

ΜΙΚΡΟΕΚΧΥΛΙΣΗ ΣΤΕΡΕΑΣ ΦΑΣΗΣ ΜΕ ΜΟΡΙΑΚΑ ΑΠΟΤΥΠΩΜΕΝΗ ΙΝΑ ΓΙΑ ΤΟΝ ΕΚΕΛΚΤΙΚΟ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΟΥ ΑΒΑCΑVΙR ΣΕ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Μ. Παπαγεωργίου¹, Ζ. Τερζοπούλου², Γ. Κύζας², Δ. Μπικιάρης², Δ. 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
e-mail: dlambro@chem.auth.gr

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη, η Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης με Μοριακά Αποτυπωμένη Ίνα (SPME-MIP_f) εφαρμόστηκε για την εκλεκτική απομάκρυνση και εκχύλιση του αντιικού φαρμάκου abacavir (ABC) σε περιβαλλοντικά και βιολογικά υποστρώματα. Έγινε ανάπτυξη της μεθόδου με υγρή χρωματογραφία φασματομετρίας μάζας (LC-DAD-ESI/MS) η οποία αναπτύχθηκε και αξιολογήθηκε προκειμένου να προσδιοριστεί η ένωση-στόχος σε περιβαλλοντικά (λύματα και επιφανειακά ύδατα) και βιολογικά (ούρα) υποστρώματα. Πραγματοποιήθηκε διερεύνηση των παραμέτρων που επιδρούν στην επίδοση της SPME. Οι κυριότερες παράμετροι, όπως ο ρυθμός ανάδευσης του δείγματος, ο χρόνος εκχύλισης και η ιοντική ισχύς του διαλύματος βελτιστοποιήθηκαν με τη χρήση του σχεδιασμού κεντρικής σύνθεσης (CCD) και τη μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (RSM). Εφαρμόζοντας τις βέλτιστες συνθήκες, που βρέθηκαν από την παραπάνω αναφερόμενη μεθοδολογία (χρόνος εκχύλισης 40 min, ρυθμός ανάδευσης 650 rpm/min και περιεκτικότητα NaCl 0,3% (w/v)), η επικυρωμένη μέθοδος παρουσίασε υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα με όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης μεταξύ 10.1-13.6 ng/L και 33.3-43.9 ng/L, αντίστοιχα. Πραγματοποιήθηκε εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα. Η ανάκτηση της μεθόδου κυμάνθηκε μεταξύ του 88% έως και 99%, υποδεικνύοντας την υψηλή ακρίβεια και εκλεκτικότητα της μεθόδου.

Λέξεις-Κλειδιά: Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης, Μοριακά Αποτυπωμένη Πολυμερική Ίνα, Υγρή Χρωματογραφία-Φασματομετρίας Μάζας

Abstract

Solid phase microextraction (SPME) based in molecularly imprinted fiber (MIP_f) has been applied to the selective removal and extraction of the antiviral drug, abacavir from water and biological matrices. Consecutively a SPME method succeeded by liquid desorption, liquid chromatography and mass spectrometry (LC-MS) was developed and evaluated in order to determinate target compounds found in environmental and biological matrices, such as urine, waste, or surface water. Investigation of parameters affecting the efficiency of SPME was carried out. Then the optimum model of stirring speed, extraction time and salt content has

been determined by using a central composite design (CCD) and response surface methodology (RSM). Applying the optimum conditions found from the methodology mention above (extraction time 40 min, stirring rate 650 rpm and salt content 0.3% NaCl w/v) the validated method presented a high sensitivity and selectivity with LODs and LOQs in the range of 10.1-13.6 and 33.3-43.9 ng/L, respectively. There was a successful application of the developed method to the analysis of ABC in real samples. A satisfying percentage extraction efficiency varied between 88% to 99% was received revealing good accuracy and absence of matrix effects.

Keywords: solid phase microextraction, abacavir, MIP-fiber, environmental matrices, biological matrices

1. Εισαγωγή

Η παρουσία των φαρμακευτικών ενώσεων, των προϊόντων προσωπικής φροντίδας (PPCP's) και των προϊόντων μετασχηματισμού τους (TPs) στο περιβάλλον έχει αποσπάσει την προσοχή της επιστημονικής κοινότητας τις τελευταίες δεκαετίες λόγω των αρνητικών επιπτώσεων αυτών στην υγεία και το περιβάλλον (Evgenidou et al. 2015, Lambropoulou and Nollet 2014). Η παρουσία των PPCP's έχει τεκμηριωθεί τόσο σε φυσικά όσο και σε τεχνητά υδάτινα συστήματα, στα οποία εισέρχονται λόγω της ελλιπούς επεξεργασίας των λυμάτων Verlicchi and Zambello (2015).

Για τον προσδιορισμό των PPCPs σε πολύπλοκα περιβαλλοντικά υποστρώματα, η κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος είναι απαραίτητη ώστε να αρθούν οι παρεμποδίσεις για να προσδιοριστεί ο αναλύτης-στόχος (Boyacı et al. 2015, Lambropoulou 2010). Συνεχώς νέες τεχνικές μικροεκχύλισης κερδίζουν έδαφος συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους εκχύλισης. Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων προκατεργασίας του δείγματος, οι τεχνικές Μικροεκχύλισης με βάση τα ροφητικά υλικά Lambropoulou (2010), όπως η Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME), προσφέρουν νέες δυνατότητες στην προκατεργασία του δείγματος (Souza-Silva et al. 2015). Η SPME μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη για μία ευρεία ποικιλία εφαρμογών είτε με τις εμπορικά διαθέσιμες ίνες είτε με ίνες που έχουν κατασκευαστεί εργαστηριακά (Xu et al. 2013, Wen et al. 2014, Fumes et al. 2015). Επιπρόσθετα, καινούργια προσροφητικά υλικά με βάση τα μοριακά αποτυπωμένα πολυμερή (MIP) έχουν διερευνηθεί τα τελευταία χρόνια επιτρέποντας όχι μόνο την προσυγκέντρωση και τον καθαρισμό του δείγματος αλλά και την εκλεκτική εκχύλιση του αναλύτη-στόχου, ιδιαίτερα σε πολύπλοκα υποστρώματα όπου μπορεί να παρεμποδιστεί το στάδιο της ανάλυσης.

Πρόσφατα, έχουν αναφερθεί διαφορετικές συνθέσεις μοριακά αποτυπωμένης ίνας που χρησιμοποιείται στην μικροεκχύλιση στερεάς φάσης για φαρμακευτικές εφαρμογές. Ενώ η έρευνα πάνω στην MIP-SPME αυξάνεται, οι περισσότερες από τις μελέτες έχουν περιοριστεί σε αντιβιοτικά, αντιφλεγμονώδη και αναλγητικά φάρμακα, ενώ μελέτες για άλλες θεραπευτικές ομάδες είναι ελάχιστες. Τα αντιϊικά φάρμακα είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες φαρμακευτικές ενώσεις που δυνητικά μπορεί να προκαλέσουν αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον με επίκεντρο την ανάπτυξη αντοχής στους ιούς Prasse et al. (2010). Αξίζει να επισημανθεί ότι αρκετές αναλυτικές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τον προσδιορισμό των αντικών φαρμάκων σε βιολογικά υποστρώματα, ωστόσο περιορισμένες είναι οι αναλυτικές τεχνικές σε υδατικά δείγματα (Yan et al. 2014, Chianella et al. 2006) οι οποίες

πραγματοποίησαν την προκατεργασία των δειγμάτων με εκχύλιση δια της στερεάς φάσης (SPE).

Σκοπός της παρούσας μελέτης, είναι η σύνθεση και η εφαρμογή μιας νέας μοριακά αποτυπωμένη SPME ίνας για τον εκλεκτικό προσδιορισμό του αντικού φαρμάκου abacavir σε περιβαλλοντικά και βιολογικά υποστρώματα. Μελετήθηκε επίσης η επίδοση της αναλυτικής μεθόδου και η αβεβαιότητα της SPME-MIP_f. Βελτιστοποιήθηκαν οι παράμετροι που επηρεάζουν τα στάδια της SPME εκχύλισης και η μέθοδος εφαρμόστηκε σε πραγματικά περιβαλλοντικά και βιολογικά δείγματα.

2. Μεθοδολογία

2.1. Μικροεκχύλιση Στερεάς Φάσης (SPME-MIP_f)

Για την διαδικασία της εκχύλισης οι μοριακά αποτυπωμένες ίνες κόπηκαν σε τεμάχια με μήκος 10 mm και ζυγίστηκαν, ώστε η ποσότητα του υλικού να είναι 10 mg κατά μέσο όρο. Μόνο τα τεμάχια με απόκλιση μικρότερη από 10% χρησιμοποιήθηκαν, ώστε να μπορεί να εξασφαλιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου. Η διαδικασία της εκχύλισης πραγματοποιήθηκε σε 25 ml υδατικού δείγματος στο οποίο είχε εμβολιαστεί με κατάλληλη ποσότητα πρότυπου διαλύματος ABC. Πριν τη χρήση, η MIP-SPME_f καθαρίστηκε με υπερκάθαρο νερό. Στη συνέχεια η MIP-SPME_f βυθίστηκε στην υδατική φάση για 40 λεπτά, με ρυθμό ανάδευσης 650 rpm σε θερμοκρασία δωματίου (25 ± 2°C). Μετά την εκχύλιση, η ίνα απομακρύνθηκε από το δείγμα και μεταφέρθηκε σε φιαλίδιο με βιδωτό πώμα που εμπεριείχε 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 100 μl της κινητής φάσης, διήθηση με φίλτρο 0,22 mm και εισαγωγή στο σύστημα LC-MS.

2.2. Χρωματογραφική ανάλυση

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επετεύχθη με σύστημα Υγρής Χρωματογραφίας της εταιρίας Shimadzu και στήλη Athena C18 (150 mm*4.6 mm, 5 mm) της εταιρίας CNW Technologies. Η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στον θετικό ιοντισμό και χρησιμοποιήθηκε μίγμα διαλυτών A (νερό LC-MS με 0.1% φορμικό οξύ) και B (μεθανόλη LC-MS). Η ταχύτητα ροής ρυθμίστηκε στα 0.4 ml/min και η θερμοκρασία του φούρνου στους 40°C. Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το εξής: 1 min: 70% A - 30% B →6 min: 10 % A -90% B , 7 min: 70% A-30% B. Για τον προσδιορισμό του ABC επιλέχθηκε η μέθοδος των επιλεγμένων ιόντων (SIM) ([M+H]⁺, m/z: 287, διαγνωστικά ιόντα: m/z: 191 και m/z: 150).

2.3. Διασφάλιση ποιότητας/Έλεγχος ποιότητας / Μέτρηση της αβεβαιότητας

Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της γραμμικότητας (linearity), της ευαισθησίας της μεθόδου μέσω του υπολογισμού του ορίου ανίχνευσης (Limit of Detection, LOD) και του ορίου ποσοτικοποίησης (Limit of Quantification, LOQ) και της ακρίβειας της μεθόδου μέσω του υπολογισμού της επαναληψιμότητας (repeatability, RSD_r) και της αναπαραγωγιμότητας (reproducibility, RSD_R). Τα όρια ανίχνευσης (LOD) προσδιορίστηκαν ως η συγκέντρωση του

εμβολιασμένου δείγματος για την οποία η αναλογία του σήματος της φαρμακευτικής ουσίας προς το θόρυβο του οργάνου είναι ίση με 3 ($S/N=3$), ενώ τα όρια ποσοτικοποίησης (LOQ) ως η αντίστοιχη συγκέντρωση του δείγματος που αντιστοιχεί σε σήμα ίσο με 10 φορές το θόρυβο του οργάνου.

Η γραμμικότητα της μεθόδου εκτιμήθηκε μέσω των καμπυλών αναφοράς και ελέγχθηκε για την περιοχή των συγκεντρώσεων ανάμεσα στο όριο ποσοτικοποίησης και 10 φορές του ίδιου ορίου πριν και μετά από κάθε σειρά δειγμάτων. Επιπλέον, δύο τυφλα δείγματα ελέγχου (QC) εμβολιασμένα με τη συγκέντρωση του ορίου ποσοτικοποίησης και 10 φορές αυτού αναλύθηκαν σε κάθε παρτίδα. Επίσης, η ακρίβεια της μεθόδου (MIP-SPME_f προσδιορίστηκε από τις ανακτήσεις και τη μέτρηση της σχετικής τυπικής απόκλισης (Relative Standard Deviation, RSD) που προκύπτει από την επαναλαμβανόμενη ανάλυση ($n=5$) εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα (επαναληψιμότητα-repeatability, RSD_f) και διαφορετικές μέρες (αναπαραγωγιμότητα-reproducibility, RSD_R).

Η αβεβαιότητα που συνδέεται με τις συγκεντρώσεις του αναλύτη-στόχου σε σύγκριση με τα διαφορετικά υποστρώματα μελετήθηκε με την “bottom up” προσέγγιση της EURCHEM και Eurolab (Guide 2000, Ellison et al. 2000), όπου βασίζεται στον προσδιορισμό, την ποσοτικοποίηση και το συνδυασμό όλων των επιμέρους πηγών αβεβαιότητας. Η συνδυασμένη αβεβαιότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με την οδηγία «Expression of Uncertainty in Measurement» GUM (2008) με την Εξίσωση 1.:

$$u' = \sqrt{(u_R)^2 + (u_{cal})^2 + (u_{rec})^2 + (u_{st})^2 + (u_R)^2 + (u_V)^2 + (u_w)^2} \quad (1)$$

Τέλος, η διευρυμένη σχετική τυπική αβεβαιότητα (u) υπολογίστηκε με τη χρήση του συντελεστή κάλυψης $k=2$, σε επίπεδο εμπιστοσύνης 95%.

2.4. Συλλογή δειγμάτων

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Μονάδα επεξεργασίας Υγρών Λυμάτων (είσοδος-έξοδος) της πόλης του Βόλου (Κεντρική Ελλάδα). Τα επιφανειακά δείγματα συλλέχθηκαν από τον Στρυμόνα ποταμό, τη Λίμνη Βόλβη και το Θερμαϊκό κόλπο, ενώ τα δείγματα ούρων ελήφθησαν από υγιή εθελόντρια 29 ετών. Όλα τα δείγματα διηθήθηκαν με φίλτρο 0,45 mm και αποθηκεύτηκαν σε σκουρόχρωμες φιάλες στους 4°C, μέχρι τη στιγμή της προκατεργασίας.

3. Βελτιστοποίηση της SPME-MIP_f

3.1. Βελτιστοποίηση της μεθοδολογίας ABC MIP-SPME_f

Ο προσδιορισμός των βέλτιστων συνθηκών για την προκατεργασία των δειγμάτων είναι εξαιρετικής σημασίας για την ανάπτυξη των αναλυτικών μεθόδων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, πολλές μεταβλητές δύναται να επηρεάσουν την αποδοτικότητα της SPME για τους αναλύτες-στόχους. Ανάμεσα σε άλλες, οι πιο συχνά μελετώμενες μεταβλητές συμπεριλαμβάνουν το χρόνο εκχύλισης, το pH του δείγματος, την προσθήκη άλατος, τη θερμοκρασία, την ανάδευση, την κατεργασία με υπερήχους, και το διαλύτη εκρόφησης. Στην παρούσα μελέτη, οι συνθήκες εκρόφησης επιλέχθηκαν χρησιμοποιώντας μια μεταβλητή κάθε

φορά, ενώ το pH ρυθμίστηκε στο 8 και η θερμοκρασία του διαλύματος στους 45°C, αντίστοιχα, λαμβάνοντας υπόψη προηγούμενα πειράματα προσρόφησης. Για τη βελτιστοποίηση των κυριότερων μεταβλητών, όπως ρυθμός ανάδευσης, χρόνος εκχύλισης και περιεκτικότητα άλατος, εφαρμόστηκε ο πειραματικός σχεδιασμός κεντρικής σύνθεσης (CCD).

3.2. Συνθήκες εκρόφησης

3.2.1. Επίδραση του διαλύτη εκρόφησης

Η ρύθμιση των συνθηκών εκρόφησης αποτελεί ένα από τα πιο σημαντικά βήματα στη διεργασία της εκχύλισης SPME. Στην παρούσα μελέτη, προκειμένου να εξασφαλιστεί η συμβατότητα του διαλύτη έκλουσης με την κινητή φάση του LC-MS, δυο πολικοί διαλύτες, η μεθανόλη (MeOH) και το ακετονιτρίλιο (ACN), καθώς και μίγματα αυτών με όξινα διαλύματα (1% φορμικού οξέος (F.A.)), αξιολογήθηκαν ως διαλύτες εκρόφησης. Η υγρή εκρόφηση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του λουτρού υπερήχων για 5 λεπτά. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, ο διαλύτης MeOH/F.A. παρουσίασε καλύτερη απόδοση στην εκρόφηση, όσον αφορά το εμβαδόν και το σχήμα των κορυφών και γι' αυτό επιλέχθηκε για τα ακόλουθα πειράματα.

3.2.2. Επίδραση του όγκου του διαλύτη εκρόφησης

Ο όγκος του διαλύτη έκλουσης είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για την αποτελεσματικότητα της εκρόφησης της SPME, καθώς επηρεάζει την ακρίβεια και την ευαισθησία της μεθόδου προσδιορίζοντας το μέγιστο συντελεστή προσυγκέντρωσης που μπορεί να επιτευχθεί για τον αναλύτη-στόχο. Κατά τη διαδικασία της εκρόφησης, μελετήθηκε η επίδραση του όγκου του διαλύτη έκλουσης από 0.5 έως 3.0 mL. Τα υψηλότερα ποσοστά εκρόφησης παρατηρήθηκαν για όγκους μεγαλύτερους από 1.0 mL. Η επαναληψιμότητα αυξήθηκε σε όγκους μικρότερους από το 1.0 mL, πιθανώς επειδή ο όγκος αυτός δεν ήταν ικανός να εκροφήσει τον αναλύτη στόχο. Συνεπώς, επιλέχθηκε ο όγκος του 1.0 mL για τα περαιτέρω πειράματα.

3.2.3. Μελέτη του χρόνου εκρόφησης

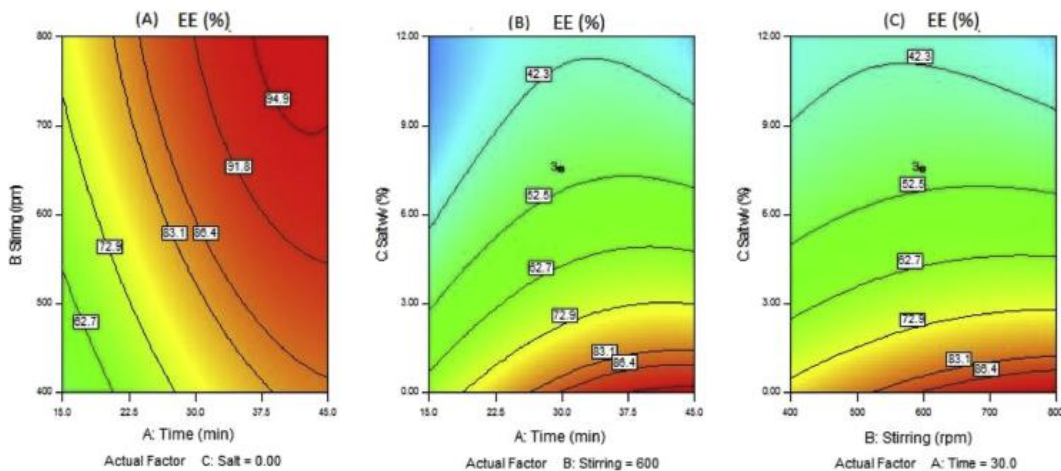
Η εκροφούμενη ποσότητα του αναλύτη-στόχου αυξήθηκε με αύξηση του χρόνου εκρόφησης και το χαμηλότερο φαινόμενο «carry over» παρατηρήθηκε με τη μεθανόλη. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι οι ανακτήσεις βελτιώθηκαν αυξάνοντας το χρόνο εκρόφησης από 1 σε 5.0 λεπτά. Με την αύξηση του χρόνου στα 10 λεπτά, το ABC εκροφάται πλήρως και συνεπώς αυτός είναι και ο χρόνος που επιλέχθηκε.

3.3. Βελτιστοποίηση της Μεθοδολογίας Μικροεκχύλισης Στερεάς Φάσης μέσω του Σχεδιασμού Κεντρικής Σύνθεσης (Central Composite Design)

Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών εκχύλισης του ABC με τη μέθοδο της SPME-MIP_f, έγινε χρήση του Λογισμικού Προγράμματος Design Expert (Trial V. 7.0.b1.1 Stat Ease, Inc., Minneapolis, USA). Ο πειραματικός σχεδιασμός κεντρικής σύνθεσης (CCD) ήταν δύο επιπέδων με έξι κεντρικά σημεία. Οι μέγιστες και κατώτατες τιμές των υπό μελέτη

παραγόντων, ήταν αντίστοιχα, +1 και -1. Κατά τον σχεδιασμό κεντρικής σύνθεσης 17 σειρές πειραμάτων έλαβαν χώρα, έτσι ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι επιδράσεις μη ελεγχόμενων μεταβλητών. Στον Πίνακα 1, παρουσιάζονται, οι κύριοι παράγοντες, τα σύμβολά τους, τα επίπεδα των παραγόντων, καθώς και η απόκριση της κάθε πειραματικής σειράς.

Για την επιλογή του εύρους των υπό μελέτη παραμέτρων έλαβαν χώρα προκαταρκτικά πειράματα τα οποία ήταν τα ακόλουθα: χρόνος εκχύλισης 15-45 min, ρυθμός ανάδευσης 400-800 rpm, και συγκέντρωση NaCl 3-15% w/v. Ο γραμμικός συντελεστής συσχέτισης R^2 του πολυωνυμικού μοντέλου δεύτερης τάξης ήταν μεγαλύτερος του 0.98, κάτι που υποδηλώνει πως τα πειραματικά δεδομένα προσαρμόζονται καλά στο μοντέλο. Σύμφωνα με τον πίνακα 1, παρατηρείται ότι όλες οι επιδράσεις ήταν στατιστικά σημαντικές, καθώς οι τιμές p-values ήταν μικρότερες του 0.05. Ο χρόνος εκχύλισης (A) και η ανάδευση (B) παρουσίασαν θετική γραμμική επίδραση στο μοντέλο, ενώ η προσθήκη άλατος, αρνητική επίδραση. Επίσης, για την απεικόνιση της συσχέτισης της απόκρισης και των επιπέδων των υπό μελέτη παραγόντων, έγινε χρήση των γραφημάτων ισοϋψών (contour plots) (Σχήμα 1), σύμφωνα με τη μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (response surface methodology). Οι βέλτιστες συνθήκες υπολογίστηκαν ως εξής: 40 λεπτά χρόνος εκχύλισης, 650 rpm ο ρυθμός ανάδευσης και 0.3% η ποσότητα του NaCl. Επίσης πραγματοποιήθηκαν πειράματα επικύρωσης της μεθοδολογίας με τις βελτιστοποιημένες παραμέτρους.



Σχήμα 1: Διαγράμματα ισοϋψών για την απεικόνιση : (Α) του ρυθμούς ανάδευσης και του χρόνου εκχύλισης, (Β) του χρόνου εκχύλισης και της ποσότητα NaCl και (Γ) του ρυθμού ανάδευσης και της ποσότητας NaCl στην αποτελεσματικότητα της εκχύλισης του ABC.

Πίνακας 1: Πειραματικά δεδομένα του CCD για τη μέθοδο ABC-SPME-MIP_f

Std	Run	Παράγοντας 1	Παράγοντας 2	Παράγοντας 3	Ανάκτηση (%)
		A:Χρόνος (min)	B:Ανάδευση (rpm)	C: NaCl (w/v (%))	
4	1	45	800	3.0	69.8
15	2	30	600	7.5	48.3
3	3	15	800	3.0	55.9
16	4	30	600	7.5	50.4
6	5	45	400	12.0	39.6
11	6	30	264	7.5	38.4
8	7	45	800	12.0	28.8
17	8	30	600	7.5	51.6
2	9	45	400	3.0	66.1
10	10	55	600	7.5	43.2
7	11	15	800	12.0	31.2
9	12	5	600	7.5	20.4
5	13	15	400	12.0	28.8
13	14	30	600	0.0	90.5
1	15	15	400	3.0	38.4
14	16	30	600	15.0	38.4
12	17	30	936	7.5	46.8

Παράγοντας	Όνομα	Μονάδες	Χαμηλό επίπεδο	Υψηλό επίπεδο	Mean	Std. Dev.
A	Χρόνος	min	15	45	30	13.44
B	Ανάδευση	rpm	400	800	600	179.30
C	NaCl	w/v (%)	3	12	7.5	4.0

3.4. Επικύρωση της μεθόδου

Για την αξιολόγηση της μεθοδολογίας SPME-MIP_f, ελέγχθηκε η γραμμικότητα, η ακρίβεια και η ευαισθησία της μεθόδου στις βέλτιστες συνθήκες για διαφορετικά περιβαλλοντικά (νερό λίμνης (LW), θαλασσινό νερό (SW), νερό ποταμού (RW) ανεπεξέργαστα απόβλητα (WWI), επεξεργασμένα απόβλητα (WWE)) και βιολογικά υποστρώματα (ούρα (U)) (Πίνακας 2). Γραμμικότητα παρατηρήθηκε σε όλο το εύρος των καμπυλών αναφοράς 50-100 ng/ L με συντελεστή γραμμικότητας $r^2 > 0.993$. Τα όρια ανίχνευσης (LOD) και το όριο ποσοτικοποίησης (LOQ) κυμάνθηκαν από το 10.1-43.9 ng/L. Η ακρίβεια της μεθόδου αξιολογήθηκε από τις μετρήσεις της επαναληψιμότητας και της αναπαραγωγιμότητας. Η επαναληψιμότητα κυμάνθηκε από 1.1-6.4%, ενώ η αναπαραγωγιμότητα από 3.4-9.7 %.

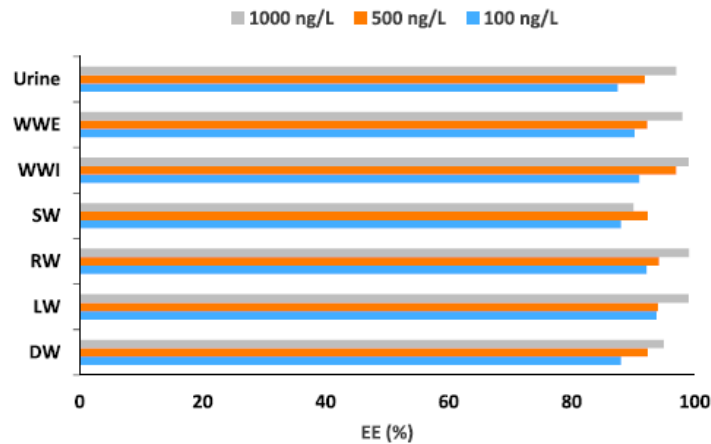
Πίνακας 2: Απόδοση της αναλυτικής μεθοδολογίας ABC-SPME-MIP_f σε διαφορετικά υποστρώματα

	Επίπεδο εμβολιασμού (ng/L)	DW	LW	SW	RW	WWI	WWE	Urine
LOD (ng/L)	-	10.1	10.5	10.3	11.6	13.6	10.6	12.7
LOQ (ng/L)	-	33.3	34.5	34.0	38.3	43.9	34.5	41.9
RSD_f (%)								
(n = 5)	100	2.2	4.8	5.3	3.3	4.2	4.4	6.4
	500	1.5	3.1	4.2	2.9	4.1	3.7	5.5
	1000	1.1	3.5	3.8	2.8	3.7	3.4	3.7
RSD_R (%)								
(n = 5)	100	3.8	5.8	6.3	5.3	6.2	5.6	9.7
	500	3.4	4.8	5.4	4.9	5.5	5.0	9.4
	1000	4.0	4.2	4.6	3.4	3.9	4.3	8.4
U (%)								
(k = 2, confidence level 95%)	100	17.4	29.6	31.4	28.2	35.7	31.2	37.7
	500	14.1	22.7	26.9	21.9	28.9	25.6	32.5
	1000	10.3	19.7	22.1	19.2	22.7	20.3	27.8

3.5. Ανάλυση πραγματικών δειγμάτων

Η αξιοπιστία και η ευελιξία της μεθόδου SPME-MIP_f σε συνδυασμό με το LC-MS ελέγχθηκε με την εκχύλιση πραγματικών δειγμάτων. Έξι κατηγορίες υγρών δειγμάτων αναλύθηκαν (νερό λίμνης (LW), νερό ποταμού (RW), θαλασσινό νερό (SW), ανεπεξέργαστα απόβλητα (WWI), επεξεργασμένα απόβλητα (WWE) και ούρα (U)). Τα δείγματα εμβολιάστηκαν με γνωστή συγκέντρωση πρότυπου διαλύματος ABC (100, 500, 1000 ng/L), έπειτα η εκχύλιση πραγματοποιήθηκε όπως αναγράφεται στην Ενότητα 2.1. Τα ανεπεξέργαστα απόβλητα (WWI) και επεξεργασμένα απόβλητα (WWE) είναι τα πιο σύνθετα υποστρώματα και για αυτό το λόγο επιλέχθηκαν ώστε να μελετήσουμε την επίδραση του υποστρώματος (Σχήμα 2). Η ανάκτηση της SPME κυμάνθηκε από 88-99%, επιβεβαιώνοντας την ελάχιστη επίδραση της φύσης του υποστρώματος στην εκχύλιση και επομένως την υψηλή εκλεκτικότητα της μεθόδου.

Η απουσία επίδρασης της φύσης του υποστρώματος στην επίδοση της μεθόδου επιβεβαιώθηκε με περαιτέρω πειράματα, εμπλουτίζοντας τα υδατικά δείγματα με 5 mg/L χουμικών οξέων. Είναι γνωστό ότι τα χουμικά οξέα μπορούν να μειώσουν την ποσότητα των εκχυλισμένων οργανικών ουσιών ή/και να δημιουργήσουν παρεμποδίσεις στην ανάλυσή τους. Ωστόσο, τα δεδομένα έδειξαν ότι η εν λόγω μεθοδολογία παρουσιάζει υψηλή εκλεκτικότητα και ικανότητα καθαρισμού του δείγματος, ώστε ούτε τα χουμικά ούτε κάποιο άλλο από τα υπό μελέτη υποστρώματα να δημιουργεί παρεμποδίσεις. Συνολικά, τα αποτελέσματα καταδεικνύουν ότι η προτεινόμενη ABC- SPME-MIP_f μέθοδος είναι απλή, ευαίσθητη και αξιόπιστη και θα μπορούσε εύκολα να εφαρμοστεί για τον προσδιορισμό του ABC σε σύνθετα περιβαλλοντικά υποστρώματα (απόβλητα) και ούρα προσφέροντας υψηλή εκλεκτικότητα.



Σχήμα 2: Αποτελεσματικότητα της εκχύλισης (EE %) του abacavir σε διαφορετικά υποστρώματα

3.6. Μελέτη της αβεβαιότητας

Στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η προσέγγιση "bottom-up" για την αξιολόγηση της αβεβαιότητας σύμφωνα με το έγγραφο ISO (GUM 2008, Ellison et al. 2000, Guide 2000). Οι παράμετροι επικύρωσης της μεθόδου που είναι σχετικοί με την προετοιμασία του δείγματος, τον αναλύτη και την πορεία του οργάνου διερευνήθηκαν και ποσοτικοποιήθηκαν. Η συνεισφορά των επιμέρους παραμέτρων εκφράστηκαν σε σχέση με τη συμβολή τους στην διευρυμένη αβεβαιότητα ως εξής: το κύριο συστατικό της αβεβαιότητας προήλθε από την ενδοεργαστηριακή επαναληψιμότητα, ακολούθησε η βαθμονόμηση και η ορθότητα. Τέλος, αβεβαιότητες που προέρχονται από άλλους παράγοντες: όπως η καθαρότητα του προτύπου, οι συγκεντρώσεις εμβολιασμού του δείγματος, η ζύγιση ήταν αμελητέες ή πολύ μικρές. Οι μετρήσεις της διευρυμένης αβεβαιότητας κυμάνθηκαν από 10.3 % έως 37.7 % σε διαφορετικά επίπεδα συγκεντρώσεων (100, 500, 1000 ng/L) και για όλα τα υπό μελέτη υποστρώματα (DW, RW, SW, LW, WWI, WWE, U).

3.7. Σύγκριση της ABC-SPME-MIP_f με την SPE

Για την περαιτέρω αξιολόγηση της εκλεκτικότητας και της αποτελεσματικότητας της εκχύλισης με την μέθοδο ABC-SPME-MIP_f σε υδατικά δείγματα, μελετήθηκαν δύο διαφορετικά προσροφητικά υλικά SPE, τα Oasis HLB (200 mg, 6 cc) και τα CNW HLB (150 mg, 6 cc) και συγκρίθηκαν για νερό ποταμού, ανεπεξέργαστα και επεξεργασμένα απόβλητα. Ακολουθώντας το πρωτόκολλο της SPE Kosma et al. (2014), οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από το 68% έως το 78% στα νερό του ποταμού, από το 56-68 % στα ανεπεξέργαστα απόβλητα και από το 59-71% στα επεξεργασμένα απόβλητα για το CNW HLB και OASIS HLB, αντίστοιχα. Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα, είναι ξεκάθαρη η υπεροχή των ανακτήσεων (>90%) και του καθαρού χρωματογραφήματος που ελήφθησαν με την μέθοδο της SPME με την μοριακά αποτυπωμένη ίνα.

Η υψηλή εκλεκτικότητα και ο αποτελεσματικός καθαρισμός των MIPs για τα αντικα φάρμακα συγκριτικά με τα συμβατικά SPE προσροφητικά υλικά: όπως C18, HLB και SCX έχει τεκμηριωθεί και σε άλλες μελέτες (Yan et al. 2014, Chianella et al. 2006).

Συνοψίζοντας, θα πρέπει να επισημάνουμε ότι η προτεινόμενη μεθοδολογία ABC-SPME-MIP_f, είναι εύκολη, γρήγορη και φιλική προς το περιβάλλον. Μπορεί να αξιοποιηθεί από ένα μεγάλο εύρος εφαρμογών, καθώς παρουσιάζει πολύ μεγάλη ευαισθησία, εκλεκτικότητα και ικανότητα εμπλουτισμού του ABC, μειώνοντας παράλληλα τις παρεμποδίσεις από τα πολύπλοκα υποστρώματα.

4. Συμπεράσματα

Στην παρούσα μελέτη η προτεινόμενη μεθοδολογία ABC-SPME-MIP_f είναι εύκολη στη χρήση, αξιόπιστη, ευαίσθητη, μειώνει τον όγκο του δείγματος και τους όγκους του διαλύτη εκρόφησης. Πλεονεκτεί από την εκχύλιση στερεάς φάσης και είναι ικανή να χρησιμοποιηθεί για αναλύσεις ρουτίνας.

5. Βιβλιογραφία

- Boyacı, E., Rodríguez-Lafuente, Á., Gorynski, K., Mirnaghi, F., Souza-Silva, É.A., Hein, D. and Pawliszyn, J., “Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases”, *Analytica chimica acta*, 873, p.p. 14-30, 2015.
- Chianella, I., Karim, K., Piletska, E.V., Preston, C. and Piletsky, S.A., “Computational design and synthesis of molecularly imprinted polymers with high binding capacity for pharmaceutical applications-model case: Adsorbent for abacavir”, *Analytica chimica acta*, 559, p.p. 73-78, 2006.
- Ellison, SLR, M Rosslein, and A Williams, “*Eurachem/CITAC guide, Quantifying uncertainty in analytical measurement 2*”, 2000.
- Evgenidou, E.N., Konstantinou, I.K. and Lambropoulou, D.A., “Occurrence and removal of transformation products of PPCPs and illicit drugs in wastewaters: a review”, *Science of The Total Environment*, 505, p.p. 905-926, 2015.
- Fumes, B.H., Silva, M.R., Andrade, F.N., Nazario, C.E.D. and Lanças, F.M., “Recent advances and future trends in new materials for sample preparation”, *Trends in Analytical Chemistry*, 71, p.p. 9-25, 2015.
- Guide, E.C., “*Quantifying uncertainty in analytical measurement*”, Laboratory of the Government Chemist, 2000, London.
- GUM, I., “*Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement, (1995), with Supplement 1, Evaluation of measurement data, JCGM 101: 2008.*” Organization for Standardization, 2008, Geneva, Switzerland.
- Kosma, C.I., Lambropoulou, D.A. and Albanis, T.A., “Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: occurrence, removal and environmental risk assessment”, *Science of the Total Environment*, 466, p.p. 421-438, 2014.
- Lambropoulou, D.A., “An Overview of Modern Extraction Techniques for the Determination of Organic Pollutants in Environmental Matrices: A Review”, *Current Organic Chemistry*, 14, p.p. 2247-2267, 2010.
- Lambropoulou, D.A. and Nollet, L.M. eds., “*Transformation products of emerging contaminants in the environment: Analysis, processes, occurrence, effects and risks*”, 2014, John Wiley & Sons.
- Prasse, C., Schlüsener, M.P., Schulz, R. and Ternes, T.A., “Antiviral drugs in wastewater and surface waters: a new pharmaceutical class of environmental relevance?”, *Environmental science & technology*, 44, p.p. 1728-1735, 2010.

Souza-Silva, É.A., Jiang, R., Rodríguez-Lafuente, A., Gionfriddo, E. and Pawliszyn, J., “A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I”, *Environmental analysis. TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 71, p.p. 224-235, 2015.

Verlicchi, P. and Zambello, E., “*Pharmaceuticals and personal care products in untreated and treated sewage sludge: Occurrence and environmental risk in the case of application on soil—A critical review*”, *Science of The Total Environment*, 538, p.p. 750-767, 2015.

Wen, Y., Chen, L., Li, J., Liu, D. and Chen, L., “*Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis*”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 59, p.p. 26-41, 2014.

Xu, J., Zheng, J., Tian, J., Zhu, F., Zeng, F., Su, C. and Ouyang, G., “*New materials in solid-phase microextraction*”, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 47, p.p. 68-83, 2013.

Yan, H., Wang, M., Han, Y., Qiao, F. and Row, K.H., “*Hybrid molecularly imprinted polymers synthesized with 3-aminopropyltriethoxysilane-methacrylic acid monomer for miniaturized solid-phase extraction: A new and economical sample preparation strategy for determination of acyclovir in urine*”, *Journal of Chromatography A*, 1346, p.p. 16-24, 2014.