

VLERËSIMI I DISA FAKTORËVE QË NDIKOJNË NË PERFORMANCËN ANALITIKE TË PËRCAKTIMIT TË AVERMEKTINAVE NË QUMËSHT ME HPLC-FLD

SUZANA KOLA.¹, ELMIRA MEHMETI.¹, NEXHIBE KAPRI.²,
ENKELA BIBA.¹, SUELA TEQJA.¹

¹Instituti i Sigurisë Ushqimore dhe Veterinarisë, Departamenti i Toksikologjisë dhe Monitorimit të Mbetjeve, Tiranë

²Universiteti i Tiranës, Fakulteti i Shkencave të Natyrës, Departamenti i Kimisë
e-mail: kolasuzana@hotmail.com

Përmbledhje

Avermektinat janë një grup komponimesh që përdoren si acaricide dhe paraziticide për trajtimit në kafshë dhe bimë. Është zhvilluar një metodë e shumë mbetjeve me HPLC-Fluo për përcaktimin sasior dhe cilësor të komponimeve fluoeshente të 5 avermektinave (moksidektinë, emamektinë B1a, abamektinë B1a, doramektinë dhe ivermektinë B1a) dhe nemadektina e cila është përdorur si standard i brendshëm në qumështin e lopëve. Metoda përfshin ekstraktimin me acetonitril dhe pastrimin në kolonën më fazë të ngurtë C₁₈. Pas ekstraktimit, avermektinat derivatizohen në komponime fluoeshente si rezultat i reaksionit të N-metilimidazolit me anhidridin e acidit trifluoroacetik. Ndarja realizohet në kolonën Prontosil C₁₈ (150 cm * 2 µm, 5µm) me fazë lëvizëse të përbërë nga acetonitril-tetrahidrofuran-ujë në raportin (68:15:17 v/v/v). Dedektimi bëhet me fluoeshencë, me gjatësi vale eksitimi 365 nm dhe emisioni 455 nm. Gjatë analizimit të avermektinave janë marrë në konsideratë disa faktorë për t'u vlerësuar si operatori, përmbajtja e yndyrës së qumështit, pastërtia e reagentëve ACS apo gradë HPLC-je, koha e tharjes, koha e analizimit të ekstraktit, koha e derivatizimit dhe vialet e injektimit. Disa nga këta faktorë ndikojnë në përcaktimin e avermektinave, tek moksidektina dhe emamektina ndikon përmbajtja e yndyrës. Për ivermektinë dhe doramektinë është pastërtia e reagentëve. Vlerësimi i tyre ndihmon në aplikimin të saktë të metodës.

Fjalëkyçe: Avermektina, HPLC-Fluo, doramektinë, qumësht, stabiliteti.

Abstract

Avermectines are a group of compounds used as acaricides or parasiticides for animal or plants. A multiresidues HPLC-Fluo method was developed for qualitative and quantitative determination of 5 fluorescent avermectines (moxidectine, emamectine B1a, abamectine B1a, doramectine and ivermectine B1a) and nemadectine as internal standard in bovine milk. The method involve the extraction with acetonitrile and purification by C₁₈ solid-phase extraction. After extraction, fluorescent derivatives of avermectines were made by reaction with trifluoroacetic anhydride and N-methylimidazole. Separation was achieved on a Prontosil C₁₈ (150 cm * 2 µm, 5µm) column with a mobile phase composed of acetonitrile-tetrahydrofuran- water (68:15:17 v/v/v). Detection is done by fluorescence, with an excitation of 365 nm and emission of 455 nm. During this study they are taken in account to evaluate different parameter like operator, fat content of milk, reagent ACS or HPLC grade, time of drying, time of analysis of the extract, time of

derivatization and the injection vials. Some of these parameters affect the determination of avermectines. For moxidectine and emamectine, it is the fat content that affects the concentration of it. For ivermectine and doramectine it is the purity of reagents that affects the concentration. Evaluation of these parameters increases the reliability of analytical results.

Key words: Avermectines, HPLC-Fluo, doramectine, milk, stability.

Hyrje

Avermektinat janë produkte natyrale të aktinomiceteve të tokës *streptomyces avermitilis* (Tomlin *et al.*, 1994), që prodhohen nga fermentimi. Avermektinat kanë veti të jashtëzakonshme antiparazitike me një spektër të gjerë efektshmërie në terapi dhe profilakti kundrejt endoparazitëve dhe ektoparazitëve (Campbell, 1983; 1984). Ato lejohen të përdoren në gjedh, derra, kuaj dhe qen. Për shkak të vetive lipofilike të avermektinave, shpërndarja e tyre në organizëm është jo e njëtrajtshme.

Avermektinat janë medikamente natyrale që veprojnë në sistemin nervor, duke shkaktuar bllokimin e transmetimit të impulseve nervore dhe paralizë të muskujve, bllokon transmetimin e aktivitetit elektrik në nerva dhe në muskujt e qelizave jovertebrore, rrit kryesisht efektin e glutamateve, duke shfaqur dhe nxitur kështu efekte të vogla të receptorëve të acidit gama-aminobutirik. Kjo shkakton një fluks të joneve klorur në qelizë, duke çuar në hiperpolarizim dhe paralizë të sistemeve jovertebrore neuromuskulare. Avermektina indukon sekretimin e faktorëve të tumorit Viktorov, (2003) të nekrozës, oksidit nitrik, prostaglandinës E2, dhe rritjen e përqendrimit brenda qelizor të Ca^{2+} . Me rritjen e përqendrimit të kalciumit në brendësi të qelizës kemi çarjen e murit qelizor që çon në vdekjen e qelizave ku ndodhet avermektina.

Avermektinat ekstrahohen kryesisht nga feçet e kafshëve të trajtuara dhe kanë një qëndrueshmëri të gjatë në mjedis (nga disa javë deri në disa muaj). Prej natyrës së tyre lipofilike bëhen të paqëndrueshme sidomos në tokë, ndërsa në kushte të caktuara si i ftohti apo ambientet anaerobe zgjasin qëndrueshmërinë e tyre.

Efektet anësore të këtyre medikamenteve janë zakonisht të përkohshme ndërsa efektet anësore të pakthyeshme janë shumë të rralla dhe ndoshta ndodhin vetëm në raste mbidozimi të konsiderueshëm duke shkaktuar koma, hipotension dhe bllokim të frymëmarrjes. Për këto raste nuk egzistojnë asnjë lloj terapie specifike dhe ka pak të dhëna në lidhje me eko-toksikologjinë (Yang, 2012) dhe qëndrueshmërinë e metabolitëve të avermektinave, por është e sigurt se ato janë të dëmshme për shumë lloje të jovertebrore, shumë të rëndësishme për ruajtjen dhe bilancin e ekosistemeve ujore dhe tokësore.

Kimikisht ato mund të klasifikohen si laktone makrociklike dhe aglikone të makrolidëve (Kolberg, 2009) (p.sh. abamektina, ivermektina, doramektina, eprinomektina dhe moksidektina). Të gjitha avermektinat përmbajnë një

grup hidroksid sekondar dhe terciare lidhur me tetrahidro-4H-benzofuran. Kur avermektinat reagojnë me TFAA në prani të N-metilimidazolit, këto grupe hidrokside mendohen të acetilohen me deacetilimin e ndërmjetëm. Produktet e derivatizimit fluoreshent përmbajnë një unazë aromatike e cila është në lidhje me sistemin e butadienit në unazën makrociklike.

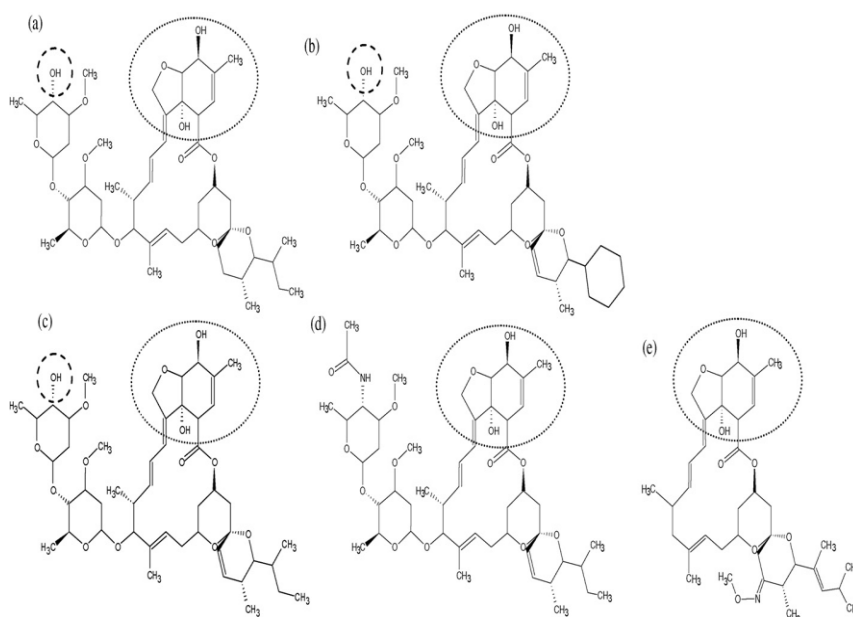


Figura 1 (a) Ivermektina (IVM), (b) doramektina (DOR), (c) abamektina (ABA), (d) eprinomektinë (EPM) dhe (e) moksidektinë (MOX). Prania e grupit të tetrahidrobenzofuranit (rrethuar me pika) dhe grupit hidroksid dytësor në unazën glikozidike (rrethuar me pika).

Për dedektimin e avermektinave janë aplikuar një sërë metodash analitike që përdorin dedektorë të ndryshëm si detektor fluoreshent LC-FLD, ultraviolet LC-UV apo dhe spektrometria e masës LC-MS si dhe aplikimi në ELISA (Raich-Montiu., 2008; Reemtsma., 2013; Campillo, 2013). Shumica e tyre përdorin hapin e derivatizimit ndërkohë që analizohen matrica komplekse siç është qumështi Berendsen, (2007).

Reemtsma *et al.* 2013 ka zhvilluar një metodë në spektrometrinë e masës për përcaktimin e ABA në ujë megjithëse nuk aplikon hapin e derivatizimit. Kohët e fundit, Novelli *et al.* 2012 ka nxjerrë ca studime në lidhje me vlerësimin e toksicitetit të abamektinës në disa organizma. ABA përcaktohet në mënyrë sasiore në tretësirat ujore ku aplikohet një metodë me ekstraktim SPE e ndjekur nga përcaktimi me fluoreshencë (SPE/HPLC-FLD).

Zhvillimi i metodës për përcaktimin e avermektinave në qumësht me (HPLC-FLD), aplikon hapin e derivatizimit. Nisur nga kjo, ky studimi ka qëllim të thellohet më shumë në këtë proces duke marrë në konsideratë faktorët që mund të ndikojnë në kryerjen korrekte të derivatizimit, si dhe

disa faktorë të tjerë që mund të kenë efekt në performancën analitike të metodës.

Materiali dhe metoda

Kjo metodë është e përshtatshme për përcaktimin sasior dhe cilësor të derivateve fluoreshente të avermektinave [abamektinë (ABA B1a), doramektinë (DRM), ivermektinë (IVM B1a), moksidektina (MXD) dhe emamektinë (EMA B1a)] në qumështin e gjedhit. Procedura analitike përfshin: standardin e brendshëm nemadektinë për të gjithë analitët, ekstraktimin lëng-lëng, pastrimin në kolonë SPE-C18, derivatizimin e avermektinave dhe analizimin e tyre në HPLC-Fluo.

Reagentët

Të gjithë reagentët e përdorur gjatë procedurës së ekstraktimit janë me pastërti analitike. Tretësit e përdorur për përgatitjen e fazave të lëvizshme dhe standardevë janë me pastërti HPLC-gradë. Si fazë lëvizëse është përdorur një përzierje acetonitril:tetrahidrofuran:ujë në raportin (68:15:17). Reagentët derivatizues përgatiten të freskët duke përdorur tretësirat 1-metilimidazole/acetonitrile (1:1; v:v) dhe trifluoroacetik anhidër/acetonitril (1:1; v:v). Tretësirat përgatiten dhe ruhen në shishe të errëta.

Standardet

Tretësirat mëmë përgatiten për abamektinën, doramektinën, moksidentinën dhe emamektinën në metanol, ivermektina në dimetilsulfoksid ndërsa nemadektina në metanol. Abamektina në tretësirën mëmë përgatitet në përqendrimin $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ndërsa avermektinat e tjera në përqendrimin $1000 \mu\text{g ml}^{-1}$. Tretësirat e standardevë mëmë ruhen në shishe qelqi të errëta dhe janë të qëndrueshme për të paktën 2 vjet në -20°C . Tretësirat e standardevë të punës janë të qëndrueshme për të paktën 1 vit ruhen në ngrirje në -20°C . Ndërsa standardet e punës në përqendrime $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ për gjysmë viti nëse ruhen në ngrirje në -20°C . Këto tretësira standarde përdoren për të ndotur mostrat e qumështit si dhe për të gjeneruar lakoren analitike të kalibrimit.

Tretësirat standarde të punës përgatiten të freskëta për çdo seri mostrash duke marrë nga standardi $0.1 \mu\text{g ml}^{-1}$ vëllimet 10, 50 dhe $100 \mu\text{l}$ si dhe nga standardi $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ vëllimet 20, 50, 100 dhe $150 \mu\text{l}$ që i korrespondojnë përkatësisht përqendrimeve 1, 5, 10, 20, 50, 100 dhe $150 \mu\text{g l}^{-1}$.

Instrumenti

Matjet analitike kryhen në HPLC Agilent të serisë 1200 e lidhur me pompën, autosamplerin dhe detektorin e fluoreshencës. Ndarja realizohet në kolonën Prontosil C18 ($150 \text{ cm} \times 2 \mu\text{m}, 5 \mu\text{m}$) me fazë lëvizëse të përbërë nga acetonitril-tetrahidrofuran-ujë në raportin (68:15:17 v/v/v) në prurje 0.6 ml min^{-1} . Temperatura e kolonës mbahet në 40°C . Vëllimi i injektimit është $10 \mu\text{l}$ dhe koha e rrjedhjes është 40 min. Dedektimi bëhet me fluoreshencë, me gjatësi vale eksitimi 365 nm dhe emisioni 455 nm. Përpunimi i të dhënave

dhe integrimi i kromatogramave realizohet duke përdorur programin Chemstation të Agilent Technologies.

Ekstraktimi i mostrave dhe pastrimi në kolonë SPE

Për ekstraktim peshohet 1 g mostër qumështi në tub centrifuge 50 ml. Shtohet sasia përkatëse e standardit të brendshëm në të gjitha mostrat dhe secila homogjenizohet në vorteks për të paktën 10 minuta. Më pas shtohet 1.5 mL acetonitril dhe homogjenizohen. Centrifugohen për 10 minuta në 4000 rpm në 4°C. Faza organike kalohet plotësisht në kolonën SPE 500 mg, 6 ml. Kolona kondicionohet me 5 ml metanol dhe ekuilibrohet me 5 ml ujë. Larja e kolonës pas kalimit të fazës organike realizohet me 2 ml ujë dhe 1 ml tretësirë metanol:ujë (3:1; v:v). Pas tharjes së kolonës prej 25 minutash komponimet eluohen me 2.5 ml metanol. Eluati avullohet deri në tharje të plotë në një rrymë azoti në temperaturën 40°C dhe është gati për t'iu nënshtruar procedurës së derivatizimit.

Derivatizimi

Treten mbetjet e standardeve kalibruese dhe mostrave në 100 µl 1-metilimidazole/acetonitrile (1:1; v:v) dhe përzihen për 10 sekonda. Shtohet 100 µl trifluoroacetik anhidër/acetonitril, (1:1; v:v) përzihen për të paktën 10 sekonda dhe lihen për 1 min për t'u derivatizuar. Pas 15 minutash në errësirë 20 µl injektohen në HPLC-Flid.

Vlerësimi i faktorëve

Fillimisht individualizohen faktorët (variablat) të cilët nuk duhet të influencojnë në mënyrë domethënëse në rezultatitn përfundimtar nga ndryshime që mund të ndodhin gjatë procesit të kryerjes së analizës.

Me plus identifikohen faktorët që potencialisht mund të influencojnë rezultatitn e analizës nëse vlerat e tyre të emëruara do të ndryshonin lehtësisht me ato të përshkruara më sipër në procedurën e ekstraktimit. Me minus (-) identifikohen faktorët alternativë.

Tabela 1 Kodimi i parametrave ku do studiohet stabiliteti i avermektinave.

Faktorë	Kodi	(+)	(-)
Operatori	A	A	B
Yndyra	B	E ulët	E lartë
Pastërtia e tretësve	C	Gradë HPLC-je	Gradë ACS-je
Filtrimi dhe tharja	D	30 minuta	60 minuta
Ruajtja e ekstraktit pas hollimit me metanol	E	Gjatë gjithë natës	Ekstrakti nuk ruhet
Derivatizimi	F	15 minuta në errësirë	Derivatizimi direkt
Vialet e injektimit	G	Viale qelqi	Viale plastike.

Ideja bazë nuk është studimi i të gjitha ndryshimeve më vete por të analizohen njëkohësisht shumë variacione. Nga kombinimi i këtyre shtatë faktorëve krijohet një bashkësi prej 8 kombinimesh duke kryer kështu 8 eksperimente që do të realizohen në tre mostra paralele.

Tabela 2 Karakteristikat dhe parametrat ku do studiohet secila mostër.

Faktorë	Karakteristikat	
(A)	-operatori A -mostra pa yndyrë -derivatizimi për 15 minuta në errësirë -tretësit e përdorur janë me gradë HPLC	-tharja realizohet për 30 min -injektimi në vialë qelqi -ruajtja e ekstraktit gjatë gjithë natës
(B)	-operatori B -mostra me yndyrë -derivatizimi për 15 minuta në errësirë -tretësit e përdorur janë me gradë ACS	-tharja realizohet për 60 minuta -ruajtja e ekstraktit gjatë gjithë natës -injektimi në vialë qelqi
(C)	-operatori A -mostra me yndyrë -derivatizimi i menjëhershëm -tretësit e përdorur janë me gradë HPLC	-tharja realizohet për 60 minuta -ruajtja e ekstraktit 0 ditë -injektimi në vialë qelqi
(D)	-operatori B -mostra pa yndyrë -derivatizimi i menjëhershëm -tretësit e përdorur janë me gradë ACS	-tharja realizohet për 30 minuta -ruajtja e ekstraktit 0 ditë -injektimi në vialë qelqi
(E)	-operatori A -mostra me yndyrë -derivatizimi për 15 minuta në errësirë -tretësit e përdorur janë me gradë ACS	-tharja realizohet për 30 minuta -ruajtja e ekstraktit 0 ditë -injektimi në vialë plastike
(F)	-operatori B -mostra pa yndyrë -derivatizimi për 15 minuta në errësirë -tretësit e përdorur janë me gradë HPLC	-tharja realizohet për 60 minuta -ruajtja e ekstraktit 0 ditë -injektimi në vialë plastike
(G)	-operatori A -mostra pa yndyrë	-tharja realizohet për 60 minuta -ruajtja e ekstraktit gjatë gjithë

	-derivatizimi i menjëhershëm -tretësit e përdorur janë me gradë ACS	natës -injektimi në viale plastike
(H)	-operatori B -mostra me yndyrë -derivatizimi i menjëhershëm -tretësit e përdorur janë me gradë HPLC	-tharja realizohet për 30 minuta -ruajtja e ekstraktit gjatë gjithë natës -injektimi në viale plastike

Rezultatet dhe diskutime

Analiza statistikore e rezultateve kryhet duke llogaritur efektin e secilit faktor. Llogaritet diferenca në vlerë absolute ndërmjet mesatares së tre rezultateve të provave në të cilat ky faktor në nivelin (+) me mesataren e tre rezultateve të provave në nivelin (-).

$$t_{\text{-eksp}} = \frac{|\text{mesatarja e shumës efekteve (+)} - \text{mesatarja e shumës(-)}|}{\text{Devijimi total i standartit}}$$

Për të vlerësuar parametrin nëse ndikon apo jo në analizimin e avermektinave do të zbatohet kriteri i $t_{\text{-studentit}}$. Vlerat tabelare për n-1 gradë lirie dhe probabilitet 95% është 2.44. Ndërsa vlerat eksperimentale të kriterit të studentit për gjithë substancat si dhe efektet e gjithë secilit parametër që është marrë në studim janë llogaritur si rrënja katrore e diferencës në vlerë absolute e mesatareve të efektit potencial (+) dhe alternativ (-) pjesëtuar me shmangien standarde të efektit total.

Tabela 3. Rezultatet e vlerave eksperimentale të kriterit të studentit për secilën avermektinë.

	Abamekti në (ABA B1a)	Doramekti në (DRM)	Ivermekti në (IVM B1a)	Moksidekt in (MXD)	Emamekti në (EMA B1a)
Operatori	0.43	0.51	0.29	0.62	0.97
Yndyra	0.15	0.02	0.14	3.09	1.38
Pastërtia e tretësve	2.17	2.75	3.30	0.71	1.20
Filtrimi dhe tharja	1.54	1.01	0.89	1.10	0.80
Ruajtja e ekstraktit pas hollimit	0.77	0.64	0.44	0.33	0.56

Derivatizimi	0.39	0.26	0.25	0.60	1.38
Vialet e injektimit	0.93	1.15	1.15	0.05	0.52

Pas përpunimit të rezultateve shihet se shumica e faktorëve nuk ndikojnë gjatë studimit të stabilitetit të avermektinave megjithëse në disa raste këto faktorë janë thelbësorë.

Që të kemi një performancë sa më të mirë analitike të përcaktimit të avermektinave në qumësht duhet të kemi parasysh që fillimisht të largohet yndyra sepse ka ndikim potencial në përcaktimin e moksidektinës dhe emamektinës. Një faktor tjetër potencial që ndikon në uljen e cilësisë së analizës është pastërtia e tretësve që përdoren në ekstraktim dhe derivatizim pasi përmbajtja e ujit ndikon në procesin e derivatizimit. Ky faktor është sinjifikativ në rastin e doramektinës dhe ivermektinës por ky faktor është i pranishëm edhe në përcaktimin e abamektinës dhe emamektinës ndonëse nuk është sinjifikativ.

Studimi i faktorit filtrim/tharje tregon që ndikimi i tij nuk është sinjifikativ por vlerat e larta të t_{eksp} tregojnë që duhet të jemi të vëmendshëm në këtë pikë të ekstraktimit. Një faktor tjetër që nuk duhet ta anashkalojmë është edhe përdorimi i vialeve, edhe pse plastiket nuk demonstrojnë vlera sinjifikative të t_{eskp} ato kanë një farë ndikimi ndaj dhe preferohet të përdoren viale qelqi të errëta.

Hapi i derivatizimit është i thjeshtë dhe i menjëhershëm por duhet treguar kujdes që të përdoren viale të errëta dhe të ruhen në -20°C nëse nuk analizohen brenda ditës. Derivatizimi i analitëve i nënshtrohet degradimit për shkak të temperaturës dhe dritës ndaj studimi i stabilitetit të avermektinave është bërë në viale qelqi të errëta për të shmangur degradimin nga drita po ashtu në instrument është fikur drita e autosampler-it dhe është vënë në temperaturën 10°C . Njëkohësisht u studiua koha e qëndrimit në errësirë për disa minuta dhe injektimi i menjëhershëm dhe u vu re që nuk ka ndryshime të dukshme.

Përfundime

Rezultatet e paraqitura në këtë studim lejon përcaktimin e 5 avermektinave me një metodë të thjeshtë dhe efikase. Përcaktimi sasior i tyre me detektorin e fluoreshencës e bën këtë metodë shumë selektive dhe sensitive për shkak të niveleve shumë të ulëta të dedektimit deri në 1 ng ml^{-1} . Ky studim nxjerr në pah faktorët që duhet të konsiderohen përpara fillimit të procedurës së ekstraktimit të avermektinave në qumështin e gjedhit.

Literatura

Tomlin C. (1994): Pesticide manual. 10th Edition. Crop Protection Publications, Farnham: 4

Campbell W. C., Fisher M. H., Stapley E. O., Albers-Schonberg G., Jacob T. A. (1983): Ivermectin: A potent new antiparasitic agent. *Science*; 221; 823-828

Campbell W. C., Benz G. W.(1984): Ivermectin: A review of efficacy and safety. *J Vet Pharmacol. Ther* 7: 1-16

Viktorov A. V.; Yurkiv V. A. (2003): Effect of ivermectin on function of liver macrophages: *Bulletin of experimental biology and medicine*. 136 (6): 569–71

Yang C. C. (2012): Acute human toxicity of macrocyclic lactones: *Current Pharmaceutical Biotechnology*. 13(6): 999–1003

Kolberg D. I. S., Presta M. A., Wickert C., Adaime M. B., Zanella R. (2009): Rapid and accurate simultaneous determination of abamectin and ivermectin in bovine milk by high performance liquid chromatography with fluorescence detection: In *J. Braz. Chem. Soc.* vol. 20 no.7 São Paulo

Raich-Montiu, J., Krogh K.A., Granados, M., Jönsson, J.Å. and Halling-Sørensen, B. (2008): Determination of ivermectin and transformation products in environmental waters using hollow fibre-supported liquid membrane extraction and LC-MS/MS: *Journal of Chromatography A*, 1187: 275-280

Reemtsma, T., Aldera, L. and Banasiak, U. (2013): A Multimethod for the Determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography-mass spectrometry: *Journal of Chromatography A*, 1271: 95-104

Campillo, N., Viñas, P., Férez-Melgarejo G., Hernández-Córdoba M. (2013): Dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of macrocyclic lactones in milk by liquid chromatography with diode array detection and atmospheric pressure chemical ionization ion-trap tandem mass spectrometry: *Journal of Chromatography A*, 1282: 20-26

Berendsen, B. J. A., Mulder, P. P. J. Van Rhijn H. J. A. (2007): The derivatisation of avermectins and milbemycins in milk: new insights and improvement of the procedure: *Analytica Chimica Acta*, 585: 126-133