



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΕΝΩΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΩΝ
HellasLab-National Member of Eurolab



Σχολή Ηλεκτρολόγων Μηχανικών
και Μηχανικών Υπολογιστών
ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ



Ερευνητικό Πανεπιστημιακό
Ινστιτούτο Συστημάτων
Επικοινωνιών και Υπολογιστών



Μετρολογία 2018

7^ο Τακτικό Εθνικό Συνέδριο Μετρολογίας

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ

ηλεκτρικές μετρήσεις

ιχνηλασιμότητα

όργανα
εργαστήρια

ακρίβεια

όρια

ποιότητα

διακριβώσεις

πρότυπα

αβεβαιότητα

ηλεκτρομαγνητική συμβατότητα

11-12 Μαΐου 2018

Πολεμικό Μουσείο, Αθήνα

<http://metrologia2018.ece.ntua.gr>

Σάββατο, 12 Μαΐου 2018

	Ηλεκτρικές μετρήσεις 3 Προεδρείο: Γ. Κορρές, Ν. Παπανικολάου	Φαρμακευτικές μετρήσεις Προεδρείο: Ι. Ντότσικας
	Αμφιθέατρο	Αίθουσα 2
15:00-15:15	Εργαστηριακή μέτρηση των ηλεκτρικών ιδιοτήτων του εδάφους συναρτήσει της συχνότητας της διέγερσης, [ID:32] <u>Ζ. Δάτσιος, Π. Μικρόπουλος, Ι. Καρακούσης</u>	Επίδραση του φαινομένου του αιματοκρίτη στις μετρήσεις με ξηραμένες κηλίδες αίματος (Dried Blood Spots, DBS, [ID:28]) <u>Ι. Ντότσικας, Ε. Καραλής Χ. Νταουσάνη</u>
15:15-15:30	Μελέτη της συμπεριφοράς των συστημάτων ασύρματης μεταφοράς ισχύος σε μικροδίκτυα Σ.Τ., [ID:71] <u>Δ. Μπαρός, Κ. Γραβιά, Δ. Βογλίτση, Ν. Παπανικολάου</u>	Έλεγχος ανθεκτικότητας μεθόδου HPLC για τον προσδιορισμό πιθανών γονιδιοτοξικών προσμίξεων της ραμπεπραζόλης με χρήση κλασματικού παραγοντικού σχεδιασμού, [ID:30] <u>Ε. Ρουμανά, Χ. Μπουζούκας, Ι. Ντότσικας</u>
15:30-15:45	Εναλλακτικές μέθοδοι μέτρησης αντίστασης γείωσης ηλεκτρικών εγκαταστάσεων, [ID:85] <u>Χ. Χριστοδούλου, Β. Ανδροβιτσανέας, Ι. Γκόνος</u>	Ανάπτυξη και επικύρωση μεθόδου HILIC-PDA για τον ποσοτικό προσδιορισμό της ρισεδρονάτης σε δισκία, [ID:36] <u>Ε. Ταξιάρχη, Δ. Κυριακίδου, Ε. Παντερή</u>
15:45-16:00	Σχεδιασμός και υλοποίηση σύγχρονου αντισταθμιστή αέργου ισχύος - STATCOM για τη ρύθμιση της τάσης στο ζυγό σύνδεσής του, [ID:84] <u>Β. Γιωτόπουλος, Μ. Φούρναρης, Γ. Κορρές</u>	Ανάπτυξη μεθόδου για τον ποσοτικό προσδιορισμό του οκτρεοτιδίου σε φαρμακευτικά σκευάσματα με υγροχρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης και φθορισμομετρικό ανιχνευτή (HILIC-FL), [ID:40] <u>Ε. Δούλου, Ά. Πάρλα, Μ. Καλομοιράκη, Μ. Κουμπάρης, Ν. Χανιωτάκης, Κ. Θερμού, Ε. Παντερή</u>
16:00-16:15	Η επίδραση του ρυθμού μετάδοσης και του μήκους κωδικής λέξης σε μετρήσεις εκπεμπόμενης ακτινοβολίας καλωδίωσης τύπου spacewire, [ID:86] <u>Α. Μπακλέζος, Χ. Νικολόπουλος, Σ. Τσατάλας, Χ. Καψάλης</u>	Ανάπτυξη και εφαρμογή ημι-στοχευμένης μεθόδου μεταβολομικής ανάλυσης με χρήση αέριας χρωματογραφίας-φασματομετρίας μάζας για μοριακές επιδημιολογικές μελέτες μεγάλης κλίμακας, [ID:50] <u>Α. Μυριδάκης, J. Chilloux, I. Garcia Perez, M.-E. Dumas</u>
16:15-16:30	Εφαρμογή του κανονισμού φωτισμού UEFA στο γήπεδο ποδοσφαίρου «Απόστολου Νικολαΐδη» για τη βελτιστοποίηση του οπτικού αποτελέσματος [ID:87] <u>Λ. Δούλος, Κ. Μπουρούσης, Φ. Τοπαλής</u>	Εφαρμογή τροποποιημένων πολυμερικών υλικών καραγεννάνης στην εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων, [ID:34] <u>Μ. Παπαγεωργίου, Σ. Νανάκη, Γ. Κύζας, Χ. Κουλουκτσή, Δ. Μπικιάρης, Δ. Λαμπροπούλου</u>
16:30	Κλείσιμο – αποτίμηση συνεδρίου	

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ΚΑΡΑ-ΓΕΝΝΑΝΗΣ ΣΤΗΝ ΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΔΙΑΣΠΟΡΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Μ. Παπαγεωργίου¹, Σ. Γ. Νανάκη², Γ. Ζ. Κύζας³, Χ. Κουλουκτσή², Δ. Ν. Μπικιάρης², Δ. Α. Λαμπροπούλου¹

¹Εργαστήριο Ελέγχου Ρύπανσης Περιβάλλοντος, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

²Εργαστήριο Χημείας και Τεχνολογίας Πολυμερών, Τμήμα Χημείας, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, 54124, Θεσσαλονίκη, Ελλάδα

³Προηγμένο Εργαστήριο Ήφαιστος, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Ανατολικής Μακεδονίας και Θράκης, Καβάλα, 65404, Ελλάδα
e-mail¹: dlambro@chem.auth.gr

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση και ο χαρακτηρισμός δυο νέων ροφητικών υλικών της ι- και κ- καραγεννάνης, τα οποία τροποποιήθηκαν με ισοκυανικές ομάδες. Στη συνέχεια, μελετήθηκε η εφαρμογή τους ως ροφητικά υλικά στην εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (Dispersive Solid Phase Extraction -DSPE) για τον προσδιορισμό του carbamazepine (CBZ) και diclofenac (DCF) σε περιβαλλοντικά υποστρώματα. Για τον προσδιορισμό των ενώσεων χρησιμοποιήθηκε η Υγρή Χρωματογραφία σε συνδυασμό με τη Φασματομετρία Μαζών (LC-DAD-ESI/MS). Η δομή, η μορφολογία και οι ιδιότητες των παρασκευασθέντων υλικών χαρακτηρίστηκαν με φασματοσκοπία υπέρυθρου με μετασχηματισμό Fourier (FT-IR), περίθλαση ακτίνων Χ (XRD), Θερμική Βαρυμετρική Ανάλυση (TGA) και Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης (SEM). Η μέγιστη χωρητικότητα ρόφησης των υλικών (Q_{max}) προσδιορίστηκε με το μοντέλο Langmuir-Freundlich και παρουσίασε τιμές για τη ι-καραγεννάνη (iCAR) από 7,44 έως 8,51 mg/g για το CBZ και 23,41 έως 35,78 mg/g για το DCF και για την κ-καραγεννάνη (kCAR) από 7,07 έως 13,78 mg/g για το CBZ και 22,66 έως 49,29 mg/g για το DCF. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση της D-SPE, όπως ο χρόνος εκχύλισης, η μάζα του ροφητικού υλικού και ο όγκος του διαλύτη έκλουσης μελετήθηκαν και βελτιστοποιήθηκαν με τη χρήση του πειραματικού σχεδιασμού κεντρικής σύνθεσης (CCD) και τη μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (RSM). Εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος παρουσίασε υψηλή ευαισθησία, με χαμηλά όρια ανίχνευσης (LODs) (0,042 μέχρι 0,090 μg/L) και ποσοτικοποίησης (LOQs) (0,137-0,298 μg/L). Η επαναληψιμότητα και η αναπαραγωγιμότητα, εκφραζόμενη ως η σχετική τυπική απόκλιση ($n = 3$) κυμάνθηκε από 2,8 έως 17,5%. Πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά περιβαλλοντικά υποστρώματα και υπολογίστηκε η αβεβαιότητα. Οι ανακτήσεις της μεθόδου κυμάνθηκαν μεταξύ του 70% έως και 108%, υποδεικνύοντας την καταλληλότητα της μεθόδου για την ανάλυση του CBZ και DCF σε επιφανειακά νερά (λίμνη, ποτάμι, θάλασσα) και υγρά λύματα.

Λέξεις-κλειδιά: εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά, ι-καραγεννάνη, κ-καραγεννάνη, carbamazepine, diclofenac

Abstract

In the present study, novel isocyanate-functionalized iota- (iCAR-TDI) and kappa- (kCAR-TDI) carrageenans were successfully prepared. Their applications, as a sorbent material, were studied in the dispersive solid phase extraction (D-SPE) methodology. The preconcentration and determination of carbamazepine and diclofenac in aqueous matrices were investigated followed by liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). The structure, morphology and properties of the prepared material were characterized with Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR), X-ray diffraction (XRD), Thermal Gravimetric Analysis (TGA) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The maximum adsorption capacity (Q_{max}) was determined by Langmuir- Freundlich model and was ranged for iota- carrageenan (iCAR) from 7.44 to 8.51 mg/g for CBZ and 23.41 to 35.78 mg/g for DCF and for kappa-carrageenan (kCAR) from 7.07 to 13.78 mg/g for CBZ and 22.66 to 49.29 mg/g for DCF. The factors affecting the performance of D-SPE, were investigated. The extraction time, sorbent mass and eluent's volume were studied and optimized with a central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). Under the optimized conditions, good linear relationships have been achieved with the correlation coefficient (r^2) varying from 0.9901 to 0.995. The method was sensitive, with a low Limit of Detections (LODs) were ranging from 0.042-0.090 $\mu\text{g/L}$ and 0.137-0.298 $\mu\text{g/L}$, respectively. Intra- and inter- day precision expressed as relative standard deviation ($n = 3$) were ranged from 2.8 to 17.5%. The results of the recoveries were obtained 70-108% for both analytes, which indicated that the method was suitable for the analysis of both compounds in surface and wastewaters.

Keywords: carbamazepine, diclofenac, carrageenan, dispersive solid phase extraction, aqueous samples

1. Εισαγωγή

Η ανίχνευση των φαρμακευτικών δραστικών ενώσεων έχει προκαλέσει ανησυχίες σχετικά με τις ενδεχόμενες δυσμενείς επιπτώσεις τους στο υδάτινο περιβάλλον Verlicchi et al. (2012). Μεταξύ αυτών, συμπεριλαμβάνεται η καρβαμαζεπίνη (CBZ), μία γνωστή αντιεπιληπτική ένωση και η δικλοφενάκη (DCF), ένα κοινό μη στεροειδές αντιφλεγμονώδες φάρμακο. Λόγω της συνεχώς αυξανόμενης κατανάλωσης, της ακατάλληλης διάθεσής τους και της ελλιπούς απομάκρυνσής τους είναι δύο ενώσεις που έχουν ανιχνευθεί παγκοσμίως σε διαφορετικά περιβαλλοντικά υποστρώματα, όπως στα επιφανειακά νερά, σε απόβλητα από τις Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων (Ε.Ε.Λ.), στο πόσιμο και στο υπόγειο νερό Evgenidou et al. (2015).

Παρόλο που η επιληψία δεν συγκαταλέγεται στις πιο συχνές ασθένειες, οι ποσότητες του CBZ που καταναλώνονται φτάνουν την υψηλή ημερήσια δόση των 1000 mg. Το ποσοστό απελευθέρωσης του CBZ εκτιμάται ότι είναι 30 τόνοι ετησίως και επομένως το CBZ έχει προταθεί να είναι δείκτης ρύπανσης ανθρωπογενούς προέλευσης στα υδάτινα οικοσυστήματα. Σύμφωνα με αρκετές μελέτες, οι περιβαλλοντικές συγκεντρώσεις του CBZ θα μπορούσαν να επηρεάσουν αρνητικά την υδρόβια ζωή (δηλαδή τα βακτήρια, τα άλγη, τα ασπόνδυλα και τα ψάρια) Zhang et al. (2008).

Το DCF, το οποίο ανήκει στα μη στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα και χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του πόνου και διαφόρων φλεγμονωδών αντιδράσεων στους ανθρώπους,

αλλά και ως φάρμακο στην κτηνιατρική Zhang et al. (2008), προστέθηκε πρόσφατα στον κατάλογο επιτήρησης των ουσιών για την παρακολούθηση σε επίπεδο Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ε.Ε.) στον τομέα της πολιτικής των υδάτων, (Απόφαση 2015/495). Η παγκόσμια κατανάλωση του DCF υπολογίζεται ότι είναι 940 τόνοι ετησίως, με συνήθη συνιστώμενη ημερήσια δόση τα 100 mg. Η συχνή εμφάνισή του στα επιφανειακά νερά, αλλά και η τοξικότητα του στα ψάρια και στα μύδια καθιστούν το DCF ως αναδυόμενο οργανικό ρύπο Lonappan et al. (2016).

Λόγω των παραπάνω, ένα μεγάλο ποσοστό των ερευνών έχει στρέψει το ενδιαφέρον της στη μελέτη αυτών των δύο ενώσεων. Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό να αναπτυχθούν αξιόπιστες τεχνικές για τον ποιοτικό και τον ποσοτικό προσδιορισμό των εν λόγω ενώσεων στα υδατικά δείγματα, προκειμένου να εκτιμηθεί η περιβαλλοντική έκθεση του CBZ και του DCF, αντίστοιχα. Η ποσοτικοποίηση των φαρμακευτικών ενώσεων συνήθως πραγματοποιείται με χρωματογραφικές τεχνικές μετά την εκχύλιση τους από υδατικά δείγματα με κατάλληλες μεθόδους προκατεργασίας δειγμάτων. Μεταξύ των διαφορετικών μεθόδων προκατεργασίας δειγμάτων, οι τεχνικές μικροεκχύλισης με βάση τα ροφητικά υλικά (Sorbptive microextraction Extraction techniques-ΣμΕ) όπως η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME), η εκχύλιση στερεάς φάσης με Διασπορά (dSPE), κλπ., χρησιμοποιούνται για την προσυγκέντρωση και/ή τον καθαρισμό των ενώσεων προσφέροντας νέες δυνατότητες στην προκατεργασία του δείγματος και εμφανίζοντας συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι των συμβατικών μεθόδων προκατεργασίας. Συνεπώς, νέες μέθοδοι μικροεκχύλισης με βάση τα ροφητικά υλικά έχουν αρχίσει να αναπτύσσονται και να χρησιμοποιούνται για την εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων και άλλων αναδυόμενων ρύπων από τα υδατικά δείγματα, με έμφαση στα καινοτόμα υλικά με αξιοσημείωτες ιδιότητες. Τα τελευταία χρόνια, η εφαρμογή και χρήση νέων ροφητικών υλικών έχει παρουσιάσει τεράστιο ενδιαφέρον, καθώς μπορεί να διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στις διαδικασίες προσυγκέντρωσης Herrero-Latorre et al. (2015).

Στη συγκεκριμένη μελέτη, δύο νέα πολυμερή καραγενάνης τροποποιημένα με 2,4-δισοκυανικό τολουόλιο (TDI) παρασκευάστηκαν και εφαρμόστηκαν ως ροφητικά υλικά για τον προσδιορισμό του CBZ και του DCF με την τεχνική της dSPE σε πέντε διαφορετικά περιβαλλοντικά υποστρώματα.

2. Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Σύνθεση των καραγενάνων με ισοκυανικές ομάδες

Αρχικά, 15 gr. από την iCAR και kCAR, αντίστοιχα εισήχθησαν σε δύο διαφορετικές σφαιρικές φιάλες, ακολούθησε η εισαγωγή 50 ml διμεθύλο σουλφοξιδίου και ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη στιγμή του σχηματισμού εναιωρήματος. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη 100 ml 2,4-δισοκυανικού τολουολίου (TDI) και έντονη ανατάραξη στους 50 °C για 4 ώρες. Ακολούθησε ο σχηματισμός της γέλης, η οποία τεμαχίστηκε και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα 100 ml διχλωρομεθανίου υπό συνθήκες μαγνητικής ανάδευσης για 2 ώρες, αποσκοπώντας στην απομάκρυνση του διμεθύλο σουλφοξιδίου και της ποσότητας του TDI που δεν αντέδρασε. Περαιτέρω καθαρισμός των υλικών πραγματοποιήθηκε με την εισαγωγή τους σε απεσταγμένο νερό στους 80 °C για 3 ώρες και σε αιθανόλη. Τέλος, ακολούθησε η ξήρανση των υλικών υπό κενό και η κοσκίνιση ώστε να παραληφθούν τα τελικά ροφητικά υλικά σκόνης μεγέθους 100 μm της τροποποιημένης iCAR και kCAR με ισοκυανικές ομάδες.

2.2. Χρωματογραφική ανάλυση

Το σύστημα της Υγρής Χρωματογραφίας Φασματομετρίας Μάζας (LC-MS) αποτελούνταν από έναν αυτόματο δειγματολήπτη SIL 20A, όπου επιλέχθηκε όγκος έγχυσης τα 20 μl και μία αντλία LC-20AB της εταιρίας Shimadzu (Japan). Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επετεύχθη με στήλη Athena C18 (150 mm*4.6 mm, 5 mm) της εταιρίας CNW Technologies. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον θετικό ιοντισμό για το CBZ και στον αρνητικό ιοντισμό για το DCF. Χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών Α (νερό LC-MS με 0.1% φορμικό οξύ) και Β (μεθανόλη LC-MS) με ισοκρατική έκλουση (10%A: 90%B). Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στα 0.4 ml/min και η θερμοκρασία του φούρνου στους 40°C. Για τον προσδιορισμό του CBZ και DCF επιλέχθηκε η μέθοδος των επιλεγμένων ιόντων (SIM) ($[\text{M}+\text{H}]$, m/z: 237 για το CBZ και $[\text{M}-\text{H}]$, m/z: 294 για το DCF).

2.3. Πειραματική διαδικασία της ρόφησης

Στα πειράματα της ρόφησης του CBZ χρησιμοποιήθηκε 1 g/L υλικού. Συγκεκριμένα, τα δείγματα ελήφθησαν σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα και διηθήθηκαν χρησιμοποιώντας φίλτρα 45 μm . Οι ισόθερμες λήφθηκαν με τη διεξαγωγή των πειραμάτων ρόφησης σε διάφορα συγκεντρώσεις ($C_0 = 0\text{-}100 \text{ mg/L}$) στις θερμοκρασίες (20, 30, 40°C) για 24 ώρες (χρόνος επαφής) σε pH = 2 και 10. Στην περίπτωση των πειραμάτων ρόφησης του DCF, χρησιμοποιήθηκαν 0,5 g/L. Οι ισόθερμες διεξήχθησαν στο pH = 6 σε T = 20, 30, 40 °C για 24 ώρες (χρόνος επαφής) για μεταβαλλόμενες αρχικές συγκεντρώσεις DCF από 0 έως 70 mg/L (Πίνακας 2).

Πίνακας 1: Παράμετροι της ρόφησης του CBZ και DCF.

Ροφητικό Υλικό	Ένωση	pH	T °C	Q_{max} (mg/g)	K_{LF} ($(\text{L}/\text{mg})^{1/b}$)	b	R^2
iCAR-TDI	CBZ	2	20	7.59	0.064	0.888	0.999
			30	7.72	0.010	0.585	0.995
			40	8.39	0.015	0.883	0.991
		10	20	7.44	0.062	0.862	0.995
			30	7.89	0.019	0.775	0.994
			40	8.51	0.005	0.640	0.994
kCAR-TDI	CBZ	2	20	9.87	0.054	0.898	0.995
			30	10.99	0.026	0.755	0.998
			40	11.12	0.011	0.631	0.999
		10	20	7.07	0.045	1.061	0.998
			30	9.27	0.022	0.826	0.998
			40	13.78	0.006	0.593	0.998
iCAR-TDI	DCF	6	20	23.41	0.095	1.485	0.998
			30	27.97	0.111	0.835	0.991
			40	37.58	0.115	0.908	0.986
kCAR-TDI	DCF	6	20	22.66	0.083	0.628	0.996
			30	35.81	0.128	0.928	0.994
			40	49.29	0.266	1.153	0.994

2.4. Εκχύλιση Στερεάς Φάσης με Διασπορά

Για την διαδικασία της Εκχύλισης Στερεάς Φάσης με Διασπορά (dSPE) ζυγίστηκαν 15 mg υλικού και εισήχθησαν σε 15 ml διαλύματος. Το pH του διαλύματος ρυθμίστηκε στο 10 και στο 6 για το CBZ και DCF, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, το διάλυμα αναδεύτηκε για 15 min. στις 1000 rpm, ακολούθησε φυγοκέντρωση για 10 min. στις 5000 rpm. Μετά την εκχύλιση, απομακρύνθηκε η υγρή φάση και προστέθηκε 1 ml οργανικού διαλύτη. Η εκρόφιση πραγματοποιήθηκε για 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων. Έπειτα ο διαλύτης συλλέχθηκε και εξατμίστηκε, με τη διαβίβαση ρεύματος αζώτου μέχρι ξηρού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε επαναδιάλυση σε 50 μl της κινητής φάσης και εισαγωγή στο σύστημα LC-MS.

2.5. Επικύρωση της μελέτης/ Διασφάλιση ποιότητας/ Έλεγχος ποιότητας

Η επικύρωση της μεθόδου πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με το έγγραφο SANTE/11945/2015 Commission (2015). Οι καμπύλες βαθμονόμησης περιγράφηκαν με τη γραμμική μέθοδο προσαρμογής ελαχίστων τετραγώνων με το συντελεστή συσχέτισης (r^2) να είναι υψηλότερος από 0.990. Οι τιμές του LOQ ορίστηκαν ως η ελάχιστη συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να ποσοτικοποιηθεί με αποδεκτή ανάκτηση (στην περιοχή 70-120%) και ακρίβεια ($RSD \leq 20\%$). Τα LOD υπολογίστηκαν σε όλες τις περιπτώσεις, με κριτήρια αναλογίας σήματος προς θόρυβο ($LOD = 3 S / N$). Η ακρίβεια της μεθόδου ελέγχθηκε με τη βοήθεια πειραμάτων ανάκτησης σε έξι επαναλήψεις τυφλών δειγμάτων στα 1, 10 και 100 μg/L. Οι ανακτήσεις και η σχετική τυπική απόκλιση (RSD) υπολογίστηκε σε τρία διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων. Η επαναληψιμότητα, RSD_r προέκυψε από την επαναλαμβανόμενη ανάλυση ($n=6$) εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα και η αναπαραγωγιμότητα, RSD_R για διαφορετικές μέρες. Οι αβεβαιότητες εκτιμήθηκαν με βάση τα στοιχεία εσωτερικής επικύρωσης σύμφωνα με το (EURACHEM/ CITAC EURACHEM 2007a, b, 2012), (Eurolab Eurolab 2002, (2007) και την οδηγία «Expression of Uncertainty in Measurement» GUM (2008) ISO (2008), σε τρία επίπεδα συγκεντρώσεων, όπως περιγράφηκε σε προηγούμενες εργασίες (Kyzas et al. 2015, Terzopoulou et al. 2016). Οι αβεβαιότητες αξιολογήθηκαν για διαφορετικά υδατικά υποστρώματα σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η διευρυμένη αβεβαιότητα (U) υπολογίστηκε με τη χρήση του συντελεστή κάλυψης $k = 2$, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

2.6. Σχεδιασμός Κεντρικής Σύνθεσης (Central Composite Design)

Για τη βελτιστοποίηση των συνθηκών εκχύλισης χρησιμοποιήθηκε ο σχεδιασμός κεντρικής σύνθεσης (CCD) ($\alpha = 1,681$) τριών παραγόντων (χρόνος εκχύλισης (A), η μάζα του ροφητικού (B) και ο όγκος έκλουσης (C)) και για τις δύο ενώσεις-στόχους. Ο σχεδιασμός περιλάμβανε 17 δοκιμές με 3 επαναλήψεις στο κεντρικό σημείο. Οι εξαρτημένες και ανεξάρτητες μεταβλητές επιλέχθηκαν με βάση τα βιβλιογραφικά δεδομένα και τα προκαταρκτικά πειράματα. Χρησιμοποιήθηκε η Ανάλυση Διασποράς (ANOVA) με επίπεδο εμπιστοσύνης 95%, ώστε να αξιολογηθούν οι πιο σημαντικές επιδράσεις αλλά και οι αλληλεπιδράσεις των παραγόντων που μελετήθηκαν (Πίνακας 4 και 5).

Πίνακας 2: Ανάλυση Διασποράς ANOVA για το CBZ με το CCD.

Παράμετροι	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας df^a	Μέσα τετραγώνων	F	p-Value	Significant
				Value b	Prob>F c	
Μοντέλο	10049.37	9	1116.60	15.34	0.0008	Yes
A- χρόνος εκχύλισης	2886.44	1	2886.44	39.64	0.0004	
B- Μάζα	1089.03	1	1089.03	14.96	0.0062	

Παράμετροι	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας df ^α	Μέσα τετραγώνων	F	p-Value	Significa nt
				Value ^β	Prob>F ^γ	
ροφητικού						
C- Όγκος	894.06	1	894.06	12.28	0.0099	
AB	861.13	1	861.13	11.83	0.0109	
AC	210.13	1	210.13	2.89	0.1332	
BC	21.12	1	21.12	0.29	0.6068	
A ²	2518.01	1	2518.01	34.58	0.0006	
B ²	2228.98	1	2228.98	30.61	0.0009	
C ²	1703.76	1	1703.76	23.40	0.0019	
Υπόλειμμα	509.68	7	72.81			
Έλλειψη προσαρμογής	497.02	5	99.40	15.70	0.0610	no
Καθαρό σφάλμα	12.67	12	6.33			
Διορθωμένο σύνολο	10559.06	16				

Πίνακας 3: Ανάλυση Διασποράς ANOVA για το DCF με το CCD.

Παράμετροι	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας df ^α	Μέσα τετραγώνων	F	p-Value	Significant
				Value ^b	Prob>F ^c	
Μοντέλο	9114.50	9	1012.72	55.55	<0.0001	Yes
A- χρόνος εκχύλισης	3539.57	1	3539.57	194.15	<0.0001	
B- Μάζα ροφητικού	1386.19	1	1386.19	76.03	<0.0001	
C- Όγκος	638.88	1	638.88	35.04	0.0006	
AB	288.00	1	288.00	15.80	0.0054	
AC	32.00	1	32.00	1.76	0.2268	
BC	0.00	1	0.00	0.00	1.0000	
A ²	2160.21	1	2160.21	118.49	<0.0001	
B ²	1548.86	1	1548.86	84.95	<0.0001	
C ²	1367.62	1	1367.62	75.01	<0.0001	
Υπόλειμμα	127.62	7	18.23			
Έλλειψη προσαρμογής	122.95	5	24.59	10.54	0.0889	no
Καθαρό σφάλμα	4.67	12	2.33			
Διορθωμένο σύνολο	9242.12	16				

α: βαθμοί ελευθερίας, β: Δοκιμή για τη σύγκριση της διακύμανσης μοντέλου με το υπόλειμμα του σφάλματος,
 c: Πιθανότητα εμφάνισης της τιμής F, εάν η μηδενική υπόθεση είναι αληθής.

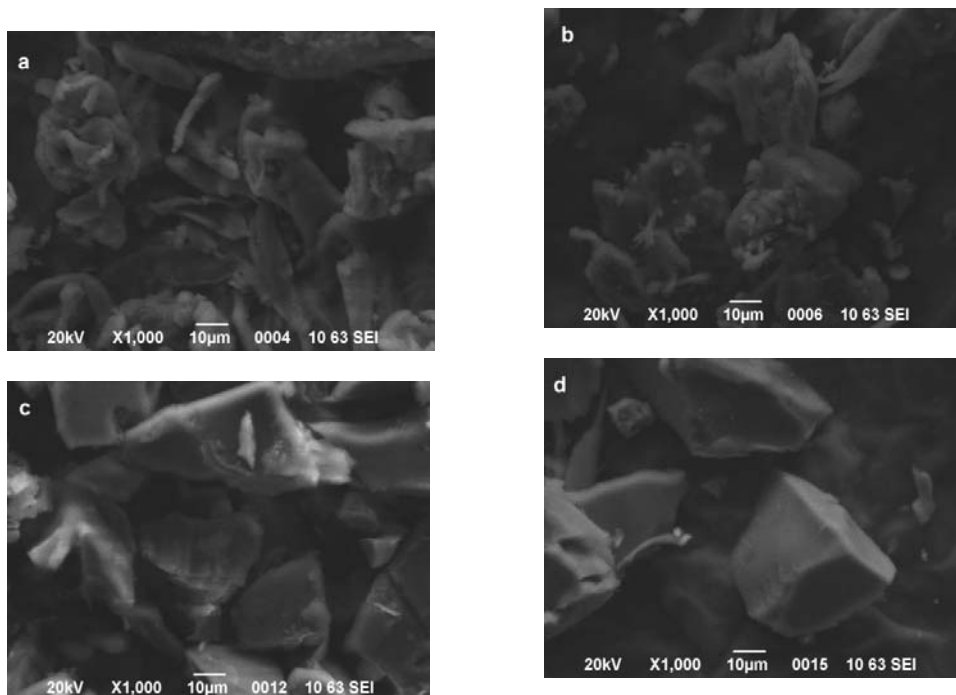
Η σημασία κάθε συντελεστή και η αλληλεπίδραση μεταξύ κάθε ανεξάρτητης μεταβλητής αξιολογήθηκε σύμφωνα με την τιμή p στο επίπεδο σημαντικότητας 5%. Η επάρκεια του

μοντέλου επαληθεύτηκε χρησιμοποιώντας τον συντελεστή προσδιορισμού R^2 , του διορθωμένου συντελεστή προσδιορισμού R^2 και την έλλειψη δοκιμής προσαρμογής.

3. Αποτελέσματα

3.1. Χαρακτηρισμός των υλικών

Η μορφολογία των παρασκευασθέντων υλικών εξετάστηκε με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης- SEM. Βρέθηκε ότι το kCAR και το iCAR έχουν ομαλές επιφάνειες χωρίς συγκεκριμένο σχήμα (Εικόνα 1α, β). Ενώ, η τροποποίηση με το TDI προκάλεσε πιο άκαμπτη και σκληρή επιφάνεια (Εικόνα 1γ, δ), μετά το τεμαχισμό στον κοπτικό μύλο, τα σωματίδια διατήρησαν το ακανόνιστο σχήμα τους με τις αιχμηρές άκρες. Αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η αντίδραση έλαβε χώρα.



Γράφημα 1: SEM μικρογραφίες για το α) kCAR, β) iCAR, γ) kCAR-TDI και δ) iCAR-TDI.

3.2. Βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας dSPE με CCD.

Στις διαδικασίες εκχύλισης, το βήμα της βελτιστοποίησης είναι πολύ σημαντικό για την αύξηση της αποδοτικότητας της εκχύλισης. Στην παρούσα μελέτη, το pH και η θερμοκρασία του διαλύματος έχουν μελετηθεί καλά από τα πειράματα της ρόφησης. Οι διαλύτες εκρόφησης επιλέχθηκαν κατά κύριο λόγο χρησιμοποιώντας μία μεταβλητή κάθε φορά, ενώ για τις άλλες μεταβλητές εφαρμόστηκε μια μεθοδολογία επιφανειακής απόκρισης (RSM) χρησιμοποιώντας το σχεδιασμό κεντρικής σύνθεσης (CCD) για την αναζήτηση των βέλτιστων πειραματικών συνθηκών και για τους δύο αναλύτες. Το RSM χρησιμοποιείται για την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών με τον ελάχιστο αριθμό πειραμάτων. Με βάση την υψηλότερη ικανότητα ρόφησης και για τις δύο ενώσεις, το υλικό kCAR-TDI χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη και τη βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας dSPE.

3.2.1. Επίδραση του διαλύτη εκρόφησης

Για να ληφθούν αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα με υψηλό συντελεστή εμπλουτισμού, ο διαλύτης έκλουσης πρέπει να έχει υψηλότερη συγγένεια με τους αναλύτες από το προσροφητικό υλικό για τη διαδικασία της dSPE. Σε αυτή τη μελέτη, δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί διαλύτες έκλουσης, συμπεριλαμβανομένων της μεθανόλης, του ακετονιτρίλιου και της ακετόνης για την εκρόφιση του DCF και του CBZ από τα υλικά. Αποφεύχθηκε η χρήση αλογονομένων διαλυτών για να ακολουθηθούν οι αρχές της πράσινης χημείας. Όταν μελετήθηκε η προσθήκη 1 mL από τους διαλύτες εκρόφισης, παρατηρήθηκε ότι η μεθανόλη και το ακετονιτρίλιο παρουσίασαν υψηλότερες ανακτήσεις από την ακετόνη. Τελικά, η μεθανόλη επελέγη ως διαλύτης έκλουσης λόγω της καλύτερης αποτελεσματικότητας της εκχύλισης (αύξηση 5-10% σε σύγκριση με το ACN), χαμηλότερη τοξικότητα και κόστος.

3.2.2. Σχεδιασμός Κεντρικής Σύνθεσης (CCD)

Αφού προσδιορίστηκαν οι σημαντικοί παράγοντες και οι αλληλεπιδράσεις με το CCD ακολούθησε η εφαρμογή της Μεθοδολογίας Απόκρισης Επιφάνειας (RSM), με στόχο την εύρεση των βέλτιστων συνθηκών για την καλύτερη απόδοση της εκχύλισης. Συνεπώς, οι βέλτιστες συνθήκες για την επίτευξη της καλύτερης απόδοσης της εκχύλισης υπολογίστηκαν ως εξής: 1 mL για τον όγκο του οργανικού διαλύτη, 15 mg για την ποσότητα του ροφητικού υλικού, και 15 min. ο χρόνος της εκχύλισης. Για να επιβεβαιωθεί η επάρκεια του μοντέλου για την πρόβλεψη της μέγιστης αποτελεσματικότητας της εκχύλισης, πραγματοποιήθηκαν τρεις διαδοχικές δοκιμές με τις βέλτιστες συνθήκες. Από τα πειραματικά αποτελέσματα υπολογίστηκε η μέση τιμή των ανακτήσεων για το DCF ($97 \pm 5,0\%$) και για το CBZ ($92 \pm 8,0\%$), καταδεικνύοντας την καταλληλότητα του προσαρμοσμένου μοντέλου επιφανειακής απόκρισης.

3.2.3. Απόδοση της αναλυτικής μεθοδολογίας

Η απόδοση της αναλυτικής μεθοδολογίας dSPE με την εφαρμογή τροποποιημένων πολυμερικών ροφητικών υλικών καραγενάνης αξιολογήθηκε για την προσυγκέντρωση του DCF και CBZ σε διαφορετικά υποστρώματα. Τα στοιχεία της επικύρωσης της μεθόδου δίνονται στον Πίνακα 6 και 7.

Πίνακας 4: Απόδοση της αναλυτικής μεθοδολογίας dSPE για το CBZ σε διαφορετικά υποστρώματα.

	Επίπεδο εμβολιασμού ($\mu\text{g/L}$)	DW	LW	SW	RW	WWI	WWE
LOD ($\mu\text{g/L}$)	-	0.042	0.046	0.043	0.047	0.062	0.047
LOQ ($\mu\text{g/L}$)	-	0.137	0.151	0.142	0.154	0.205	0.154
RSD _r (%)							
	1	7.2	11.2	13.1	9.6	12.1	11.2
(n = 5)	10	5.1	9.1	10.9	7.7	11.2	9.8
	100	3.7	8.8	9.2	7.5	10.7	9.0
RSD _R (%)							
	1	10.2	15.3	16.1	14.1	17.5	17.0
(n = 5)	10	9.8	13.7	14.8	12.8	15.2	14.9
	100	9.1	10.2	14.1	11.4	14.0	12.3

U (%)	1	33.92	33.2	33.41	34.86	39.91	37.19
(k = 2, confidence level 95%)	10	15.96	16.68	17.24	17.03	19.88	18.56
	100	9.91	10.84	12.17	11.28	13.62	12.22

Πίνακας 5: Απόδοση της αναλυτικής μεθοδολογίας dSPE για το DCF σε διαφορετικά υποστρώματα.

	Επίπεδο εμβολιασμού (µg/L)	DW	LW	SW	RW	WWI	WWE
LOD (µg/L)	-	0.060	0.067	0.063	0.068	0.090	0.068
LOQ (µg/L)	-	0.199	0.220	0.207	0.225	0.298	0.225
RSD _t (%)							
	1	5.1	11.5	12.8	8.0	9.7	10.5
(n = 5)	10	3.9	8.9	10.5	7.1	10.2	9.3
	100	2.8	8.1	10.0	6.8	9.5	8.8
RSD _R (%)							
	1	9.6	14.6	15.9	13.4	15.6	14.1
(n = 5)	10	8.5	12.4	13.9	11.8	13.6	12.9
	100	9.5	11.4	12.7	10.2	12.9	11.8
U (%)	1	24.51	27.49	23.05	25.28	36.57	28.42
(k = 2, confidence level 95%)	10	11.67	14.04	13.08	12.94	18.09	14.68
	100	8.06	10.0	10.25	8.99	12.44	10.51

Η αβεβαιότητα της αναλυτικής μεθόδου εκτιμήθηκε επίσης βάσει δεδομένων εσωτερικού ελέγχου σύμφωνα με τον οδηγό EURACHEM / CITAC και GUM και για τις δύο ενώσεις σε δύο επίπεδα, όπως μελετήθηκε σε προηγούμενη μελέτη. Η σχετική διευρυμένη αβεβαιότητα ήταν μικρότερη από 40% και για τις δύο ενώσεις σε όλα τα υποστρώματα.

Η αξιοπιστία της μεθόδου dSPE σε συνδυασμό με το LC-MS ελέγχθηκε με την εκχύλιση πραγματικών δειγμάτων. Πέντε κατηγορίες υγρών δειγμάτων αναλύθηκαν (νερό λίμνης (LW), νερό ποταμού (RW), θαλασσινό νερό (SW), ανεπεξέργαστα απόβλητα (WWI) και επεξεργασμένα απόβλητα (WWE)). Οι ανακτήσεις της μεθοδολογίας dSPE κυμάνθηκαν μεταξύ 70% και 108% για όλα τα περιβαλλοντικά υποστρώματα, επιβεβαιώνοντας την καταλληλότητα της προτεινόμενης μεθοδολογίας.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε η εφαρμογή της μεθοδολογίας dSPE με τροποποιημένα πολυμερικά ροφητικά υλικά καραγενάνης για την προσυγκέντρωση του CBZ και DCF. Για την βελτιστοποίηση αλλά και την εύρεση των κατάλληλων συνθηκών χρησιμοποιήθηκε ο σχεδιασμός κεντρικής σύνθεσης (CCD). Η προτεινόμενη μεθοδολογία αναμένεται να αποτελέσει μια δυναμική προσέγγιση για τον προσδιορισμό του CBZ και DCF στα περιβαλλοντικά υποστρώματα.

Αναφορές

- Commission E. "Document SANTE/11945/2015, analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed", 2015.
- EURACHEM. "EURACHEM/CITAC guide: Measurement uncertainty arising from sampling: A guide to methods and approaches", 2007a.
- EURACHEM. "EURACHEM/CITAC guide: Use of uncertainty information in compliance assessment", 2007b.
- EURACHEM. "EURACHEM/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement", 2012.
- Eurolab. "EUROLAB technical report 1/2002, measurement uncertainty in testing", 2002.
- Eurolab. "EUROLAB technical report 1/2007, measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation", 2007.
- Evgenidou EN, Konstantinou IK, Lambropoulou DA. "Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: A review", Science of The Total Environment, 505: 905-926, 2015.
- Herrero-Latorre C, Barciela-García J, García-Martín S, Peña-Creciente RM, Otárola-Jiménez J. "Magnetic solid-phase extraction using carbon nanotubes as sorbents: A review". Analytica Chimica Acta, 892: 10-26, 2015.
- ISO. ISO Guide 98-3, "Guide to the expression of uncertainty in measurement", International Organization for Standardization, 2008, Geneva, Switzerland.
- Kyzas GZ, Nanaki SG, Koltsakidou A, Papageorgiou M, Kechagia M, Bikiaris DN, et al. "Effectively designed molecularly imprinted polymers for selective isolation of the antidiabetic drug metformin and its transformation product guanylhurea from aqueous media", Analytica Chimica Acta, 866: 27-40, 2015.
- Lonappan L, Brar SK, Das RK, Verma M, Surampalli RY. "Diclofenac and its transformation products: Environmental occurrence and toxicity - A review", Environmental International, 96: 127-138, 2016.
- Terzopoulou Z, Papageorgiou M, Kyzas GZ, Bikiaris DN, Lambropoulou DA. "Preparation of molecularly imprinted solid-phase microextraction fiber for the selective removal and extraction of the antiviral drug abacavir in environmental and biological matrices", Analytica Chimica Acta, 913: 63-75, 2016.
- Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. "Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment--a review", Science of The Total Environment, 429: 123-55, 2012.
- Zhang Y, Geißen SU, Gal C. "Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies", Chemosphere, 73: 1151-1161, 2008.