98	117,61
	3,40	2,98	100,29
	2,96	2,98	108,14
	3,73	2,98	94,29
	3,00	2,98	118,78
	3,03	2,98	95,28
			96,26

Παρατηρούμε ότι η επί τοις εκατό ανάκτηση κυμαίνεται από 93,6 έως 118,8%. Επομένως μετά την προσθήκη του εσωτερικού προτύπου τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται.

7.6 Πιστότητα (Precision)

A) Πιστότητα συστήματος

Η πιστότητα του συστήματος καθορίζεται μετρώντας εις τριπλούν κάθε πρότυπο διάλυμα. Εκφράζεται από %RSD του εμβαδού της κορυφής.

Κριτήρια αποδοχής: Θα πρέπει $\%RSD \leq 2,0$

B) Επαναληψιμότητα

Παρασκευάστηκαν 6 διαλύματα ελέγχου και ένα πρότυπο διάλυμα. Από τα αποτελέσματα υπολογίζεται η %περιεκτικότητα και το %RSD.

Κριτήρια αποδοχής: Θα πρέπει $\%RSD \leq 5,0$

Γ) Ενδιάμεση Πιστότητα

Εκτελούνται δύο επιπλέον μελέτες επαναληψιμότητας χρησιμοποιώντας τρία ανεξάρτητα διαλύματα ελέγχου: α) σε διαφορετική ημέρα, β) από διαφορετικό αναλυτή.

Εδώ θα παρουσιαστεί αντιπροσωπευτικός πίνακας για τη εμαμεκτίνη όσον αφορά την Επαναληψιμότητα / Ενδιάμεση πιστότητα

Υπολογίζεται η % περιεκτικότητα για τη εμαμεκτίνη και το αντίστοιχο % RSD. Τα αποτελέσματα αναλύονται με χρήση του One Way Anova. Η τυπική απόκλιση SR της ενδιάμεσης πιστότητας

Πίνακας 14: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά την επαναληψιμότητα

	Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	Cstd (ppb)	Μέσος όρος (\pm SD)/RSD%
1 ^η Μέρα			
1 ^{ος} Αναλυτής	206115	2,5	201549
	204733		(\pm 1,9)
	198000		1,7
	202949		
	200000		
	197500		

Πίνακας 15: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά την επαναληψιμότητα από 2^ο αναλυτή

1 ^η Μέρα 2 ^{ος} Αναλυτής	Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	Cstd (ppb)	Μέσος όρος (±SD)/RSD%
	236115	2,5	229049
	234733		(±1,2)
	228000		1,1
	222949		
	225000		
	227500		

Πίνακας 16: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά την επαναληψιμότητα από 2^ο αναλυτή 2^η μέρα

2 ^η Μέρα 2 ^{ος} Αναλυτής	Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	Cstd (ppb)	Μέσος όρος (±SD)/RSD%
	266115	2,5	262882 (±0,9) 0,8
	264733		
	268000		
	262949		
	258000		
	257500		

Επαναληψιμότητα: %RSD_r =1,3

Συνολική Επαναληψιμότητα: %RSD =0,6

Συνολική Επαναληψιμότητα: %RSD_R =0,8

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται

Πίνακας 17: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά τα δείγματα και την επαναληψιμότητά τους

1 ^η Μέρα 1 ^{ος} Αναλυτής	Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	Ctest (ppb)	%Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/RSD%
	204125	2,5	103,94	104,7 (±4,6) 3,8
	210732		106,63	
	280991		106,70	
	274980		110,35	
	219515		98,67	
	211777		96,11	

Πίνακας 18: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά τα δείγματα και την επαναληψιμότητά τους από 2^ο αναλυτή

1 ^η Μέρα 2 ^{ος} Αναλυτής	Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα	Ctest (ppb)	%Ανάκτηση	Μέσος όρος (±SD)/RSD%
	226904	2,5	102,42	103,7 (±3,6)
	247276		112,13	
	220126		107,68	2,8
	221362		110,30	
	254330		104,52	
	214486		95,61	

Πίνακας 19: Αποτελέσματα πιστότητας όσον αφορά τα δείγματα και την επαναληψιμότητά τους από 2^ο αναλυτή 2^η μέρα

<i>2^η Μέρα 2^{ος} Αναλυτής</i>	<i>Εμβαδόν κορυφής στο πρότυπο διάλυμα</i>	<i>Ctest (ppb)</i>	<i>%Ανάκτηση</i>	<i>Μέσος όρος (±SD)/RSD%</i>
	247825		100,29	107,7
	220536		108,14	(±2,6)
	247825	2,5	94,29	2,1
	193008		118,78	
	235695		95,28	
	235432		96,26	

Επαναληψιμότητα: %RSDr =2,3

Συνολική Επαναληψιμότητα: %RSDr =2,6

Συνολική Επαναληψιμότητα: %RSD=2,8

Ενδιάμεση Πιστότητα: %RSDR =2,9

Τα κριτήρια αποδοχής πληρούνται

7.7 Σταθερότητα (Stability)

Διαλύματα ελέγχου όπως έχουν περιγραφεί στο εδάφιο 6.4 αναλύονται φρέσκα, μετά από 24h ενώ έχουν παραμείνει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος καθώς και σε θερμοκρασία ψυγείου με τα αποτελέσματα να είναι τα εξής:

Πίνακας 20: Αποτελέσματα σταθερότητας σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης για 24h

Εμβαδόν εμαμεκτίνης T=0	Εμβαδόν δοραμεκτίνης T=0	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Για 24h στους 25 βαθμούς κελσίου	Εμβαδόν δοραμεκτίνης Για 24h στους 5 βαθμούς κελσίου	%Ανάκτηση Για 24h στους 25 βαθμούς κελσίου	Για 24h στους 5 βαθμούς κελσίου
208994	189453	205903	186232	98,8	100,7

Παρατηρώντας ότι το διαλύματα ελέγχου μας ήταν σταθερά για 24 ώρες τόσο στους 5 βαθμούς Κελσίου όσο και στους 25 βαθμούς Κελσίου, διενεργήσαμε και μία δεύτερη μελέτη σταθερότητας και ελέγξαμε τα δείγματα στις ίδιες συνθήκες αλλά μετά από 72 ώρες αυτή τη φορά και είχαμε:

Πίνακας 21: Αποτελέσματα σταθερότητας σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης για 72h

Εμβαδόν εμαμεκτίνης T=0	Εμβαδόν δοραμεκτίνης T=0	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Για 72h στους 25 βαθμούς κελσίου	Εμβαδόν δοραμεκτίνης Για 72h στους 5 βαθμούς κελσίου	%Ανάκτηση Για 72h στους 25 βαθμούς κελσίου	Για 72h στους 5 βαθμούς κελσίου
208994	189453	202148	187288	97,4	99,2

Παρατηρώντας ότι τα διαλύματα ελέγχου ήταν σταθερά και μετά από 72 ώρες, διενεργήσαμε 2 ακόμα πειράματα σταθερότητας, ένα στους 5 βαθμούς Κελσίου για μία βδομάδα και ένα αφού πρώτα βάλουμε τα δείγματα σε κλίβανο 30 βαθμών Κελσίου με 75% σχετική υγρασία και κατόπιν της παρασκευής τους τα αναλύσαμε και έχουμε:

Πίνακας 22: Αποτελέσματα σταθερότητας σε διαφορετικές συνθήκες φύλαξης για 7 μέρες

Εμβαδόν εμαμεκτίνης T=0	Εμβαδόν δοραμεκτίνης T=0	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Για 7 μέρες στους 25 βαθμούς κελσίου	Εμβαδόν δοραμεκτίνης Για 7 μέρες στους 5 βαθμούς κελσίου	%Ανάκτηση Για 7 μέρες στους 25 βαθμούς κελσίου	Για 7μέρες στους 5 βαθμούς κελσίου
208994	189453	190148	185288	90,8	92,8

Πίνακας 23: Αποτελέσματα σταθερότητας σε συνθήκες φύλαξης 30 βαθμών Κελσίου με 75% σχετική υγρασία

Εμβαδόν εμαμεκτίνης T=0	Εμβαδόν δοραμεκτίνης T=0	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Για 2 μέρες σε κλίβανο 30 βαθμών με 75% σχετική υγρασία	Εμβαδόν δοραμεκτίνης Για 2 μέρες σε κλίβανο 30 βαθμών με 75% σχετική υγρασία	%Ανάκτηση Για 2 μέρες σε κλίβανο 30 βαθμών με 75% σχετική υγρασία
208994	189453	180148	165288	82,8

7.8 Ανθεκτικότητα (Robustness)

Μελετήθηκε κατά το στάδιο της βελτιστοποίησης των πειραματικών συνθηκών. Οι παράμετροι που κρίθηκαν κρίσιμες είναι οι εξής:

- Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση
- Η συγκέντρωση του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση
- Ο αριθμός των εκχυλίσεων
- Η ποσότητα του χλωριούχο νατρίου στο δείγμα
- Η οξίνιση ή μη του δείγματος και
- Η ψύξη ή μη κατά την διαδικασία προκατεργασίας των δειγμάτων

Πίνακας 24: Μελέτη Ανθεκτικότητας και επίδραση του pH της κινητής φάσης

Εμβαδόν εμαμεκτίνης pH=5	Εμβαδόν εμαμεκτίνης pH=4,8	Εμβαδόν εμαμεκτίνης pH=5,2	%Ανάκτηση pH=4,8	%Ανάκτηση pH= 5,2
230338	228771	236125	99,7	101,4

Παρατηρούμε ότι με βάσει τα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα, η μέθοδος ανάλυσης επιδεικνύει ανθεκτικότητα σε μεταβολή του pH στην κινητή φάση με $\pm 0,2$ μονάδες.

Πίνακας 25: Μελέτη Ανθεκτικότητας και επίδραση της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος της κινητής φάσης

Εμβαδόν εμαμεκτίνης Cbuffer 50mM	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Cbuffer 30mM	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Cbuffer 70mM	%Ανάκτηση Cbuffer 30mM	%Ανάκτηση Cbuffer 70mM
230338	208771	166125	90,1	74,4

Παρατηρούμε ότι με βάσει τα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα, η μέθοδος ανάλυσης δεν επιδεικνύει ανθεκτικότητα σε μεταβολή της συγκέντρωσης του ρυθμιστικού διαλύματος στην κινητή φάση.

Πίνακας 26: Μελέτη ανθεκτικότητας όσον αφορά την επίδραση που μπορεί να έχει η ποσότητα χλωριούχου νατρίου κατά την προκατεργασία

Εμβαδόν εμαμεκτίνης Με προσθήκη 0,5 g NaCL	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Με προσθήκη 2,0 g NaCL	%Ανάκτηση Με προσθήκη 0,5 g NaCL	%Ανάκτηση Με προσθήκη 2,0 g NaCL
227338	218771	99,6	98,4

Με βάση τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα προκύπτει ότι η ποσότητα του χλωριούχου νατρίου δεν έχει ιδιαίτερη επίδραση στην ανάκτηση της μεθόδου, με αποτέλεσμα να κρατήσουμε στη μέθοδο την ποσότητα του 0,5 g NaCL.

Πίνακας 27: Μελέτη ανθεκτικότητας και επίδραση σε αυτήν όσον αφορά τον αριθμό των εκχυλίσεων κατά τη προκατεργασία του δείγματος

Εμβαδόν εμαμεκτίνης Με οξίνιση του δείγματος	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Χωρίς οξίνιση του δείγματος	%Ανάκτηση Με οξίνιση του δείγματος	%Ανάκτηση Με οξίνιση του δείγματος
234027	160771	100,5	80,4

Παρατηρούμε ότι με βάσει τα ανωτέρω πειραματικά δεδομένα, η μέθοδος ανάλυσης δεν επιδεικνύει την ίδια ανάκτηση τόσο με οξίνιση του δείγματος όσο και χωρίς εκχύλιση.

Πίνακας 28: Μελέτη ανθεκτικότητας και επίδραση ή μη της ψύξης κατά την προκατεργασία του δείγματος

Εμβαδόν εμαμεκτίνης Με ψύξη του δείγματος στους -80 βαθμούς	Εμβαδόν εμαμεκτίνης Χωρίς ψύξη του δείγματος	%Ανάκτηση Με ψύξη του δείγματος στους -80 βαθμούς	%Ανάκτηση Χωρίς ψύξη του δείγματος
--	---	---	--

258348	133771	99,3	56,4
--------	--------	------	------

Τέλος, βλέπουμε ότι η μέθοδος επιδεικνύει ανθεκτικότητα σε πολλές παραμέτρους και μόνο σε όσες παραμέτρους βελτίωσαν εντυπωσιακά, η μέθοδος δεν ήταν σημαντικά ανθεκτική.

8. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής έρευνας αναπτύχθηκε μία μέθοδος με HPLC για τον προσδιορισμό της φλουμεκίνης σε σκευάσματα ιχθυοτροφών, όσο και μία μέθοδος LC/MS-MS για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό εμαμεκτίνης σε προϊόντα υδατοκαλλιέργειας. Στόχος, ήταν η δημιουργία 2 μεθόδων με αυξημένη ευαισθησία, εύκολο τρόπο προκατεργασίας, μικρό χρόνο ανάλυσης αλλά πάντα εναρμονισμένες με τη νομοθεσία όσον αφορά τα χαμηλά επίπεδα συγκέντρωσης που απαιτούνται, διότι από ένα όριο και πάνω καθίστανται άκρως τοξικές γεγονός με άμεση επίπτωση τόσο στον άνθρωπο όσο και στο υπόλοιπο βιοσύστημα.

Για την φλουμεκίνη βελτιστοποιήθηκαν παράμετροι όπως:

- Η εκχυλισιμότητα, με αποτέλεσμα την αύξηση απόκρισης και ευαισθησίας
- Μειώθηκε ο χρόνος προκατεργασίας
- Μειώθηκε δραστικά ο χρόνος έκλουσης της φλουμεκίνης με τροποποίηση του προγράμματος βαθμιδωτής έκλουσης

Τα ανωτέρω επιτεύχθηκαν από μία σειρά πειραμάτων και εν συνεχεία ακολούθησε επικύρωση της μεθόδου και μελετήθηκαν οι παρακάτω παράμετροι:

- Γραμμικότητα
- Ακρίβεια
- Πιστότητα
- Όριο Ανίχνευσης
- Όριο Ποσοτικοποίησης

Τα αποτελέσματα των ανωτέρω πειραματικών δεδομένων κρίθηκαν ικανοποιητικά.

Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της εμαμεκτίνης και ως αποτέλεσμα είναι τα παρακάτω:

- Αύξηση ευαισθησίας και απόκρισης της δραστικής
- Μείωση του χρόνου προκατεργασίας και απλοποίηση των παρασκευαστικών
- Χρήση εσωτερικού προτύπου για μείωση της επίδρασης της οργανολογικής αστάθειας στη μέθοδο ανάλυσης
- Μείωση χρόνου έκλουσης

Και πραγματοποιήθηκαν τα αντίστοιχα πειράματα επικύρωσης:

- Γραμμικότητα
- Ακρίβεια
- Πιστότητα
- Ειδικότητα
- Σταθερότητα
- Ανθεκτικότητα
- Όριο ποσοτικοποίησης
- Όριο Ανίχνευσης

Τα αποτελέσματα των ανωτέρω πειραματικών δεδομένων κρίθηκαν ικανοποιητικά και για την εμαμεκτίνη.

Εν κατακλείδι, οι στόχοι που τέθηκαν ανωτέρω, εκπληρώθηκαν . Επομένως η πορεία όλης της πειραματικής διαδικασίας κρίνεται επαρκής, και οι μέθοδοι κρίθηκαν ικανοποιητικές για τη σκοπούμενη χρήση.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 29: Πίνακας ορολογίας με τις αντιστοιχίσεις των ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων

Ξενόγλωσσος Όρος	Ελληνικός Όρος
Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography	Υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης
Capillary Electrophoresis	Τριχοειδής ηλεκτροσφόρηση
Mass Spectrometry	Φασματομετρία μαζών
Linearity	Γραμμικότητα
Accuracy	ακρίβεια
Specificity	ειδικότητα
Stability	σταθερότητα
Post Column Creator	Αντιδραστήρας μετά τη στήλη
Derivatization	παραγωγοποίηση

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους

Πίνακας 30: Πίνακας με ακρωνύμια και τη σημασία τους

HPLC	High Performace Liquid Chromatography
RP-HPLC	Reversed Phase High Performace Liquid Chromatography
SLS	Sodium layryl sulfate
RSD	Relative Standard Deviation
LOQ	Limit of Quantitation
LOD	Limit of Detection
CAN	Acetonitrile
C	concentration
SD	Standard Deviation
MeOH	Methanol
MS	Mass Spectrometry

ΑΝΑΦΟΡΕΣ

1. Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, Εθνικό Συνταγολογόγιο 2018, Κεφάλαιο 5.1, σελίδα 273.
2. Χαράλαμπος Γκούβας: "Αντιμικροβιακά Φάρμακα και Λοιμώξεις", Ιατρικές Εκδόσεις Πασχαλίδης, Αθήνα 1986
3. A.C. Barnes, T.S Hashtings, and S.G.B Amyes, Aquaculture antibacterials are antagonized by sea-water, *Journal of Fish Diseases*, 1995, vol.18, pp. 463-465.
4. http://www.mills.gr/Files/10_4.pdf, 23 Μαΐου 2019.
5. <http://archimedes.teilar.gr/content/ppt/19.ppt>, 23 Μαΐου 2019
6. A.Ledo, C.P. Dopazo, J.L Romalde, A.E Toranzo. and J.L Barja, Effectiveness of different chemotherapeutic agents for controlling bacterial fish diseases, *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 1987, vol 7, pp. 20-22.
7. http://www.selonda.com/selonda.php?show=common/faq.ecm&lft=lft_faq_gr.ecm#1, 24 Μαΐου 2019
8. <http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2009:0162:FIN:EL:PF>, 24 Μαΐου 2019.

9. Z.J. Shao, Aquaculture pharmaceuticals and biologicals: Current perspectives and future possibilities, *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2001, vol.50, pp. 229-243.
10. A. Huet, C. Charlier, S.A. Tittlemier, G. Benrejeb, S. Delahaut, J. Agric. Food Chem. 2006, vol.54, pp.2822 – 2827.
11. 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. Official J. Eur. Commun. 28/11/2001, L 311, 1-66.
12. J. Malvisi, G. Rocca, P. Anfossi, G. Giorgetti, *Aquaculture* 1996, vol.147, pp.159 – 168.
13. K. Iwaki, N. Okumura, M. Yamazaki, *Aquaculture* 2006, vol.253, pp.309 – 316
14. E. Gikas, P. Kormali, D. Tsipi, A. Tsarbopoulos, *Aquaculture pharmaceuticals and biologicals* 2004, vol.52, pp.1025 – 1030
15. J. B. Williams, J. Bullock, M. Carson, *Aquaculture* 2002, vol.205, pp.221 – 230.
16. EU Commission Regulation No. 2377/1990 (1990): Official Journal of European Communities, **L224**: 1–8 (Consolidated version of the Annexes I to IV updated up to 20.01.2008 obtained from www.emea.eu.int) M. Ferding, A. Kaleta, Thanh Vo T.D., W. Buchberger.
17. M.K. Hassouan, O. Ballesteros, A. Zafra, J.L. Vilchez, A. Navalon, Multiresidue method for simultaneous determination of quinolone antibacterials in pig kidney samples by liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 2007, vol.859: pp.282-288,
18. <http://www.virbac.gr/p-virbacgrpubgr/pdf/4AntimicroviakaN.pdf>, 22 Μαΐου 2019.
19. O.B. Samuelsen, and A. Ervik, A single-dose of oxolinic acid and vetoquinol, an oxolinic acid ester, in Atlantic halibut (*Hippoglossus*

hipoglossus L.) held in sea water at 9°C. *Journal of Fish Diseases*, 1999, vol.22, pp. 13-23.

20. Council of the European Communities, Council Regulation No. 90/167/EEC laying down the conditions governing the preparation, placing on the market and use of medicated feedingstuffs in the Community. *Official Journal of the European Communities*, 1990, vol 92, pp. 42-48.
21. K.M Treves-Brown, *Applied fish pharmacology*. Aquaculture Series 3, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 2000 pp.309
22. L.C Jackson , L.A Machado, M.L Hamilton *Quinolonas y terapia antimicrobiana*. *Acta Medic*, 1998, vol. 8.pp. 58-65
23. J.E Maddison, and A.D.J Watson (2002). *Antibacterial drugs*. In: J.E Maddison pp 80-88, S.W,Chuch,D.,eds.,*Small Animal Clinical Pharmacology*.W.B.S
24. WHO (2003). *Toxicological evaluation of certain veterinary drug residues in food* (Prepared by the sixtieth meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives). WHO Food Additives Series, vol. 51, Geneva.
25. Emamectin benzoate: residue study on apples in Spain and Italy.CEMAS, North Ascot, Berkshire, UK. Report No. CEMR-2650, vol.22 June 2006.
26. Emamectin benzoate: residue study on protected salmon fish in Italy and Spain during 2007 and 2008.CEMAS, North Ascot, Berkshire,UK.vol.12 August 2008
27. Emamectin benzoate: storage stability in cotton seed and gin trash stored deep frozen for up to nine months. Syngenta Jealott's Hill International Research Centre, Bracknell, vol.17,pp.257-268
28. Skoog, Holler, Nieman, *Αρχές της Ενόργανης Ανάλυσης*, 2005 ,pp. 844-845, εκδόσεις Κωσταράκης.
29. Ν. Θωμαΐδης, *Σημειώσεις μαθήματος φασματομετρικών τεχνικών*, 23 Μαΐου 2019,

30. I.N. Παπαδογιάννης, Β.Φ. Σαμανίδου, Ενόργανη Χημική Ανάλυση, 2η έκδοση, Πήγασος, Θεσσαλονίκη, 2001.
31. E. Turiel, G. Bordin, A.R. Rodriguez, Determination of quinolones and fluoroquinolones in hospital sewage water by off-line and on-line solid-phase extraction procedures coupled to HPLC-UV. *Journal of Separation Science*, 2005, vol 28: pp.257–267.
32. J. Malvisi, G. Rocca, P. Anfossi, G. Giorgetti, *Aquaculture* 1997, vol.157, pp.197 – 204.
33. E. Roybal, A.P. Pfenning, S.B. Turnipseed, C.C. Walker, J.A. Hurlbut, 1997, vol.80, pp.982–987.
34. M.I.R.M. Santero, N.M. Kassab, A.K. Singh, E.R.M. Hedor-Hackmam Quantitative determination of gatifloxacin, levofloxacin, lomefloxacin and pefloxacin fluoroquinolonic antibiotics in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006, vol.40, pp179–184.
35. V. Samanidou, E. Evaggelopoulos, M. Trotsmuller, X. Guo, E. Lankmayr, Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 2006, vol1203, pp.115–123.
36. A. Juan-Garcia, G. Font, Y. Pico, Determination of quinolone residues in chicken and fish by capillary electrophoresis-mass spectrometry, *Electrophoresis*, 2006, vol 27, pp.2240–2249.
37. F. Canada-Canada, A. Espinosa-Mansilla, A. Jimenez-Giron, A. Munoz de la Pena, Simultaneous Determination of the Residues of Fourteen Quinolones and Fluoroquinolones in Fish Samples using Liquid Chromatography with Photometric and Fluorescence Detection, *Czech Journal of Food Science*, 2008, Vol 30, pp 74-82.

38. B. Del'epine, D. Hurtaud-Pessel, Proceedings of the Euroresidue IV, Veldhoven, The Netherlands, 2000, pp. 350–355.
39. S.M. Plakas, K.R. El-Said, F.A. Bencsath, S.M. Musser, C.C. Walker, J. Quantitative determination of flumequine, oxolinic acid and pefloxacin fluoroquinolonic antibiotics in pharmaceutical preparations by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 1999, vol.40, pp.614–619.
40. A. Juan-García, G. Font, Y. Picó, Determination of 10 quinolones with Electrophoresis, 2006, vol.27, pp.2240 – 2249.
41. D. A. Skoog, F. J. Holler, T. A. Nieman, Αρχές της ενόργανης ανάλυσης, εκδόσεις Κωσταράκης, 2005.
42. E. Hoffmann and V. Stroobant, Mass Spectrometry principles and applications, Third Edition, Wiley, 2007.
43. N. Μαραγκού, Ανάπτυξη μεθόδων προσδιορισμού ενώσεων που προκαλούν ορμονικές διαταραχές με υγροχρωματογραφία-φασματομετρία μάζας, Διδακτορική διατριβή, ΕΚΠΑ, Αθήνα 2010.
44. Mass Spectrometry Fundamental LC-MS Mass Analysers, Chromacademy, 23 May 2019, <http://www.chromacademy.com/mass-spec-training.html>.
45. Manual, Thermo for TSQ
46. Method validation. HPLC-fluorescence method to determine the total toxic residue of emamectine and its metabolites, on vegetables, including leafy vegetables and cole crops. Analytical Research method vol.92-3. Merck.
47. Interim report: 6, 12 and 18 month freezer storage stability of emamectin and metabolites (or degradation products) in leafy vegetables and cole crops. Merck & Co., Rahway, NJ, USA. Study ID 618-244-93698, 15 July, 1994.
48. D. Shang, A. Di Cicco, Nicole Gibbons, M. Dyck and H. Nicolidakis, Determination of emamectin benzoate and other Avermectin Residues in fish feed using LC/MS-MS, , Health Canada. Western Laboratory, 2008

