

## TRABAJOS ORIGINALES

# COMPARACION DEL METODO MICROBIOLOGICO CON CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCION (HPLC) EN LA DETECCION DE RESIDUOS DE QUINOLONAS Y FLUROQUINOLONAS EN MUSCULO DE PECES SALMONIDEOS

Betty San Martín,  
Hernán Cañón,  
Alejandra Quiróz  
y Patricia Hernández\*.

## COMPARISON OF A MICROBIOLOGICAL ASSAY WITH HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY (HPLC) FOR THE DETECTION OF QUINOLONES AND FLUROQUINOLONES RESIDUES IN SALMONIDS MUSCLE.

### SUMMARY

*A comparison between a microbiological assay and HPLC for the detection of enrofloxacin, oxolinic acid and flumequine residues in salmon muscle was studied. The limit of detection of the microbiological assay for enrofloxacin, oxolinic acid and flumequine was 10, 40 and 300 ppb, respectively and HPLC was 5 ppb for all the drugs studied. These sensitivities were lower than those described previously. The main difference for the microbiological assay and HPLC could relate to the indicator organism concentration and the aliquot injected, respectively. The results suggest that the microbiological assay could be used as screening with a confirmatory method by HPLC within a residue monitoring program for these drugs.*

**Keywords:** HPLC, microbiological assay, quinolones, residuos.

**Palabras clave:** HPLC, método microbiológico, quinolonas, residuos

### INTRODUCCION

La salmonicultura en Chile ha experimentado un fuerte crecimiento en los últimos años, convirtiéndose en el segundo productor a nivel mundial (Banco Central de Chile, 1998). Esta rápida expansión de la industria acuícola ha sido acompañada de un incremento en las enferme-

dades de origen bacteriano, situación que también ha ocurrido en otros países. Las estrategias para combatir estas enfermedades suponen prácticas de manejo, vacunaciones y terapias con drogas antibacterianas. Hoy, existen pocas vacunas disponibles comercialmente frente a los patógenos bacterianos de peces, por lo que el uso de quimioterápicos sigue siendo la herramienta terapéutica más importante. Los antibióticos más utilizados en salmonicultura son oxitetraciclina, quinolonas, fluoroquinolonas y sulfonamidas (Canadian Aquaculture Institute, 1998).

\* Laboratorio de Farmacología,  
Departamento de Ciencias Clínicas.  
Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias.  
Universidad de Chile. Av. Santa Rosa 11735.  
Correo 2 Casilla 15. La Pintana. Santiago. Chile.

El uso masivo de antimicrobianos no solo incrementa la aparición de resistencia bacteriana, sino que también, la posibilidad de generar residuos de antibióticos en el producto final, sobre todo si no se respetan los períodos de resguardo recomendados por las industrias farmacéuticas.

Diversos estudios, han puesto de manifiesto que entre los principales problemas en salud pública que generan los residuos de antibióticos en productos de origen animal, figuran las reacciones anafilácticas, alteraciones de la flora intestinal humana y alteraciones tóxicas específicas. En el caso particular de las quinolonas y fluoroquinolonas, los perfiles toxicológicos incluyen artropatía en animales juveniles, nefropatía, efectos en el sistema nervioso central, toxicidad ocular, alteraciones de la espermatogénesis, interacciones metabólicas con drogas, efectos cardiovasculares, posible mutagenicidad y fotosensibilidad (Gough y col., 1985; Smith, 1986; Stalhmam y Lode, 1989).

Lo anteriormente señalado, ha generado que diversas organizaciones internacionales normen sobre los Límites Máximos Residuales (LMR) de antibióticos en los diferentes alimentos de origen animal, con el fin de incrementar la seguridad hacia el consumidor y permitir el libre comercio de estos productos entre los países. Es por ello que se hace necesario que existan metodologías analíticas estandarizadas que sirvan para la detección de residuos de antibióticos en diferentes matrices de origen animal.

Existen una gran cantidad de métodos analíticos para la determinación de residuos de quinolonas y fluoroquinolonas en salmónidos. Métodos cualitativos y de bajo costo que sirven como primer "screening" como los micro-biológicos y métodos cuantitativos y confirmativos como HPLC; ambos ocupados por diferentes países dentro de programas de control de residuos de antibióticos en salmonicultura (Boe y Lunestad, 1996; Koenen-Dierick y col, 1997). El objetivo del presente trabajo, es comparar la sensibilidad del método microbiológico con HPLC para la detección de residuos de ácido oxolínico, enrofloxacina y flumequina en músculo de salmón, incluido piel en proporciones naturales.

## MATERIALES Y METODO.

### Agentes antimicrobianos:

Los agentes antimicrobianos ensayados fueron enrofloxacina (99.12% droga activa; Bayer Chile), flumequina (100% droga activa, Sigma y ácido oxolínico (100% droga activa, Sigma). Se prepararon soluciones stock de 1000 ug/ml de droga activa usando NaOH 0,1 N y mantenidas a 4°C por 1 mes. Las diferentes concentraciones de drogas para los ensayos se prepararon diariamente utilizando agua destilada para el método microbiológico y fase móvil para HPLC. Las concentraciones de trabajo fueron:

Enrofloxacina: 160-80-40-20-10-5 ppb

Ácido oxolínico: 600-300-160-80-40-20-10-5 ppb

Flumequina: 5000-2500-1200-600-300-160-80-40-20-10-5 ppb

Matriz: Para los ensayos se utilizo músculo de salmón libre de antimicrobianos, incluido piel en proporciones naturales como lo indica el European Committee for Veterinary Medicinal Products, CVMP (1997). Las matrices fueron homogeneizadas en un triturador de carne, utilizándose 300 mg para los análisis microbiológicos y 3 g para los análisis cromatográficos.

### Método microbiológico:

Se utilizó una modificación del método microbiológico en alimentos de la A.O.A.C. (1984). El organismo indicador utilizado fue una suspensión de esporas de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (2.5 x 10<sup>6</sup> esporas/ml, Difco) sembrados en medio de cultivo 11 (A.O.A.C., 1990), ajustado a pH 6, a una concentración final de 3000 esporas/ml de agar preparadas en placas petri de 100 x 15 mm. Sobre las placas se colocaron aproximadamente 300 mg de músculo de salmón con piel, fortificado con las concentraciones de trabajo de cada antibiótico. Las placas se incubaron a 37°C por 24 horas y las zonas de inhibición fueron medidas usando un vernier de precisión. Para controlar la inter-variabilidad del ensayo se utilizo un sensidisco control de enrofloxacina (10 mcg) con un halo de inhibición promedio de 1.4 ± 0.1 cm.

### **Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC):**

Los análisis se realizaron usando una bomba Waters 510, autosampler Waters 727 plus con detector de Fluorescencia Waters 474. La metodología utilizada para la detección de ácido oxolínico y flumequina mediante HPLC fue la descrita por Hormazabal e Yndestad (1994), modificando la fase móvil a una proporción de ácido fosforico 0.002M / acetonitrilo / tetrahydrofurano de 68:17:15. Para enrofloxacin se utilizó la técnica descrita por Hormazabal, y col. (1991) modificando también la mezcla de la fase móvil quedando en una proporción de ácido fosfórico 0.002M/acetonitrilo/metanol de 76:16:8. En ambos casos se modifico la alícuota inyectada a la columna de HPLC, siendo esta de 100 µl. El detector fue utilizado a una longitud de onda de excitación de 278 nm y emisión de 440 nm para enrofloxacin. En el caso de ácido oxolinico y flumequina la longitud de onda de excitación y emisión fueron de 325 nm y 360 nm, respectivamente. La columna analítica (4.6x250 mm) y la precolumna (3.9x20mm) fueron empacadas con dimethyloctadecylsilyl sílica de 5 µm (Waters Corporation, Milford, MA, USA).

Para los análisis se tomaron 3 g de músculo de salmón con piel incluida, y se le añadió un volumen de antibiótico capaz de lograr las concentraciones de trabajo señaladas para cada antibiótico. Para controlar la inter variabilidad del ensayo se utilizaron concentraciones de referencia de 40 ppb. El porcentaje de recuperación por HPLC fue determinada comparando las concentraciones de los tejidos fortificados con aquellas de las soluciones estandares .

#### **Análisis de Resultados:**

Para definir el límite de detección por el método microbiológico se definió como positivas las muestras fortificadas con antibiótico que dieron un halo de inhibición mayor a  $1,2 \pm 0,1$ cm (Commission of the European Communities, 1997; San Martin y Moraga, 1996). Para definir el límite de detección por HPLC se considero la relación señal ruido del cromatograma (Food and Drug Administration, 1997; European Medicinal Evaluation Agency, 1998). La linealidad de

ambos métodos se obtuvo siguiendo las recomendaciones entregadas por la Food and Drug Administration (1997). Con este fin cada concentración de trabajo se repitió 10 veces para el método microbiológico y 5 veces para el método cromatografico, obteniéndose el promedio, desviación estándar y coeficiente de correlación para cada concentración. Con el promedio de los halos de inhibición expresados en cm (método microbiológico) y con el promedio de las áreas cromatograficas (HPLC) versus las diferentes concentraciones de antibióticos probadas para cada antibiótico, se realizo el Análisis de Regresión Lineal obteniéndose el coeficiente de correlación ( $r^2$ ) de ambos métodos.

### **RESULTADOS**

El límite de detección obtenido por el método microbiológico para enrofloxacin y ácido oxolínico fue de 10ppb y 40 ppb, respectivamente, pudiendo sólo detectarse concentraciones de 300ppb para flumequina (Cuadro 1).

El límite de detección por HLPC para las tres drogas analizadas fue de 5ppb (Cuadro 1). La relación señal ruido para la enrofloxacin fue de 7.2, 1.7 y 4.9 en los tiempos 5.80, 6.18 y 6.74, que es donde se observaron señales de interferencia en los blancos. Para ácido oxolínico y flumequina no se observaron señales de interferencia en los tiempos de retención para cada droga. En la figura 1 se observan los cromatogramas de las matrices de salmón incluido piel (A y B), sin antibiótico.

Los tiempos de retención fueron de  $4.68 \pm 0.16$  para enrofloxacin (A) y sin  $7.28 \pm 0.08$  y  $14.09 \pm 0.32$  para ácido oxolínico y flumequina (B). Ambos cromatogramas se observan en la figura 2.

El porcentaje de recuperación fue de 65, 70 y 60% para enrofloxacin, ácido oxolínico y flumequina, respectivamente.

En los cuadros 2, 3 y 4 se observan los resultados expresados en cm (método microbiológico) o áreas (HPLC), obtenidos para las diferentes concentraciones de enrofloxacin, ácido oxolínico y flumequina, respectivamente. En las tablas se señalan además el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), que fluctuaron entre

0.864 y 0.998, para cada droga según el método utilizado.

### DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los límites de detección para enrofloxacin y ácido oxolinico obtenidos por el método microbiológico utilizando *Bacillus subtilis* ATCC 6633 como organismo indicador, fueron semejantes a las descritas en otros estudios (Boe y Lunestad, 1996; Pearson e Inglis, 1993; Bowser y Babish, 1991; Stoffnegern y col., 1993). Sin embargo, es importante destacar que las concentraciones mínimas detectadas en nuestro trabajo fueron menores a 10 ppb y 40 ppb para enrofloxacin y ácido oxolinico, respectivamente. Estas diferencias se pueden atribuir a varias

razones. Si comparamos nuestra metodología analítica con Boe y Lunestad (1996), la principal diferencia esta relacionada con el organismo indicador seleccionado, ya que ellos utilizaron en la detección de quinolonas *Escherichia coli* ATCC 11303. A su vez, si analizamos el trabajo de Pearson e Inglis (1993), quienes utilizaron al igual que nosotros *Bacillus subtilis* ATCC 6633, la principal variable está relacionada con la concentración de esporas por ml de agar, donde ellos utilizaron entre 40 a 80 veces más esporas/ml de medio que nosotros, haciéndonos suponer que la capacidad del antibiótico para inhibir el crecimiento bacteriano está relacionado con la concentración de éste en el medio.

LIMITES DE DETECCIÓN (I) DEL MÉTODO MICROBIOLÓGICO Y HPLC PARA ENROFLOXACINA, ÁCIDO OXOLÍNICO Y FLUMEQUINA.		
CUADRO N° 1		
Antibiótico	Límite de detección (ppb)	
	HPLC	Método Microbiológico
Enrofloxacin	5	10
Acido oxolinico	5	40
Flumequina	5	300

RESULTADOS DE ENROFLOXACINA ANALIZADA POR EL MÉTODO MICROBIOLÓGICO Y HPLC OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACION						
CUADRO N° 2						
Concentración	Método microbiológico n=10			HPLC n=5		
	Promedio halo(cm)	Desviación estandar	Coficiente de variación	Promedio areas cromatográficas	Desviación estandar	Coficiente de variación
160 ppb	2.0	0.07	3.5	NA	NA	NA
80 ppb	1.8	0.05	2.7	1154106	65432	5.6
40 ppb	1.7	0.09	5.2	573761	53733	9.3
20 ppb	1.7	0.05	2.9	279066	10131	3.6
10 ppb	1.5	0.07	4.6	191729	5699	2.9
5 ppb	ND	ND	ND	91707	475	4.8
r <sup>2</sup>	0.941			0.998		
ND: no detectado. NA: no analizado.						

**CUADRO  
Nº 3****RESULTADOS DE ACIDO OXOLINICO ANALIZADO  
POR EL MÉTODO MICROBIOLÓGICO Y HPLC  
OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACION .**

Concentración	Método microbiológico n=10			HPLC n=5		
	Promedio halo(cm)	Desviación estandar	Coefficiente de variación	Promedio areas cromatográficas	Desviación estandar	Coefficiente de variación
600 ppb	2.2	0.06	2.7	NA	NA	NA
300 ppb	2.2	0.04	18	NA	NA	NA
160 ppb	1.8	0.06	3.3	NA	NA	NA
80 ppb	1.6	0.04	2.5	109647	9682	8.8
40 ppb	1.4	0.06	4.2	58522	4745	8.1
20 ppb	ND	ND	ND	35455	2619	7.3
10 ppb	ND	ND	ND	21336	1780	8.3
5 ppb	ND	ND		14336	1364	9.5
r <sup>2</sup>		0.866			0.999	
ND: no detectado. NA: no analizado.						

**CUADRO  
Nº 4****RESULTADOS (HALOS O AREAS) DE RUMEQUINA  
POR EL MÉTODO MICROBIOLÓGICO (CM)Y HPLC (AREAS)  
OBTENIDOS PARA CADA CONCENTRACION ANALIZADA.**

Concentración	Método microbiológico n=10			HPLC n=5		
	Promedio halo(cm)	Desviación estandar	Coefficiente de variación	Promedio areas cromatográficas	Desviación estandar	Coefficiente de variación
5000 ppb	2.6	0.14	5.3	NA	NA	NA
2500 ppb	2.1	0.06	2.8	NA	NA	NA
1200 ppb	2.0	0.11	5.5	NA	NA	NA
600 ppb	1.6	0.07	4.3	NA	NA	NA
300 ppb	1.2	0.11	9.1	NA	NA	NA
160 ppb	ND	ND	ND	NA	NA	NA
80 ppb	ND	ND	ND	156305	6468	4.1
40 ppb	ND	ND	ND	82533	7133	8.6
20 ppb	ND	ND	ND	36076	2602	7.2
10 ppb	ND	ND	ND	20798	1503	7.2
5 ppb	ND	ND	ND	14360	814	5.6
r <sup>2</sup>		0.983			0.988	
ND: no detectado. NA: no analizado.						

En el caso particular de flumequina, nuestros resultados concuerdan con los de Boe y Lunestad, (1996) aun cuando se utilizaron diferentes organismos indicadores. Al analizar los límites de detección por HPLC para ácido oxolínico y flumequina, estos fueron mas bajo a los descritos por Hormazabal e Ynestad (1994). La principal diferencia realizada en este trabajo fue la alícuota inyectada a la columna (100 µl). De hecho, Hormazabal e Ynestad señalan que la sensibilidad puede ser mejorada al inocular una mayor cantidad de muestra. Estos investigadores inyectando alícuotas de 25µl obtuvieron límites de detección de 30 y 35 ppb para ácido oxolínico y flumequina, respectivamente; en el presente trabajo inyectando alícuotas de 100 µl el limite de detección fue de 5 ppb para ambas drogas. Para enrofloxacin, la sensibilidad alcanzada (5ppb), concuerdan con la descrita por Hormazabal y col. (1991).

Nuestros resultados confirman que la metodología por HPLC es, debido a su sensibilidad y especificidad, el mejor método para la detección de residuos de quinolonas en músculo de salmón. Al respecto, la FDA señala que los métodos de detección de residuos de estas drogas en salmónidos deben ser capaces de detectar valores entre 1 y 10 ppb (Federal Joint Subcommittee on Aquaculture, 1994). Sin embargo, no se puede descartar a los métodos microbiológicos que tradicionalmente son usados como screening para el análisis de residuos de drogas antimicrobianas, sobre todo si se considera que estos son métodos simples, rápidos y relativamente baratos. Los métodos cromatograficos, debido a la lentitud de los procedimientos de clean-up de las muestras, previo al análisis, tienen una capacidad de entrega de resultados limitada.

La decisión de cual metodología analítica seleccionar para un monitoreo de residuos de drogas antimicrobianas depende de los Límites Máximos Residuales (LMR) definidos por las diferentes organizaciones internacionales, ya que ellas incrementan la seguridad al consumidor y permiten el libre movimiento de productos de origen animal. Así por ejemplo FAO/OMS (1997), sugiere que los LMR para flumequina deberían ser de 500 ppb en músculo de especies salmonídeas. En la medida que los países opten por estas recomendaciones, se da la posibilidad

de utilizar los métodos microbiológicos como screening con mayor seguridad. Situación similar podría ocurrir para ácido oxolínico. Debe tenerse presente que existe un creciente interés mundial para armonizar los diferentes aspectos relacionados con el uso de sustancias químicas en animales de producción, entre los cuales se consideran los LMRs para las diferentes drogas (Jones, 1997).

En el caso de enrofloxacin, a la fecha solo se han definido los LMR.s para músculo de aves, porcinos y bovinos siendo estos de 30 ppb. Al respecto, Vandaele (1997), sugiere que en orden de sostener la producción de peces en Europa, un LMR obtenido para al menos un especie animal productora de alimento, podría ser extendido a todas las especies. De ser esto cierto, los métodos microbiológicos podrían también ser implementados como screening. Finalmente, debemos considerar que la población humana no solo necesita una mayor cantidad de productos alimenticios, en especial aquellos de origen animal, sino que además, éstos deben ser inocuos a la salud humana. Así, el presente trabajo contribuye a los continuos esfuerzos de estandarizar metodologías analíticas para la detección de residuos de antibióticos en productos de origen animal, especialmente en aquellos derivados de la industria acuícola.

## RESUMEN

Las quinolonas y fluoroquinolonas son un grupo de antimicrobianos de gran uso en la salmonicultura, por lo cual dentro de los sistemas de manejo de estos quimioterápicos está el respetar los tiempos de carencia, con el fin de asegurar que el producto final llega sin residuos de estos medicamentos a la población humana.

Dentro de los métodos de detección de residuos de ácido oxolínico, flumequina y enrofloxacin están los microbiológicos y los químicos (Cromatografía Líquida de Alta Resolución), ambos con diferentes límites de detección.

Se planteó como objetivo comparar ambos métodos y ver su sensibilidad en relación a las exigencias internacionales.

El límite de detección del método microbio-

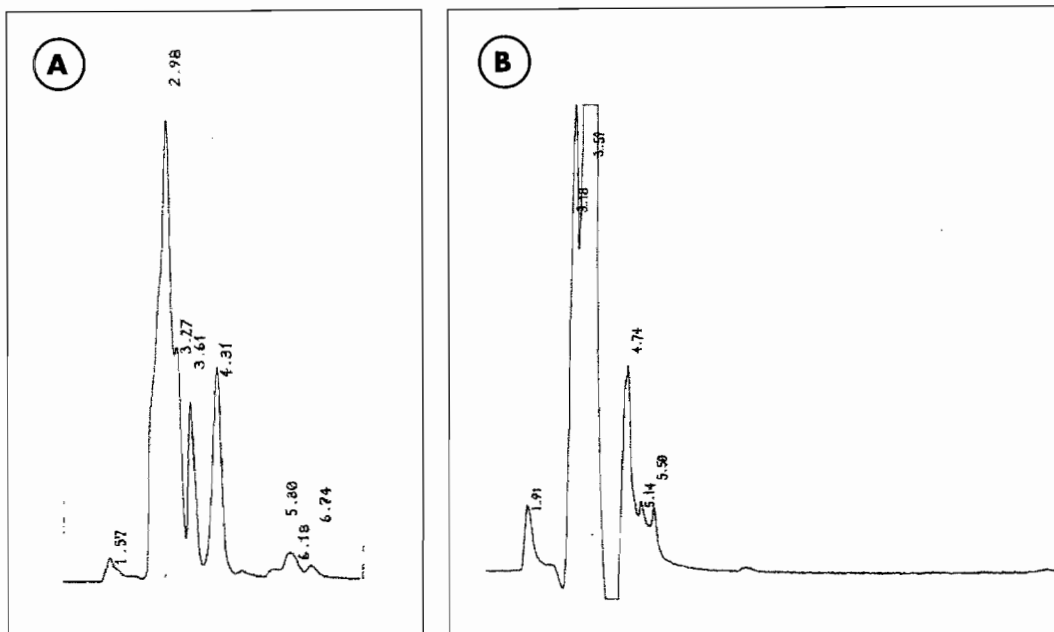


Figura 1 Cromatogramas de músculo de salmón incluido piel, libre de antibióticos. Blanco para enrofloxacin (A). Blanco para ácido oxolínico y Flumequina (B).

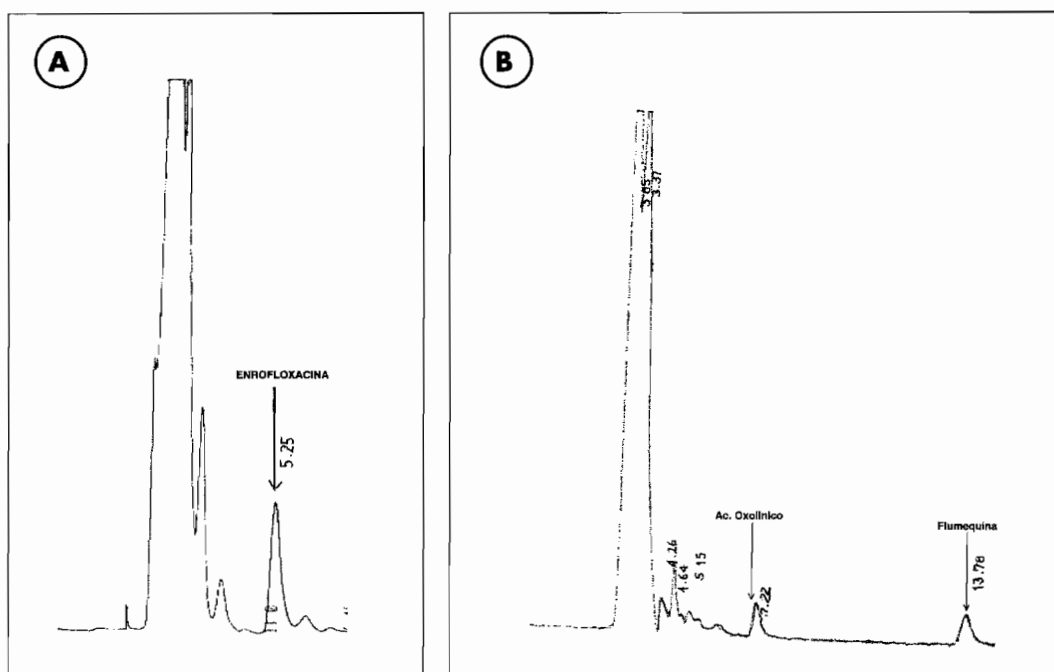


Figura 2 Cromatogramas de músculo de salmón incluido piel, fortificados con 10 ppb de enrofloxacin (A) y 5 ppb de ácido oxolínico y flumequina (B).

lógico para enrofloxacin, ácido oxolínico y flumequina fue de 10, 40 y 300 ppb respectiva-

mente; por HPLC, el límite de detección fue de 5 ppb para los tres antimicrobianos analizados.

## BIBLIOGRAFIA.

- Association of Official Analytical Chemists AO.AC. 1990. Association of Analytical Chemists Official Methods of Analysis. 14<sup>a</sup> Ed. Arlington, V.A. Assoc. Offic. Chem. pp1141.
- Banco Central de Chile. Microfichas de Exportación 1998
- Boe, B.; B. Lunestad. 1996 A bioassay for the detection of residues of antibacterial agents in fish. Central Laboratory, Directorate of Fisheries, Strandgaten 229 5002, Bergen, Norway.
- Bowser, P.; J.G. Babish, 1991. Enrofloxacin in salmonids. *Veterinary and Human Toxicology* 33 (suppl. 1): 46-48.
- Canadian Aquaculture Institute. 1998. Chilean Fish Health Course. April 1-3., 1998 Puerto Montt, Chile
- Comission of the European Communities, 1994. Residues in food producing animals and their products Reference Materials and Methods. Sg 31. Second Edition Ed. R.J. Heitzman. United Kingdom.
- Committee for Veterinary Medicinal Products CVMP 1997 Note for. guidance on the establishment of maximum residue limits for Salmonidae and other fin fish. EMEAICVMPII 53b/97-FINAL
- FAO/WHO. 1997. A summary of the conclusions of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) at its 48<sup>th</sup> meeting: Geneva, 18-27 February 1997.
- Federal Joint Subcommittee on Aquaculture. 1994. Guide to drug, vaccine and pesticide used in aquaculture. Texas Agricultural Extension Service.
- Food and Drug Administration. 1997. Guidance for Industry. Validation of Analytical Procedures: Methodology. U.S Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. Center for Veterinary Medicine. December. 1997.
- Gough, A.W.; NJ. Barsoum; R.C Renlund; J.M. Sturgess; F.A. de la Iglesia. 1985. Fine structural changes during reparative phase of canine induced artropathy. *Veterinary Pathology* 22: 82-84.
- Hormazabal, V.; A Rogstad; I Steffenak; M. Ynestad. 1991 Rapid assay for monitoring residues of enrofloxacin and sarafloxacin in fish tissues by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography*, 14 (8), 1605-1614
- Hormazabal, V.; M. Ynestad 1994. A rapid and time-effective assay for determination of oxolinic acid and flumequine in fish tissues by HPLC. *Journal of Liquid Chromatography*. 17 (13), 2911-2917.
- Jones, PG.H. 1997. Regulatory harmonization for veterinary medicines in the European Union. Plenary Lecture 1. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20 (Suppl 1): 1-9.
- Koenen-Dierick, K; L. Okerman; L. De Zutter; J. Degrootd; J. Van Hoof; S Srebrnick. 1995 A one-plate microbiological screening test for antibiotic residue testing in kidney tissue and meat - an alternative to the EU 4-plate method. *Food Additives and Contaminants*, 12(1): 77-82.
- Pearson, M.; V. Inglis. 1993 A sensitive microbioassay for the detection of antibacterial agents in the aquatic environment. *Journal of Fish Diseases* 16: 255-260.
- San Martin, B.; R. Moraga. 1996. Evaluacion de la técnica microbiologica con *Bacillus subtilis* BGA para la deteccion de residuos de anfimiciobianos en leche bovina. *Avances en Cs. Veterinarias*. Vol. 11(1): 43-48.
- Smith, J. T 1986. The mode of action of 4-quinolones and possible mechanisms of resistance. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 18. Suppl D: 21-29.
- Stalhamann, R. and H. Lode. 1989 Consideraciones generales sobre seguridad: Toxicidad. Efectos Adversos y Modo de Interaccion de quinolonas In: *Las Quinolonas*. Academic Press Limited. Pp 221-256.
- Stoffregen, DA.; AJ Chako; S. Backman; JG. Babish 1993 Successful therapy of furunculosis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., using the fluoroquinolone antimicrobial agent enrofloxacin. *Journal of Fish Diseases* 16: 219-228.
- Vandaele, B. 1997. How to maintain enough medicines available for aquaculture in Veterinary Medicine. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* 20 (Suppl 1): 330.