



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
« ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ »

« Προσδιορισμός φαρμακευτικών ενώσεων σε λυματολάσπη και του βαθμού απομάκρυνσης μέσω υδροθερμικής επεξεργασίας με χρήση εκχύλισης QuEChERS και υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC-MS/MS-LTQ-ORBITRAP) »

**ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ ΜΙΣΕΡΛΗ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**



**UNIVERSITY OF IOANNINA**  
**SCHOOL OF SCIENCES**  
**DEPARTMENT OF CHEMISTRY**  
**SECTOR OF INDUSTRIAL CHEMISTRY**

POSTGRADUATE COURSE

« ANALYTICAL CHEMISTRY, ENVIRONMENTAL AND FOOD CHEMISTRY AND TECHNOLOGY »

« **Determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge and their removal degree by hydrothermal treatment using a modified QuEChERS extraction and a liquid chromatography-mass spectrometry of high resolution and accuracy (UHPLC LTQ/Orbitrap MS)** »

**KLEOPATRA MISERLI**  
**CHEMIST**

**MASTER THESIS**

**IOANNINA 2021**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**  
**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**  
**ΤΟΜΕΑΣ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ**

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΧΗΜΕΙΑΣ  
« ΑΝΑΛΥΤΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ, ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ »

**« Προσδιορισμός φαρμακευτικών ενώσεων σε λυματολάσπη και του βαθμού απομάκρυνσης μέσω υδροθερμικής επεξεργασίας με χρήση εκχύλισης QuEChERS και υγρής χρωματογραφίας - φασματομετρίας μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC-MS/MS-LTQ-ORBITRAP) »**

**ΚΛΕΟΠΑΤΡΑ ΜΙΣΕΡΛΗ**  
**ΧΗΜΙΚΟΣ**

**ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

1. Κωνσταντίνου Ιωάννης (επιβλέπων): Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
2. Αλμπάνης Τριαντάφυλλος: Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων
3. Παπαγεωργίου Γεώργιος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2021**

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Ολοκληρώνοντας την παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που με το δικό τους τρόπο με στήριξαν σε όλη αυτήν την πορεία. Συγκεκριμένα:

τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας, κ. Ιωάννη Κωνσταντίνου, επιβλέποντα της μεταπτυχιακής μου διατριβής για την πολύτιμη καθοδήγηση και υποστήριξή του καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας μου. Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπαιδευθώ σε ένα πλήθος αναλυτικών τεχνικών σχετικών με το ερευνητικό αντικείμενο της παρούσας εργασίας αλλά και για τις πολύτιμες γνώσεις που μου μετέδωσε σχετικά με την έρευνα, βάση της εμπειρίας του. Αυτά τα δύο χρόνια είχαμε μία άριστη συνεργασία και υπήρξε πάντοτε πρόθυμος να με βοηθήσει με οποιαδήποτε απορία και να με στηρίξει σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

τον Καθηγητή του Τμήματος Χημείας και Πρύτανη του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο για την πρόσβαση στο χώρο και σε οργανολογίες του εργαστηρίου Ελέγχου Ρύπανσης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος.

τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής κ. Κωνσταντίνου Ιωάννη, κ. Αλμπάνη Τριαντάφυλλο και κ. Παπαγεωργίου Γεώργιο για την αποδοχή να αξιολογήσουν τη Μεταπτυχιακή μου Διατριβή, το χρόνο που αφιέρωσαν και τις χρήσιμες συμβουλές και παρατηρήσεις τους κατά τη διόρθωση της διπλωματικής εργασίας.

την Δρ. Χριστίνα Κοσμά για την συμβολή της και τη βοήθειά της στην χρήση του συστήματος υγρής χρωματογραφίας – υπερ-ψηλής πίεσης UHPLC-MS/MS-LTQ-ORBITRAP.

την συνάδελφο και υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας Αγγελική Καλογεροπούλου για την εκμάθηση και τη συνεργασία μας στην τεχνική εκχύλισης Quecher's.

τους συναδέλφους του Τμήματος Χημείας Μπαϊράμη Φειδία, Ράπη Ιλάιρα, Μανώλη Νότα, Λύκο Χρήστο, Ναστοπούλου Αμαλία και Μάνο Δονάτο για την συνεργασία μας και για το φιλικό κλίμα που αναπτύχθηκε μεταξύ μας καθ' όλη τη διάρκεια της φοίτησής μου στο μεταπτυχιακό πρόγραμμα σπουδών του Τμήματος Χημείας.

Κλεοπάτρα Μισερλή

Ιωάννινα

Οκτώβριος, 2021

## Περίληψη

Η πρόσφατη εμφάνιση πλήθους αναγνωρισμένων ενώσεων ανθρωπογενούς ή φυσικής προέλευσης στο περιβάλλον με τη μορφή βιολογικών και χημικών ρυπαντών αποτελεί παγκόσμιο ζήτημα αυξανόμενης περιβαλλοντικής ανησυχίας. Τα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν κάνει την εμφάνισή τους την τελευταία δεκαετία και αποτελούν την πιο σημαντική κατηγορία αναδύομενων ρύπων τα οποία καταλήγουν μέσω των αποχετευτικών συστημάτων σε μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων και κατόπιν σε υδάτινους αποδέκτες με αποτέλεσμα να αποτελούν ρύπους του υδάτινου οικοσυστήματος.

Στόχος της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη και η επικύρωση μιας αναλυτικής μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τριαντατριών (33) φαρμακευτικών ενώσεων σε δείγματα λυματολάσπης και παράλληλα η εφαρμογή της υδροθερμικής επεξεργασίας της λυματολάσπης για τον προσδιορισμό του ποσοστού απομάκρυνσης των υπολειμμάτων των φαρμακευτικών ουσιών από αυτή. Εφαρμόστηκε η τεχνική εκχύλιση Quechers και ο προσδιορισμός των ενώσεων πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπέρ-υψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή μαζών LTQ/Orbitrap MS. Πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση της αναλυτικής μεθόδου σε διάφορα στάδια της προκατεργασίας και η μέθοδος επικυρώθηκε τόσο στο υπόστρωμα της λυματολάσπης όσο και στο υπόστρωμα του υδροεξανθρακώματος ως προς τους όρους της γραμμικότητας, ανάκτησης, αποτελεσματικότητας, επαναληψιμότητας, ορίων ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης, αβεβαιότητας και επίδρασης του υποστρώματος.

Η μελέτη της επίδρασης σημαντικών παραμέτρων και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της υδροθερμικής κατεργασίας πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της μεθοδολογίας της επιφανειακής απόκρισης για τον υπολογισμό της επί τοις εκατό απομάκρυνσης τόσο του συνόλου των ενώσεων όσο και τεσσάρων ξεχωριστών ενώσεων (Amisulpride, Amitriptyline, Risperidone και Citalopram) που ανιχνεύθηκαν σε υψηλή συγκέντρωση στη λυματολάσπη.

Τέλος, η μέθοδος Quechers εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα λυματολάσπης και υδροεξανθρακώματος για την ανίχνευση, τον προσδιορισμό των φαρμακευτικών ενώσεων και τον υπολογισμό του ποσοστού απομάκρυνσής τους από τα δύο υποστρώματα.

**Λέξεις-Κλειδιά:** φαρμακευτικές ενώσεις, ενεργός ιλύς, υδροθερμική επεξεργασία, υδροεξανθράκωμα, LC-MS/MS, μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM).

## **Summary**

The recent emergence of several recognized associations of anthropogenic or natural origin in the environment in the form of biological and chemical contaminants is a global issue of growing environmental concern. Pharmaceutical products have appeared in the last decade and constitute the most important category of emerging pollutants that end up through sewer systems in waste treatment plants and then in water recipients, thus constituting pollutants of the aquatic ecosystem.

The aim of this postgraduate thesis is the development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of thirty-three (33) pharmaceutical compounds in sludge samples and at the same time the application of hydrothermal treatment of sludge for the determination of the removal rate of pharmaceutical substances residues. The Quechers extraction technique was applied, and the compounds were determined by an ultra-high pressure liquid chromatography system coupled with high resolution mass spectrometry and specifically with the LTQ/Orbitrap MS hybrid mass analyzer. The analytical method was optimized at various stages of pretreatment and the method was validated both in sludge substrate and in hydrochar substrate in terms of linearity recovery, efficiency, repeatability, limits of detection and quantification, uncertainty and impact of the substrate.

The study of the influence of important parameters and the finding of the optimal conditions of hydrothermal treatment was carried out by applying the central composite design (CCD) and the surface response methodology (RSM) to calculate the percentage removal of pharmaceutical compounds and four separate compounds (Amisulpride, Amitriptyline, Risperidone και Citalopram) detected at high concentration levels in sludge.

Finally, Quechers was applied to real samples of sludge and hydrochar to detect the medicinal compounds and calculate their removal rate from the two substrates.

**Keywords:** pharmaceutical compounds, sewage sludge, hydrothermal treatment, hydrochar, LC-MS/MS, Response Surface Medology (RSM).

## Περιεχόμενα

Περίληψη .....	i
Summary .....	ii
I. Θεωρητικό Μέρος .....	- 1 -
Κεφάλαιο 1 .....	- 1 -
Φαρμακευτικά Προϊόντα στο περιβάλλον: ένα αναδυόμενο περιβαλλοντικό πρόβλημα .	- 1 -
1.1 Εισαγωγή .....	- 1 -
1.2 Είσοδος και συμπεριφορά των φαρμακευτικών προϊόντων στο περιβάλλον .....	- 3 -
1.3 Φαρμακευτικές ουσίες που μελετήθηκαν .....	- 6 -
Κεφάλαιο 2 .....	- 15 -
Μέθοδοι και Στάδια επεξεργασίας αποβλήτων .....	- 15 -
2.1 Μέθοδοι και Στάδια επεξεργασίας αποβλήτων στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού-	15 -
i. Πρωτοβάθμια επεξεργασία ή μηχανικός καθαρισμός .....	- 15 -
ii. Δευτεροβάθμια επεξεργασία ή βιολογικός καθαρισμός .....	- 16 -
iii. Τριτοβάθμια επεξεργασία ή χημικός καθαρισμός .....	- 17 -
2.2 Προέλευση-Σύσταση και Ποιοτικά χαρακτηριστικά Λυματολάσπης .....	- 18 -
2.2.1 Πρωτοβάθμια λυματολάσπη .....	- 20 -
2.2.2 Δευτεροβάθμια λυματολάσπη .....	- 21 -
2.3 Παραγωγή λυματολάσπης στις Ευρωπαϊκές Χώρες .....	- 23 -
2.4 Μέθοδοι Διάθεσης και επεξεργασίας της ιλύος .....	- 24 -
Κεφάλαιο 3 .....	- 27 -
Υδροθερμική Επεξεργασία Λυματολάσπης .....	- 27 -
3.1 Εισαγωγή .....	- 27 -
3.2 Υδροθερμική Ανθρακοποίηση Λυματολάσπης .....	- 28 -
3.3 Παράμετροι που επηρεάζουν την Υδροθερμική Ανθρακοποίηση .....	- 35 -
3.4 Εφαρμογές Υδροθερμικής Ανθρακοποίησης .....	- 38 -
3.4 Μεθοδολογία Βελτιστοποίησης υδροθερμικής αναθρακοποίησης: Μεθοδολογία Επιφανειακής Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) .....	- 42 -
Κεφάλαιο 4 .....	- 49 -
Τεχνικές εκχύλισης και ανάλυσης ρύπων από περιβαλλοντικά υποστρώματα .....	- 49 -
4.1 Εισαγωγή .....	- 49 -
4.2 Τεχνικές εκχύλισης ρύπων από στερεά υποστρώματα .....	- 50 -

4.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους (UAE) .....	- 50 -
4.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE).....	- 51 -
4.2.3 Εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης υποστρώματος (MSPD).....	- 52 -
4.2.4 Εκχύλιση QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe) .....	- 53 -
4.3 Τεχνικές ανάλυσης ρύπων από στερεά υποστρώματα.....	- 57 -
4.3.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (Electrospray Ionization, ESI) .....	- 59 -
4.3.2 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap .....	- 60 -
II. Σκοπός και Αντικείμενο της Έρευνας.....	- 63 -
III. Πειραματικό Μέρος.....	- 65 -
Κεφάλαιο 5 .....	- 65 -
5.1 Πρότυπες ενώσεις – Διαλύτες – Αντιδραστήρια – Αέρια – Υλικά .....	- 65 -
5.1.1 Πρότυπες Φαρμακευτικές ενώσεις .....	- 65 -
5.1.2 Διαλύτες.....	- 65 -
5.1.3 Αντιδραστήρια .....	- 66 -
5.1.4 Αέρια.....	- 66 -
5.1.5 Υλικά.....	- 66 -
5.2 Σκεύη – Συσκευές – Αναλυτικά όργανα.....	- 67 -
5.2.1 Σκεύη .....	- 67 -
5.2.2 Συσκευές .....	- 67 -
5.2.3 Αναλυτικά όργανα .....	- 68 -
Κεφάλαιο 6 .....	- 69 -
Πειραματική διαδικασία υδροθερμικής ανθρακοποίησης (HTC) .....	- 69 -
6.1 Σχεδιασμός και εκτέλεση υδροθερμικής ανθρακοποίησης .....	- 69 -
Κεφάλαιο 7 .....	- 73 -
Πειραματική Διαδικασία προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών σε υπόστρωμα λυματολόασης.....	- 73 -
7.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων .....	- 73 -
7.2 Δειγματοληψία και Προ-κατεργασία της λυματολόασης.....	- 74 -
7.2.1 Δειγματοληψία της λυματολόασης.....	- 74 -
7.2.2 Προ-κατεργασία της λυματολόασης.....	- 76 -
7.3 Ανάπτυξη μεθόδου Quechers για την εκχύλιση φαρμακευτικών ουσιών από υπόστρωμα λυματολόασης.....	- 78 -
Κεφάλαιο 8 .....	- 81 -



Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών σε υπόστρωμα υδροεξανθράκωματος .....	- 81 -
8.1 Πρωτόκολλο Quechers σε υδροεξανθράκωμα .....	- 81 -
Κεφάλαιο 9 .....	- 83 -
Χρωματογραφικές συνθήκες και επικύρωση μεθόδου .....	- 83 -
9.1 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL ...	- 83 -
9.2 Επικύρωση Μεθόδου .....	- 86 -
9.3 Επίδραση του υποστρώματος .....	- 90 -
IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ .....	- 91 -
Κεφάλαιο 10 .....	- 91 -
Βελτιστοποίηση της μεθόδου Quechers για την εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων από στερεά υποστρώματα .....	- 91 -
A. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών στη λυματολάσπη .....	- 91 -
10.1 Εισαγωγή .....	- 91 -
10.2 Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση QuEChERS .....	- 92 -
B. Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων στη λυματολάσπη-	103 -
10.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου Quechers .....	- 103 -
10.4 Επίδραση υποστρώματος .....	- 108 -
Γ. Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων στο υδροεξανθράκωμα .....	- 109 -
10.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου Quechers .....	- 109 -
10.6 Επίδραση υποστρώματος .....	- 114 -
Κεφάλαιο 11 .....	- 115 -
Υδροθερμική κατεργασία λυματολάσπης για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων .....	- 115 -
11.1 Εισαγωγή .....	- 115 -
11.2 Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού .....	- 115 -
11.3 Μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση της απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών από τη λυματολάσπη με τη μέθοδο της επιφανειακής απόκρισης .....	- 117 -

11.4 Μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση αντιπροσωπευτικών φαρμακευτικών ενώσεων από τη λυματολάσπη με τη μέθοδο της επιφανειακής απόκρισης.....	- 126 -
(α) Amisulpride.....	- 126 -
(β) Amitriptyline .....	- 132 -
(γ) Risperidone.....	- 138 -
(δ) Citalopram .....	- 144 -
Κεφάλαιο 12 .....	- 149 -
Συμπεράσματα .....	- 149 -
Κεφάλαιο 13 .....	- 153 -
Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία.....	- 153 -
Ελληνική Βιβλιογραφία.....	- 170 -

### **Περιεχόμενα Εικόνων**

Εικόνα 1.1: Οι διαδικασίες που επιδρούν στην τύχη των φαρμάκων στο έδαφος. ....	- 5 -
Εικόνα 1.2: Βασικές διαδρομές έκθεσης φαρμακευτικών προϊόντων στο περιβάλλον. ....	- 6 -
Εικόνα 2.1: Γραμμή επεξεργασίας λυμάτων στη ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων.....	- 18 -
Εικόνα 2.2: Αερόβια βιολογική οξείδωση των οργανικών ουσιών .....	- 22 -
Εικόνα 2.3: Γραμμή επεξεργασίας της ιλύος στη ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων .....	- 22 -
Εικόνα 2.4: Διεργασίες υδροθερμικής επεξεργασίας της λυματολάσπης .....	- 26 -
Εικόνα 3.1: Σχηματική απεικόνιση των βιώσιμων εννοιών σχετικά με την παραγωγή υδροεξανθρακωμάτων, τις εφαρμογές και τον αντίκτυπο στο παγκόσμιο κλίμα.....	- 29 -
Εικόνα 3.2: Εικόνες από SEM (α) αποξηραμένης λάσπης, (β) παραγόμενο υδροεξανθράκωμα στους 180 °C, (γ) 220 °C , (δ) 250 °C .....	- 34 -
Εικόνα 4.1: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης υπερήχων.....	- 51 -
Εικόνα 4.2: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης με μικροκύματα ΜΑΕ .....	- 52 -
Εικόνα 4.3: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης υποστρώματος. ....	- 53 -
Εικόνα 4.4: Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης QuEChERS.....	- 55 -
Εικόνα 4.5: Σχηματική απεικόνιση των κύριων σταδίων εκχύλισης των τριών βασικών μεθόδων QuEChERS .....	- 55 -
Εικόνα 4.6: Κύρια τμήματα ενός φασματογράφου μάζας.....	- 58 -
Εικόνα 4.7: Σχηματική απεικόνιση της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό. ....	- 60 -

Εικόνα 4.8: Σχηματική απεικόνιση του υβριδικού αναλυτή LTQ Orbitrap .....	- 62 -
Εικόνα 4.9: Σχηματική απεικόνιση του τροχιακού αναλυτή μαζών Orbitrap .....	- 62 -
Εικόνα 6.1: Πειραματική διάταξη υδροθερμικής επεξεργασίας: (α) αντιδραστήρας - αυτόκλειστο, (β) κεφαλή, (γ) κυλινδρικό θερμαντικό σώμα που περιέχει το αυτόκλειστο, (δ) ηλεκτρονικός ρυθμιστής θερμοκρασίας και λειτουργίας. ....	- 69 -
Εικόνα 6.2: (α) σωματίδια λυματολάσπης πριν την υδροθερμική κατεργασία και (β) σωματίδια υδροεξανθρακώματος εκπλυμένων με νερό. ....	- 72 -
Εικόνα 7.1: α) λυματολάσπη μη λυοφιλιωμένη και β) λυοφιλιωμένα σωματίδια λυματολάσπης με μέγεθος <250 μm.....	- 76 -
Εικόνα 7.2: Εργαστηριακός σφαιρόμυλος που χρησιμοποιήθηκε για την ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων της λυματολάσπης (αριστερά) και εργαστηριακά κόσκινα των 500 και 250 μm για την κατανομή μεγέθους σωματιδίων.....	- 77 -
Εικόνα 9.1: Χρωματογράφημα επιλεγμένων ιόντων UHPLC/LTQ-Orbitrap εκχυλισμένου προτύπου μίγματος λυματολάσπης (00 μg/L) φαρμακευτικών ενώσεων.....	- 84 -

### **Περιεχόμενα Σχημάτων**

Σχήμα 3.1: Κύρια οργανικά συστατικά στην ιλύ καθαρισμού λυμάτων και τα προϊόντα τους υπό υδροθερμικές συνθήκες .....	- 30 -
Σχήμα 3.2: Μηχανισμός σχηματισμού υδροεξανθρακώματος από λυματολάσπη σε υδροθερμικές συνθήκες .....	- 32 -
Σχήμα 3.3: Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση (α) δύο παραγόντων ( $\alpha=1,41$ ) και (β) τριών παραγόντων ( $\alpha=1,68$ ). Όπου, (•) τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού (points of factorial design), (ο) τα αξονικά σημεία (axial points) και (□) το κεντρικό σημείο (central point) .....	- 45 -
Σχήμα 7.1: Η διαφορά μεταξύ της σύνθετης και της άμεσης δειγματοληψίας ως προς τον όγκο των δειγμάτων εκφρασμένο σε λίτρα, τη διάρκεια δειγματοληψίας και τα όρια ανίχνευσης.....	- 75 -
Σχήμα 7. 2: Πρωτόκολλο Quechers σε λυματολάσπη.....	- 80 -
Σχήμα 8.1: Πρωτόκολλο Quechers σε Υδροεξανθράκωμα.....	- 82 -
Σχήμα 10.1: Επίδραση των αλάτων εκχύλισης στις ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων. ....	- 94 -

Σχήμα 10.2: Επίδραση της προσθήκης H <sub>2</sub> O και 0.1 M EDTA κατά το στάδιο ενυδάτωσης του δείγματος.....	- 95 -
Σχήμα 10.3: Επίδραση της μάζας του αρχικού δείγματος για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης .....	- 96 -
Σχήμα 10.4: Επίδραση του όγκου του εκχυλίσματος που οδηγείται προς καθαρισμό στη διαδικασία της εκχύλισης .....	- 98 -
Σχήμα 10.5: Επίδραση MgSO <sub>4</sub> , PSA, Z <sup>+</sup> -sep και GCB στις ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων. ....	- 101 -
Σχήμα 10.6: Επίδραση του όγκου του καθαρού εκχυλίσματος που οδηγείται προς εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου.....	- 102 -
Σχήμα 10.7: Αποτελεσματικότητα της μεθόδου (%PE) για τις προσδιοριζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις.....	- 102 -
Σχήμα 10.8: Επίδραση υποστρώματος (%) για τις φαρμακευτικές ενώσεις. ....	- 102 -
Σχήμα 10.9: Αποτελεσματικότητα της μεθόδου (%PE) για τις προσδιοριζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις.....	- 113 -
Σχήμα 10.10: Επίδραση υποστρώματος (%) για τις φαρμακευτικές ενώσεις. ....	- 114 -
Σχήμα 11.1: Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών της επί τοις % απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ενώσεων.....	- 119 -
Σχήμα 11.2: Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals).....	- 120 -
Σχήμα 11.3: Διάγραμμα των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals) με τις προβλεπόμενες τιμές. ....	- 120 -
Σχήμα 11.4: Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικό γράφημα του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε συνάρτηση της θερμοκρασίας (A) και του χρόνου της αντίδρασης (B). ....	- 123 -
Σχήμα 11.5: Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικό γράφημα του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε συνάρτηση της θερμοκρασίας (A) και επί τοις % αναλογίας λυματολάσπης/νερού (Γ). ....	- 124 -
Σχήμα 11.6: Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικό γράφημα του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε συνάρτηση του χρόνου (B) και επί τοις % αναλογίας λυματολάσπης/νερού (Γ). ....	- 124 -

Σχήμα 11.7: (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Amisulpride.....	- 126 -
Σχήμα 11.8: Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals).....	- 129 -
Σχήμα 11.9: Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Amisulpride: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ). .....	- 131 -
Σχήμα 11. 10: (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Amitriptyline. ....	- 133 -
Σχήμα 11.11: Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Amitriptyline: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ). .....	- 137 -
Σχήμα 11.12: (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Risperidone. ....	- 139 -
Σχήμα 11.13: Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Risperidone: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ). .....	- 143 -
Σχήμα 11.14: (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Citalopram.....	- 145 -
Σχήμα 11.15: Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Citalopram: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία	

λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ). ..... - 148 -

### **Περιεχόμενα Πινάκων**

Πίνακας 1.1 : Ιδιότητες των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων.....	- 8 -
Πίνακας 3.1: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των τεχνολογιών αξιοποίησης βιομάζας.....	- 28 -
Πίνακας 3.2: Τυπικές συνθήκες λειτουργίας και κύρια χαρακτηριστικά υδροεξανθρακώματος κατά την υδροθερμική ανθρακοποίηση της ιλύς λυμάτων.....	- 33 -
Πίνακας 3.3: Βασικά πλεονεκτήματα του Πειραματικού σχεδιασμού (DoE).....	- 42 -
Πίνακας 3.4: Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός α) δύο παραμέτρους και β) τριών παραμέτρων με κωδικοποιημένες τιμές.....	- 46 -
Πίνακας 4.1: Βιβλιογραφική ανασκόπηση της μεθόδου QuEChERS.....	- 56 -
Πίνακας 4.2: Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα από τη χρήση του υβριδικού αναλυτή orbitrap.....	- 62 -
Πίνακας 6.1: Πειραματικές συνθήκες των κρίσιμων παραμέτρων της υδροθερμικής ανθρακοποίησης (HTC).....	- 70 -
Πίνακας 9.1: Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων.....	- 85 -
Πίνακας 9 2: Δεδομένα από την ανάλυση στο σύστημα UHPLC/LTQ-Orbitrap MS/MS για τις φαρμακευτικές ενώσεις.....	- 85 -
Πίνακας 10.1: Αναλυτικά χαρακτηριστικά επικύρωσης μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων σε υπόστρωμα λυματολάσπης.....	106- 116 -
Πίνακας 10.2: Αναλυτικά χαρακτηριστικά επικύρωσης μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων σε υπόστρωμα υδροεξανθρακώματος.....	- 116 -
Πίνακας 11.1: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών και της επί τοις % απόδοσης της στερεής μάζας του υδροεξανθρακώματος.....	- 116 -
Πίνακας 11.2: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση των φαρμακευτικών ουσιών από τη λυματολάσπη.....	- 118 -
Πίνακας 11.3: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ένωσης Amisulpride.....	- 127 -

Πίνακας 11.4: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Amisulpride από τη λυματολάσπη.....	- 128 -
Πίνακας 11.5: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις % απομάκρυνσης της ένωσης Amitriptyline.....	- 134 -
Πίνακας 11.6: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Amitriptyline από τη λυματολάσπη.....	- 135 -
Πίνακας 11.7: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις % απομάκρυνσης της ένωσης Risperidone. ....	- 140 -
Πίνακας 11.8: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Risperidone από τη λυματολάσπη. ....	- 141 -
Πίνακας 11.9: Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις % απομάκρυνσης της ένωσης Citalopram. ....	- 146 -
Πίνακας 11.10: Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Citalopram από τη λυματολάσπη.....	- 147 -

## I. Θεωρητικό Μέρος

### *Κεφάλαιο 1*

#### ***Φαρμακευτικά Προϊόντα στο περιβάλλον: ένα αναδυόμενο περιβαλλοντικό πρόβλημα***

##### ***1.1 Εισαγωγή***

Η ταχεία αύξηση του πληθυσμού και το φαινόμενο της αστικοποίησης δημιουργούν ποικίλες καθημερινές προκλήσεις στην παγκόσμια κοινότητα για την αειφόρο ανάπτυξη. Η πρόσφατη εμφάνιση πλήθους αναγνωρισμένων ενώσεων ανθρωπογενούς ή φυσικής προέλευσης στο περιβάλλον με τη μορφή βιολογικών και χημικών ρυπαντών αποτελεί παγκόσμιο ζήτημα αυξανόμενης περιβαλλοντικής ανησυχίας. Αυτοί οι ρύποι είναι χημικές ενώσεις κυρίως οργανικής φύσεως και συνήθως εμφανίζονται σε ίχνη συγκεντρώσεων που κυμαίνονται από μέρη ανά τρισεκατομμύριο (ppt ή ng/L) ή ακόμη και σε μέρη ανά δισεκατομμύριο (ppb ή μg/L). Αυτές οι ενώσεις αναφέρονται ως «αναδυόμενοι ρύποι» (Rout et.al, 2021). Όταν γίνεται αναφορά στον όρο «αναδυόμενοι ρύποι», πρέπει να οριστεί καλύτερα ο όρος αυτός σε τι στοχεύει. Τα φαρμακευτικά προϊόντα έχουν κάνει την εμφάνισή τους την τελευταία δεκαετία και αποτελούν την πιο σημαντική κατηγορία των αναδυόμενων ρύπων διαδραματίζοντας πολύτιμο ρόλο τόσο στη θεραπεία όσο και στην πρόληψη ασθενειών σε ανθρώπους και ζώα. Με εξαίρεση τα αντιβιοτικά και τα αντι-νεοπλασματικά, ο σκοπός των περισσότερων φαρμακευτικών προϊόντων είναι απλώς ο έλεγχος των συμπτωμάτων και όχι οι συνθήκες θεραπείας. Ως εκ τούτου, πολλά φάρμακα λαμβάνονται για μεγάλα χρονικά διαστήματα, ακόμη και για το μεγαλύτερο μέρος της ζωής του χρήστη. Αν και οι ανεπιθύμητες ενέργειες στην υγεία των ανθρώπων και των ζώων έχουν μελετηθεί εντατικά, μόλις πρόσφατα εξετάστηκε η τύχη, η συμπεριφορά και οι επιπτώσεις των φαρμάκων στο περιβάλλον, αφού ορισμένες από αυτές τις ουσίες απεκκρίνονται μη μεταβολισμένες ή ως δραστικοί μεταβολίτες, οι οποίοι δεν αποδομούνται στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων και εισέρχονται στο περιβάλλον (Lillenberg, 2011, Halling-Sorensen et.al, 1998).

Η ύπαρξη αυτών των χημικών ενώσεων στο περιβάλλον δεν αποτελεί καινούριο φαινόμενο καθώς μπορεί να χρονολογηθεί πριν από 2000 χρόνια περίπου με την εμφάνιση του παλαιότερου ρύπου, το μόλυβδο, που παρουσιάστηκε από την υπερβολική εκμετάλλευση των ορυχείων μολύβδου από τους Ρωμαίους και τους Έλληνες (Sauvé και Desrosiers et.al,



2014). Στις μέρες μας αυξάνονται ολοένα και περισσότερο οι κατηγορίες των αναδύομενων ρύπων που φυσικά περιλαμβάνουν μολυσματικές ουσίες όπως φυτοφάρμακα, φαρμακευτικές ενώσεις και προϊόντα προσωπικής φροντίδας, αρώματα, πλαστικοποιητές, ορμόνες, επιβραδυντικά φλόγας, νανοσωματίδια, ενώσεις υπερφθοροαλκυλίου, χλωριωμένες παραφίνες, σιλοξάνες, τοξίνες από φύκη, διάφορα ιχνοστοιχεία, συμπεριλαμβανομένων σπάνιων γαιών και ραδιονουκλεϊδίων κ.λπ. Αυτά είναι μόνο μερικά παραδείγματα από μια μακρά λίστα πιθανών αναδύομενων ρύπων. Οι πρώτοι ρύποι που εμφανίστηκαν ήταν τα πολυχλωριωμένα διφαινύλια (PCBs), μια σημαντική ομάδα ρύπων που διασκορπίστηκαν στο περιβάλλον λόγω της ισχυρής βιομηχανικής ανάπτυξης μεταξύ του 1929 και του 1977 (Mahanty et.al, 1986).

Το φλέγον ζήτημα σήμερα είναι ότι, δεδομένου ότι βελτιώνεται συνεχώς η ικανότητα των ανθρώπων να εντοπίζουν τους διάφορους αναδύομενους ρύπους, η παρουσία ανθρώπινων ή κτηνιατρικών φαρμάκων είναι ανεξέλεγκτη στα επιφανειακά ύδατα. Η εισαγωγή τους στο περιβάλλον είναι συνάρτηση συνδυασμού πολλών παραγόντων: της ποσότητας που παράγεται, της δοσολογίας (ποσότητα, συχνότητα και διάρκεια), της αποτελεσματικότητας απέκκρισης της μητρικής ένωσης και των μεταβολιτών της, της ικανότητας προσρόφησης / εκρόφησης στο έδαφος και τη μεταβολική αποσύνθεση στην επεξεργασία των λυμάτων (Buser et.al, 1998). Οι συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών στη λυματολάσπη και στα επιφανειακά ύδατα είναι συχνά πολύ υψηλότερες από το αναγνωρισμένο κατώτατο όριο και είναι δυνατόν να παραμείνουν στο περιβάλλον ως και ένα χρόνο με συνέπεια τη διατάραξη ισορροπίας της υδρόβιας ζωής αλλά και την ανίχνευση διαφόρων φαρμακευτικών ουσιών στο πόσιμο νερό (Benotti MJ et.al, 2008).

Αυτό το γεγονός έχει παρακινήσει ένα τεράστιο επιστημονικό κοινό να ασχοληθεί για την καλύτερη κατανόηση της τύχης και της συμπεριφοράς των πιο συχνά εμφανιζόμενων φαρμακευτικών ενώσεων στα αστικά και νοσοκομειακά λύματα και για την αξιολόγηση των πιθανών περιβαλλοντικών επιπτώσεών τους (Kosma et al., 2014). Υπό αυτό το πρίσμα, πολλές έρευνες έχουν διεξαχθεί σε διάφορους τύπους λυμάτων σε διαφορετικές περιοχές σε όλο τον κόσμο. Ωστόσο, πολύ λίγα δεδομένα είναι προς το παρόν διαθέσιμα στην Ελλάδα σχετικά με την εμφάνιση και τη μοίρα των ρύπων αυτών στα λύματα. Μέχρι πρόσφατα, η έρευνα και η παρακολούθηση δεδομένων σχετικά με την περιβαλλοντική τύχη τους στα απόβλητα της Ελλάδας έχει περιοριστεί σε μελέτες που εστιάζονται σε ένα μικρό αριθμό στοχευμένων ενώσεων σε τοπικές περιοχές, χωρίς εκτιμήσεις σχετικά με την αποτελεσματικότητα των μονάδων επεξεργασίας λυμάτων (MEA) (Botitsi et.al, 2007). Η

πολιτική κοινότητα έχει επίσης παρατηρήσει τον κίνδυνο φαρμακευτικής ρύπανσης στο περιβάλλον. Έχουν συνταχθεί δύο οδηγίες (2001/83 / ΕΚ για τα φαρμακευτικά παρασκευάσματα για τον άνθρωπο, 2001/82 / ΕΚ για τα φάρμακα για ζώα) προκειμένου να αναπτυχθεί μια περιβαλλοντική εκτίμηση για την αποδοχή νέων φαρμακευτικών προϊόντων στην αγορά. Παρά τις νομοθεσίες αυτές, τα φαρμακευτικά προϊόντα δεν περιλαμβάνονται ακόμη σε καμία λίστα προτεραιότητας είτε στην Ευρώπη είτε στις ΗΠΑ. Επιπλέον, τα όρια και οι ρυθμίσεις γι' αυτά αλλά και τις νέες ενώσεις δεν έχουν ακόμη καθοριστεί ειδικά στα κριτήρια επεξεργασίας νερού και λυμάτων (Van De Steene & Lambert, 2008).

Παρά το μικρό μέγεθος της Ελλάδας σε σχέση με άλλες ευρωπαϊκές χώρες, η Ελλάδα είναι ένας από τους μεγάλους κατά κεφαλήν καταναλωτές φαρμακευτικών προϊόντων μετά τις Ηνωμένες Πολιτείες και τον Καναδά, με δαπάνες, πολύ υψηλότερες από τον μέσο όρο σύμφωνα με τον Οργανισμό Οικονομικής Συνεργασίας και Ανάπτυξης (ΟΟΣΑ) (OECD, 2011). Οι φαρμακευτικές δαπάνες στην Ελλάδα, κυμάνθηκαν περίπου στο 14% των συνολικών δαπανών υγειονομικής περίθαλψης το 2001, περίπου ίσες με αυτές της Γερμανίας (14,3%), της Σουηδίας (13,5%) και του Ηνωμένου Βασιλείου (15,8%) αλλά χαμηλότερα από εκείνων άλλων μεσογειακών χωρών (Πορτογαλία 22,8%, Ιταλία 22,3%, Ισπανία 22%) και του μέσου όρου των χωρών του ΟΟΣΑ 16,9% (OECD, 2003). Οι τρέχουσες πληροφορίες δείχνουν έτσι ότι η υψηλή φαρμακευτική κατανάλωση στην Ελλάδα αντικατοπτρίζει και τις υψηλές εισροές των ενώσεων στις τοπικές μονάδες επεξεργασίας λυμάτων.

## ***1.2 Είσοδος και συμπεριφορά των φαρμακευτικών προϊόντων στο περιβάλλον***

Μεγάλες ποσότητες φαρμακευτικών προϊόντων παρασκευάζονται κάθε χρόνο και με την κατανάλωση ή την ακατάλληλη απόρριψή τους καταλήγουν στα λύματα. Συχνά οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων δεν μπορούν να απομακρύνουν πλήρως αυτές τις ουσίες με αποτέλεσμα να καταλήγουν πολλά φάρμακα στο περιβάλλον. Τα υπολείμματα φαρμακευτικών προϊόντων μπορούν να εισέλθουν στο περιβάλλον μέσω διαφορετικών διαδρομών, όπως από βιομηχανίες-μονάδες παραγωγής, απόβλητα εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων, οικιακά απορρίμματα και λύματα υγειονομικής ταφής, περιττώματα, τη διάθεση των αχρησιμοποίητων ή των ληγμένων φαρμακευτικών προϊόντων και την τυχαία διαρροή κατά τη διάρκεια της κατασκευής ή της διανομής τους. Η κύρια οδός εισόδου φαρμακευτικών προϊόντων από ανθρώπινη χρήση στο περιβάλλον είναι μέσω των πηγών αποχέτευσης. Ανεξάρτητα λοιπόν, από τη διαδρομή της εισόδου στο περιβάλλον, η τύχη των

προϊόντων αυτών χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες: τη μεταφορά, τη δέσμευση και την υποβάθμιση. Τα φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να μεταφερθούν χωρίς αποδόμηση και να αποθηκευτούν, τουλάχιστον προσωρινά, σε άλλα υποστρώματα ή διαμερίσματα μέσω διεργασιών όπως είναι η βιο-συμπύκνωση, η απορρόφηση και η εναπόθεση σωματιδίων (Glassmeyer et.al, 2008). Ενώ η υποβάθμιση των ενώσεων αυτών μπορεί να γίνει είτε με την πλήρη αποδόμησή τους, την ανοργανοποίηση ή τη μερική υποβάθμισή τους για την παραγωγή πάρα-προϊόντων.

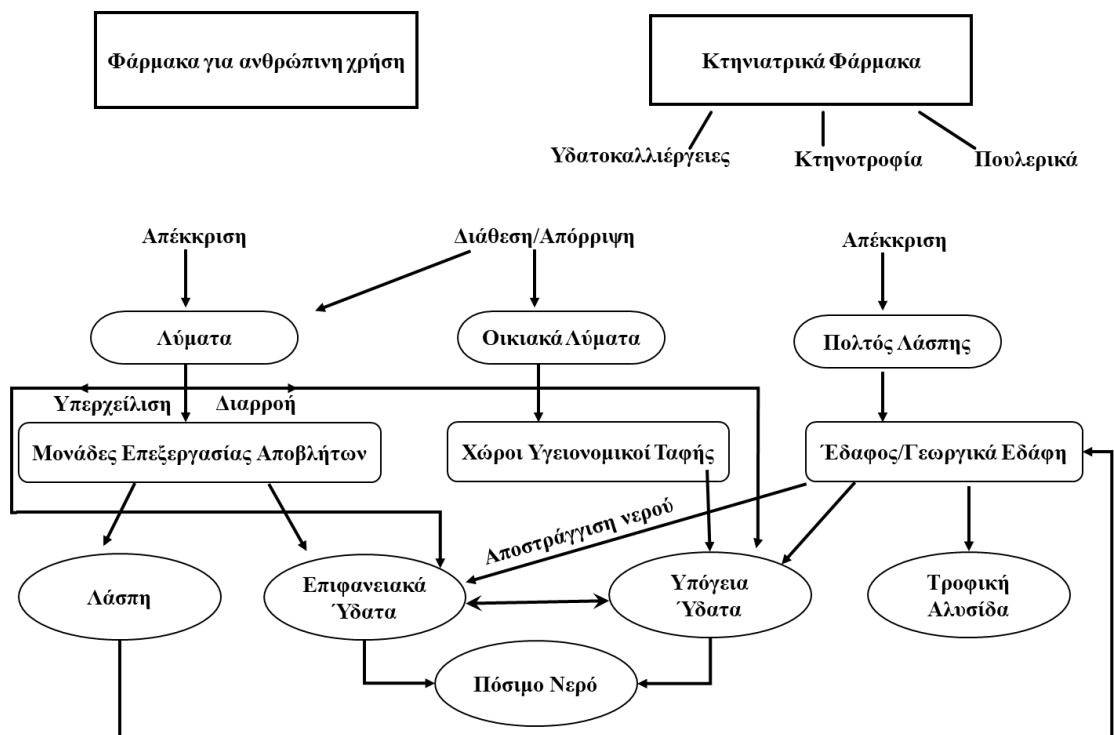
Ως γνωστόν, μια χημική ουσία μπορεί να υποστεί διάφορες δομικές αλλαγές μέσα από μια ποικιλία βιολογικών και μη βιολογικών διεργασιών μετά την εισαγωγή της στο περιβάλλον. Οι δομικοί μετασχηματισμοί μπορεί επίσης να είναι και αποτέλεσμα επεξεργασίας των λυμάτων (Schröder et.al, 2002). Πολλά φαρμακευτικά προϊόντα μετασχηματίζονται βιολογικά από οργανισμούς όπως είναι τα βακτήρια και οι μύκητες που βρίσκονται στο περιβάλλον. Μπορούν επίσης να υποβληθούν σε δομικές αλλαγές μέσα στο σώμα των ανθρώπων και των ζώων από μικροοργανισμούς στο έντερο ή από ένζυμα όπως τα κυτοχρώματα. Οι φαρμακευτικές ενώσεις υπόκεινται και σε μία σειρά από μη βιολογικές διεργασίες επεξεργασίας (φυσικές και χημικές διεργασίες) όπως είναι η υδρόλυση, η οξειδωση και η φωτόλυση σε διάφορα περιβαλλοντικά συστήματα όπως στα επιφανειακά ύδατα, στο έδαφος ή στην επεξεργασία λυμάτων (Εικόνα 1.1). Οι παραπάνω δομικές αλλαγές των φαρμακευτικών προϊόντων έχουν ως αποτέλεσμα μια αλλαγή στις φυσικοχημικές και φαρμακευτικές τους ιδιότητες. Συνήθως θεωρείται ότι ο μεταβολισμός και άλλες διαδικασίες μετασχηματισμού οδηγούν σε μειωμένη τοξικότητα. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ωστόσο, ο μεταβολισμός οδηγεί σε πιο δραστικές τοξικές ενώσεις (Kümmerer et.al, 2010).

Από την άλλη, κτηνιατρικά φάρμακα, όπως αντιβιοτικά, ορμόνες και παρασιτοκτόνα εντοπίζονται στο έδαφος, στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα σε σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (ng/L και µg/L) αν και είναι δυνατόν να παραμείνουν στο περιβάλλον για μεγάλο χρονικό διάστημα. Τα περιττώματα των ζώων είναι η κύρια πηγή περιβαλλοντικής μόλυνσης από φάρμακα, καθώς τα περισσότερα από αυτά χρησιμοποιούνται στην κτηνιατρική και τελικά καταλήγουν να εντοπίζονται στον πολτό λάσπης. Ο πολτός λάσπης αποτελείται από ούρα και κόπρανα που είτε αποθηκεύονται είτε εφαρμόζονται αμέσως στις γεωργικές εκτάσεις ως εδαφοβελτιωτικά. Όταν αυτή η λάσπη διασκορπίζεται στο χωράφι, τα μη μεταβολισμένα φάρμακα που υπάρχουν σε αυτήν ή οι βιολογικά δραστικοί μεταβολίτες τους, μπορεί να απειλήσουν τα υπόγεια ύδατα, ανάλογα με την κινητικότητά τους στο σύστημα εδάφους και να επηρεάσουν τους χερσαίους και υδρόβιους οργανισμούς ως

αποτέλεσμα της έκπλυσής τους από τις εκτάσεις (Díaz-Cruz et al., 2003). Η ίδια κατάσταση παρατηρείται επίσης όταν η λάσπη από εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων χρησιμοποιείται σαν εδαφοβελτιωτικό και περιέχει φάρμακα που χρησιμοποιούνται από τον άνθρωπο τα οποία απορρίπτονται σε υπονόμους μαζί με τα ούρα και τα κόπρανα και στη συνέχεια εισέρχονται σε εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας λυμάτων, είναι πιθανό ότι πολλές οργανικές ενώσεις, ιδιαίτερα οι υδρόφοβες ενώσεις να προσροφώνται στη λάσπη όπου συγκεντρώνονται (με διάφορες τάξεις μεγέθους) σε σύγκριση με τα λύματα από τα οποία προήλθε η λάσπη. Στην Εικόνα 1.2 παρουσιάζονται οι βασικές διαδρομές έκθεσης στο περιβάλλον των φαρμάκων που χρησιμοποιούνται στην ιατρική και στην κτηνιατρική. Ο άνθρωπος μπορεί να εκτεθεί σε υπολείμματα φαρμάκων στο περιβάλλον μέσω (1) της κατανάλωσης καλλιεργειών που έχουν συσσωρεύσει ουσίες από εδάφη που εκτέθηκαν σε ρυπασμένο εδαφοβελτιωτικό (2) από ζώα που έχουν συσσωρεύσει κτηνιατρικά φάρμακα μέσω της τροφικής αλυσίδας (3) από ψάρια που εκτίθενται σε θεραπείες που χρησιμοποιούνται στην υδατοκαλλιέργεια και (4) από υπόγεια και επιφανειακά ύδατα που περιέχουν κτηνιατρικά φάρμακα (Mailler et al., 2017).



**Εικόνα 1.1:** Οι διαδικασίες που επιδρούν στην τύχη των φαρμάκων στο έδαφος (Αλμπάνης, 1999).



**Εικόνα 1.2:** Βασικές διαδρομές έκθεσης φαρμακευτικών προϊόντων στο περιβάλλον (Díaz-Cruz et al., 2003).

### 1.3 Φαρμακευτικές ουσίες που μελετήθηκαν

Στην παρούσα εργασία ανιχνεύθηκαν τριάντα τρεις δραστικές φαρμακευτικές ουσίες που ανήκουν σε διαφορετικές φαρμακευτικές ομάδες, στην ενεργό ιλύ που προκύπτει από τη Μονάδα Επεξεργασίας Υγρών Αποβλήτων (ΜΕΥΑ) της πόλης των Ιωαννίνων. Προηγούμενες έρευνες σχετικά με την ύπαρξη και την απομάκρυνση τους από τις ΜΕΥΑ, η υψηλή ετήσια κατανάλωσή τους αλλά και οι πιθανές επιπτώσεις που είναι δυνατόν να προκαλέσουν τόσο στους ανθρώπινους όσο και στους υδάτινους οργανισμούς οδήγησε στην επιλογή των ενώσεων αυτών (Zhou et al., 2019, Cerqueira et al., 2014, Santos et al., 2016, Rossini et al., 2016). Για παράδειγμα στην έρευνα των Ekpeghere et al. ανιχνεύθηκαν 24 φαρμακευτικές ουσίες, που ανήκουν στις κατηγορίες των αναλγητικών, διεγερτικών, αντισπασμωδικών, μη στεροειδών αντιφλεγμονωδών φαρμάκων και των αντιβιοτικών, στη λάσπη από 12 δημοτικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (S-sludge) και 4 μονάδων επεξεργασίας λυμάτων των ζώων. Οι κυρίαρχες ενώσεις ήταν οι τετρακυκλίνες και το ακετυλοσαλυκυλικό οξύ, σε συγκεντρώσεις  $34,54-86,39 \text{ mg kg}^{-1}$  και  $0,374-367,0 \text{ mg kg}^{-1}$  αντίστοιχα ενώ η ουσία Carbamazepine και διάφορα αντιβιοτικά ανιχνεύθηκαν σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις (Ekpeghere et al., 2017). Επιπλέον οι Ajibola et al., 2020

μελέτησαν την ανίχνευση 17 φαρμακευτικών ενώσεων (τετρακυκλίνες, σουλφοναμίδες, φλουοροκινολόνες) σε υπόστρωμα λυματολάσπης. Οι υψηλότερες συγκεντρώσεις βρέθηκαν για τις τετρακυκλίνες (έως 4689 ng g<sup>-1</sup>) και για τις φθοροκινολόνες (έως 1201 ng g<sup>-1</sup>) Στον πίνακα 1.1 παρουσιάζονται οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υπό μελέτη φαρμακευτικών ουσιών.

#### ❖ Αντιβιοτικά

Τα αντιβιοτικά είναι χημικοί θεραπευτικοί παράγοντες και αποτελούν μία από τις κυριότερες ομάδες φαρμακευτικών σκευασμάτων που χρησιμοποιούνται σε ανθρώπους, φυτά και ζώα για τη διαχείριση μολυσματικών ασθενειών. Η σταθερότητα και αντοχή των αντιβιοτικών στο περιβάλλον αποτελεί φλέγον αντικείμενο έρευνας αφού εμφανίζουν περιορισμένη βιοαποδόμηση κατά τη διάρκεια επεξεργασίας τους στις ΜΕΥΑ με αποτέλεσμα να εμφανίζονται ίχνη συγκεντρώσεων σε επιφανειακά νερά και στην ενεργό ιλύ. Οι σουλφοναμίδες (sulfadiazine, sulfamethoxazole, sulfapyridine) αποτελούν μία από τις σημαντικές κατηγορίες των αντιβιοτικών (Ajibola et al., 2020).

#### ❖ Ψυχιατρικά φάρμακα

Τα ψυχιατρικά φάρμακα δρουν στο Κεντρικό Νευρικό Σύστημα και αποτελούν ισχυρό εργαλείο για τη θεραπεία της ψυχικής ασθένειας. Χωρίζονται σε έξι βασικές κατηγορίες που περιλαμβάνουν τα αντικαταθλιπτικά, τα αγχολυτικά, τα διεγερτικά, τα αντιψυχωσικά και τα αντιεπιληπτικά. Πολλές από τις ουσίες που μελετώνται στην διατριβή αυτή ανήκουν στην ευρύτερη κατηγορία των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων. Η ουσία carbamazepine, είναι η πιο διαδεδομένη αντιεπιληπτική ουσία σε παγκόσμιο επίπεδο και καταναλώνεται σε αρκετά υψηλές ποσότητες το χρόνο (Dolega et al., 2021).

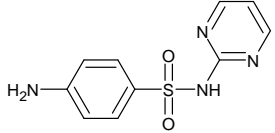
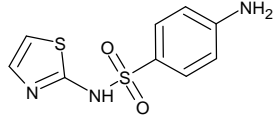
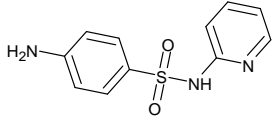
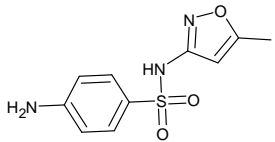
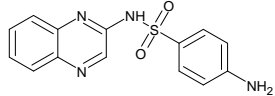
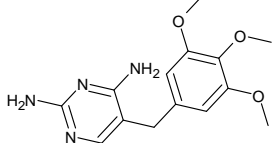
#### ❖ Υπολιπιδαιμικά

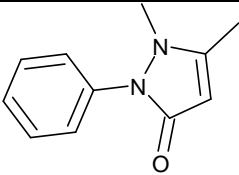
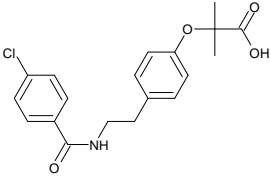
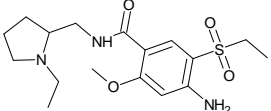
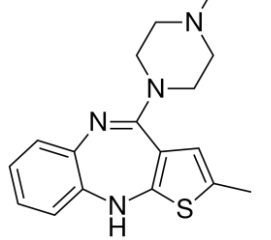
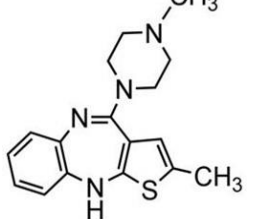
Τα υπολιπιδαιμικά φάρμακα χρησιμοποιούνται για τη μείωση των επιπέδων της χοληστερόλης και των τριγλυκεριδίων στο αίμα και για αυτό ονομάζονται αλλιώς και ρυθμιστές λιπιδίων στο αίμα. Μία από τις κατηγορίες που μελετάται στην παρούσα διατριβή είναι οι φιβράτες (π.χ Bezafibrate) μειώνουν τη στάθμη της χοληστερόλης LDL, κυρίως όμως των τριγλυκεριδίων (Shen & Zhou, 2016).

#### ❖ Αναλγητικά και μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη φάρμακα

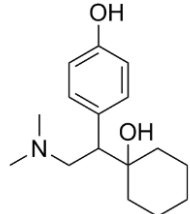
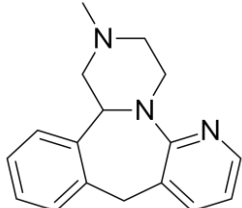
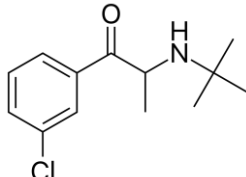
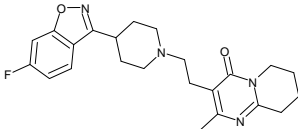
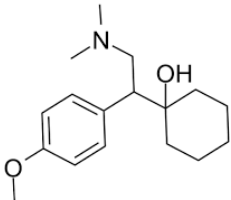
Τα αναλγητικά φάρμακα έχουν αντιφλεγμονώδεις και αντιπυρετικές ιδιότητες και χρησιμοποιούνται συχνά για την ανακούφιση από τον πόνο. Το Phenazone ανήκει σε αυτή τη κατηγορία και χρησιμοποιείται συχνά ως μη συνταγογραφούμενο για τις αντιπυρετικές του ιδιότητες (Grant et al., 1980).

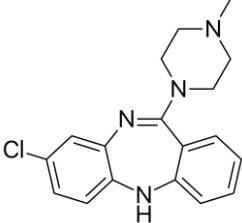
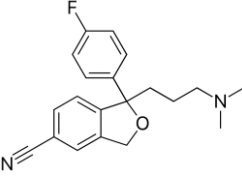
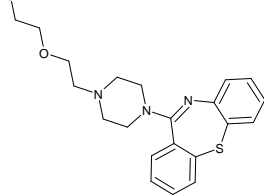
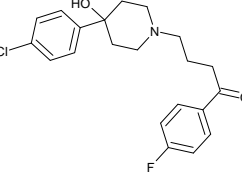
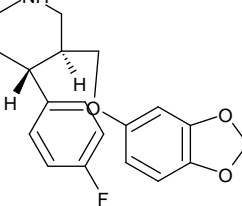
Πίνακας 1.1 : Ιδιότητες των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων

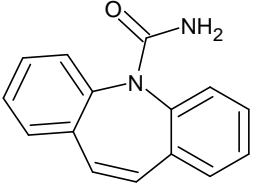
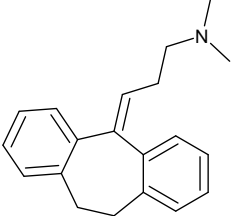
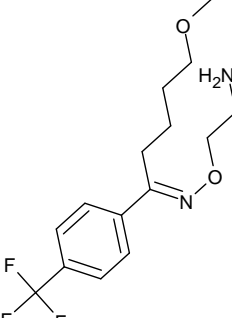
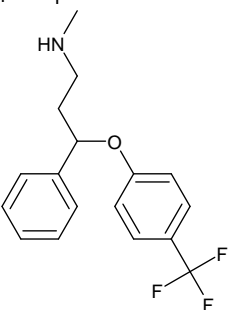
Θεραπευτική Ομάδα	Φαρμακευτικές Ενώσεις	Δομή <sup>[α]</sup>	Χημικός τύπος <sup>[α]</sup>	ESI πολικότητα	Μοριακό Βάρος	pKa <sup>[β]</sup>	logKow <sup>[β]</sup>	Πρόδρομο ιόν (m/z)
Αντιβιοτικά	Sulfadiazine (SDZ)		C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	+	250,28	6,36	0,09	251,0597
	Sulfathiazole (STZ)		C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	+	255,31	7,20	0,05	256,0209
	Sulfapyridine (SPY)		C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S	+	249,29	8,43	0,35	250,0645
	Sulfamethoxazole (SMX)		C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S	+	253,28	5,70	0,89	254,0594
	Sulfaquinoxaline (SQX)		C <sub>14</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S	+	300,36	5,10	1,68	301,0754
	Trimethoprim (TMP)		C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub>	+	290,32	7,12	0,91	291,1462

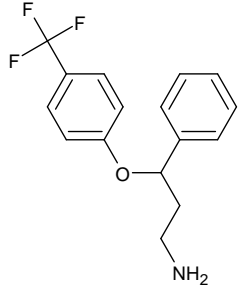
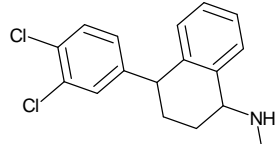
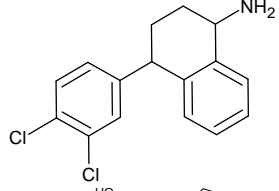
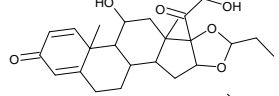
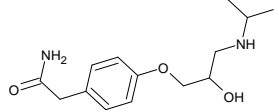
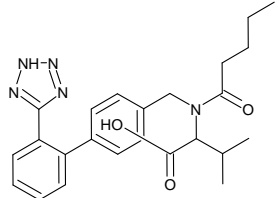
<b>Αναλγητικά/ μη-στεροειδή αντιφλεγμονώδη</b>	Phenazone (PHZ)		$C_{11}H_{12}N_2O$	+	188,23	1,40	0,38	189,1022
<b>Υπολιπιδαιμικά</b>	Bezafibrate (BZF)		$C_{19}H_{20}ClNO_4$	+	361,82	3,83	3,99	362,1154
<b>Ψυχιατρικά</b>	Amisulpride (AMS)		$C_{17}H_{27}N_3O_4S$	+	369,48	9,37	1,10	370,1795
	Olanzapine (OLN)		$C_{17}H_{20}N_4S$	+	312,44	4,0/7,24/14,7	4,09	313,1481
	N-desmethyl-olanzapine (DMO)		$C_{16}H_{18}N_4S$	+	298,40	8,5	4,09	299,1325



O-desmethyl-venlafaxine (ODV)		$C_{16}H_{25}O_2N$	+	263,37	9,45/10,66	2,72	264,1958
Mirtazapine (MTZ)		$C_{17}H_{19}N_3$	+	265,36	7,70	2,90	266,1652
Bupropion (BUP)		$C_{13}H_{18}ONCl$	+	239,74	8,22	3,85	240,1150
Risperidone (RIS)		$C_{23}H_{27}FN_4O_2$	+	410,49	8,76/1,16	2,63	411,2191
Venlafaxine (ODV)		$C_{17}H_{27}O_2N$	+	277,40	10,09	2,74	278,2115

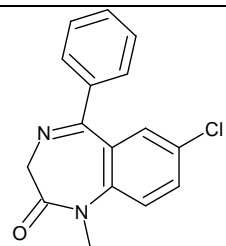
Clozapine (CZP)		$C_{18}H_{19}N_4Cl$	+	326,83	7,50	3,23	327,1371
Citalopram (CIT)		$C_{20}H_{21}FN_2O$	+	324,39	9,78	3,76	325,1711
Quetiapine (QTP)		$C_{21}H_{25}N_3O_2S$	+	383,50	7,06	3,17	384,1740
Haloperidol (HAL)		$C_{21}H_{23}ClFNO_2$	+	375,90	8,66	4,30	376,1474
Paroxetine (PAX)		$C_{19}H_{20}FNO_3$	+	329,40	9,9	1,23	330,1500

Carbamazepine (CBZ)		$C_{15}H_{12}N_2O$	+	236,27	13,9	2,45	237,1022
Amitriptyline (AMT)		$C_{20}H_{23}N$	+	277,40	9,76	4,92	278,1903
Fluvoxamine (FLV)		$C_{15}H_{21}F_3N_2O_2$	+	318,33	8,86	3,20	319,1628
Fluoxetine (FLX)		$C_{17}H_{18}F_3NO$	+	309,33	9,80	4,09	310,1413

Norfluoxetine (NFx)		$C_{16}H_{16}F_3NO$	+	295,30	9,77	3,74	296,1257
Sertraline (STR)		$C_{17}H_{17}Cl_2N$	+	306,20	9,16	5,51	306,0811
N-des-Sertraline (NDS)		$C_{16}H_{15}Cl_2N$	+	292,20	9,85	5,15	292,0654
Budensonide (BDS)		$C_{24}H_{32}O_6$	+	416,50	13,74	3,20	417,2272
Atenolol (ATL)		$C_{14}H_{22}N_2O_3$	+	266,34	9,60	0,16	267,1703
Valsartan (VLS)		$C_{24}H_{29}N_5O_3$	+	435,50	4,73	4,00	436,2343

---

Diazepam (DZP)



$C_{16}H_{13}ClN_2O$

+

284,74

3,40

2,82

285,0789

---

[α] Δεδομένα από <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

[β] Δεδομένα από <https://go.drugbank.com/drugs>

## **Κεφάλαιο 2**

### **Μέθοδοι και Στάδια επεξεργασίας αποβλήτων**

#### **2.1 Μέθοδοι και Στάδια επεξεργασίας αποβλήτων στις μονάδες βιολογικού καθαρισμού**

Οι κυριότερες κατηγορίες λυμάτων στις οποίες απαντώνται τοξικές ουσίες, ανάμεσά τους και οι φαρμακευτικές ενώσεις είναι: τα οικιακά λύματα, τα βιομηχανικά απόβλητα, τα όμβρια νερά και τα αστικά λύματα που αποτελούν μίγμα των παραπάνω περιπτώσεων. Η παρουσία των φαρμακευτικών ουσιών σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο περιβάλλον σχετίζεται με τη δημιουργία χρόνιας τοξικότητας αλλά και την ανάπτυξη ανθεκτικότητας των βακτηριακών ειδών σε αυτές τις ουσίες (Michael et al., 2013). Έτσι, η βασική επιδίωξη της επεξεργασίας λυμάτων είναι η απομάκρυνση όλων των ανεπιθύμητων ουσιών και η προστασία του περιβάλλοντος από τις αρνητικές επιπτώσεις των αστικών λυμάτων και τις απορρίψεις των βιομηχανικών αποβλήτων. Στις μέρες μας όλες οι σύγχρονες ΜΕΥΑ περιλαμβάνουν τρία στάδια κατεργασίας: i) την πρωτοβάθμια, ii) τη δευτεροβάθμια και iii) τη τριτοβάθμια επεξεργασία που περιγράφονται αναλυτικά στη συνέχεια και είναι ικανές να συνεισφέρουν σημαντικά στην απομάκρυνση των οργανικών ρύπων από τα λύματα (Wang et al., 2011). Συγκεκριμένα θα πραγματοποιηθεί συνοπτική περιγραφή της λειτουργίας της μονάδας επεξεργασίας υγρών αποβλήτων της πόλης των Ιωαννίνων.

##### **i. Πρωτοβάθμια επεξεργασία ή μηχανικός καθαρισμός**

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει κυρίως φυσικές διεργασίες διαχωρισμού που στηρίζονται στις φυσικές ιδιότητες των ρύπων. Συνήθως εφαρμόζονται οι παρακάτω μέθοδοι και τεχνικές που απεικονίζονται και στην Εικόνα 2.1 και απομακρύνεται κυρίως το στερεό περιεχόμενο των λυμάτων (λίπη, έλαια, άμμος και αιωρούμενα στερεά). Αφού συλλεχθούν στην εγκατάσταση όλα τα λύματα (αστικά, βιομηχανικά και βοθρολύματα), οδηγούνται στο αντλιοστάσιο για τοπική ανύψωση ώστε στη συνέχεια να οδηγηθούν στην κύρια γραμμή επεξεργασίας με βαρύτητα. Η πρώτη φάση επεξεργασίας είναι ο εσχαρισμός με τη χρήση εσχάρων για την απομάκρυνση σωματιδίων με διάμετρο πάνω από 10 mm και στη συνέχεια ο εξαμμωτής όπου πραγματοποιείται απομάκρυνση της άμμου και ο λιποσυλλέκτης για την αφαίρεση των λιπών και των αφρών. Μετά την αμμοσυλλογή, τα λύματα οδηγούνται στη δεξαμενή πρωτοβάθμιας καθίζησης όπου παραμένουν ορισμένο χρόνο και στο διάστημα αυτό καθιζάνουν τα αιωρούμενα στερεά λόγω της βαρύτητας. Μετά την πρωτοβάθμια καθίζηση η εγκατάσταση ακολουθεί δύο γραμμές λειτουργίας . Αφενός το πρωτογενώς

επεξεργασμένο λύμα με υπερχειλίση οδηγείται στην αναερόβια δεξαμενή βιολογικής απομάκρυνσης φωσφόρου και αφετέρου η καθιζάνουσα ιλύς οδηγείται με βαρύτητα σε παχυντή πρωτοβάθμιας ιλύος. Συνεπώς, το πρώτο στάδιο επεξεργασίας μπορεί να ελαττώσει το ρυπαντικό φορτίο (οργανικά, στερεά, μικρόβια) κατά μέσο όρο από 35-60% περίπου και είναι κοινό σε όλες τις ΜΕΥΑ (Λέκκα, 2013, Τζομάκα, 2015, Αλμπάνης, 1999).

## **ii. Δευτεροβάθμια επεξεργασία ή βιολογικός καθαρισμός**

Σε αυτό το στάδιο καθαρισμού χρησιμοποιούνται βιοχημικές αντιδράσεις για να απομακρύνει τις διαλυτές ή κολλοειδείς οργανικές ενώσεις. Ο καθαρισμός αυτός γίνεται με αερόβιους ή / και με αναερόβιους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν διάφορες τεχνικές βιολογικού καθαρισμού όπως οι δεξαμενές ενεργού ιλύος, τα συστήματα βιολογικής λεπτής στοιβάδας (βιολογικά διυλιστήρια ή φίλτρα), τα συστήματα αναερόβιας χώνευσης κ.ά. Στην μονάδα των Ιωαννίνων τα λύματα οδηγούνται αρχικά στον αναερόβιο βιολογικό αντιδραστήρα όπου σε συνθήκες απουσίας οξυγόνου πραγματοποιείται η αποφωσφόρωση και η απονιτροποίηση. Αναλυτικότερα πραγματοποιείται απελευθέρωση του φωσφόρου, πρόσληψη άνθρακα και ανάπτυξη των πολυφωσφορικών βακτηριδίων, τα οποία στην συνέχεια, στην δεξαμενή αερισμού υπό αερόβιες συνθήκες, επαναπροσλαμβάνουν τον φώσφορο και δημιουργούν την ιλύ πλούσια σε φώσφορο, με την απομάκρυνση της οποίας επιτυγχάνεται η μείωση των συγκεντρώσεων φωσφόρου στα λύματα. Στη συνέχεια εισέρχονται στην ανοξική δεξαμενή απομάκρυνσης του αζώτου και από εκεί οδηγούνται στη δεξαμενή αερισμού (οξειδωτικές τάφροι) και υφίστανται συνδυασμένη βιολογική αερόβια και αναερόβια επεξεργασία. Τέλος, τα λύματα οδηγούνται στις τέσσερις δεξαμενές δευτεροβάθμιας καθίζησης όπου καθιζάνει η βιομάζα και στη συνέχεια μέσω του αντλιοστασίου επανακυκλοφορίας ιλύος, επανακυκλοφορεί προς τους βιολογικούς αντιδραστήρες για τη διατήρηση σταθερού ποσοστού ενεργού ιλύος. Η περίσσεια ιλύς οδηγείται προς περαιτέρω επεξεργασία ενώ τα διαυγασμένα υγρά που υπερχειλίζουν οδηγούνται στη μονάδα απολύμανσης για την καταστροφή των παθογόνων μικροοργανισμών.

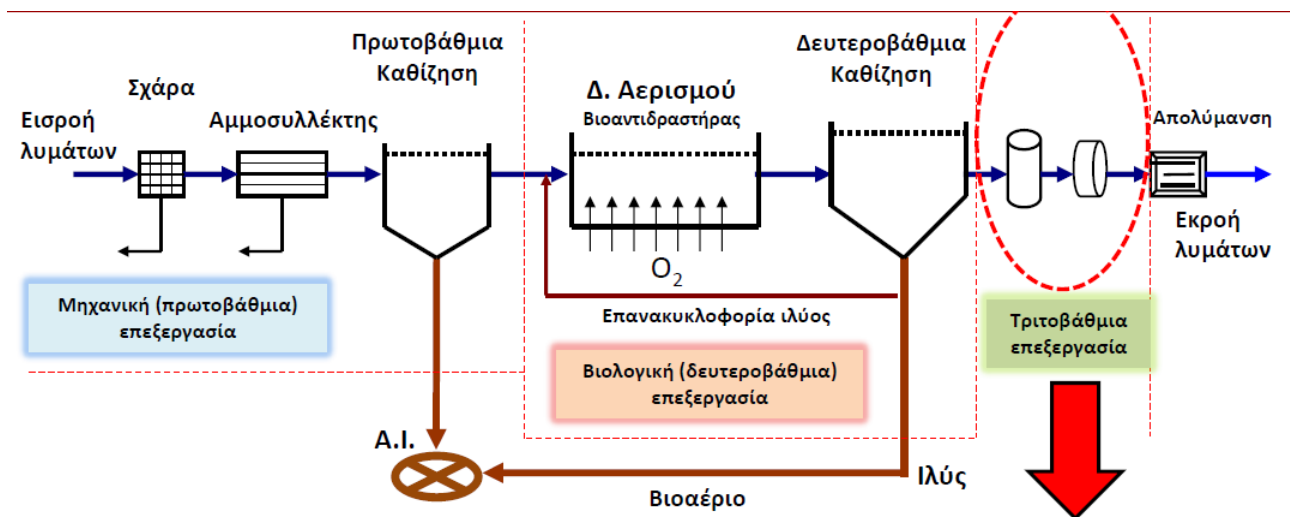
Η δευτεροβάθμια επεξεργασία δίνει σε μεγάλο βαθμό οξειδωμένα προϊόντα (π.χ.  $\text{NO}_3^-$  και αποτελεί συνήθως το τελικό στάδιο για αρκετές περιπτώσεις λυμάτων). Μια από τις προϋποθέσεις επιτυχίας του βιολογικού καθαρισμού είναι η απουσία τοξικών χημικών ουσιών (κυανιούχα, χλωριομένοι υδρογονάνθρακες, βαρέα μέταλλα κ.ά. ) τα οποία παρεμποδίζουν την ανάπτυξη ορισμένων μικροοργανισμών. Γι' αυτό καλό είναι να

απομακρύνονται από τα λύματα πριν αυτά οδηγηθούν στον δευτεροβάθμιο καθαρισμό. Σε αυτό το στάδιο η ελάττωση του ρυπαντικού φορτίου είναι της τάξης του 80-90%. Για τον πλήρη καθαρισμό των λυμάτων και αποβλήτων, ώστε να είναι επιτρεπτή η ανακύκλωση του νερού για βιομηχανική ή αρδευτική χρήση είναι απαραίτητη μια ακόμα βαθμίδα επεξεργασίας, η τριτοβάθμια.

### **iii. Τριτοβάθμια επεξεργασία ή χημικός καθαρισμός**

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει τη χημική επεξεργασία των λυμάτων στην οποία εφαρμόζονται διεργασίες μεμονωμένα ή σε συνδυασμό με διεργασίες του πρωτοβάθμιου και του δευτεροβάθμιου καθαρισμού. Οι πιο συνηθισμένες διεργασίες είναι: Χημική κατακρήμνιση, Προσρόφηση, Ιονταναλλαγή, Μεταφορά αερίων, Απολύμανση, Διεργασίες μεμβρανών, Ηλεκτροδιάλυση, Καύση, κ.ά. Οι διεργασίες αυτές δεν έχουν όλες καθαρά χημικό χαρακτήρα αλλά συσχετίζονται άμεσα ή έμμεσα με χημικές ή φυσικοχημικές δράσεις. Η τριτοβάθμια επεξεργασία στην ΜΕΥΑ των Ιωαννίνων γίνεται με μηχανική διήθηση σε τέσσερα εγκατεστημένα φίλτρα τύπου περιστρεφόμενου τυμπάνου. Τα λύματα διέρχονται από το εσωτερικό προς το εξωτερικό του τυμπάνου μέσω πορώδους διηθητικού μέσου. Στη συνέχεια ακολουθεί η απολύμανση που συνήθως πραγματοποιείται με ισχυρούς οξειδωτικούς παράγοντες ( $\text{Cl}_2$ ,  $\text{ClO}_2$ ) και συμβάλει στην μείωση του μικροβιακού φορτίου του νερού αλλά και στον έλεγχο των οσμών. Συγκεκριμένα στην ΜΕΥΑ των Ιωαννίνων η απολύμανση των επεξεργασμένων λυμάτων γίνεται με τη χρήση υποχλωριώδους νατρίου ( $\text{NaOCl}$ ) με ποσότητα 120 L/h ώστε να εξασφαλίζεται ότι το 90-95% περίπου της μάζας των υγρών αποβλήτων παραμένει στις δύο όμοιες δεξαμενές χλωρίωσης για τουλάχιστον 30 με 40 λεπτά και απομακρύνονται όλοι οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που περιέχονται στα λύματα. Το τελικό στάδιο αυτής της επεξεργασίας είναι αυτό της αποχλωρίωσης που αποσκοπεί στη μείωση του υπολειμματικού χλωρίου και στην αποφυγή παραπροϊόντων απολύμανσης που μπορεί να δημιουργήσουν δυσμενείς επιπτώσεις στους υδάτινους αποδέκτες. Πριν το επεξεργασμένο νερό εξέλθει από το βιολογικό καθαρισμό και καταλήξει στον ποταμό Καλαμά, οι δύο δεξαμενές χλωρίωσης περιλαμβάνουν και δύο κατακόρυφους επιφανειακούς αεριστήρες για να εμπλουτίσουν στο τέλος τα λύματα με οξυγόνο.





**Εικόνα 2.1:** Γραμμή επεξεργασίας λυμάτων στη ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων (Νταρακάς, 2010).

## 2.2 Προέλευση-Σύσταση και Ποιοτικά χαρακτηριστικά Λυματολάσπης

Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων λειτουργούν έτσι ώστε να μειώσουν τη ρύπανση των λυμάτων που προέρχεται από ανθρώπινες δραστηριότητες και να ελαχιστοποιήσουν τα προβλήματα που προκαλούνται στο περιβάλλον και την υγεία των ανθρώπων. Η λυματολάσπη (ή ιλύς) είναι ένα υποπροϊόν της διαδικασίας επεξεργασίας λυμάτων και προέρχεται τόσο από την πρωτοβάθμια όσο και από την δευτεροβάθμια επεξεργασία τους. Συγκεκριμένα είναι ένα ετερογενές στερεό υγρό υπόλειμμα που αποτελείται από την περίσσεια της βιομάζας που αναπτύσσεται μέσα από τα στάδια της βιολογικής επεξεργασίας, καθώς και από τα στερεά μικροσωματίδια, τα οποία έχουν διαχωριστεί από τα λύματα από την πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια καθίζηση (Ding et al., 2021). Ένα μεγάλο ποσοστό περίπου 25-80% του ξηρού στερεού περιεχομένου της ιλύος είναι βιομάζα και διαθέτει μεγάλο ποσοστό υγρασίας (75-85%) με μικρή συνοχή. Το ξηρό αυτό στερεό υλικό της ιλύος αποτελείται από ένα σύνθετο μίγμα οργανικών ενώσεων (υδατάνθρακες, πρωτεΐνες και λίπος), ανόργανων στοιχείων (μεταβατικά μέταλλα), και νεκρά ή ζωντανά βακτήρια. Διαθέτει υψηλό περιεχόμενο οργανικής ύλης με μακρο (φωσφόρος, άζωτο) και μικρο- συστατικά (Al, Fe, K, και Ca) χρήσιμα για τα φυτά. Ωστόσο, περιλαμβάνει εκατοντάδες και ποικίλες τοξικές ουσίες όπως παθογόνα, βαρέα μέταλλα και

οργανικούς ρύπους, οι οποίοι δημιουργούν δυσάρεστες οσμές, προβλήματα υγιεινής και είναι αρκετά επικίνδυνοι για το περιβάλλον (Μπούρας, 2012).

Κατά τη διαδικασία βιολογικής επεξεργασίας λυμάτων, οι οργανικές ενώσεις που απαιτούν οξυγόνο για την οξείδωσή τους και την απομάκρυνσή τους μετατρέπονται σε βιοστερεά, τα οποία αποτελούν τη λυματολάσπη. Η λάσπη λυμάτων αντιπροσωπεύει συνήθως το 1-2% του όγκου των επεξεργασμένων λυμάτων. Σύμφωνα με τα στατιστικά στοιχεία της UN-Habitat, οι αντίστοιχες μονάδες στις ΗΠΑ, για παράδειγμα, παράγουν πάνω από 6,5 εκατομμύρια τόνους ξηρών στερεών ετησίως και εκτιμάται ότι παράγονται περίπου 3,0 και 2,0 τόνοι ξηρών στερεών ετησίως στην Κίνα και την Ιαπωνία, αντίστοιχα (Zhen et al. 2017).

Τα βασικά ποιοτικά χαρακτηριστικά της λυματολάσπης παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω (Μπούρας, 2012, Νταρακάς, 2010, Μάλλιου, 2006):

**Χρώμα:** Η ακατέργαστη λυματολάσπη έχει γκρίζο έως κιτρινωπό χρώμα. Μετά την αναερόβια επεξεργασία έχει χρώμα μαύρο λόγω της παρουσίας θεικού σιδήρου ενώ όταν έχει υποστεί αερόβια επεξεργασία έχει χρώμα καφέ.

**Οσμή:** Η ακατέργαστη ιλύς είναι αρκετά δύσοσμη. Η αναερόβια επεξεργασμένη έχει οσμή πίσσας, ενώ η αερόβια επεξεργασμένη έχει οσμή χόματος.

**pH:** Το pH αποτελεί μία χαρακτηριστική παράμετρο για την παρακολούθηση της ζύμωσης της ιλύος στους αντιδραστήρες. Το pH στις δεξαμενές ζύμωσης θα πρέπει να είναι 7,0 - 7,5 ώστε να επικρατεί ισορροπία μεταξύ των δύο ζυμώσεων (όξινης και αλκαλικής).

**Οργανικός άνθρακας, οργανική ύλη:** Οι συγκεκριμένοι παράμετροι καθορίζουν την ποσότητα του βιοαερίου που θα παραχθεί κατά τη ζύμωση της ιλύος. Η παραγωγή βιοαερίου είναι 1 L / g οργανικής ύλης που αποδομείται.

**Υγρασία:** Προσδιορίζεται με τη μέτρηση της απώλειας του βάρους της ιλύος μετά από ξήρανση στους 105°C και αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο χαρακτηρισμού της ιλύος.

**Αναλογία C:N:P:** Εξαρτάται από την αναλογία μεταξύ των στοιχείων C, N και P που συναντώνται στην τροφή των βακτηρίων της ιλύος. Εάν η αναλογία αυτή είναι σωστή τότε βελτιστοποιούνται και οι βιολογικές δραστηριότητες που πραγματοποιούνται στη λυματολάσπη.

**Ικανότητα αφυδάτωσης:** Επιτυγχάνεται εργαστηριακά με την παρακολούθηση του χρόνου που απαιτείται για την στερεοποίηση μιας ποσότητας ιλύος η οποία έχει διαστρωθεί επί χάρτινου φίλτρου ή στρώματος άμμου.

**Ικανότητα βιοαποδόμησης:** Αποτελεί σημαντική παράμετρο για την εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με την ταχύτητα με την οποία αποδομούνται οι οργανικές ουσίες

της ιλύος. Ενδεικτικό στοιχείο για την πρόοδο των βιολογικών διεργασιών είναι η ποσότητα του παραγόμενου βιοαερίου. Συνεπώς εργαστηριακά πραγματοποιείται μέτρηση της ποσότητας του παραγόμενου βιοαερίου συναρτήσει της χρονικής διάρκειας του πειράματος και της θερμοκρασίας.

### **2.2.1 Πρωτοβάθμια λυματολόσπη**

Η πρωτοβάθμια ιλύς που προκύπτει από την πρωτοβάθμια επεξεργασία των λυμάτων που περιλαμβάνει φυσικές ή και χημικές μεθόδους επεξεργασίας για την απομάκρυνση των αιωρούμενων στερεών. Μία σχετικά απλή, οικονομική και φυσική μέθοδος που εφαρμόζεται είναι η βαρυτική καθίζηση-κατακάθιση. Όπως είναι γνωστό στα αστικά λύματα ή βιομηχανικά απόβλητα ένα μεγάλο μέρος των ρύπων εμφανίζεται υπό μορφή αιωρούμενων σωματιδίων τα οποία μεταφέρονται σε συνθήκες ροής και είναι δυνατόν να κατακαθίσουν σε συνθήκες ηρεμίας ή ημι-ηρεμίας. Κάτω από ένα όριο διαστάσεων των σωματιδίων που εξαρτάται και από την φύση τους, η ταχύτητα κατακάθισης γίνεται πολύ μικρή ώστε να είναι αδύνατη η καταβύθιση τους (κολλοειδή σωματίδια). Στην ιδεατή κατακάθιση τα σωματίδια θεωρούνται μεμονωμένα (διακεκριμένα) χωρίς αλληλεπιδράσεις και αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος τους κατά την διάρκεια της καθίζησης με αποτέλεσμα να κινούνται με σταθερή τελική ταχύτητα. Ενώ όταν τα σωματίδια δεν είναι διακεκριμένα και συσσωματώνονται τότε η ταχύτητα κατακάθισης αυξάνει με την αύξηση του βάρους των συσσωμάτων. Τα περισσότερα αιωρούμενα σωματίδια στα φυσικά λύματα δεν είναι διακεκριμένα σωματίδια και παρουσιάζουν αλλαγές στο σχήμα και το μέγεθος τους.

Αναλυτικότερα στη ΜΕΥΑ των Ιωαννίνων η πρωτοβάθμια ιλύς απομακρύνεται από τις δεξαμενές πρωτοβάθμιας καθίζησης και οδηγείται στους παχυντές βαρύτητας. Η πάχυνση είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για να αυξηθεί η περιεκτικότητα στερεών στην ιλύ με την απομάκρυνση κάποιας ποσότητας υγρού κλάσματος. Η ιλύς αυτή περιέχει κυρίως ανόργανες ουσίες, δηλαδή πολλά αδρανή υλικά όπως άμμο, χώμα, γυαλιά κ.λ.π. και πρόκειται για ιλύ η οποία αφυδατώνεται πολύ εύκολα, η περιεκτικότητά της σε στερεά είναι συνήθως 2,5-3,0% και μυρίζει πολύ έντονα. Με δεδομένο ότι τα λύματα στο στάδιο του μηχανικού καθαρισμού δεν έχουν υποστεί ακόμα βιολογική επεξεργασία, η ιλύς της πρωτοβάθμιας καθίζησης περιέχει και μεγάλο ποσοστό οργανικών ουσιών (Νταρακάς, 2006). Έπειτα, μεταφέρεται στις δεξαμενές χώνευσης για την αναερόβια χώνευση της ιλύος και την παραγωγή του βιοαερίου. Η χωνεμένη πλέον ιλύς, υφίσταται μεταπάχυνση και

ομογενοποιείται με τη περίσσεια δευτεροβάθμια ιλύ στις δεξαμενές ομογενοποίησης πριν τη διεργασία της αφυδάτωσης (Εικόνα 2.3).

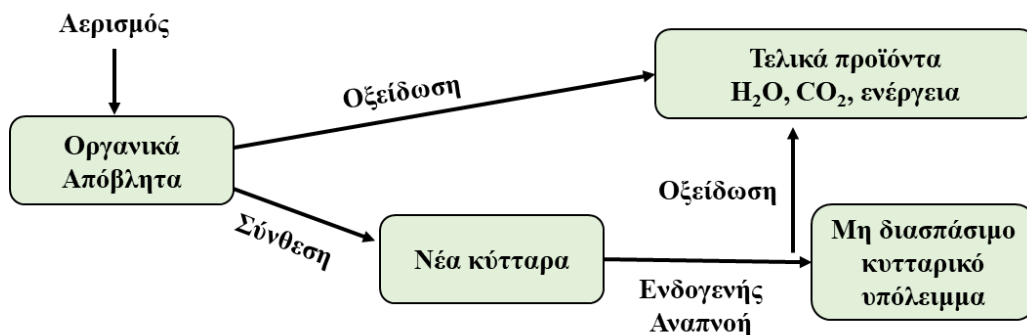
### **2.2.2 Δευτεροβάθμια λυματολάσπη**

Οι οργανικές ουσίες που παραμένουν στα λύματα ή τα βιομηχανικά απόβλητα μετά και τον πρωτοβάθμιο καθαρισμό βρίσκονται σε πολύ λεπτό διαμέρισμά ή είναι διαλυμένες και προσδιορίζονται με το βιοχημικά απαιτούμενο οξυγόνο BOD<sub>5</sub>. Για την απομάκρυνση τους στον δευτεροβάθμιο καθαρισμό δημιουργούνται κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη σαπροφυτικών οργανισμών οι οποίοι χρησιμοποιούν το οργανικό φορτίο για την ανάπτυξη νέων κυττάρων και την παραγωγή ενέργειας. Συνήθως στην πράξη εφαρμόζονται οι τεχνικές της αερόβιας βιοαποδόμησης και σε ειδικές περιπτώσεις χρησιμοποιούνται αναερόβια ή συνδυασμένη αερόβια-αναερόβια βιοαποδόμηση. Οι βιολογικές επεξεργασίες καθαρισμού που είναι η συνηθέστερη μορφή του δευτεροβάθμιου καθαρισμού εφαρμόζονται σε συμβατικές εγκαταστάσεις και διακρίνονται ανάλογα με τους μικροοργανισμούς που είναι υπεύθυνοι για την αποδόμηση των περιεχομένων οργανικών ενώσεων (Albanis et.al, 1991).

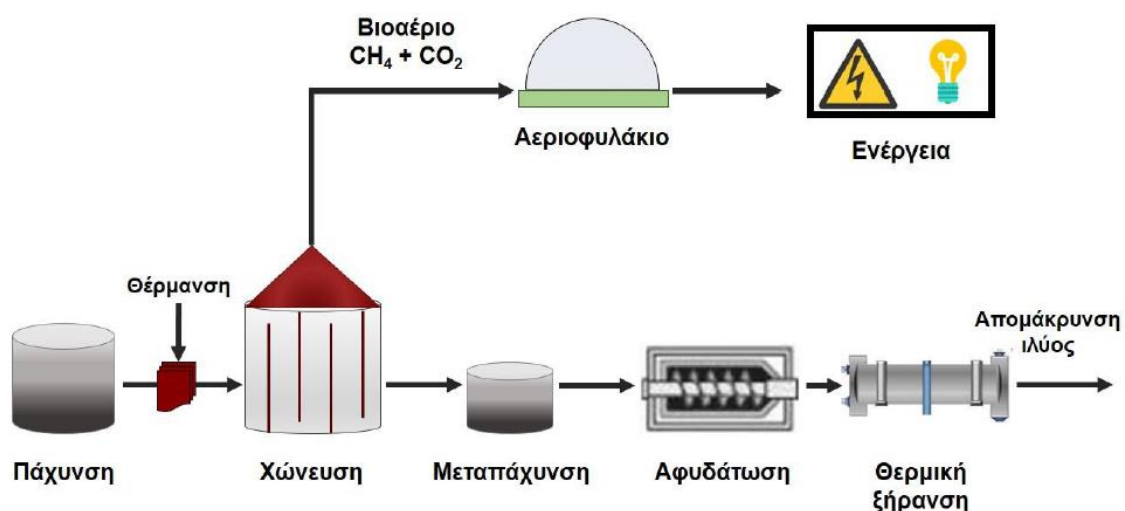
Ο βιολογικός αντιδραστήρας είναι μια δεξαμενή από την οποία διέρχονται τα λύματα στα οποία παρέχεται συνεχώς οξυγόνο με τη μορφή εμφυσούμενου αέρα είτε με έντονη ανάδευση που επιτυγχάνουν επιφανειακοί αεριστές έτσι ώστε να υπάρχει πάντα διαλυμένο οξυγόνο συγκέντρωσης 1-2 mg/L. Τα λύματα του βιολογικού αντιδραστήρα περιέχουν ήδη μεγάλες συγκεντρώσεις οργανικής ύλης και αρκετό οξυγόνο, συνθήκες ευνοϊκές για την ανάπτυξη αερόβιων μικροοργανισμών, κυρίως βακτηριδίων. Οι μικροοργανισμοί οξειδώνουν ένα τμήμα της οργανικής ύλης για απολαβή ενέργειας με κύρια προϊόντα το διοξείδιο του άνθρακα και νερό (Εικόνα 2.2). Το υπόλοιπο τμήμα της οργανικής ύλης, συχνά το μεγαλύτερο, το μετατρέπουν σε κυτταρική μάζα νέων μικροοργανισμών, νέα οργανική ύλη. Η διαφορά βέβαια εδώ βρίσκεται στο ότι η νέα οργανική ύλη είναι εύκολα συσσωματώσιμη και καθιζήσιμη σε αντίθεση με την αρχική. Έτσι πραγματοποιείται καθίζηση στη δευτεροβάθμια δεξαμενή καθίζησης όπου οδηγείται συνεχώς το μίγμα λυμάτων και μικροοργανισμών του βιολογικού αντιδραστήρα και επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός των στερεών. Οι μικροοργανισμοί μαζί με ανόργανα στερεά αλλά και τα μη διασπασθέντα οργανικά στερεά συσσωματώνονται και καθιζάνουν στον πυθμένα της δεξαμενής δημιουργώντας τη δραστική λάσπη (μάζα) υψηλής περιεκτικότητας της σε ζωντανούς μικροοργανισμούς. Εκεί ένα τμήμα της επανακυκλοφορεί στον βιολογικό αντιδραστήρα ώστε να μεταφερθεί εκεί η επιθυμητή συγκέντρωση μικροοργανισμών, ενώ το άλλο μέρος

της ιλύος απομακρύνεται για την περαιτέρω επεξεργασία της (Αγγελος, 2009), (Ανδρεαδάκης 2002).

Η πλεονάζουσα δευτεροβάθμια ιλύ παροχετεύεται καθημερινά μέσω του αντλιοστασίου περίσσειας προς μεταπάχυνση και ομογενοποίηση με την πρωτοβάθμια ιλύ. Στις δεξαμενές μεταπάχυνσης λαμβάνει χώρα ανάμειξη πρωτογενούς και δευτερογενούς ιλύος και η ομογενοποιημένη πλέον ιλύς οδηγείται στη μονάδα μηχανικής αφυδάτωσης. Η δευτεροβάθμια ιλύ περιέχει στερεά της τάξεως του 0,5-1,5% και είναι μέτρια έως δύσκολα αφυδατούμενη. Η αφυδάτωση επιτυγχάνεται με φυγοκεντρικές περιστρεφόμενου τυμπάνου ώστε να αφαιρεθεί το υγρό και να είναι εύκολη μετά η μεταφορά και η διάθεσή της. Λίγο πριν την είσοδο της ιλύος στις φυγοκεντρικές διατάξεις γίνεται προσθήκη πολύ-ηλεκτρολύτη με σκοπό να επιτευχθεί η επιθυμητή κροκίδωση, ώστε να απομακρυνθεί ο υπολειπόμενος φώσφορος και να ενισχυθεί η αφυδάτωση (Τζομάκα, 2015).



**Εικόνα 2.2:** Αερόβια βιολογική οξείδωση των οργανικών ουσιών (Αλμπάνης, 1999).



**Εικόνα 2.3:** Γραμμή επεξεργασίας της ιλύος στη ΜΕΥΑ της πόλης των Ιωαννίνων (Σκουντούρογλου, 2019).

### 2.3 Παραγωγή λυματολάσπης στις Ευρωπαϊκές Χώρες

Η λυματολάσπη αποτελεί προϊόν επεξεργασίας που προέρχεται από μονάδες επεξεργασίας οικιακών αλλά και βιομηχανικών αποβλήτων. Η ποσότητα παραγωγής ιλύος λυμάτων στην Ευρώπη αυξάνεται ταχύτατα λόγω του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού αλλά και των κανονισμών που υιοθετούνται για τη βελτίωση της ποιότητας των λυμάτων στις μικρές κοινότητες (Tarpani et al., 2020). Κατά τη διάρκεια των τελευταίων 30 χρόνων, η οδηγία 91/271 / Ευρωπαϊκή Ένωση (ΕΕ) των Μονάδων Επεξεργασίας Αστικών Αποβλήτων υποχρέωσε τις Χώρες της ΕΕ-15 (παλιά κράτη μέλη) να βελτιώσουν τα συστήματα συλλογής και επεξεργασίας των λυμάτων τους. Ως αποτέλεσμα, παρατηρήθηκε σχεδόν 50% αύξηση της ετήσιας παραγωγής λυματολάσπης στην ΕΕ-15, από 6,5 εκατομμύρια τόνους ξηρών στερεών το 1992 σε 9,8 εκατομμύρια τόνους το 2005. Εν συνεχεία, με την είσοδο 12 νέων κρατιδίων στην ΕΕ η ετήσια παραγωγή λυματολάσπης στην ΕΕ-12 (νέα κράτη μέλη) εκτιμήθηκε σε 1,1 εκατομμύρια τόνους το 2005 ([http:// epp.eurostat.ec.europa.eu](http://epp.eurostat.ec.europa.eu)), με το συνολικό ποσό να ανέρχεται στους 10,9 εκατομμύρια τόνους για την ΕΕ-27 (όλα τα κράτη μέλη) το 2005. Είναι προφανές ότι η εφαρμογή της παραπάνω οδηγίας προκάλεσε σημαντική αύξηση στην ετήσια παραγωγή ιλύος στην ΕΕ κατά τα επόμενα έτη, με την εκτίμηση ότι το 2020 η ποσότητα του ξερού στερεού θα φτάσει τους 13 εκατομμύρια τόνους (Kelessidis & Stasinakis, 2012).

Το νομικό πλαίσιο που θεσπίστηκε από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή και ρυθμίζει τις διάφορες διαδρομές που μπορεί να ακολουθήσει η ιλύς αποτελείται κυρίως από οδηγίες που πρέπει να ενσωματωθούν στην εθνική νομοθεσία των μελών (European Commission, 2001).

➤ Η οδηγία 86/278/EEC του Συμβουλίου για την προστασία του περιβάλλοντος, και ιδίως του εδάφους, όταν η ιλύς λυμάτων χρησιμοποιείται στη γεωργία. Η παρούσα οδηγία καθορίζει ελάχιστα πρότυπα ποιότητας για το έδαφος και τη λάσπη που χρησιμοποιούνται στη γεωργία και καθορίζει τις απαιτήσεις παρακολούθησης όταν η λάσπη απλώνεται σε γεωργική γη. Οι οριακές τιμές που ορίζονται στην παρούσα οδηγία αφορούν τη συγκέντρωση βαρέων μετάλλων για την ιλύ καθώς και για το έδαφος όταν η ιλύς λυμάτων χρησιμοποιείται σαν εδαφοβελτιωτικό αλλά αφορά και τα μέγιστα ετήσια φορτία βαρέων μετάλλων μέσω της εφαρμογής ιλύος λυμάτων.

➤ Η οδηγία πλαίσιο για τη διαχείριση των αποβλήτων (91/156/ EEC που τροποποιεί την 75/442/ EEC για τα απόβλητα) επιβεβαιώνει την ιεράρχηση που υπάρχει και περιγράφεται ήδη στην ανακοίνωση για την κοινοτική στρατηγική στη διαχείριση των αποβλήτων. Σύμφωνα με αυτήν την ιεραρχία, πρέπει να προτιμηθεί η πρόληψη

δημιουργίας αποβλήτων, ακολουθούμενη από τη μείωσή τους, την επαναχρησιμοποίηση, την ανακύκλωση και την ανάκτηση ενέργειας. Η παρούσα οδηγία θεσπίζει αρχές για τη χρήση και τη διάθεση των αποβλήτων, σχέδια διαχείρισης αποβλήτων, έγκριση διαδικασίες και παρακολούθηση. Επιπλέον, η παρούσα οδηγία παρέχει τον ορισμό για τον όρο "απόβλητα". Ο κατάλογος των διαφόρων τύπων αποβλήτων παρέχεται από την πρόσφατη απόφαση 2001/118/EK της Επιτροπής, η οποία τροποποιεί τις αποφάσεις της απόφασης 2000/532/EK που αφορούν συγκεκριμένα απόβλητα (π.χ. λάσπη) που εφαρμόζονται επιπλέον στην οδηγία - πλαίσιο για τα απόβλητα.

Στις περισσότερες περιπτώσεις, η οδηγία 86/278/EEC υιοθετήθηκε από τα κράτη μέλη η οποία προβλέπει οριακές τιμές συγκέντρωσης βαρέων μετάλλων, παθογόνων μικροοργανισμών και οργανικών ρύπων που μπορούν να εισάγονται στο έδαφος σε ετήσια βάση. Έτσι, όταν οι συγκεντρώσεις των παραπάνω υπερβαίνουν τις οριακές τιμές, η χρήση της ιλύος απαγορεύεται να χρησιμοποιηθεί και πρέπει να επεξεργαστεί πριν τη γεωργική χρήση. Ο ορισμός της επεξεργασμένης ιλύος δίδεται στο άρθρο 2 της οδηγίας και έχει ως εξής: «ιλύς που έχει υποστεί βιολογική, χημική ή θερμική επεξεργασία, μακράς διάρκειας αποθήκευση ή οποιαδήποτε άλλη κατάλληλη διεργασία έτσι ώστε να μειωθούν σημαντικά οι κίνδυνοι για την ανθρώπινη υγεία που πηγάζουν από τη χρήση της.

Η ελληνική νομοθεσία ενσωμάτωσε την οδηγία 86/278/EEC το 1991 με την Κ.Υ.Α 80568/4225 η οποία έχει τίτλο <<μέθοδοι, όροι και περιορισμοί για τη χρησιμοποίηση της ιλύος στη γεωργία που προέρχεται από την επεξεργασία αστικών και οικιακών λυμάτων>> και πρόσθεσε επιπλέον σε εθνικό επίπεδο τιμές ορίων για το χρώμιο.

#### **2.4 Μέθοδοι Διάθεσης και επεξεργασίας της ιλύος**

Δεδομένου της έλλειψης χώρου για περαιτέρω επεξεργασία ιλύος στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων, το πρόβλημα της διάθεσης και της επεξεργασίας της λάσπης επιδεινώνεται ολοένα και περισσότερο από την ταχεία αστικοποίηση και εκβιομηχάνιση των τελευταίων 30-40 χρόνων στον αναπτυσσόμενο κόσμο. Το επίκεντρο των διεργασιών επεξεργασίας της ιλύος είναι η ελαχιστοποίηση της μάζας και του όγκου της προκειμένου να μειωθούν οι δαπάνες διάθεσης και να ελαχιστοποιηθούν επικίνδυνες προκλήσεις υγείας που σχετίζονται με τη διάθεση (Barry et al., 2019). Η λάσπη περιέχει τεράστια ποσότητα ανανεώσιμης οργανικής ύλης με τη μορφή θρεπτικών ουσιών (άζωτο, φώσφορος, κάλιο και ασβέστιο), παράγοντας πιθανά προϊόντα προστιθέμενης αξίας με βάση τη λάσπη. Έτσι, οι κυριότερες μέθοδοι διάθεσης της ιλύος στις διάφορες χώρες της Ευρωπαϊκής Ένωσης είναι

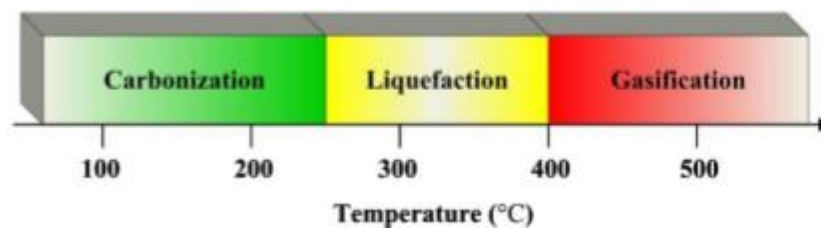
σήμερα η γεωργική αξιοποίηση, η καύση και η υγειονομική ταφή. Σε μικρότερο ποσοστό η επεξεργασμένη ιλύς μπορεί να διατεθεί σε δάση, σε κήπους αλλά και για την αποκατάσταση εδαφών. Η γεωργική αξιοποίηση αποτελεί μια μέθοδο χαμηλού κόστους για την απόθεση της ιλύος, αλλά είναι απαραίτητο η ανακύκλωση της ιλύος στην γεωργία να ελέγχεται έτσι ώστε να ελαχιστοποιούνται τα πιθανά περιβαλλοντικά προβλήματα (Smith et al., 1996). Η διάθεση της ιλύος που παράγεται από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων σε χώρους υγειονομικής ταφής (X.Y.T.A) αποτελεί την πιο διαδεδομένη μέθοδο στον ελλαδικό χώρο. Η μέθοδος αυτή επιταχύνει τις βιολογικές διεργασίες σταθεροποίησης της λάσπης και οι εκροές από έναν X.Y.T.A. περιλαμβάνουν στραγγίσματα, βιοαέριο και παραγωγή ενέργειας με αποτέλεσμα τις εκπομπές σε νερό, έδαφος και αέρα (Μάλλιου, 2006). Η μέθοδος της καύσης της ιλύος στοχεύει στη μείωση του όγκου της, στην παραγωγή αποστειρωμένου αδρανούς υπολείμματος και στην εκμετάλλευση της παραγόμενης ενέργειας ως θέρμανση, ατμό, ηλεκτρικό ρεύμα ή καύσιμο υλικό. Όμως σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι ότι η παραγόμενη τέφρα περιέχει βαρέα μέταλλα και η διάθεσή της σε XYTA εγκυμονεί κινδύνους για τη ρύπανση του περιβάλλοντος. Επίσης κατά την καύση της λυματολάσπης εκπέμπονται διοξίνες και φουράνια (PCDD/PCDF), που είναι επικίνδυνα για τη δημόσια υγεία (Kacprzak et al., 2017). Ως εκ τούτου, είναι επιτακτική ανάγκη να αναλυθεί η δευτερογενής ρύπανση στη διαδικασία αποτέφρωσης της ιλύος.

Η θερμική επεξεργασία περιλαμβάνοντας την πυρόλυση, τη ξήρανση και την αεριοποίηση είναι μια βιώσιμη εμπορική επιλογή για το χειρισμό οργανικών αποβλήτων, αφού καταστρέφει τους παθογόνους οργανισμούς και μειώνει τον όγκο της ιλύος. Η πυρόλυση προάγει τη χημική αποσύνθεση της ιλύος σε περιοχή θερμοκρασιών από 300 έως 650 °C απουσία οξυγόνου. Η διαδικασία έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό ενός πλούσιου σε άνθρακα στερεού προϊόντος, που ονομάζεται βιοεξανθράκωμα, μια πτητική ύλη που μπορεί να είναι εν μέρει συμπυκνωμένη σε υγρή φάση (βιο-έλαιο) και μία αέρια φάση, η οποία συνήθως περιλαμβάνει CO, CO<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub> και H<sub>2</sub> (Mohan et al., 2017). Η ξήρανση είναι μια ήπια διαδικασία πυρόλυσης που διεξάγεται σε αδρανή ατμόσφαιρα σε θερμοκρασίες 200-300 °C και χρόνο παραμονής περίπου 0,5-2 h. Αυτή η διαδικασία είναι αρκετά ενδιαφέρουσα για τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων της ιλύος που είναι για καύση, δεδομένου ότι η συγκεκριμένη ενεργειακή πυκνότητα του στερεού προϊόντος είναι αυξημένη, με πολύ χαμηλή απώλεια μάζας (~ 30%) και παραγωγή αερίου (10%). Τέλος, η ιλύς λυμάτων μπορεί να καεί μερικώς μέσω αεριοποίησης σε πολύ υψηλές θερμοκρασίες (600-1200 °C) με πολύ μικρό χρόνο παραμονής (10-20 δευτερόλεπτα), λαμβάνοντας ένα



μίγμα αερίων (CO, H<sub>2</sub>, και CO<sub>2</sub>) (Kambo & Dutta, 2015), (Puig-Arnavat et al., 2010). Ωστόσο, η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό της ιλύος λυμάτων (> 95%) μπορεί να περιορίσει την αποδοτική και οικονομική εφαρμογή των συμβατικών θερμικών επεξεργασιών. Έτσι η υδροθερμική επεξεργασία υιοθετείται ως μία εξειδικευμένη θερμική μέθοδος για την επεξεργασία υγρών βιολογικών αποβλήτων, η οποία χρησιμοποιεί το ίδιο το νερό ως αντιδραστήριο και διαλύτη και έχει λάβει αυξημένη προσοχή τα τελευταία χρόνια. Η μέθοδος μπορεί να χωριστεί σε τρεις ξεχωριστές διεργασίες ανάλογα με τη θερμοκρασία: την υδροθερμική εξανθράκωση (180-280 °C), την υγροποίηση (250-400 °C), και την υπό/υπέρκρισιμη αεριοποίηση του νερού (> 400 °C). Ο κύριος στόχος αυτών των διεργασιών είναι η παραγωγή αέριων, υγρών και στερεών ενεργειακών προϊόντων από λάσπη λυμάτων που έχει αφυδατωθεί. Οι ομοιότητες και οι διαφορές μεταξύ των παραπάνω διεργασιών παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.4 (He et al., 2013), (Parshetti et al., 2013).

Διαδικασίες	Εξανθράκωση	Υγροποίηση	Αεριοποίηση
Θερμοκρασία (°C)	180-250	250-400	>400
Προϊόντα	Υδροεξανθράκωμα	Βιο-στερεό	Αέριο



**Εικόνα 2.4:** Διεργασίες υδροθερμικής επεξεργασίας της λυματολάσπης

## **Κεφάλαιο 3**

### **Υδροθερμική Επεξεργασία Λυματολάσπης**

#### **3.1 Εισαγωγή**

Ένα ευρύ φάσμα τεχνολογιών επεξεργασίας παρέχεται για τη διάθεση, την ανάκτηση πόρων ή την παραγωγή ενέργειας από τη λυματολάσπη, η οποία αντιπροσωπεύει μια πιθανή πηγή δευτερογενούς ρύπανσης του περιβάλλοντος, λόγω της περιεκτικότητάς της σε παθογόνους παράγοντες, βαρέα μέταλλα, φαρμακευτικά προϊόντα, φθαλικές ενώσεις, πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAH), υπερφθοροχημικά, πολυαιθοξυλικές εννυλοφαινόλες και οργανοχλωριωμένα φυτοφάρμακα. Οι συμβατικές ΜΕΑ δεν είναι πάντα σε θέση να απομακρύνουν τέτοιες τοξικές ουσίες, συμπεριλαμβανομένων των μεταβολιτών τους, και ως εκ τούτου, χαμηλές συγκεντρώσεις υπολειμμάτων και παραπροϊόντων μπορεί να εξακολουθούν να υπάρχουν στη λάσπη και τα λύματα (Lindholm-Lehto et al., 2017). Οι θερμοχημικές επεξεργασίες προτιμώνται συχνά έναντι των βιολογικών διεργασιών, λόγω των σύντομων χρόνων αντίδρασής τους και των υψηλών αποδοτικών μετατροπών τους. Οι υδροθερμικές κατεργασίες παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα αλλά και μειονεκτήματα έναντι άλλων θερμοχημικών διαδικασιών που συνοψίζονται στον πίνακα 3.1 (T. Wang et al., 2018). Προηγούμενες μελέτες πάνω στην υδροθερμική επεξεργασία της ιλύος επικεντρώθηκαν στην παραγωγή ενός ελαιώδους προϊόντος μέσω της υδροθερμικής υγροποίησης στους 250–380 °C (Xu & Lancaster, 2008) και αέριου H<sub>2</sub> χρησιμοποιώντας την καταλυτική υδροθερμική αεριοποίηση πάνω από 380 °C και αυτογενής πίεση 23 MPa (Afif et al., 2011). Το τελευταίο διάστημα η Υδροθερμική Ανθρακοποίηση/Εξανθράκωση λαμβάνει μια ιδιαίτερη προσοχή ως μια βιώσιμη θερμοχημική διαδικασία για τη μετατροπή της υγρής βιομάζας σε ένα στερεό προϊόν που μοιάζει με τύρφη, γνωστό ως υδροεξανθράκωμα. Έχει χρησιμοποιηθεί για σχεδόν έναν αιώνα σε διάφορες επιστήμες, κυρίως για να προσομοιώσει στο εργαστήριο τη φυσική γεωλογική διαδικασία σχηματισμού προϊόντων με υψηλό περιεχόμενο άνθρακα από υπολείμματα οργανικής ύλης (Funke et al., 2010).

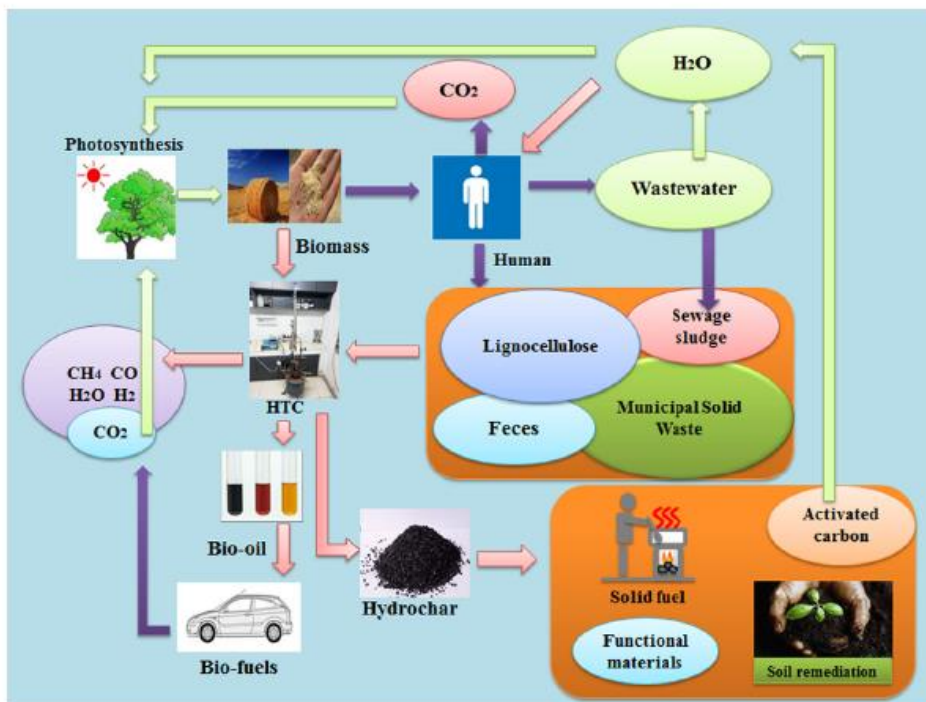
**Πίνακας 3.1:** Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα των τεχνολογιών αξιοποίησης βιομάζας.

<b>Τεχνολογίες αξιοποίησης βιομάζας</b>	<b>Πλεονεκτήματα</b>	<b>Μειονεκτήματα</b>	<b>Προσέγγιση</b>
<b>Πυρόλυση</b>	Υψηλή απόδοση και ευελιξία	Ακατάλληλο για απόβλητα βιομάζας υψηλής υγρασίας	Αργή ή γρήγορη πυρόλυση που παράγει βιοεξανθράκωμα, βιο-έλαιο και αέρια όπως CO, CO <sub>2</sub> , CH <sub>4</sub> και H <sub>2</sub> .
<b>Υδροθερμική επεξεργασία</b>	Εφαρμογή σε βιομάζα υψηλής υγρασίας	Δύσκολη συλλογή προϊόντος και υψηλές απαιτήσεις σε εξοπλισμό	Ανθρακοποίηση, Υγροποίηση και Αεριοποίηση παράγοντας υδροεξανθράκωμα, βιο-έλαιο και αέριο
<b>Βιολογική μετατροπή</b>	Χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις	Μεγάλη χρονική περίοδος	Ζύμωση ή αναερόβια πέψη που παράγει βιοαιθανόλη και βιοαέριο
<b>Πύκνωση ως στερεό καύσιμο</b>	Χαμηλό μεταφορικό κόστος	Χαμηλό ενεργειακό περιεχόμενο	Σφαιροποίηση για παραγωγή πέλλετ καυσίμου ή μπρικέτας ως καύσιμη ύλη

### **3.2 Υδροθερμική Ανθρακοποίηση Λυματολάσσης**

Ο Friedrich Bergius το 1913 ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε τον όρο Υδροθερμική Ανθρακοποίηση (ΥΑ) για να περιγράψει τη φυσική διαδικασία σχηματισμού άνθρακα όπου μετατρέπει την κυτταρίνη σε υλικά από άνθρακα. Ωστόσο, η διαδικασία αυτή δεν εφαρμόστηκε μέχρι και τις τελευταίες δεκαετίες του 20ού αιώνα ως η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την απόκτηση οργανικών ενώσεων με σκοπό τη σύνθεση νέων χημικών ουσιών μαζί με την ανάκτηση υγρών ή και αερίων καυσίμων. Πρόσφατα όμως ανακαλύφθηκε εκ νέου και αναφέρεται με ποικίλους τρόπους ως επεξεργασία ζεστού συμπιεσμένου νερού, ως υποκρίσιμη επεξεργασία νερού και ως υδροθερμική επεξεργασία. Τα τελευταία χρόνια, το παραγόμενο στερεό υπόλειμμα κατά την υδροθερμική αεριοποίηση και υγροποίηση, χρίζει αυξανόμενης προσοχής (Karayildirim et al., 2008). Κατά την υδροθερμική διαδικασία, η ακατέργαστη βιομάζα μετατρέπεται σε ένα στερεό προϊόν που επηρεάζεται σημαντικά από το μέσο εκχύλισης. Το νερό αποτελεί τον ιδανικό διαλύτη εκχύλισης αφού είναι ένα οικονομικό, φιλικό προς το περιβάλλον και μη τοξικό μέσο. Επειδή η υγρή βιομάζα δεν απαιτεί ξήρανση πριν από την υδροθερμική, έχει εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα. Γενικά, η υδροθερμική ανθρακοποίηση πραγματοποιείται σε σχετικά

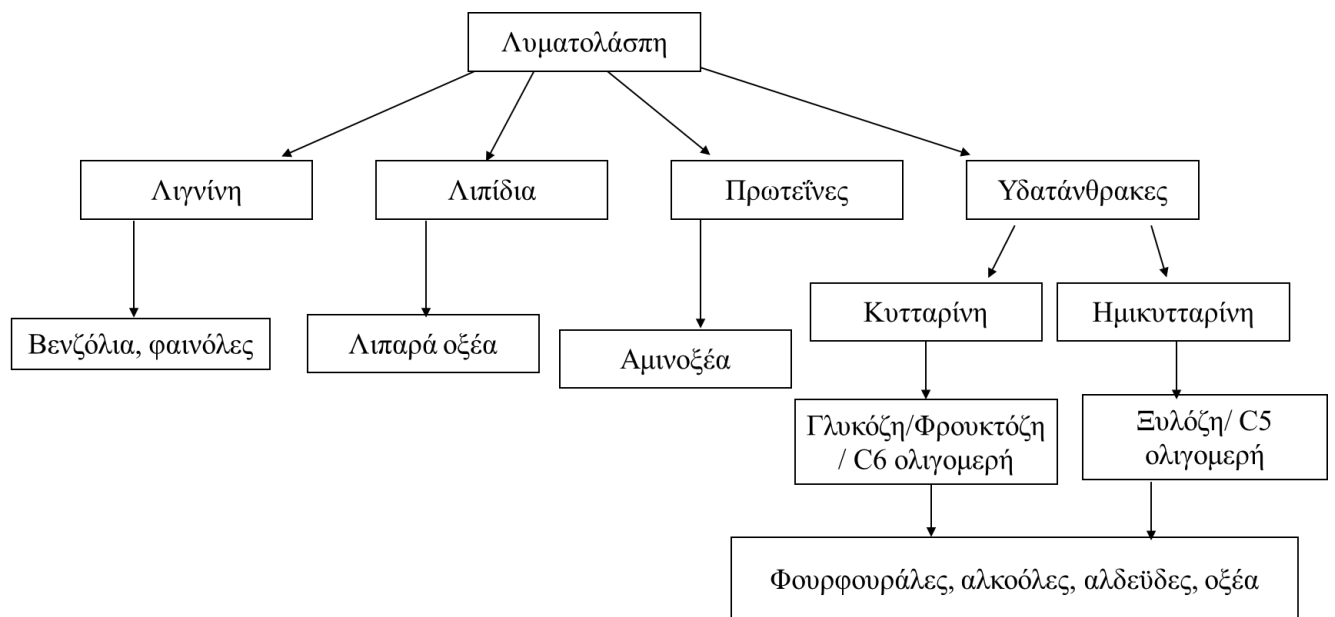
χαμηλές θερμοκρασίες (180-250 °C), χρόνου (5-240 λεπτά) και κάτω από αυτογενή πίεση (2-6 Μρα), μειώνοντας την περιεκτικότητα σε οξυγόνο και υδρογόνο της πρώτης ύλης μέσω αντιδράσεων αφυδάτωσης και αποκαρβοξυλίωσης. Αυτή η διαδικασία ρυθμίζεται από τις υδροθερμικές παραμέτρους όπως ο χρόνος παραμονής και η θερμοκρασία της αντίδρασης, οι οποίες καθορίζουν το βαθμό απόδοσης της αντίδρασης και τον βαθμό συμπύκνωσης της ακατέργαστης βιομάζας (Wiedner et al., 2013). Το στερεό υπόλειμμα που παράγεται από την υδροθερμική ονομάζεται υδροεξανθράκωμα, παρουσιάζει υδρόφοβες ιδιότητες, και ως εκ τούτου, διαχωρίζεται εύκολα από το υγρό προϊόν. Το υδροεξανθράκωμα επιδεικνύει ανώτερες επιδόσεις σε σχέση με την ακατέργαστη βιομάζα λόγω της υψηλότερης ενεργειακής πυκνότητας, της καλύτερης αφυδάτωσης και της βελτιωμένης απόδοσης καύσης από τη χρήση του ως στερεό καύσιμο (Xu et al., 2013). Ανάλογα τα διάφορα είδη βιομάζας που χρησιμοποιούνται, το παραγόμενο προϊόν εφαρμόζεται ευρέως για τη δέσμευση άνθρακα, τη βελτίωση του εδάφους, την παραγωγή βιοενέργειας και την αποκατάσταση της ρύπανσης των λυμάτων (Saidur et al., 2011). Τα οφέλη της βιωσιμότητας της παραγωγής υδροεξανθρακωμάτων και οι πιθανές εφαρμογές του συνοψίζονται στην Εικόνα 3.1.



**Εικόνα 3.1:** Σχηματική απεικόνιση των βιώσιμων εννοιών σχετικά με την παραγωγή υδροεξανθρακωμάτων, τις εφαρμογές και τον αντίκτυπο στο παγκόσμιο κλίμα (Wang et al., 2018).

Η υδροθερμική ανθρακοποίηση εφαρμόζεται σε μια μεγάλη ποικιλία λιγνοκυτταρινών βιομαζών, με μεταβλητή σύνθεση σε ημικυτταρίνη (20%–40%), κυτταρίνη (40% - 60%) και λιγνίνη (10%–25%), αλλά και σε μη λιγνοκυτταρινή βιομάζα, όπως τρόφιμα, ζωική λυματολάσπη, λυματολάσπη και αστικά στερεά απόβλητα με διαφορετικές συνθέσεις. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα αυτής της τεχνολογίας είναι (1) ότι δεν απαιτείται προηγούμενη ξήρανση του υποστρώματος, (2) η μείωση του όγκου των αποβλήτων σε χώρους υγειονομικής ταφής (90% -95%), (3) η υψηλή σταθερότητα της κατεργασμένης πρώτης ύλης, (4) η βελτιωμένη σχέση κόστους-αποτελεσματικότητας σε σύγκριση με την συμβατική θερμική ξήρανση, λαμβάνοντας ένα παραπροϊόν με υψηλή ενεργειακή πυκνότητα, (5) η μείωση της περιεκτικότητας σε άζωτο έως 50%, μειώνοντας τις εκπομπές NOx σε σύγκριση με την πρώτη ύλη, (6) η αποδοτική σφαιροποίηση σε σύγκριση με το βιοεξανθράκωμα, μειώνοντας το κόστος μεταφοράς και (7) η βελτίωση των επιφανειακών ιδιοτήτων του υδροεξανθρακώματος με χημική ενεργοποίηση (Villamil et al., 2019), (T. Liu et al., 2017).

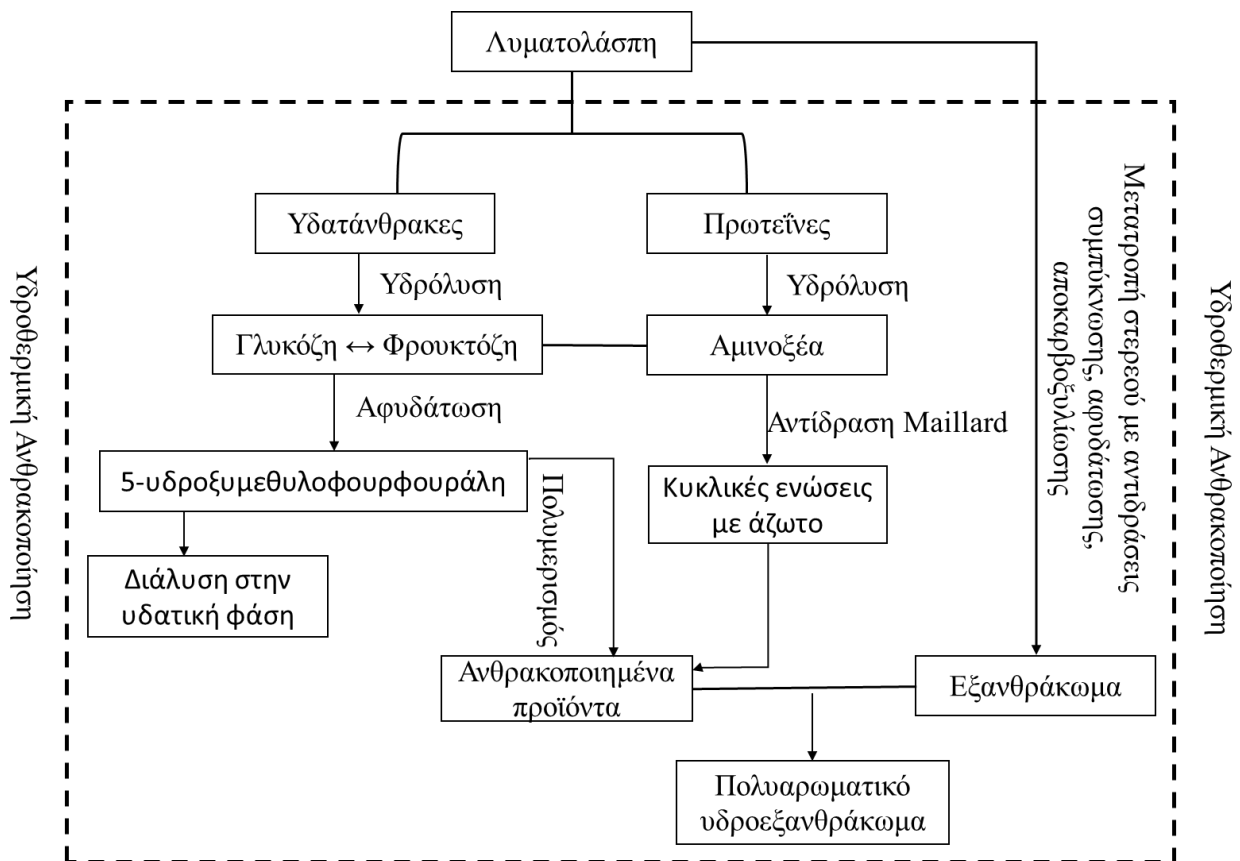
Η ιλύς λυμάτων αποτελείται κυρίως από λιγνίνη (15% -30%), πρωτεΐνες (40%), λιπίδια (10% - 25%), υδατάνθρακες (14%) και τέφρα, τα οποία μπορούν να αποσυντεθούν με την εφαρμογή της υδροθερμικής ανθρακοποίησης και να παράγουν προϊόντα όπως αλκοόλες, αλδεΐδες, καρβοξυλικά οξέα, αμινοξέα, λιπαρά οξέα και φουρφουράλες. Στο σχήμα 3.1 παρουσιάζονται τα κύρια οργανικά συστατικά της λυματολάσπης και τα προϊόντα υδρόλυσής τους σύμφωνα με τη διαδικασία ΥΑ (He et al., 2014).



**Σχήμα 3.1:** Κύρια οργανικά συστατικά στην ιλύ καθαρισμού λυμάτων και τα προϊόντα τους υπό υδροθερμικές συνθήκες (Villamil et al., 2019).

Στη συνέχεια στο σχήμα 3.2 απεικονίζεται ο σχηματισμός του υδροεξανθρακώματος από την ΥΑ της ιλύος καθαρισμού λυμάτων όπου υπό υδροθερμικές συνθήκες, διαφορετικά μονοπάτια αντιδράσεων λαμβάνουν χώρα λόγω της παρουσίας σακχαριτών, πρωτεϊνών και αμινοξέων. Η αποικοδόμηση των αμινοξέων μπορεί να επηρεαστεί από το χαμηλό pH που προκαλείται στην υδροθερμική μετατροπή των σακχαριτών. Ο (Abdelmoez et al., 2010) μελέτησε τον μετασχηματισμό και την αποσύνθεση των αμινοξέων σε υποκρίσιμες συνθήκες (230-290 °C) και ανέφερε ότι οι πιο σταθερές μορφές βρέθηκαν σε υψηλές τιμές pH (ιονισμένη μορφή), ενώ παρατηρήθηκε αντίστροφη τάση σε σχεδόν ουδέτερες και όξινες τιμές pH. Κατά τη διάρκεια της διαδικασίας ΥΑ, αντιδράσεις Maillard πραγματοποιούνται μεταξύ της ομάδας του καρβονυλίου των σακχάρων με την αμινομάδα των αμινοξέων, για να ληφθούν πολυμερικές ενώσεις που ονομάζονται μελανοΐδινες. Αυτές οι αντιδράσεις είναι υπεύθυνες για την χαρακτηριστική οσμή και το καφέ χρώμα του υδροεξανθρακώματος της ιλύος καθαρισμού λυμάτων. Οι αρωματικές ενώσεις και αμίνες που περιέχουν άζωτο βρίσκονται στην υδατική φάση ως αποτέλεσμα των αντιδράσεων Maillard, ενώ στο υδροεξανθράκωμα έχουν βρεθεί ετεροκυκλικές ενώσεις αζώτου, συμπεριλαμβανομένων των τεταρτοταγών N και N-πυριδίνης. Ο (Danso-Boateng et al., 2015) ανίχνευσε διαφορετικές ενώσεις Maillard, όπως αλδεΐδες, φουράνια, πυρρόλες, πυραζίνες και πυριδίνες σε (4,3% κ.β.) σε θερμοκρασίες και χρόνους αντίδρασης υψηλότερους από 180 °C και 15 λεπτά, αντίστοιχα. Ο (De la Rubia et al., 2018) παρατήρησε επίσης αρκετά προϊόντα Maillard, συμπεριλαμβανομένων των πυρρολών, της πυριδίνης και των αλδεϋδών στην υδατική φάση της αφυδατωμένης ενεργοποιημένης ιλύος (15% κατά βάρος) στους 208 °C για 1 ώρα. Τα ευρήματα υποδεικνύουν ότι η απαμίνωση ευνοείται σε υψηλή θερμοκρασία, αποδίδοντας συγκεντρώσεις αμμωνίου έως και 930 mg/L. Στην περιοχή θερμοκρασιών μεταξύ 180 °C και 220 °C, η περιεκτικότητα σε άζωτο στο υδροεξανθράκωμα και στις αρωματικές δομές αυξάνεται σημαντικά σε υψηλή θερμοκρασία, ενώ στην υδατική φάση η περιεκτικότητα σε άζωτο παραμένει σχετικά σταθερή. Ο Inoue et al., το 1997 παρατήρησε μετά την υδροθερμική επεξεργασία της αφυδατωμένης λυματολάσπης (150-300 °C) ότι σε θερμοκρασίες άνω των 150 °C, η περιεκτικότητα αζώτου σε λάσπη μεγαλύτερη από 60% μεταφέρθηκε στην υδατική φάση και προωθήθηκε η διαλυτοποίηση και η αποσύνθεση του περιεχομένου αζώτου. Στην ΥΑ της αφυδατωμένης ιλύος (17,5% κατά βάρος) σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 300 °C (93 bar), το σχηματιζόμενο  $\text{NH}_4^+$ -N οφείλεται στην αρχική υδρόλυση των ασταθών πρωτεϊνών και του ανόργανου αζώτου. Επιπλέον, σε θερμοκρασίες υψηλότερες από 340 °C (155 bar), η κυρίαρχη αντίδραση που παρατηρείται

είναι η απαμίνωση της Ν-πυριδίνης (He et al., 2015). Στον Πίνακα 3.2 συνοψίζονται διαφορετικές συνθήκες λειτουργίας και τα κύρια χαρακτηριστικά του υδροεξανθρακώματος που λαμβάνονται από την ΥΑ ποικίλων ειδών λυματολάσπης.



**Σχήμα 3.2:** Μηχανισμός σχηματισμού υδροεξανθρακώματος από λυματολάσπη σε υδροθερμικές συνθήκες (He et al., 2013).

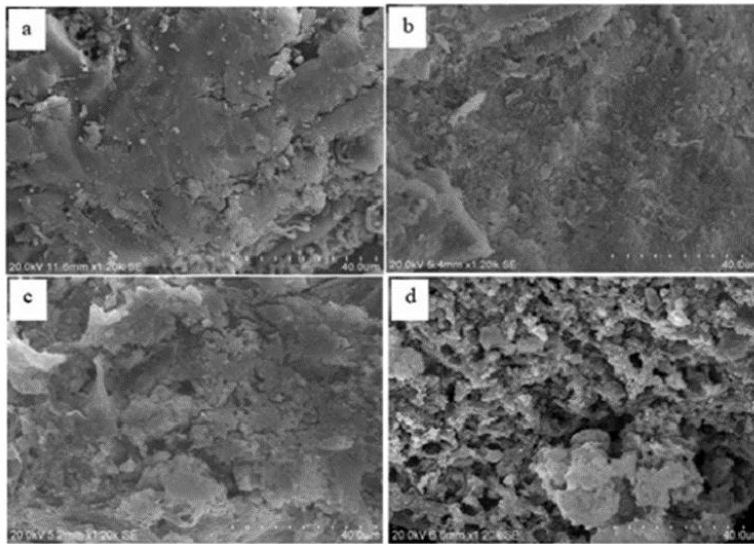
**Πίνακας 3.2:** Τυπικές συνθήκες λειτουργίας και κύρια χαρακτηριστικά υδροεξανθρακώματος κατά την υδροθερμική ανθρακοποίηση της ιλύς λυμάτων (Villamil et al., 2019).

Υπόστρωμα Λυματολάσπης	Στερεό (%)	Θερμοκρασία (°C)	Χρόνος (min)	Απόδοση (%)	Άνθρακας (%)	Θερμογόνος δύναμη (kJ/kg)
Αφυδατωμένη	20,19	190-220	300-420	60,2	25,9-41,1	11,02-19,1
Δευτερογενής	10	250	15	-	40,1	15,8
Χωνευμένη	14,3	200	240-270	60,4	33	14,7-15,1
Αφυδατωμένη	12	200	30	-	41,9	-
Χωνευμένη	3,6	180-280	30	80,4-93,9	40-48,4	16,5-22,4
Λάσπη από δημόσιο βιολ.καθαρισμό	20	190-260	60-1440	-	35,9-38,6	16,7-18,3
Αφυδατωμένη	14	180-240	15-45	-	52,2-67,9	18,8-20,2
Πρωτογενής	4,3	140-200	15-240	60,5-81,1	37,2-39,2	17-19
Λυματολάσπη	10,7	180-300	30-480	53-66,2	19,6-24,5	11/12/01
Αφυδατωμένη βιολογική λάσπη	14,4	120-210	60	43,4-93,7	35,1	22,7-28,2
Αφυδατωμένη	17,5	200-300	20	-	39,9	-
Δευτερογενής	11	270	120	-	-	-
Αφυδατωμένη	10,7	220-300	60	48,2-57,7	22,3-2,2	9,6-10,3
Λυματολάσπη	-	180-200	240-480	-	57,3-58,6	-
Χωνευμένη	19	200	30	65-85	23,4	-
Αφυδατωμένη	14,4	120-210	60	-	30,2-36,6	22,7_27
Χωνευμένη	19	200	30	-	23,3	-

Ένα από τα κύρια μειονεκτήματα των παραγόμενων υλικών της ΥΑ, συμπεριλαμβανομένων του υδροεξανθρακώματος από τη λυματολάσπη είναι ότι παρουσιάζουν περιορισμένο πορώδες και επιφάνεια. Το παραγόμενο υδροεξανθράκωμα είναι ένα στερεό με καφέ χρώμα, αδιάλυτο στο νερό και κονιοποιείται εύκολα σε σκόνη. Οι εικόνες SEM αποκαλύπτουν ότι οι μορφολογίες επιφάνειας των αποξηραμένων λυμάτων και του παραγόμενου υδροεξανθρακώματος είναι σαφώς διαφορετικές και μεταβάλλονται σημαντικά όταν η θερμοκρασία ανθρακοποίησης αυξάνεται από 180 °C έως 250 °C. Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι η ΥΑ είναι πιο αποτελεσματική σε θερμοκρασία 250 °C, πετυχαίνοντας μικρότερο μέγεθος και περισσότερη πορώδη επιφάνεια του παραγόμενου



υδροεξανθράκωματος. Συνεπώς, το υδροεξανθράκωμα που παράγεται δε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αυτούσιο σαν προσροφητικό υλικό λόγω της μικρής επιφάνειας και του μεγέθους των πόρων του. Αλλά η ικανότητα προσρόφησης του μπορεί να αυξηθεί μέσω διεργασιών ενεργοποίησης (Danso-Boateng et al., 2013).



**Εικόνα 3.2:** Εικόνες από SEM (α) αποξηραμένης λάσπης, (β) παραγόμενο υδροεξανθράκωμα στους 180 °C, (γ) 220 °C , (δ) 250 °C (Danso-Boateng et al., 2013).

### **3.3 Παράμετροι που επηρεάζουν την Υδροθερμική Ανθρακοποίηση**

#### **(i) Θερμοκρασία**

Η θερμοκρασία αντιπροσωπεύει έναν κρίσιμο παράγοντα κατά τη διάρκεια της υδροθερμικής επεξεργασίας επειδή αποτελεί καθοριστικό παράγοντα για τις ιδιότητες του νερού το οποίο προκαλεί ιοντικές αντιδράσεις που συμβαίνουν στην υποκρίσιμη περιοχή (Möller et al., 2011). Πάνω από το κρίσιμο σημείο, ο μηχανισμός της υδροθερμικής μετατοπίζεται από τις ιοντικές αντιδράσεις σε αντιδράσεις ελευθέρων ριζών στην υπερκρίσιμη περιοχή του νερού. Ωστόσο, στις κυριαρχούμενες ιοντικές αντιδράσεις, η αύξηση της θερμοκρασίας μεταβάλλει το ιζώδες του νερού, επιτρέποντας την ευκολότερη διείσδυσή του σε πορώδη μέσα και, συνεπώς, την περαιτέρω αποδόμηση της βιομάζας (Savage, 1999). Επιπλέον, όταν η θερμοκρασία υπερβαίνει την ενέργεια ενεργοποίησης, ξεκινά η σχάση των δεσμών στα οργανικά μακρομόρια που απαντώνται στη βιομάζα. Οι θερμοκρασίες που προσεγγίζουν μια συγκεκριμένη περιοχή έντασης της αντίδρασης έχουν καθοριστική επίδραση στην αντίδραση υδρόλυσης της βιομάζας ενώ οι υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να οδηγήσουν σε αντιδράσεις αφυδάτωσης, αποκαρβοξυλίωσης και συμπύκνωσης ταυτόχρονα (Funke et al, 2010). Όταν η θερμοκρασία δεν είναι επαρκής για να διασπάσει τα κύρια συστατικά της βιομάζας, είναι πιθανό να συμβεί μια διαδικασία που μοιάζει με την πυρόλυση σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Επιπλέον, ανάλογα με τις θερμοκρασίες που χρησιμοποιούνται στην υδροθερμική ανθρακοποίηση, μεταβάλλεται η στοιχειακή σύνθεση (η ατομική αναλογία των H/C και O/C) των παραγόμενων υδροεξανθρακωμάτων. Η Sevilla et al. απέδειξε πως η αύξηση της θερμοκρασίας της ΥΑ από τους 230 °C στους 250 °C προκάλεσε μείωση των ατομικών αναλογιών O/C και H/C, υποδηλώνοντας ότι οι αυξημένες θερμοκρασίες βελτίωσαν το βαθμό συμπύκνωσης του υδροεξανθρακώματος (Sevilla & Fuertes, 2009).

#### **(ii) Χρόνος αντίδρασης**

Η υδροθερμική ανθρακοποίηση είναι σχετικά μία αργή αντίδραση με χρόνους παραμονής που κυμαίνονται από ορισμένες ώρες έως και αρκετές ημέρες. Πραγματοποιήθηκαν αρκετά πειράματα με ποικίλους χρόνους αντίδρασης χωρίς όμως η επιρροή τους να αξιολογείται λεπτομερώς. Σε σύγκριση με τη θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής έχει παρόμοια αλλά μικρότερη επίδραση στην ανάκτηση στερεών προϊόντων. Γενικά ένας υψηλός χρόνος παραμονής αυξάνει το βαθμό έντασης της αντίδρασης. Σε αντίθεση με την αναμενόμενη χαμηλότερη %απόδοση του στερεού σε υψηλή ένταση αντίδρασης, έχει παρατηρηθεί ότι ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής μπορεί να αυξήσει

σημαντικά την %απόδοση του υδροεξανθρακώματος. Το γεγονός αυτό εξηγείται από τον πολυμερισμό των θραυσμάτων που διαλυτοποιήθηκαν στην υγρή φάση και οδηγούν στην καθίζηση των αδιάλυτων στερεών σχηματίζοντας ένα δευτερεύων υδροεξανθράκωμα με πολυαρωματική δομή (He et al., 2013). Τόσο η εκχύλιση όσο και η υδρόλυση πραγματοποιούνται μέσα σε λίγα λεπτά αντί για ώρες για το υπόλοιπο ενανθράκωση (Peterson et al., 2008), (Hashaikeh et al., 2007), (Karagöz et al., 2005). Ωστόσο, δεν είναι δυνατό να εξαχθεί συμπέρασμα για το ποιος μηχανισμός αντίδρασης της υδροθερμικής ανθρακοποίησης καθορίζει το ρυθμό. Τόσο οι μηχανισμοί διάχυσης και μεταφοράς κατά τη διάρκεια της αποσύνθεσης της βιομάζας όσο και ο πολυμερισμός και η συμπύκνωση είναι πιθανό να διέπουν το συνολικό ρυθμό αντίδρασης (Funke et al, 2010).

### **(iii) Συγκέντρωση υποστρώματος**

Σε μικρότερο ποσοστό σε σύγκριση με τους άλλους δύο παράγοντες η αναλογία βιομάζας προς νερό (δηλ. το στερεό φορτίο) αντιπροσωπεύει μια εξίσου σημαντική παράμετρο στη διαδικασία της υδροθερμικής. Για παράδειγμα, για στερεό φορτίο κοντά στο μηδέν, κατά τη διαδικασία της διήθησης, η βιομάζα μπορεί να διαλυθεί σχεδόν πλήρως αφήνοντας μόνο λίγα υπολείμματα. Από την άλλη πλευρά, η αύξηση του στερεού φορτίου με ταυτόχρονη εξάτμιση του νερού ανακτά μεγάλα τμήματα του διαλυμένου οργανικού κλάσματος ως στερεό υλικό (Wang et al., 2019). Επιπλέον, ένα υψηλό στερεό φορτίο παρουσιάζει θετική επίδραση στον συνολικό χρόνο παραμονής της αντίδρασης, πιθανώς από την συνεχώς αυξανόμενη συγκέντρωση των μονομερών στην υγρή φάση, η οποία προωθεί τον πολυμερισμό να ξεκινήσει νωρίτερα, οδηγώντας σε μεγαλύτερο κλάσμα αδιάλυτων στερεών (Robbiani, 2013). Έχει αναφερθεί ότι η αντίδραση της ανθρακοποίησης πραγματοποιείται στην υποκρίσιμη περιοχή του νερού όταν μειώνεται η περιεκτικότητα σε υγρασία, οδηγώντας σε αυξημένο σχηματισμό στερεού προϊόντος από λυματολάσπη (Gong et al., 2014). Προκειμένου να μεγιστοποιηθεί η παραγωγή, το στερεό φορτίο πρέπει να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερο, αλλά η μεταφορά των θραυσμάτων που παράγονται για πρώτη φορά με την αντίδραση της υδρόλυσης από τη μήτρα της ιλύος είναι πιθανώς περιορισμένη, κάτι που μπορεί να αποτελεί και το καθοριστικό βήμα για τον ρυθμό και την ένταση της αντίδρασης (Hashaikeh et al., 2007). Ως εκ τούτου, η περιεκτικότητα σε υγρασία της λυματολάσπης μπορεί να είναι τυπικά στο 75-99%. Έτσι, η περιεκτικότητα σε υγρασία μετά

από μηχανική αφυδάτωση της ιλύος, φτάνει περίπου το 80-85% και φαίνεται επομένως ικανοποιητική για τις υδροθερμικές διεργασίες.

#### **(iv) ρυθμός αύξησης θερμοκρασίας**

Ο ρυθμός θέρμανσης που εφαρμόζεται κατά την ΥΑ είναι μία από τις πιο κρίσιμες παραμέτρους αφού ασκεί σημαντική επιρροή στον σχηματισμό των ενδιάμεσων προϊόντων και στη κατανομή των προϊόντων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Brand et al. ο αργός ρυθμός θέρμανσης ( $2\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) ευνόησε το στερεό υπόλειμμα έχοντας χαμηλότερο λόγο O/C και H/C, σε σύγκριση με τον γρήγορο ρυθμό θέρμανσης ( $20\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ) (Brand et al., 2014). Ένας αργός ρυθμός θέρμανσης παρέχει αρκετό χρόνο για να προωθήσει την αντίδραση αποδόμησης των βιομορίων και τον ανασυνδυασμό των ενδιάμεσων. Προφανώς, το ίδιο αποτέλεσμα ισχύει και για τον ρυθμό ψύξης, ο οποίος είναι γενικά εκτός υπολογισμού όταν χρησιμοποιείται ψύξη νερού/αέρα. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο αντίκτυπος του ρυθμού θέρμανσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από την τελική θερμοκρασία της αντίδρασης. Ωστόσο, δεν υπάρχουν αρκετά βιβλιογραφικά δεδομένα για το ρόλο του ρυθμού θέρμανσης και την επίδρασή του στους μηχανισμούς της υδροθερμικής αντίδρασης (Wang et al., 2019).

#### **(v) pH**

Αρκετοί ερευνητές παρατήρησαν πτώση της τιμής του pH κατά τη διάρκεια της υδροθερμικής ανθρακοποίησης. Έχει προταθεί ότι σχηματίζεται μια ποικιλία οργανικών οξέων και έχουν αναγνωριστεί ως ενδιάμεσα προϊόντα μέχρι τώρα το οξικό, το μυρμηκικό, το γαλακτικό και το λεβουλινικό οξύ (Titirici et al., 2007). Ένα ουδέτερο έως ασθενές όξινο περιβάλλον φαίνεται να είναι η ιδανικότερη συνθήκη. Σε πειράματα έχουν εφαρμοστεί διαφορετικά οξέα και βάσεις και έχει παρατηρηθεί σημαντική επίδραση στο ρυθμό αντίδρασης και στα χαρακτηριστικά/κατανομή του προϊόντος. Ο τύπος οξέος που χρησιμοποιείται παίζει σημαντικό ρόλο. Για παράδειγμα, μικρές ποσότητες οξέων Arrhenius, καταλύουν γενικά την αντίδραση αφυδάτωσης. Θα πρέπει επίσης να σημειωθεί ότι μια υψηλή τιμή pH τείνει να έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερες αναλογίες H/C στο προϊόν και έναν άνθρακα με υψηλότερη περιεκτικότητα σε πίσσα. Οι επιδράσεις των όξινων συνθηκών σε άλλους μηχανισμούς αντίδρασης, όπως στην αποκαρβοξυλίωση και στον πολυμερισμό, είναι ακόμα άγνωστες (Wallman, 1995)

### **3.4 Εφαρμογές Υδροθερμικής Ανθρακοποίησης**

Η τεχνολογία της υδροθερμικής ανθρακοποίησης κερδίζει ολοένα και περισσότερο την προσοχή για τις πιθανές εφαρμογές του παραγόμενου υδροεξανθρακώματος σε διαφορετικά πεδία, όπως η βελτίωση του εδάφους, ο καθαρισμός του νερού, η αποθήκευση ενέργειας, η δέσμευση CO<sub>2</sub> και η κατάλυση. Η εμπορική ανάπτυξη της ΥΑ απαιτεί υψηλές επενδύσεις, λόγω της απαιτούμενης υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα στον σχεδιασμό του αντιδραστήρα, για τη βελτίωση της εσωτερικής ανάκτησης θερμότητας, καθώς και για τους καταλύτες και την ανακύκλωση και αναγέννηση του νερού επεξεργασίας, προκειμένου να ξεπεραστούν τα τεχνολογικά κενά και οι οικονομικοί περιορισμοί (Masoumi et al., 2021). Στη συνέχεια παρουσιάζονται αναλυτικότερα τα πεδία που βρίσκει εφαρμογή το υδροεξανθράκωμα:

#### **(α) παραγωγή ενέργειας**

Το υδροεξανθράκωμα είναι ένα πλούσιο ενεργειακά σε άνθρακα υλικό που προσφέρει τεράστιες δυνατότητες ως στερεό καύσιμο από ανανεώσιμη πηγή. Όσον αφορά το ενεργειακό ισοζύγιο, η ΥΑ χαμηλής θερμοκρασίας συνιστάται ως η πιο οικονομική και αποδοτική διαδικασία για την παραγωγή βιοκαυσίμου σε σύγκριση με τη συμβατική θερμική ξήρανση. Μία μέτρια θερμοκρασία (200 °C) και χρόνος κατακράτησης 30 λεπτών προτείνονται για την παραγωγή στερεών βιοκαυσίμων από ιλύ λυμάτων με ρυθμό ανάκτησης ενέργειας 50%. Έχει επίσης προταθεί να βελτιωθεί η ένταση της μηχανικής αφυδάτωσης προκειμένου να ενισχυθεί η θερμική απόδοση της διαδικασίας. Υψηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα και χαμηλή περιεκτικότητα σε τέφρα προτιμώνται εάν το υδροεξανθράκωμα καίγεται με σκοπό την παραγωγή ενέργειας (Zhao et al., 2014). Τα υδροεξανθρακώματα περιέχουν λιγότερη περιεκτικότητα σε θείο και άζωτο από την ιλύ καθαρισμού λυμάτων και δεν είναι επιρρεπή σε αυτόματη ανάφλεξη, λόγω των λειτουργικών επιφανειακών οξυγόνων. Επιπλέον, το οργανικό χλώριο μπορεί να μετατραπεί στην ανόργανη μορφή του, μειώνοντας τις δυνατότητες διάβρωσης και σχηματισμού διοξίνης που συμβαίνουν στην άμεση καύση τροφοδοσίας. Η διαδικασία ΥΕ παράγει μόνο μικρές ποσότητες επιβλαβών αερίων σε σύγκριση με τις επεξεργασίες πυρόλυσης. Σε σύγκριση με την αποτέφρωση, δεν υπάρχει κίνδυνος έλλειψης ενέργειας σε υψηλή περιεκτικότητα σε υγρασία. Η ΥΕ μετατρέπει την ακατέργαστη λάσπη σε στερεό καύσιμο με μεγαλύτερη διαδικασία καύσης, αλλά με πιο σταθερή φλόγα (He et al., 2013).

### **(β) προσροφητικό υλικό**

Το υδροεξανθράκωμα όπως έχει ήδη αναφερθεί διαθέτει μικρή επιφάνεια, με χαμηλή ανάπτυξη πόρων και αρνητικό επιφανειακό φορτίο λόγω των πολικών λειτουργικών ομάδων επιφανείας. Παρουσιάζει χαμηλές επιφανειακές τιμές BET 30 m<sup>2</sup>/g που μπορεί να οφείλονται σε πτητικές ύλες που δεν μεταφέρθηκαν στην υδατική φάση κατά την διάρκεια της ΥΑ ή οργανικών ενώσεων από την υδατική φάση που μετανάστευσαν στην επιφάνεια του υδροεξανθρακώματος, εμποδίζοντας έτσι την πρόσβαση στους πόρους (Román et al., 2013). Ωστόσο υδροεξανθρακώματα από χωνευμένη λυματολάσπη, επεξεργασμένα αστικά απόβλητα, απορρίμματα υπολειμμάτων ζαχαροκάλαμου, μπαμπού κ.α εφαρμόζονται ως προσροφητικά για την απομάκρυνση διαφόρων ρύπων, όπως ζιζανιοκτόνα, προϊόντα προσωπικής φροντίδας, αντιβιοτικά και βαρέα μέταλλα (Fang et al., 2018). Το πρόβλημα με τη μικρή επιφάνεια των υδροεξανθρακωμάτων περιορίζεται με τη χρήση φυσικών ή χημικών ενεργοποιητών. Από αυτή την άποψη, το υδροεξανθράκωμα χρησιμοποιείται ως πρόδρομη ένωση του ενεργού άνθρακα επειδή διαθέτει χαμηλό βαθμό συμπύκνωσης, ο οποίος μπορεί να ρυθμιστεί για να παράγει ενεργοποιημένους άνθρακες με επιδεκτικές ιδιότητες ρύθμισης της επιφάνειας, όπως για παράδειγμα υψηλή συγκέντρωση οξυγονωμένων λειτουργικών ομάδων που λειτουργούν ως ενεργές θέσεις που αλληλεπιδρούν και ακινητοποιούν άλλα μόρια. Οι χημικοί ενεργοποιητές είναι για παράδειγμα KOH, NaOH, H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> και H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ενώ φυσικό παράγοντα ενεργοποίησης αποτελεί το CO<sub>2</sub> και ο αέρας. Όπως υποδεικνύεται από τους Romero-Anaya et al. επιφανειακές περιοχές έως 3150 m<sup>2</sup>/g μπορούν να επιτευχθούν με υδροθερμική ανθρακοποίηση (200 °C, 24 ώρες) γλυκόζης και επακόλουθη χημική ενεργοποίηση (750 °C, 1 ώρα) με την ισχυρή βάση KOH. Οι υψηλότερες περιοχές BET επιτεύχθηκαν με την ακόλουθη σειρά παραγόντων ενεργοποίησης: NaOH > KOH > H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> > CO<sub>2</sub>. Από την άλλη πλευρά, η φυσική ενεργοποίηση με CO<sub>2</sub> παρήγαγε πιο χαμηλό περιεχόμενο επιφανειακού οξυγόνου σε σύγκριση με τη χημική ενεργοποίηση (Romero-Anaya et al., 2014).

### **(γ) εδαφοβελτιωτικό εδάφους**

Τα υδροεξανθρακώματα προερχόμενα από τη λυματολάσπη θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως βιώσιμα λιπάσματα καθώς η πλειονότητα των θρεπτικών μακροστοιχείων (N, Ca, P και Mg) παραμένει ενσωματωμένη στην στερεά φάση διαδραματίζοντας σημαντικό ρόλο στην βελτίωση του εδάφους. Ωστόσο πρέπει κανείς να αναλογιστεί και τα αρνητικά αποτελέσματα από την εφαρμογή του υδροεξανθρακώματος ως εδαφοβελτιωτικό (Tasca et al., 2017). Σύμφωνα με τον Rillig et al. η περαιτέρω αύξηση της

συγκέντρωσης του υδροεξανθρακώματος επιδείνωσε την ανάπτυξη του φυτού *Taraxacum* (Rillig et al., 2010) ενώ ο Bargmann et al. παρατήρησε την έλλειψη αζώτου στα φυτά λόγω της μη μεταφοράς του από το υδροεξανθράκωμα σε αυτά την πρώτη εβδομάδα προσθήκης του υδροεξανθρακώματος (Bargmann et al., 2014)ω. Συνεπώς απαιτείται έρευνα εις βάθος για την εκτίμηση των οικοτοξικολογικών ιδιοτήτων του υδροεξανθρακώματος και των επιπτώσεών του στο έδαφος ώστε να μειωθούν οι αρνητικές επιπτώσεις του στις γεωργικές εφαρμογές (Masoumi et al., 2021).

#### **(δ) ανάκτηση θρεπτικών ουσιών**

Η υδροθερμική επεξεργασία μπορεί να εφαρμοστεί στην ανάκτηση θρεπτικών ουσιών, ειδικά όταν το υπόστρωμα προέρχεται από λάσπη από περιττώματα ζώων και λάσπη λυμάτων πλούσια σε φώσφορο και άζωτο. Ο Ekro et al. μελέτησε την επίδραση του pH στην εκχύλιση του αζώτου και του φωσφόρου χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου 0,1 M και θειικό, οξικό και μυρμηκικό οξύ σε θερμική υδρόλυση (120-170 °C, 1 ώρα) και ΥΑ (200-250 °C, 1 ώρα) από λυματολάσπη χοιριδίων. Η θερμοκρασία ήταν καθοριστική στην εκχύλιση του φωσφόρου από το νερό επεξεργασίας, επιτυγχάνοντας την υψηλότερη ανάκτηση φωσφόρου με τη χρήση H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> στους 170 °C. Ωστόσο, ο φωσφόρος διατηρήθηκε ως επί το πλείστον στο υδροεξανθράκωμα. Στην ανάκτηση του αζώτου, η εκχύλιση με H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> έδειξε ικανοποιητικά αποτελέσματα (Ekro et al., 2016). Οι ερευνητές Aragón-Briceno et al. ανέφεραν ότι η συνολική συγκέντρωση διαλυτού φωσφόρου στην υδατική φάση αυξήθηκε από 3% σε 14% όταν η θερμοκρασία της ΥΑ αυξήθηκε από 160 °C σε 250 °C, όπως επίσης και το διαλυτό άζωτο στο νερό επεξεργασίας αυξήθηκε ουσιαστικά με τη θερμοκρασία (από 160 °C έως 250 °C) (Aragón-Briceno et al., 2017). Ο Munir et al. παρατήρησε ότι η ανάκτηση του φωσφορικού άλατος στη διαδικασία της ΥΑ της λυματολάσπης μπορεί να επιτευχθεί με καταβύθιση ρητίνης MgCl<sub>2</sub> σε συνθήκες 220 °C για 1 ώρα και αυξάνεται με αύξηση του pH και των ιόντων μαγνησίου (Munir et al., 2017).

#### **(ε) δέσμευση άνθρακα**

Η διαδικασία διάθεσης του υδροεξανθρακώματος που προέρχεται από βιομάζα στο έδαφος συμβάλλει στη δέσμευση και αποθήκευση άνθρακα. . Αυτή η διαδικασία αποτελεί μια μέθοδο μείωσης της ποσότητας διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα και αντισταθμίζει τις ανθρωπογενείς εκπομπές CO<sub>2</sub>. Ο ρυθμιζόμενος πορώδης χαρακτήρας αυτών των υλικών και η βιώσιμη πηγή που χρησιμοποιείται για την παραγωγή τους αποτελούν υποσχόμενα χαρακτηριστικά για τη χρήση τους ως προσροφητές CO<sub>2</sub> (Malghani et al., 2013).

### **(στ) καταλύτης**

Στο υδροεξανθράκωμα υπάρχει η δυνατότητα μεταβολής των φυσικοχημικών του ιδιοτήτων, γεγονός που οδηγεί στην προσθήκη λειτουργιών στην επιφάνειά του με σκοπό την ενίσχυση του φαινομένου της προσρόφησης. Ο μελέτησε την ΥΑ λυματολάσπης ενισχυμένη με νανοσωματίδια νικελίου Ni για την παραγωγή του καταλύτη υδροεξανθράκωμα/Ni. κατά τη διάρκεια της καταλυτικής αεριοποίησης δημιουργήθηκαν ομοιόμορφα κατανεμημένα, πάνω στο υδροεξανθράκωμα, νανοσωματίδια NiO τα οποία παρείχαν τις ενεργές θέσεις για την προσρόφηση της πίσσας και την καταλυτική μετατροπή της. Λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταλλικών κατιόντων και του άνθρακα, το σύστημα Ni<sub>0.1</sub>-HC παρουσίασε την υψηλότερη καταλυτική δραστηριότητα στην προώθηση της παραγωγής υδρογόνου, με 72,5% εκλεκτικότητα στο υδρογόνο, και στη μείωση της πίσσας υπό ήπιες συνθήκες (Gai et al., 2017).



### **3.4 Μεθοδολογία Βελτιστοποίησης υδροθερμικής αναθρακοποίησης: Μεθοδολογία Επιφανειακής Απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM)**

Ο πειραματικός σχεδιασμός (Design of Expert, DoE) είναι μια συλλογή εργαλείων που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη της συμπεριφοράς ενός συστήματος και αποτελεί την πιο χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία που εφαρμόζεται στον τομέα της χημειομετρίας. Στις κλασικές ερευνητικές μεθόδους, ο κύριος στόχος είναι ο καθορισμός ενός κανόνα, ο οποίος έχει την ιδιότητα μιας απόλυτης κατηγορίας, σε ένα δεδομένο επίπεδο γνώσης, δηλαδή με άλλα λόγια ο κανόνας αυτός είναι είτε άνευ όρων σωστός ή όχι. Όταν όμως αντιμετωπίζεται ένα πολύπλοκο σύστημα, αυτό το είδος προσέγγισης καθίσταται δύσκολο να εφαρμοστεί γιατί υπάρχουν πολλοί παράγοντες που έχουν πολύπλοκα αποτελέσματα και είναι δύσκολο να βρεθεί το σωστό μαθηματικό μοντέλο σύμφωνο με τον κανόνα. Συνεπώς η ουσία του DoE είναι ότι επιτρέπει τη λήψη βέλτιστων λύσεων ακόμη και όταν είναι πραγματικά αδύνατο να αποκτηθεί ένα λειτουργικό μαθηματικό μοντέλο και να καθοριστεί ένας κανόνας με ακρίβεια. Στον πειραματικό σχεδιασμό χρησιμοποιούνται πολυωνμικά μοντέλα αφού η ποιότητα της προσέγγισης μπορεί να βελτιωθεί με την αύξηση του πολυωνμικού βαθμού. Τέτοια μοντέλα είναι κατάλληλα για την επίλυση προβλημάτων βελτιστοποίησης καθώς καθιστούν δυνατή τη συνεκτίμηση ενός μεγάλου αριθμού παραγόντων και των επιπτώσεων αλληλεπίδρασής τους (Luciano et al., 2010, Lazic, 2004).

**Πίνακας 3.3:** Βασικά πλεονεκτήματα του Πειραματικού σχεδιασμού (DoE) (Brereton et al., 2003).

---

#### **Πλεονεκτήματα του πειραματικού σχεδιασμού**

---

Ανίχνευση της σημαντικότητας των παραγόντων

Βελτιστοποίηση των μεθόδων

Εξοικονόμηση χρόνου με την πραγματοποίηση πολλών πειραμάτων έναντι της προσέγγισης μίας μεταβλητής τη φορά

Ποσοτική μοντελοποίηση και ποιοτική βελτίωση

---

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response Surface Methodology, RSM) αναπτύχθηκε για πρώτη φορά από τον Box και τους συνεργάτες του στη δεκαετία του '50. Ο όρος αυτός προήλθε από τη γραφική προοπτική που δημιουργήθηκε μετά την καταλληλότητα του μαθηματικού μοντέλου, και η χρήση του έχει υιοθετηθεί ευρέως σε κείμενα σχετικά με

τη χημειομετρία. Η απόκριση RSM αποτελείται από μια ομάδα μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών που βασίζονται στην προσαρμογή εμπειρικών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται σε σχέση με τον πειραματικό σχεδιασμό. Γραμμικές ή τετραγωνικές πολυωνμικές συναρτήσεις χρησιμοποιούνται για να περιγράψουν το μελετώμενο σύστημα, και κατά συνέπεια, να διερευνήσουν τις πειραματικές συνθήκες μέχρι τη βελτιστοποίηση του (Ganorkar & Shirkhedkar, 2017), (Sarabia et al., 2020).

Τα κυριότερα στάδια στην εφαρμογή της RSM ως τεχνική βελτιστοποίησης είναι τα ακόλουθα (Bezerra et al., 2008):

(1) η επιλογή ανεξάρτητων μεταβλητών που επιδρούν σημαντικά στο υπό μελέτη σύστημα μέσω διερευνητικών πειραματικών σχεδιασμών και η οριοθέτηση της πειραματικής περιοχής, σύμφωνα με τον στόχο της μελέτης και την εμπειρία του ερευνητή

(2) η επιλογή του μοντέλου του πειραματικού σχεδιασμού και η διεξαγωγή των πειραμάτων σύμφωνα με την επιλεγμένη πειραματική μήτρα

(3) η μαθηματική - στατιστική επεξεργασία των ληφθέντων πειραματικών δεδομένων μέσω της εφαρμογής μιας πολυωνμικής συνάρτησης

(4) η αξιολόγηση της προσαρμογής του μοντέλου

(5) η ανάγκη για επαλήθευση και η δυνατότητα μετατόπισης προς τη κατεύθυνση της βέλτιστης περιοχής και

(6) η λήψη των βέλτιστων τιμών για κάθε μελετώμενη μεταβλητή.

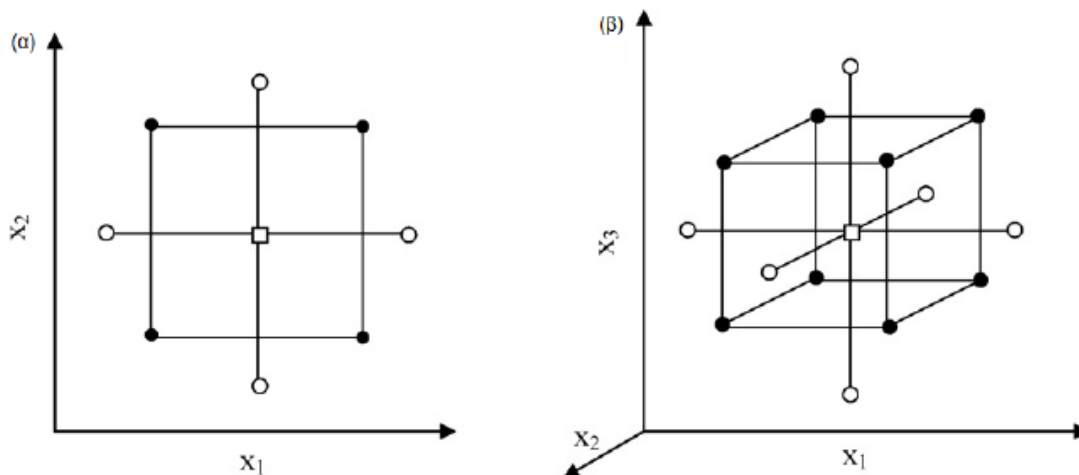
Η απόκριση του υπό μελέτη συστήματος επηρεάζεται από πολλές μεταβλητές και είναι πρακτικά αδύνατο να εντοπιστούν και να ελεγχθούν οι μικρές συνεισφορές από τη κάθε μία μεταβλητή. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η επιλογή των μεταβλητών που προκαλούν σοβαρές επιπτώσεις στην απόκριση του συστήματος. Πραγματοποιούνται διερευνητικοί σχεδιασμοί (screening designs) για να προσδιοριστούν ποιες από τις διάφορες πειραματικές μεταβλητές και αλληλεπιδράσεις τους παρουσιάζουν τις πιο σημαντικές επιδράσεις. Έτσι, οι μεταβλητές με μικρή ή μηδενική επίδραση στην απόκριση αποκλείονται από τον μετέπειτα πειραματικό σχεδιασμό ενώ οι μεταβλητές με σημαντική επίδραση μελετώνται διεξοδικά. Για τον σκοπό αυτό χρησιμοποιούνται οι πλήρεις ή οι κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί δύο επιπέδων κυρίως επειδή είναι αποδοτικοί και οικονομικοί (Olivero et al., 1995). Οι μεταβλητές  $U_1, U_2, \dots, U_k$  στην εξίσωση 3.1 αποτελούν τις φυσικές μεταβλητές/ παράγοντες. Ωστόσο, εκφράζονται σε διαφορετικές μονάδες και ποικίλλουν σε διαφορετικά εύρη τιμών, και ως εκ τούτου υπάρχει ένας συντελεστής κλίμακας που εμποδίζει την

αξιολόγηση της σπουδαιότητας ενός παράγοντα στο μοντέλο. Επομένως, οι φυσικές μεταβλητές μετατρέπονται γραμμικά σε κωδικοποιημένες μεταβλητές,  $X_1, X_2, \dots, X_k$ , οι οποίες είναι αδιάστατες ποσότητες με κοινό εύρος τιμών, χωρίς οι σημαντικές μεταβλητές να επηρεάζουν την εκτίμηση των λιγότερο σημαντικών μεταβλητών. Παρ' όλα αυτά, ένας πειραματικός σχεδιασμός μπορεί να είναι ο βέλτιστος στις κωδικοποιημένες μεταβλητές αλλά όχι στις φυσικές μεταβλητές.

$$X_j = U_j - U_j^0 / \Delta U_j \quad (3.1)$$

όπου  $U_j^0 = [\max(U_j) + \min(U_j)]/2$  είναι η πραγματική τιμή στο κεντρικό σημείο και  $\Delta U_j = [\max(U_j) - \min(U_j)]/2$  είναι η απόσταση μεταξύ της πραγματικής τιμής στο κεντρικό σημείο και της πραγματικής τιμής στο μέγιστο ή ελάχιστο επίπεδο μίας παραμέτρου. Με αυτόν τον μετασχηματισμό, το  $X_j$  κυμαίνεται από  $-1$  έως  $1$  (Sarabia et al., 2020).

Η επιλογή του κατάλληλου πειραματικού σχεδιασμού αποτελεί το πιο κρίσιμο στάδιο στην εφαρμογή της οποιαδήποτε μεθοδολογίας καθώς επηρεάζει την ανάπτυξη της επιφάνειας απόκρισης και την ακρίβεια στην πρόβλεψη. Μερικά παραδείγματα πειραματικών σχεδιασμών είναι: ο πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός (FD), ο κλασματικός παραγοντικός σχεδιασμός (FFD), ο σχεδιασμός Taguchi, ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) και ο Box-Behnken σχεδιασμός (BBD). Στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εφαρμόστηκε ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός και η μεθοδολογία της επιφάνειας απόκρισης. Ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (CCD) αποτελεί τη πιο κοινή προσέγγιση της μεθοδολογίας RSM ως προς τη βελτιστοποίηση του μοντέλου. Η προσέγγιση CCD είναι μια πλήρη παραγοντική ή κλασματική παραγοντική σχεδίαση δύο επιπέδων που περιέχει ένα κεντρικό σημείο ενισχυμένο με μια ομάδα ακτινωτών σημείων (star) ή αξονικών σημείων (axial) που απέχουν απόσταση  $\alpha$  από το κέντρο όπως φαίνεται στο σχήμα 3.3. Αυτά τα σημεία καθιστούν δυνατή την εκτίμηση της καμπυλότητας στο μοντέλο. Η μέθοδος CCD είναι κατάλληλη για διαδοχική σχεδίαση πειραμάτων όπου μέσω διερευνητικής σχεδίασης, στα πειράματα με πολλούς παράγοντες μπορούν να επιλεγούν οι πιο σημαντικοί παράγοντες (Mäkelä, 2017).



**Σχήμα 3.3:** Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός για τη βελτιστοποίηση (α) δύο παραγόντων ( $\alpha=1,41$ ) και (β) τριών παραγόντων ( $\alpha=1,68$ ). Όπου, (•) τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού (points of factorial design), (ο) τα αξονικά σημεία (axial points) και (□) το κεντρικό σημείο (central point) (Bezerra et al.,2008).

Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός πλήρη κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού είναι τα εξής (Bezerra et al., 2008):

- Ο απαιτούμενος αριθμός πειραμάτων δίνεται από τη σχέση  $N = 2^k + 2k + C_p$ , όπου  $k$  είναι ο αριθμός των μελετώμενων παραγόντων και ( $C_p$ ) ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου.
- Οι τιμές του  $\alpha$  εξαρτώνται από τον αριθμό των μεταβλητών και μπορούν να υπολογιστούν από τη σχέση:  $\alpha = [2^k]^{1/4}$ . Οι τιμές που παίρνει το  $\alpha$  είναι: 1,41, 1,68 και 2,00 για δύο, τρεις και τέσσερις μελετώμενες μεταβλητές αντίστοιχα.
- Όλοι οι παράγοντες μελετιούνται σε πέντε επίπεδα ( $-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$ ).

Ο πίνακας 3.4 παρουσιάζει τις κωδικοποιημένες τιμές ενός σχεδιασμού για α) δύο παραμέτρους και β) για τρεις παραμέτρους.

**Πίνακας 3.4:** Κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός α) δύο παραμέτρους και β) τριών παραμέτρων με κωδικοποιημένες τιμές (Bezerra et al., 2008).

Α) Δύο Παραμέτρων			Β) Τριών Παραμέτρων			
	X1	X2		X1	X2	X3
Παραγοντικός	-1	-1	Παραγοντικός	-1	-1	-1
Σχεδιασμός	1	-1	Σχεδιασμός	+1	-1	-1
	-1	1		-1	+1	-1
	1	1		+1	+1	-1
Αξονικά	-α	0		-1	-1	+1
σημεία	α	0		+1	-1	+1
	0	-α		-1	+1	+1
	0	α		+1	+1	+1
Κεντρικό	0	0	Αξονικά	-α	0	0
σημείο			σημεία			
				+α	0	0
				0	-α	0
				0	+α	0
				0	0	-α
				0	0	+α
			Κεντρικό	0	0	0
			σημείο			

Το απλούστερο μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη μεθοδολογία RSM για να περιγράψει τη συσχέτιση των παραμέτρων με την απόκριση στηρίζεται στην ακόλουθη εξίσωση 3.2 πρώτου βαθμού (Bezerra et al., 2008):

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i \chi_i + \varepsilon \quad (3.2)$$

όπου k είναι ο αριθμός των μεταβλητών,  $\beta_0$  είναι μία σταθερά, ο όρος  $\beta_i$  αντιπροσωπεύει τους συντελεστές των παραμέτρων της εξίσωσης, ο όρος  $\chi_i$  αντιπροσωπεύει τις μεταβλητές και  $\varepsilon$  είναι το σφάλμα των πειραμάτων. Στην περίπτωση που απαιτείται η διερεύνηση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μεταβλητών και εκτίμηση της καμπυλότητας, η παραπάνω εξίσωση παίρνει την ακόλουθη πλέον μορφή (εξίσωση 3.3) (Bezerra et al., 2008):

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i \chi_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \varepsilon \quad (3.3)$$

όπου  $\beta_{ij}$  οι συντελεστές των αλληλεπιδράσεων των μεταβλητών. Παράλληλα για να καθοριστεί ένα κρίσιμο σημείο (μέγιστο, ελάχιστο, ή σαγματικό), είναι απαραίτητο η πολυωνυμική συνάρτηση να περιέχει τετραγωνικούς όρους σύμφωνα με την εξίσωση 3.4 που παρουσιάζεται παρακάτω (Bezerra et al., 2008):

$$Y = \beta_0 \sum_{i=1}^k \beta_i \chi_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} \chi_i \chi_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} \chi_i^2 + \varepsilon \quad (3.4)$$

Η εκτίμηση της ορθότητας του μοντέλου επιτυγχάνεται με την εφαρμογή της Ανάλυσης Διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Για την εκτίμηση του μοντέλου χρησιμοποιούνται ο συντελεστής συσχέτισης ( $R^2$ ), ο διορθωμένος συντελεστής συσχέτισης ( $R_{adj}^2$ ), η έλλειψη της προσαρμογής (Lack of fit), η δοκιμή F και η δοκιμή t. Τέλος, η επεξεργασία των γραφικών παραστάσεων των υπολειμμάτων παρέχει πολύτιμες πληροφορίες για την καταλληλότητα του μοντέλου. Έτσι, όταν το μαθηματικό μοντέλο είναι καλά προσαρμοσμένο τότε η γραφική παράσταση των υπολειμμάτων παρουσιάζει συμπεριφορά κανονικής κατανομής. Όταν το μοντέλο παρουσιάζει μεγάλα υπολείμματα, τότε προκύπτουν προβλήματα στην εξαγωγή συμπερασμάτων για τα δεδομένα της πειραματικής περιοχής (Bezerra et al., 2008).

Τέλος, η συνάρτηση Derringer ή επιθυμητή συνάρτηση (Desirability function) είναι η σημαντικότερη και πλέον χρησιμοποιούμενη μεθοδολογία στη βελτιστοποίηση των αναλυτικών διαδικασιών. Αυτή η μεθοδολογία βασίζεται αρχικά στην κατασκευή μιας επιθυμητής συνάρτησης για κάθε μεμονωμένη απόκριση. Συνεπώς, οι μετρούμενες ιδιότητες που σχετίζονται σε κάθε απόκριση μετατρέπονται σε μία μεμονωμένη αδιάστατη επιθυμητή ( $d_i$ ) κλίμακα. Η κλίμακα της επιθυμητής συνάρτησης κυμαίνεται μεταξύ  $d=0$ , για μια εντελώς ανεπιθύμητη απόκριση και  $d=1$ , για μια πλήρως επιθυμητή απόκριση, πάνω από την οποία περαιτέρω βελτιώσεις δεν θα είχαν καμία σημασία. Αυτός ο μετασχηματισμός καθιστά δυνατό τον συνδυασμό των αποτελεσμάτων που λαμβάνονται για ιδιότητες μετρούμενες σε διαφορετικές τάξεις μεγέθους. Εκτός από τις μεμονωμένες τιμές  $d_i$ , είναι δυνατό να προσδιοριστεί και η συνολική επιθυμητή συνάρτηση (D), η οποία ορίζεται ως ο σταθμισμένος γεωμετρικός μέσος όρος της μεμονωμένης επιθυμητής τιμής ( $d_i$ ) σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση 3.5 (Bezerra et al., 2008):

$$D = m \sqrt{d_1 x d_2 x \dots dm} \quad (3.5)$$

όπου  $m$  είναι ο αριθμός των αποκρίσεων που μελετήθηκαν στη διαδικασία βελτιστοποίησης. Έτσι, η διαδικασία ταυτόχρονης βελτιστοποίησης στοχεύει στην εύρεση των επιπέδων των παραγόντων που επιδεικνύουν την ολική μέγιστη επιθυμία.

## **Κεφάλαιο 4**

### **Τεχνικές εκχύλισης και ανάλυσης ρύπων από περιβαλλοντικά υποστρώματα**

#### **4.1 Εισαγωγή**

Όλα τα στάδια μιας αναλυτικής διαδικασίας είναι κρίσιμα και απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για τη λήψη ακριβών και επαναλήψιμων αποτελεσμάτων. Η ανίχνευση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των φαρμακευτικών ενώσεων στη λυματολάσπη αποτελεί δύσκολο έργο. Η λάσπη είναι μια σύνθετη μήτρα στην οποία οι συγκεντρώσεις των προσδιοριζόμενων ουσιών βρίσκονται συχνά σε χαμηλά επίπεδα της τάξεως  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  έως  $\text{ng}/\text{Kg}$  ή  $\text{ng}/\text{L}$  έως  $\mu\text{g}/\text{L}$  (Li et al., 2016). Επομένως η ένταση του σήματος του αναλυτικού οργάνου μπορεί να καταστέλλεται στη διεπαφή του συστήματος όταν πολλαπλά συστατικά της μήτρας συν-εκκλύονται, πράγμα που έχει ως αποτέλεσμα την υποτίμηση των πραγματικών συγκεντρώσεων. Επιπλέον, οι χαμηλές συγκεντρώσεις στις οποίες βρίσκονται οι ενώσεις στη λάσπη καθιστούν την ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής μεθόδου προκατεργασίας για την εξαγωγή αυτών των ρύπων-στόχων εξαιρετικά δύσκολη. Συνεπώς από τα πιο πολύπλοκα και χρονοβόρα στάδια είναι αυτό της προκατεργασίας του δείγματος, το οποίο είναι απαραίτητο για την απομόνωση και παραλαβή ή για τον καθαρισμό και την προσυγκέντρωση των συστατικών (Scheurer et al., 2010). Τα βασικά χαρακτηριστικά που διέπουν μια τεχνική προκατεργασίας είναι η απλότητα, η ταχύτητα, το χαμηλό κόστος, η εκλεκτικότητα, η αποδοτικότητα και η αυτοματοποίηση. Για να καταστεί μια τεχνική προκατεργασίας κατάλληλη πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και ορισμένες παράμετροι, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες της ένωσης, η χημική σύνθεση του δείγματος, διάφορες παρεμποδίσεις που τυχόν υπάρχουν στο δείγμα, η σταθερότητα της προσδιοριζόμενης ένωσης κατά τη διάρκεια της προκατεργασίας, οι προσμίξεις στα δοχεία κατά την αποθήκευση ή την προκατεργασία, η ανάκτηση, η οποία πρέπει να είναι ποσοτική, η καταλληλότητα του διαλύτη ως προς το χρωματογραφικό σύστημα, και χαρακτηριστικά, όπως η απλότητα της διαδικασίας, η επαναληψιμότητα, η ακρίβεια και η προσυγκέντρωση του δείγματος στο τελευταίο στάδιο (Παπαδογιάννη, 2004).

Οι κύριοι στόχοι της κατεργασίας του δείγματος είναι (Chirila et al., 2006):

- Η τροποποίηση του υποστρώματος του δείγματος για την προετοιμασία του δείγματος πριν την εισαγωγή του στη στήλη, ώστε να καταστήσει το διαλύτη κατάλληλο για χρήση και να παρατείνει τη διάρκεια ζωής του οργάνου.



- Ο καθαρισμός του δείγματος για την απομάκρυνση των παρεμποδίσεων για καλύτερη απόδοση και εκλεκτικότητα, για τη μείωση της επίδρασης του υποστρώματος και για προστασία του οργάνου, έτσι ώστε να ελαττωθεί το κόστος ανάλυσης.
- Η προσυγκέντρωση του δείγματος για τη βελτίωση της ευαισθησίας της μεθόδου με μείωση των ορίων ανίχνευσης και του ποσοτικού προσδιορισμού.
- Η απομόνωση και εκλεκτική παραλαβή των συστατικών που μας ενδιαφέρουν.

Η εκχύλιση στερεάς φάσης (SPE), η μικροεκχύλιση στερεάς φάσης (SPME) και η μικροεκχύλιση υγρής φάσης (LPME) είναι από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές εκχύλισης μικρορύπων από δείγματα νερού και υγρών αποβλήτων. Για την εκχύλιση στερεών δειγμάτων, η εκχύλιση με υπερήχους (UAE), η εκχύλιση με μικροκύματα (MAE), η εκχύλιση υγρών υπό πίεση (PLE) η εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης (MSPD) και η γρήγορη, εύκολη, φθηνή, αποτελεσματική, ανθεκτική και ασφαλής μέθοδος (QuEChERS) εφαρμόζονται ταυτόχρονα στην εκχύλιση ρύπων από δείγματα λάσπης και εδάφους (Meng et al., 2021). Παρακάτω αναλύονται ενδεικτικά κάποιες τεχνικές εκχύλισης που εφαρμόζονται σε στερεά υποστρώματα. Στην παρούσα διατριβή, χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος QuEChERS για την εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων από στερεό υπόστρωμα λυματολάσπης.

## **4.2 Τεχνικές εκχύλισης ρύπων από στερεά υποστρώματα**

### **4.2.1 Εκχύλιση με υπερήχους (UAE)**

Η εκχύλιση με υπερήχους (UAE) αποτελεί μια εναλλακτική μέθοδο στην εκχύλιση Soxhlet για στερεά υποστρώματα και έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στις διαδικασίες ανίχνευσης και προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών (Luque-Muñoz et al., 2017), (Pérez-Lemus et al., 2020). Η μέθοδος αυτή μειώνει τον χρόνο εκχύλισης σε σύγκριση με την Soxhlet, αλλά είναι λιγότερο αναπαραγωγίμη μέθοδος. Η βασική αρχή της τεχνικής UAE στηρίζεται στον σχηματισμό και στην ανάπτυξη φυσαλίδων (φαινόμενο σπηλαίωσης) που συμβαίνουν κατά τη διάδοση ενός κύματος υπερήχων σε ένα υγρό μέσο Εικόνα 4.1. Ο διαλύτης επιλέγεται με βάση τις φυσικές του ιδιότητες όπως το ιξώδες, την επιφανειακή τάση και την πίεση ατμών. Όλες αυτές οι παράμετροι επηρεάζουν το φαινόμενο της. Η εκχύλιση UAE είναι ταχύτερη από την εκχύλιση Soxhlet (30-60 λεπτά ανά δείγμα) αλλά απαιτείται διήθηση του δείγματος μετά το τέλος της εκχύλισης. Είναι μία τεχνική φιλική προς το περιβάλλον δεδομένου ότι εξοικονομεί ενέργεια και χρόνο, απαιτείται λιγότερη ποσότητα διαλύτη (100 mL στη Soxhlet και 10 mL στη UAE) και ο χρόνος εκχύλισης είναι μικρότερος

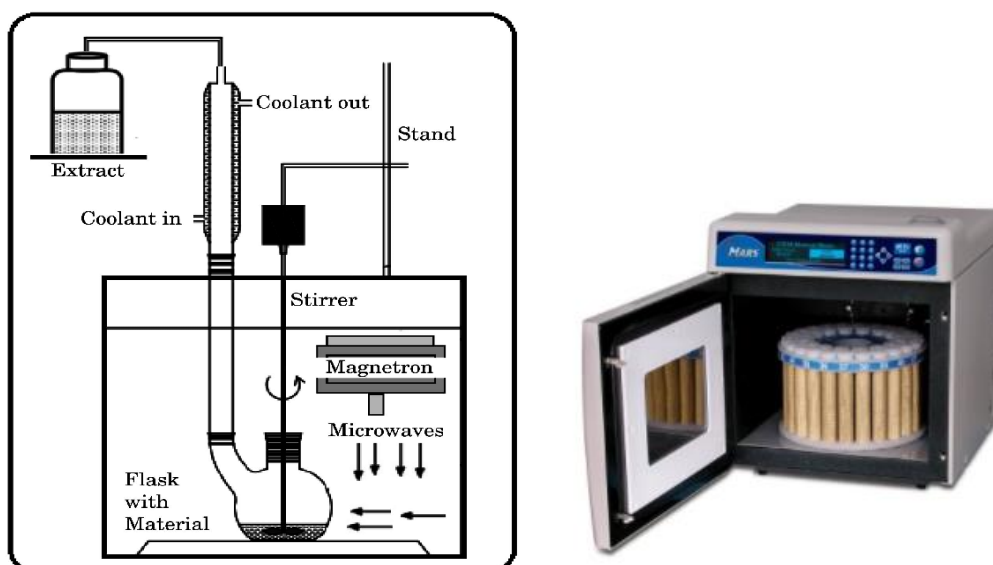
σε σύγκριση πάντα με την Soxhlet. Ως εκ τούτου, με τη χρήση υπερήχων, οι εκχυλίσεις μπορούν να ολοκληρωθούν μέσα σε λίγα λεπτά, να απλοποιηθεί η χρήση και επεξεργασία τους και να χρησιμοποιούν μόνο ένα κλάσμα της ενέργειας που συνήθως απαιτείται για μια παραδοσιακή εκχύλιση με τη μέθοδο Soxhlet (Chemat et al., 2017).



**Εικόνα 4.1:** Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης υπερήχων UAE (Chemat et al., 2017).

#### **4.2.2 Εκχύλιση με μικροκύματα (MAE)**

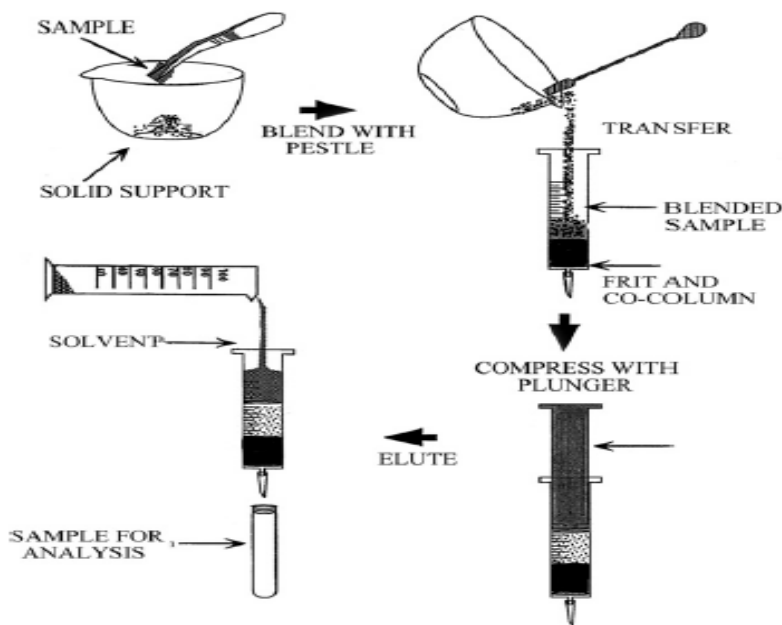
Μια πιο σύγχρονη τεχνική που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων στη λυματολόαση η εκχύλιση με μικροκύματα (MAE). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιεί μη ιονίζουσα ηλεκτρομαγνητική ενέργεια που μεταδίδεται ως κύματα (μικροκύματα) για την άμεση θέρμανση του διαλύτη για την εκχύλιση των ενώσεων, επιταχύνοντας έτσι περισσότερο την ταχύτητα εκχύλισης. Καλύπτει ένα ευρύ φάσμα ενεργειακής ισχύος από 200W έως 1200 W. Το όφελος αυτής της τεχνικής είναι η χρήση μικρών ποσοτήτων διαλυτών σε σύγκριση με τη Soxhlet και την εκχύλιση υπερήχων (30 mL σε MAE έναντι 300-500mL για τη Soxhlet) που επιτρέπει τον έλεγχο των παραμέτρων εκχύλισης όπως ο χρόνος, η ισχύς και η θερμοκρασία (Llompart et al., 2019). Ωστόσο, οι διαλύτες εκχύλισης που απαιτούνται για την εκχύλιση πρέπει να απορροφούν τα μικροκύματα (διαλύτες με μόνιμο δίπολο), τα οποία μπορεί να διεισδύσουν σε ορισμένα υλικά και να αλληλεπιδράσουν με πολικά συστατικά όπως το νερό. Μετά την εκχύλιση απαιτείται φιλτράρισμα του δείγματος και ένα επιπλέον βήμα καθαρισμού του υποστρώματος. Υπάρχει μόνο ένας μικρός αριθμός δημοσιεύσεων πάνω σε αυτή τη μέθοδο καθώς ο εξοπλισμός της είναι αρκετά ακριβός (Εικόνα 4.2) (Zuloaga et al., 2012).



**Εικόνα 4.2:** Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης με μικροκύματα MAE (Shahid & Yusuf, 2015).

#### **4.2.3 Εκχύλιση διασποράς στερεάς φάσης υποστρώματος (MSPD)**

Αν και δεν είναι μια συχνά χρησιμοποιούμενη τεχνική εκχύλισης, η MSPD αποτελεί κατάλληλη μέθοδο για την επεξεργασία πολύπλοκων υποστρωμάτων. Η εφαρμογή της σε πολύπλοκες μήτρες, όπως είναι η λυματολάσπη, διασφαλίζει όχι μόνο την αποτελεσματική εκχύλιση των αναλυτών αλλά επίσης αποτρέπει την αύξηση των πιθανών παρεμβολών. Πρωτοεμφανίστηκε το 1989 και εφαρμόστηκε στην εκχύλιση στερεών, ημιστερεών ή δειγμάτων με υψηλό ιξώδες. Το δείγμα ομογενοποιείται με ένα προσροφητικό μέσο, επιτρέποντας την διασπορά του δείγματος σε αυτό και την εκχύλιση των αναλυτών στόχων με τον κατάλληλο διαλύτη έκλουσης (Εικόνα 4.3) (Barker, 2007). Επιτρέπει την ταυτόχρονη εκχύλιση και καθαρισμό των ενώσεων με αξιοσημείωτη μείωση στην κατανάλωση διαλυτών, δεν απαιτεί ακριβή οργανολογία, είναι φιλική προς το περιβάλλον και απλή στη χρήση της. Μεταξύ των σημαντικότερων μεταβλητών κατά τη διαδικασία εκχύλισης MSPD είναι ο διαλυτής εκχύλισης (που χρησιμοποιείται ως μέσο διασποράς) και ο διαλύτης έκλουσης. Λιπόφιλα προσροφητικά υλικά, όπως πυριτία με C18 ή πυριτία με C8, και μίγματα οργανικών διαλυτών, χρησιμοποιούνται σε πολλές εφαρμογές (Capriotti et al., 2010).



**Εικόνα 4.3:** Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης υποστρώματος (Barker, 2007).

#### 4.2.4 Εκχύλιση *QuEChERS* (*Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe*)

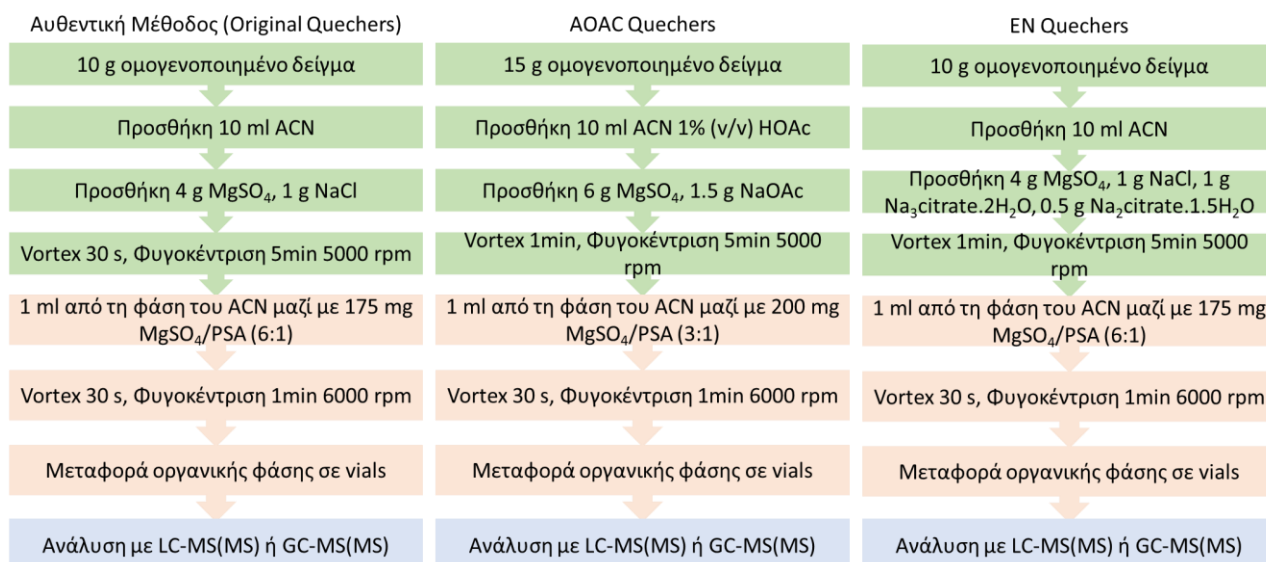
Η εκχύλιση *QuEChERS* αποτελεί μια παραλλαγή στην παραδοσιακή υγρή εκχύλιση και στην εκχύλιση στερεάς φάσης. Η μέθοδος παρουσιάστηκε για πρώτη φορά στο European Pesticide Residue Workshop (EPRW) το 2002 στη Ρώμη, δημοσιεύθηκε το 2003 από τους (Anastassiades et al., 2003) και επικυρώθηκε στη συνέχεια από τον (Lehotay et al., 2005). Εφαρμόστηκε αρχικά για τον προσδιορισμό υπολειμμάτων φυτοφαρμάκων σε διάφορα αγροτικά προϊόντα με υψηλή περιεκτικότητα σε νερό. Η *QuEChERS* είναι μια αποτελεσματική προσέγγιση προετοιμασίας του δείγματος που απομονώνει ένα ευρύ φάσμα αναλυτών από περίπλοκες μήτρες εκτός από τον καθαρισμό του εκχυλίσματος. Η μέθοδος περιλαμβάνει δύο στάδια (Εικόνα 4.4): i) ένα βήμα εκχύλισης που στηρίζεται στην ομογενοποίηση του δείγματος με κάποιον οργανικό διαλύτη και στην κατανομή του παρουσία μεγάλων ποσοτήτων αλάτων όπου προάγεται μια ισορροπία μεταξύ μιας υδατικής και μιας οργανικής στιβάδας (ακετονιτρίλιο-ACN), ακολουθούμενο από ii) ένα βήμα εκχύλισης διασποράς στερεάς φάσης (d-SPE) που περιλαμβάνει τον περαιτέρω καθαρισμό με τη χρήση αρκετών συνδυασμών προσροφητικών και αλάτων για την απομάκρυνση ουσιών που παρεμβαίνουν στη μήτρα (Rahman et al., 2017), (Islas et al., 2017). Το τελευταίο βήμα απαιτεί μικρότερη ποσότητα εκχυλίσματος και προσροφητικού και επιτρέπει τη μείωση ή την

εξάλειψη των πρόσθετων σταδίων φυγοκέντρωσης ή διήθησης. Η φύση του διαλύτη εκχύλισης μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με τις προσδιοριζόμενες ενώσεις.

Στην πρωταρχική μέθοδο (original Quechers) το ακετονιτρίλιο (ACN) είναι ο επιλεγμένος οργανικός διαλύτης εκτός από την ακετόνη και τον οξικό αιθυλεστέρα αφού απομονώνει αποτελεσματικά ένα ευρύ φάσμα φαρμακευτικών ουσιών (μη πολικών και σχετικά πολικών αναλυτών) ενώ ελαχιστοποιεί την ποσότητα του λιπόφιλου υλικού. Επιπλέον, δεδομένου ότι είναι υδατοδιαλυτό, διεισδύει καλύτερα στην υδατική φάση των δειγμάτων. Το βήμα περιλαμβάνει τη χρήση 4 g άνυδρου  $MgSO_4$  για το διαχωρισμό φάσεων (μεταξύ υδατικής και οργανικής φάσης) και παραγωγή θερμότητας γύρω στους 40 °C (ως αποτέλεσμα της εξώθερμης αντίδρασης ενυδάτωσης) που βοηθά στην εκχύλιση μη πολικών φαρμάκων (αποφεύγοντας τη χρήση μη πολικών διαλυτών) και 1 g NaCl για να μειωθεί η ποσότητα των πολικών παρεμβολών που συνεκλούνται και να αυξήσει την εκλεκτικότητα της εκχύλισης. Η συνδυασμένη χρήση αυτών των αλάτων έδειξε καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά την ανάκτηση, τον διαχωρισμό των φάσεων, την ποσότητα από τη συνεκλούμενη μήτρα και τη μορφή της κορυφής σε σύγκριση με τη χρήση άλλων αλάτων όπως  $LiCl$ ,  $MgCl_2$ ,  $NaNO_3$  και  $Na_2SO_4$ . Το δείγμα αναδεύεται, φυγοκεντρείται και ένα κλάσμα του οργανικού εκχυλίσματος υποβάλλεται στη διαδικασία d-SPE (Varela-marti & Gonza, 2020). Η πρώτη και πιο σημαντική τροποποίηση μέχρι σήμερα ήταν η εισαγωγή ρυθμιστικών αλάτων στο αρχικό βήμα εκχύλισης ώστε να αποφευχθεί η απώλεια ορισμένων ενώσεων ευαίσθητων στο pH. Για την επίλυση του προβλήματος της αποδόμησης των ενώσεων που εξαρτώνται από το pH, ενσωματώθηκαν στο γενικό πρωτόκολλο ένα ισχυρό οξικό ρυθμιστικό (pH= 4,8) και ένα ασθενέστερο κιτρικό ρυθμιστικό (pH= 5–5,5), την AOAC Official 2007.1 Μέθοδο (AOAC, 2007) και την Ευρωπαϊκή Τυποποιημένη Μέθοδο EN 15662 (British Standard, 2008), αντίστοιχα. Η Εικόνα 4.5 απεικονίζει τα κύρια βήματα εκχύλισης των τριών βασικών μεθόδων QuEChERS.



**Εικόνα 4.4:** Σχηματική απεικόνιση της εκχύλισης QuEChERS (Varela-marti et al., 2019).



**Εικόνα 4.5:** Σχηματική απεικόνιση των κύριων σταδίων εκχύλισης των τριών βασικών μεθόδων QuEChERS (Varela-marti & Gonza, 2020).

Η τεχνική της d-SPE εκχύλισης προτιμάται σε αντίθεση με την παραδοσιακή SPE, καθώς η εκχύλιση των αναλυτών ή των συστατικών της μήτρας (εξαρτάται από τη χρήση της) πραγματοποιείται σε όλη τη μάζα του διαλύματος. Επομένως, απαιτείται η χρήση κενού, στηλών και προπαρασκευαστικών σταδίων, καθώς η συλλογή κλασμάτων διαλυτών, εξάτμιση των διαλυτών κ.λπ. Συνοπτικά, δεν απαιτεί μια κουραστική και μακρά διαδικασία και η εξαντλητική προσοχή του αναλυτή (Varela-marti & Gonza, 2020). Τα πιο διαδεδομένα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται στη είναι η πρωτοταγής-δευτεροταγής αμίνη

(PSA), το MgSO<sub>4</sub> και η οκταδέκυλη πυριτία με C<sub>18</sub>. Η PSA είναι ένας ασθενής ιονταλλάκτης που μπορεί να αφαιρέσει λιπαρά οξέα, σάκχαρα, οργανικά οξέα, λιπίδια και μερικές χρωστικές ουσίες ενώ το MgSO<sub>4</sub> χρησιμοποιείται για να απομακρύνει την επιπλέον υγρασία στο δείγμα. Η C<sub>18</sub> χρησιμοποιείται για να αφαιρέσει συστατικά του δείγματος με υψηλή λιπαρή περιεκτικότητα (Varela-marti et al., 2019). Εκτός από τα συνηθισμένα προσροφητικά σε πιο πρόσφατες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν νέα υλικά όπως το προσροφητικό υλικό Z<sup>+</sup>-sep και ο γραφίτικός ενεργός άνθρακας. Το προσροφητικό το Z<sup>+</sup>-Sep βασίζεται σε οξείδιο του ζirkονίου και αποτελείται από ένα οξείδιο ζirkονίου και πυριτία C<sub>18</sub> και προτείνεται για δείγματα που περιέχουν περισσότερο από 15% λιπαρές ουσίες (Rajski et al., 2013, Herrero et al., 2014). Ο γραφίτικός ενεργός άνθρακας (GCB) πρέπει να χρησιμοποιείται με ιδιαίτερη προσοχή γιατί ναι μεν είναι σε θέση να απομακρύνει αποτελεσματικά χρωστικές ουσίες που υπάρχουν στο δείγμα (π.χ. καροτενοειδή και χλωροφύλλη), αλλά μπορεί να δεσμεύσει ισχυρά επίπεδες ενώσεις, προκαλώντας χαμηλά ποσοστά ανάκτησης (Hennion laboratoire, 2000). Η μέθοδος QuEChERS συχνά περιλαμβάνεται ως μέρος των διαδικασιών της «πράσινης αναλυτικής χημείας» και γίνονται προσπάθειες προς τον αυτοματισμό της μεθόδου παρέχοντας έναν νέο ορίζοντα στη μέθοδο. Παρακάτω στον πίνακα 4.1 παρουσιάζεται μία συνοπτική βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη μέθοδο για την ανίχνευση φαρμακευτικών ουσιών σε υπόστρωμα λυματολάσπης.

**Πίνακας 4.1:** Βιβλιογραφική ανασκόπηση της μεθόδου QuEChERS.

<b>Αριθμός ενώσεων</b>	<b>Εκχύλιση</b>	<b>Καθαρισμός</b>	<b>Ανάλυση</b>	<b>Βιβλιογραφία</b>
136	Quechers	d-SPE	LC-MS(TOF)	(Peysson & Vulliet, 2013)
27	Quechers	d-SPE	UPLC-MS/MS	(Cerqueira et al., 2014)
12	Quechers	d-SPE	LC-MS	(Cerqueira et al., 2014)
11	Quechers	d-SPE	UPLC-MS/MS	(Santos et al., 2016)
13	Quechers	d-SPE	HPLC-MS/MS	(Benedetti et al., 2020)
19	Quechers	d-SPE	LC-MS(QqQ)	(Malvar et al., 2020)
17	Quechers	d-SPE	LC-MS(QqQ)	(Ajibola et al., 2020)

### **4.3 Τεχνικές ανάλυσης ρύπων από στερεά υποστρώματα**

Η οργανολογία για την ανάλυση, την ταυτοποίηση και τον προσδιορισμό των φαρμακευτικών ενώσεων στην ιλύ λυμάτων βασίζεται στον χρωματογραφικό διαχωρισμό σε συνδυασμό με φασματομετρία μάζας. Η φασματομετρία μάζας είναι μία τεχνική όπου τα συστατικά του δείγματος μετατρέπονται σε κινούμενα ιόντα και διαχωρίζονται ανάλογα με το λόγο της μάζας προς το φορτίο τους ( $m/z$ ). Μπορεί να συνδυαστεί με την αέρια χρωματογραφία (Gas Chromatography, GC) ή την υγρή χρωματογραφία (Liquid Chromatography, LC) παρέχοντας τις τεχνικές GC-MS ή LC-MS αλλά και τις συνδυασμένες τεχνικές αυτών GC-MS/MS ή LC-MS/MS (Chevalier et al., 1966).

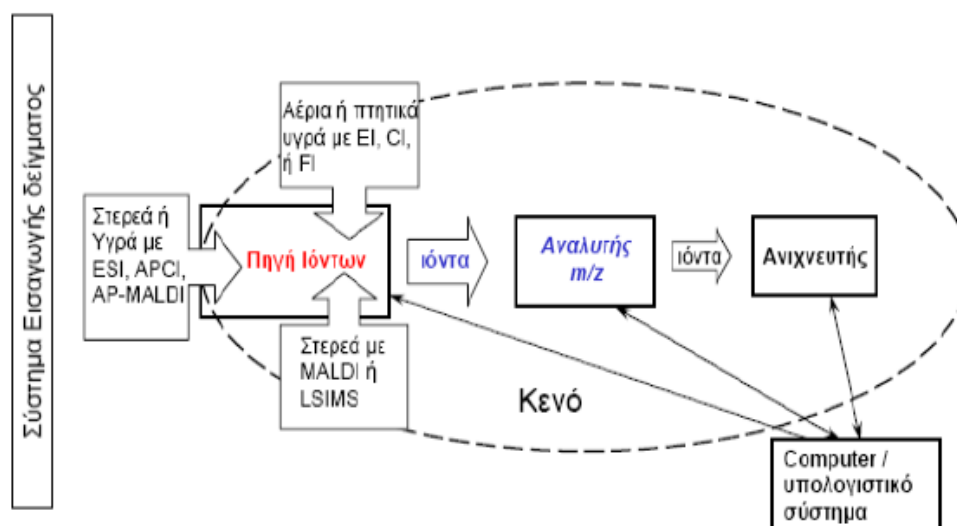
Οι φαρμακευτικές ουσίες είναι κυρίως πολικές ενώσεις με χαμηλή πτητικότητα ή/και θερμική σταθερότητα για την ανάλυσή τους με αέρια χρωματογραφία (GC) (López-Serna et al., 2018). Παρ'όλα αυτά, οι περιορισμοί αυτοί έχουν ξεπεραστεί από διαδικασίες παραγωγοποίησης όπως η ακυλίωση (ακετυλίωση), αλκυλίωση και σιλυλίωση (Bo et al., 2015). Η οργανολογία GC είναι μία σχετικά οικονομική τεχνολογία που επιτρέπει αυτό το είδος ανάλυσης και πραγματοποιείται από ένα ευρύ φάσμα εργαστηρίων ανά τον κόσμο, συμπεριλαμβανομένων και εκείνων στις αναπτυσσόμενες χώρες. Η αέρια χρωματογραφία μπορεί να συνδυαστεί είτε με απλό ανιχνευτή φασματομετρίας μάζας (MS) είτε σε διαδοχικό συνδυασμό (MS/MS) είτε με ανιχνευτή σύλληψης ηλεκτρονίων (ECD). Το τριπλό τετράπολο (QqQ) είναι ο πιο κοινός αναλυτής που χρησιμοποιείται κυρίως στην επιλεγμένη παρακολούθηση της αντίδρασης για ποσοτική ανάλυση (Barón et al., 2014). Ωστόσο, ορισμένα παραδείγματα ανάλυσης στόχων σε υψηλή ανάλυση χρησιμοποιούν τον αναλυτή μάζας χρόνου πτήσης (Q-TOF) (Schoeman et al., 2017).

Ωστόσο, παρά τα παραπάνω, η υγρή χρωματογραφία (LC) είναι πλέον η πιο δημοφιλής τεχνική στον προσδιορισμό των φαρμακευτικών ενώσεων σε περιβαλλοντικές μήτρες, συμπεριλαμβανομένης της ιλύος λυμάτων. Αυτό οφείλεται πιθανώς στην υψηλότερη ευελιξία του να περιλαμβάνει μεγαλύτερο φάσμα ενώσεων που μπορούν να αναλυθούν εύκολα χωρίς να προηγείται η παραγωγοποίηση. Στην παρούσα διατριβή εφαρμόστηκε η υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας (UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL).



Τα κύρια τμήματα ενός τυπικού συστήματος φασματομετρίας μάζας παρουσιάζονται στην εικόνα 4.6 και είναι τα εξής (Watson & Sparkman, 2008):

- ❖ Σύστημα εισαγωγής δείγματος: ένα μικρό ποσοστό του δείγματος εισάγεται σε υγρή μορφή ώστε να μετατραπεί σε ιόντα στην αέρια φάση.
- ❖ Πηγή ιόντων (ionization source): Τα εισερχόμενα μόρια μετατρέπονται σε ιόντα είτε με βομβαρδισμό με ηλεκτρόνια, ιόντα ή μόρια ή φωτόνια είτε με εφαρμογή ηλεκτρικού πεδίου ή υψηλής θερμοκρασίας. Στη συνέχεια τα ιόντα επιταχύνονται και εισέρχονται στον αναλυτή μαζών.
- ❖ Αναλυτής μάζας: Πραγματοποιείται διαχωρισμός των ιόντων ανάλογα με το λόγο  $m/z$  που φέρουν.
- ❖ Ανιχνευτής ιόντων: Συλλογή των ιόντων που διαχωρίστηκαν και μετατροπή τους σε ηλεκτρικό σήμα.
- ❖ Σύστημα κενού: Το υψηλό κενό εξασφαλίζει τη χαμηλή πίεση που είναι απαραίτητη ώστε να αποτραπεί τυχόν σύγκρουση των ιόντων με άλλα αέρια μόρια πριν φτάσουν στον ανιχνευτή.
- ❖ Επεξεργαστής σήματος και σύστημα καταγραφής και ανάγνωσης των πληροφοριών: το ηλεκτρικό σήμα μετατρέπεται σε ψηφιακό μέσω ενός μετατροπέα αναλογικού σήματος σε ψηφιακό. Τέλος, τα δεδομένα αποθηκεύονται στη μνήμη του ηλεκτρονικού υπολογιστή και μπορούν να υποβληθούν σε επεξεργασία.

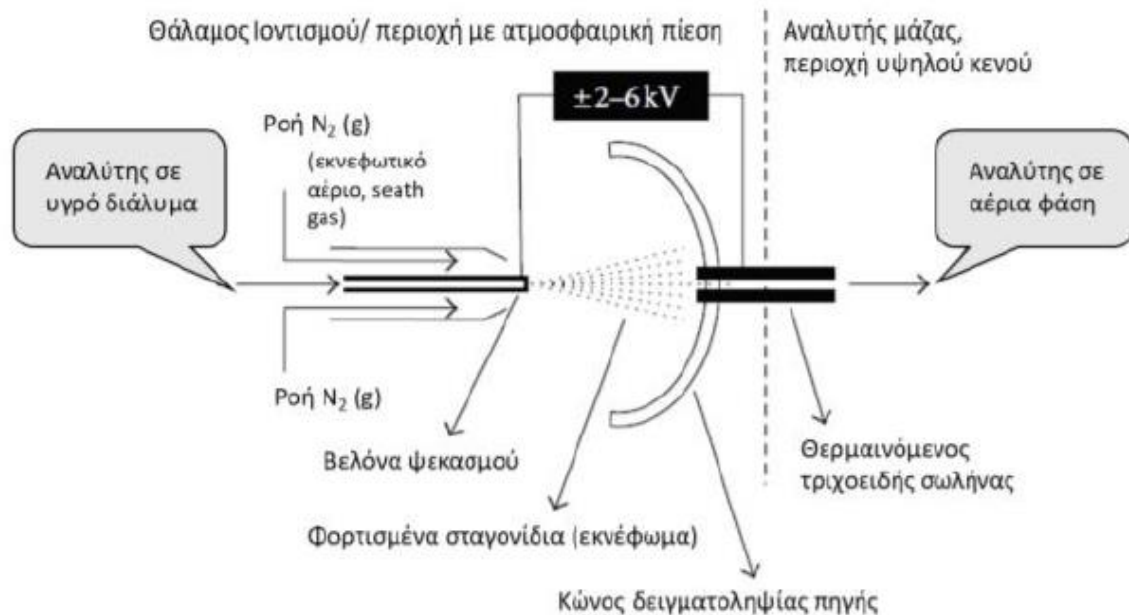


Εικόνα 4.6: Κύρια τμήματα ενός φασματογράφου μάζας (Watson & Sparkman, 2008).

#### 4.3.1 Ιοντισμός με ηλεκτροψεκασμό (*Electrospray Ionization, ESI*)

Ο ηλεκτροψεκασμός (ESI) είναι μία ήπια τεχνική ιονισμού και παρουσιάζει τα πλεονεκτήματα της υψηλής αναπαραγωγιμότητας, καλής ευαισθησίας και υψηλή ευελιξία σύζευξης σε διαφορετικούς τύπους φασματομέτρων μάζας. Με την προσθήκη πολλαπλών φορτίων στο αναλυόμενο βιομόριο, ο λόγος  $m/z$  που ανιχνεύεται στο φάσμα μάζας μειώνεται, άρα ακόμη και βιομόρια μεγάλης μάζας (π.χ. πρωτεΐνες) μπορούν να ανιχνευθούν. Η πηγή ESI μπορεί να τοποθετηθεί σε όλους τους τύπους αναλυτών μάζας όπως ένα απλό τετράπολο, παγίδα ιόντων, TOF κ.α (Chevalier et al., 1966). Η τεχνική του ψεκασμού σε ηλεκτρικό πεδίο χρησιμοποιείται ως η κυριότερη μέθοδος σύζευξης της υγρής χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών. Βασίζεται στην παρατήρηση ότι όταν ένα υγρό ψεκάζεται μέσω ενός τροχοειδούς σωλήνα μέσα σε ένα ισχυρό ηλεκτρικό πεδίο, το υγρό διασπείρεται σε ένα νέφος από πολύ μικρές φορτισμένες σταγόνες, όπως φαίνεται στην εικόνα 4.7. Για την παραγωγή του ισχυρού ηλεκτρικού πεδίου απαιτείται εφαρμογή υψηλού δυναμικού (3-6 kV), μεταξύ του μεταλλικού τριχοειδούς και ενός παρακείμενου αντιηλεκτροδίου, τα οποία βρίσκονται σε απόσταση 1-3 cm. Με τον τρόπο αυτό προκαλείται στην άκρη του τριχοειδούς ένα αερόλυμα πολλαπλά φορτισμένων σταγόνων. Οι σταγόνες αυτές, όπως διασχίζουν την πηγή ιοντισμού και οδηγούνται προς το φασματόμετρο μάζας υφίστανται αποδιαλύτωση με τη βοήθεια του υγρού αζώτου. Σταδιακά, το μέγεθος των σταγόνων ελαττώνεται και τα φορτισμένα σωματίδια αναγκάζονται να συνυπάρξουν σε όλο και μικρότερο χώρο, με αποτέλεσμα τη δημιουργία κλιμακούμενων απωστικών δυνάμεων μεταξύ τους. Οι δυνάμεις που καθορίζουν τη σταθερότητα των παραγόμενων σταγονιδίων κατά τον ηλεκτροψεκασμό είναι οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ομοίως φορτισμένων ιόντων που τείνουν να «σπάσουν» τη σταγόνα και η επιφανειακή τάση της σταγόνας που τείνει να την κρατήσει σταθερή. Με τη μείωση της διαμέτρου της σταγόνας, η επιφανειακή της τάση δεν αλλάζει δραματικά, όμως οι απωστικές δυνάμεις αυξάνονται μέχρι να φτάσουν την επιφανειακή τάση. Το σημείο αυτό ονομάζεται όριο Rayleigh, και τη στιγμή που ξεπεραστεί αυτό το όριο, δηλαδή όταν οι απωστικές δυνάμεις μεταξύ των φορτίων στην επιφάνεια κάθε σταγόνας υπερσχύουν των συνεκτικών δυνάμεων της επιφανειακής τάσης, λαμβάνει χώρα η έκρηξη Coulomb με αποτέλεσμα το σχηματισμό πολλών μικρότερων σταγονιδίων. Ακολουθεί αλληλουχία παρόμοιων εκρήξεων που τελικά οδηγούν στην παραγωγή αέριων ιόντων των ενώσεων που προσδιορίζονται. Όπως κατευθύνονται προς το φασματόμετρο μάζας, τα φορτισμένα σταγονίδια, περνούν μέσα από έναν κώνο δειγματοληψίας και απομακρύνονται και τα τελευταία μόρια διαλύτη, είτε μέσω

θερμαινόμενου τριχοειδούς, είτε μέσω ενός αδρανούς αερίου ξήρανσης, το οποίο είναι συνήθως  $N_2$  (Banerjee & Mazumdar, 2012, Watson & Sparkman, 2007, Hoffmann & Stroobant, 2016).



**Εικόνα 4.7:** Σχηματική απεικόνιση της πηγής ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (Banerjee & Mazumdar, 2012).

#### 4.3.2 Υβριδικός αναλυτής Orbitrap

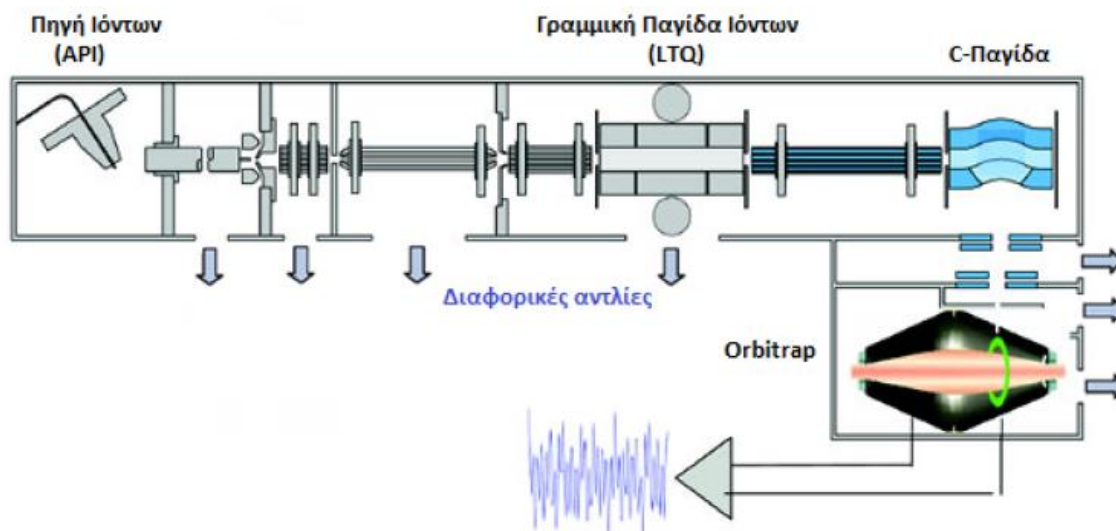
Ο αναλυτής μάζας αποτελεί την καρδιά του φασματομέτρου μάζας. Ο αναλυτής μάζας μπορεί να συγκριθεί με το πρίσμα. Τα διάφορα μήκη κύματος ενός φωτός διαχωρίζονται από ένα πρίσμα και στη συνέχεια ανιχνεύονται από έναν οπτικό υποδοχέα. Ομοίως στον αναλυτή μάζας, οι διαφορετικοί τύποι ιόντων ( $m/z$ ) μιας δέσμης ιόντων διαχωρίζονται και στη συνέχεια περνούν στον ανιχνευτή. Ο ιδανικός αναλυτής μάζας πρέπει να μπορεί να διαχωρίσει όσο το δυνατόν μικρότερες διαφορές  $m/z$  και να επιτρέπει την ανάλυση μεγάλου αριθμού ιόντων, έτσι ώστε να έχει τη μεγαλύτερη ευαισθησία και να είναι συμβατός με όλες τις τεχνικές εισαγωγής δείγματος και ιοντισμού (Banerjee & Mazumdar, 2012). Υπάρχουν τρεις μεγάλες κατηγορίες αναλυτών ανάλογα με τις αρχές στις οποίες στηρίζεται ο διαχωρισμός των ιόντων. Υπάρχουν οι αναλυτές σάρωσης όπως ο τετραπολικός αναλυτής μαζών (Q), οι παλμικοί αναλυτές μαζών, όπως οι αναλυτές χρόνου πτήσης (TOF) και η τετραπολική παγίδα ιόντων (ion trap, IT) και οι υβριδικοί αναλυτές που περιλαμβάνουν συνδυασμό αναλυτών σε σειρά, όπως ο υβριδικός αναλυτής Orbitrap (Hoffmann & Stroobant, 2016). Η σωστή επιλογή του αναλυτή μάζας εξαρτάται από την

διαχωριστική/διακριτική ικανότητα, το εύρος μάζας, τον ρυθμό σάρωσης και το όριο ανίχνευσης που απαιτούνται για μια ανάλυση.

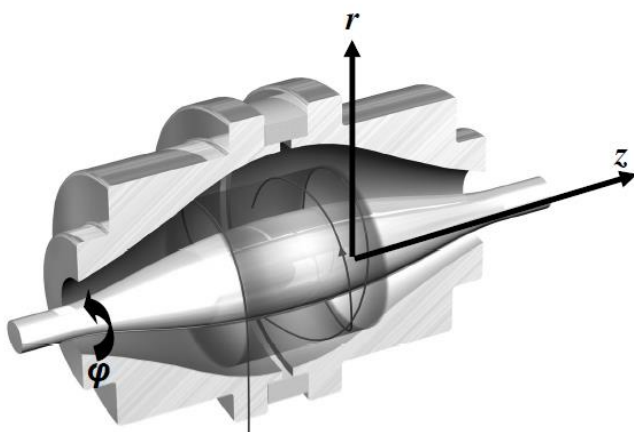
Ο υβριδικός αναλυτής orbitrap αποτελεί την τελευταία εξέλιξη στους αναλυτές παγίδας ιόντων που χρησιμοποιούνται για το διαχωρισμό  $m/z$  (Εικόνα 4.8). Η τεχνολογία αυτή αναπτύχθηκε από τον Alexandor Makarov (Makarov, 2000) ενώ ήταν στην HD Technologies, Ltd στο Ηνωμένο Βασίλειο και εμπορευματοποιήθηκε το 2005 ως μέρος ενός συζευγμένου φασματομέτρου μάζας χρησιμοποιώντας μια ανοδική γραμμική τετραπολική παγίδα ιόντων που αναπτύχθηκε από την Thermo Electron (Σαν Χοσέ, Καλιφόρνια) (Hardman & Makarov, 2003). Τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα από τη χρήση του υβριδικού αναλυτή orbitrap παρουσιάζονται στον πίνακα 4.2.

Το orbitrap αποτελείται από δύο ηλεκτρόδια με τη μορφή ομοαξονικών συμμετρικών ηλεκτροδίων, ένα εξωτερικό με κυλινδρικό σχήμα και ένα εσωτερικό ηλεκτρόδιο με σχήμα ατράκτου, όπως υποδεικνύεται στην εικόνα 4.9. Ένα σταθερό ηλεκτρικό δυναμικό επιβάλλεται μεταξύ αυτών των δύο αξονικών συμμετρικών ηλεκτροδίων (δεν εμπλέκεται μαγνητικό πεδίο ή ταλαντευόμενα ηλεκτρικά δυναμικά). Τα ιόντα εισέρχονται στην τροχιακή παγίδα σε ορθή γωνία προς τον άξονα  $z$  σε μη μηδενική θέση κατά μήκος των αξόνων  $x$  και  $y$  σε βέλτιστη θέση μεταξύ των επιφανειών και μετατοπίζονται από το σημείο του μεγαλύτερου διαχωρισμού των δύο επιφανειών (κέντρο του orbitrap) κατά μήκος του άξονα  $z$ . Τα ιόντα που εισέρχονται από μια παγίδα  $C$  έχουν κινητική ενέργεια ίση με την αντίθετη δυναμική ενέργεια του ακτινικού ηλεκτρικού πεδίου μεταξύ των δύο αξονικών συμμετρικών επιφανειών. Τα ταλαντευόμενα ιόντα προκαλούν ένα ρεύμα το οποίο μπορεί να ανιχνευτεί με έναν ενισχυτή. Τα ιόντα συγκεκριμένης μάζας παράγουν ένα κυματικό σήμα ενώ πολλά ιόντα διαφορετικής μάζας παράγουν ένα σύνθετο σήμα των οποίων οι συχνότητες υπολογίζονται με μετασχηματισμούς Fourier. Ο λόγος του κάθε ιόντος σχετίζεται με τη συχνότητα ταλάντωσης ( $\omega$ ) του ιόντος με βάση την εξίσωση 4.1. Τα ιόντα με διαφορετικό λόγο, έχουν διαφορετική περιστροφή και αξονική ταλάντωση με αποτέλεσμα να παράγουν διαφορετικά σήματα στον ενισχυτή. Έτσι, από τον υπολογισμό της συχνότητας ( $\omega$ ) προκύπτει και ο προσδιορισμός της μοριακής μάζας (Olsen et al., 2005, Watson & Sparkman, 2008).

$$\omega = \sqrt{k/(m/z)} \quad (4.1)$$



**Εικόνα 4.8:** Σχηματική απεικόνιση του υβριδικού αναλυτή LTQ Orbitrap (Watson & Sparkman, 2008).



**Εικόνα 4.9:** Σχηματική απεικόνιση του τροχιακού αναλυτή μαζών Orbitrap (Watson & Sparkman, 2008).

**Πίνακας 4.2:** Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα από τη χρήση του υβριδικού αναλυτή orbitrap (Watson & Sparkman, 2008).

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υψηλή διακριτική ικανότητα 70000+	Απαίτηση χαμηλής πίεσης
Μεγάλη ακρίβεια στον προσδιορισμό μαζών (<5ppm), Ανάλυση πολύπλοκων μιγμάτων	Υψηλό κόστος σε σύγκριση με τη γραμμική τετραπολική παγίδα ιόντων (QIT)
Μη καταστρεπτική ανίχνευση ιόντων	Ανεπαρκής παγίδευση των παραγόμενων ιόντων
Δυνατότητα συνδυασμού MS/MS	

## II. Σκοπός και Αντικείμενο της Έρευνας

Ο προσδιορισμός φαρμακευτικών ενώσεων αποτελεί ένα πεδίο έρευνας που έχει μελετηθεί αρκετά αλλά συνεχίζει να απασχολεί τους επιστήμονες. Σήμερα δίνεται όλο ένα και περισσότερη σημασία στον προσδιορισμό υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων, με γρήγορες απλές μεθόδους που δύναται να αυτοματοποιηθούν ώστε να καθίσταται εφικτή η ανάλυση όσο το δυνατών περισσότερων αναλυτών σε μεγάλο πλήθος δειγμάτων εύκολα και γρήγορα.

Η λυματολάσπη αποτελεί προϊόν επεξεργασίας που προέρχεται από μονάδες επεξεργασίας οικιακών αλλά και βιομηχανικών αποβλήτων και η ποσότητα παραγωγής της αυξάνεται με γοργό ρυθμό λόγω του συνεχώς αυξανόμενου πληθυσμού. Αξίζει να σημειωθεί ότι οι μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων αδυνατούν να απομακρύνουν πλήρως τις φαρμακευτικές ουσίες με αποτέλεσμα να παραμένουν υπολείμματα αυτών στην παραγόμενη λυματολάσπη. Επιπλέον, ορισμένες από τις παραπάνω τεχνολογίες επεξεργασίας λυματολάσπης, όπως οι βιολογικές και οι απολυμαντικές μπορούν να μεταβάλλουν τις ιδιότητες των αντιβιοτικών και να αυξήσουν τις συγκεντρώσεις αυτών στα λύματα. Συνεπώς χρίζεται απαραίτητη η περαιτέρω επεξεργασία της λυματολάσπης για την άμεση και μέγιστη δυνατή αξιοποίησή της. Η υδροθερμική επεξεργασία είναι μία τεχνολογία που συμβάλλει στην μείωση της συγκέντρωσης των οργανικών ρύπων του περιβάλλοντος κυρίως λόγω της προσρόφησης των οργανικών ρύπων στην επιφάνεια των εξανθρακωμάτων και της διάσπασής τους σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας, πίεσης και χρόνου αντίδρασης. Μετά και την απομάκρυνση των ρύπων, το στερεό υπόλειμμα (υδροεξανθράκωμα) που προκύπτει βρίσκει άμεση εφαρμογή κυρίως ως βελτιωτικό εδάφους.

Σκοπός λοιπόν της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας είναι η ανάπτυξη μίας μεθόδου για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τριάντα-τριών φαρμακευτικών ενώσεων που επιλέχθηκαν λόγω της συχνότητας ανίχνευσής τους σε λυματολάσπη από τον βιολογικό καθαρισμό της πόλης των Ιωαννίνων με την τεχνική της υγρής χρωματογραφίας υπερ-ψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία υψηλής ευκρίνειας και ακρίβειας μάζας, (LC-HRMS/MS) και η υδροθερμική επεξεργασία της λυματολάσπης για την απομάκρυνση των ενώσεων αυτών.

Η πορεία εκχύλισης των ενώσεων από τη μήτρα της λυματολάσπης πραγματοποιήθηκε με τη τεχνική QuEChERS στην οποία βελτιστοποιήθηκε η μάζα του δείγματος, η ποσότητα των προσροφητικών υλικών καθαρισμού και ο όγκος του εκχυλίσματος που λαμβάνεται για καθαρισμό αλλά και για εξάτμιση. Επίσης,

πραγματοποιήθηκε βελτιστοποίηση των παραμέτρων του συστήματος LC-HRMS/MS για να είναι δυνατός ο ταυτόχρονος προσδιορισμός και των τριάντα-τριών φαρμακευτικών ενώσεων, με τη μεγαλύτερη ευαισθησία για κάθε μία εξ αυτών, στο συντομότερο χρονικό διάστημα. Η ίδια ακριβώς πορεία ακολουθήθηκε και για τον ταυτόχρονο υπολειμματικό προσδιορισμό των ίδιων ενώσεων σε υπόστρωμα υδροεξανθρακώματος, το οποίο παράγεται κατά την υδροθερμική επεξεργασία.

Η μέθοδος και για τα δύο υποστρώματα επικυρώθηκε ως προς τα χαρακτηριστικά της γραμμικότητας, της ακρίβειας, της πιστότητας (υπό συνθήκες επαναληψιμότητας και ενδο-εργαστηριακής αναπαραγωγιμότητας), της αβεβαιότητας (υπολογισμός αναλογίας Horrat), ενώ παράλληλα προσδιορίστηκαν τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και ο συντελεστής συνεισφοράς της μήτρας τόσο στη λυματολάσπη όσο και στο υδροεξανθράκωμα. Τέλος, έγινε εφαρμογή της μεθόδου σε πραγματικά δείγματα λυματολάσπης και υδροεξανθρακώματος για τον υπολογισμό του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ενώσεων. Η μελέτη της επίδρασης σημαντικών παραμέτρων και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της υδροθερμικής κατεργασίας πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της μεθοδολογίας της επιφανειακής απόκρισης. Επιλέχθηκαν τρεις ανεξάρτητες μεταβλητές: η θερμοκρασία, ο χρόνος και η αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt) που επιδρούν στο μελετώμενο σύστημα με σκοπό τον διερευνητικό σχεδιασμό (screening designs) για τον προσδιορισμό των πιο σημαντικών επιδράσεων των μεταβλητών.

### III. Πειραματικό Μέρος

#### Κεφάλαιο 5

##### 5.1 Πρότυπες ενώσεις – Διαλύτες – Αντιδραστήρια – Αέρια – Υλικά

###### 5.1.1 Πρότυπες Φαρμακευτικές ενώσεις

Χρησιμοποιήθηκαν αναλυτικά πρότυπα των φαρμακευτικών ενώσεων αλλά και τα αντίστοιχα δευτεριωμένα εσωτερικά πρότυπα ορισμένων ενώσεων (Sulfadiazine, Sulfathiazole, Sulfapyridine, Olanzapine, N-desmethyl-Olanzapine, Trimethoprim, Amisulpride, Caffeine, O-desmethyl-Venlafaxine, Sulfamethoxazole, Mirtazapine, Bupropion, Risperidone, Venlafaxine, Clozapine, Citalopram, Quetiapine, Haloperidol, Paroxetine, Carbamazepine, Amitriptyline, Fluvoxamine, Fluoxetine, Norfluoxetine, Sertraline, N-desmethyl-Sertraline, Bezafibrate, Budenonide, Atenolol, Sulfaquinoxaline, Valsartan, Diazepam, Phenazone, d<sub>3</sub>-Olanzapine, d<sub>4</sub>-Haloperidol, d<sub>5</sub>-Fluoxetine, d<sub>6</sub>-Amitriptyline και d<sub>10</sub>-Carbamazepine) σε στερεά μορφή υψηλής καθαρότητας >98-99% του οίκου Sigma Aldrich (Darmstadt, Germany). Όλες οι πρότυπες ουσίες συνοδεύονταν από πιστοποιητικό ανάλυσης και επισήμανση ημερομηνίας λήξης.

###### 5.1.2 Διαλύτες

- Υπερκάθαρο νερό (συσκευή παραγωγής υπερκάθαρου νερού της εταιρίας EVOQUA Water Technologies).
- Νερό χρωματογραφικής καθαρότητας > 99.99 % (LC-MS grade) του οίκου Fischer Chemical και Νερό (HPLC grade) καθαρότητας > 99.9%, του οίκου Fischer Chemical.
- Ακετονιτρίλιο (HPLC grade) καθαρότητας > 99.9%, του οίκου Fischer Chemical.
- Μεθανόλη χρωματογραφικής καθαρότητας > 99.99 % (LC-MS grade) του οίκου Fischer Chemical.
- Φορμικό (μυρμηκικό) οξύ καθαρότητας 98-100 %, του οίκου Merck KGaA (Darmstadt, Germany).
- Ακετοξικό οξύ καθαρότητας > 95 %, της εταιρίας Sigma-Aldrich.
- Αποσταγμένο Νερό



### 5.1.3 Αντιδραστήρια

- Αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA) σε στερεή μορφή, του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
- Άνυδρο θειϊκό μαγνήσιο ( $MgSO_4$ ) σε στερεή μορφή, καθαρότητας 99,5%, του οίκου Thermo-Fischer (Kandel, Germany).
- Διένυδρο κιτρικό τρι-νάτριο ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) σε στερεή μορφή, καθαρότητας >99%, του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
- Σεσκιδρίτης διβασικού κιτρικού νατρίου σε στερεή μορφή, καθαρότητας >99%, του οίκου Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
- Χλωριούχο νάτριο (NaCl) σε στερεή μορφή, του οίκου Merck (Darmstadt, Germany).
- Προσροφητικό υλικό πρωτοταγής δευτεροταγής αμίνη (PSA,40-63 $\mu$ m) της εταιρείας Chromatific.
- Προσροφητικό υλικό Z<sup>+</sup>-sep Bulk της εταιρείας Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).
- Γραφικός ενεργός άνθρακας (GCB) της εταιρείας Agilent Technologies (California, USA)

### 5.1.4 Αέρια

- Αέριο άζωτο ( $N_2$ ), βιομηχανικού τύπου

### 5.1.5 Υλικά

- Λυματολάσπη η οποία συλλέχθηκε από τον Βιολογικό Καθαρισμό της πόλης των Ιωαννίνων.
- Υδροεξανθράκωμα, το οποίο παρασκευάστηκε με τη μέθοδο της υδροθερμικής ανθρακοποίησης (Hydrothermal Carbonization, HTC).
- Φίλτρα διήθησης με πληρωτικό υλικό πολυτετραφθοροαιθυλένιο PTFE (13 mm), με διάμετρο πόρων 0.22  $\mu$ m.
- Φίλτρα διήθησης No 42 (90 mm), με διάμετρο πόρων 2.5  $\mu$ m του οίκου Whatman TM (UK).
- Σύριγγες όγκου 1 ml της εταιρείας Soft care laboratories, China

- Ταινία parafilm
- Διηθητικό χαρτί
- Αλουμινόχαρτο

## 5.2 Σκεύη – Συσκευές – Αναλυτικά όργανα

### 5.2.1 Σκεύη

- Κόσκινα με άνοιγμα βροχίδων 500 και 250μm.
- Σωλήνες φυγοκέντρωσης πολυπροπυλενίου τύπου falcon, των 15 και 50 mL.
- Γυάλινα φιαλίδια των 2 mL, 8 mL και 12 mL με βιδωτά πώματα.
- Μικρο-ένθετα των 100 μl.
- Γυάλινες φιάλες κενού, του 1 L.
- Ποτήρια ζέσεως των 50 και 250 mL.
- Γυάλινοι ογκομετρικοί κύλινδροι των 50 και 100 mL.
- Ύαλοι ωρολογίου.
- Γυάλινες ογκομετρικές φιάλες των 10 mL.
- Σιφόνια πλήρωσεως ακριβείας των 10 mL.
- Γυάλινες πιπέτες Pasteur.

### 5.2.2 Συσκευές

- Αναλυτικός ζυγός, ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, KERN ABJ (Germany).
- Αντλία κενού
- Λουτρό υπερήχων.
- Μαγνητικός αναδευτήρας.
- Πειραματική διάταξη υδροθερμικής επεξεργασίας του οίκου Parr Instrument Company (Moline IL. USA), αποτελούμενη από: α) τον αυτόκλειστο αντιδραστήρα, χωρητικότητας 100 mL, β) την κεφαλή που αποτελείται από μανόμετρο, ηλεκτρικό αναδευτήρα, βαλβίδες εισαγωγής και εξαγωγής νερού για την ψύξη του αναδευτήρα, βαλβίδες εισαγωγής και εξαγωγής αερίων, βαλβίδα λήψης δείγματος υγρής φάσης και βαλβίδα ασφαλείας, γ) το κυλινδρικό θερμαντικό σώμα και δ) τον ηλεκτρονικό ρυθμιστή θερμοκρασίας και λειτουργίας (4848 Reactor Controller).
- Πυριαντήριο Memmert (Germany).

- Συσκευή ανάδευσης VORTEX
- Συσκευή συμπύκνωσης δειγμάτων υπό ήπιο ρεύμα αζώτου Techne Dri-Block DB-3D (Staffordshire, UK)
- Σφαιρόμυλος πορσελάνης του οίκου THE PASCALL ENGINEERING CO. LTD. (Sussex, England), εφοδιασμένος με ηλεκτροκινητήρα της εταιρείας Normand Electrical Co. Ltd. (London & Portsmouth, England)
- Τράπεζα ανακίνησης SM shaker (Germany).
- Φυγόκεντρος του οίκου Thermo Scientific, τύπου HERAUS Megafuge 8 (SuZhou, China).
- Ψυγεία με θερμοκρασία λειτουργίας 4-8°C και καταψύκτες ελάχιστης θερμοκρασίας -30 °C.

### **5.2.3 Αναλυτικά όργανα**

- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπέρ-υψηλής πίεσης (Ultra High Pressure Liquid Chromatography, UHPLC) συζευγμένης με φασματοφωτομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας και παγίδας ιόντων Orbitrap, (UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL) της Thermo Fischer Scientific (Bremen, Germany). Το σύστημα υγρής χρωματογραφίας περιλαμβάνει αντλία αυτόματης ροής δείγματος (Accela Pump Ser. No 750157) και θερμοστατούμενο σύστημα αυτόματου δειγματολήπτη (Accela AS). Για τη χρωματογραφική ανάλυση χρησιμοποιήθηκε στήλη ανάστροφης φάσης Hypersil Gold C18 (Thermo Fisher Scientific), (100×2.1 mm, 1.9 μm). Η λήψη των χρωματογραφημάτων και η επεξεργασία των αποτελεσμάτων, έγινε με το λογισμικό Xcalibur 2.1.0 1139, που ήταν εγκατεστημένο σε ηλεκτρονικό υπολογιστή, συνδεδεμένο με το σύστημα UHPLC.

## Κεφάλαιο 6

### Πειραματική διαδικασία υδροθερμικής ανθρακοποίησης (HTC)

#### 6.1 Σχεδιασμός και εκτέλεση υδροθερμικής ανθρακοποίησης

Για την παραγωγή υδροεξανθρακωμάτων, μέσω υδροθερμικής επεξεργασίας (HTC), χρησιμοποιήθηκε η ειδική πειραματική διάταξη, του οίκου Parr Instrument Company (Moline IL, USA) Εικόνα 6.1. Η διάταξη απαρτίζεται από τα εξής μέρη:

α) αντιδραστήρας χωρητικότητας 100 mL (Εικόνα 6.1.(α)),

β) φέρουσα κεφαλή που περιλαμβάνει: μανόμετρο, ηλεκτρικό αναδευτήρα, βαλβίδες εισαγωγής και εξαγωγής νερού για την ψύξη του αναδευτήρα, βαλβίδες εισαγωγής και εξαγωγής αερίων, βαλβίδα λήψης δείγματος υγρής φάσης και βαλβίδα ασφαλείας (Εικόνα 6.1.(β)),

γ) κυλινδρικό θερμαντικό σώμα (Εικόνα 6.1.(γ)) και

δ) ηλεκτρονικός ρυθμιστής θερμοκρασίας και λειτουργίας (4848 Reactor Controller) (Εικόνα 6.1.(δ)).



**Εικόνα 6.1:** Πειραματική διάταξη υδροθερμικής επεξεργασίας: (α) αντιδραστήρας - αυτόκλειστο, (β) κεφαλή, (γ) κυλινδρικό θερμαντικό σώμα που περιέχει το αυτόκλειστο, (δ) ηλεκτρονικός ρυθμιστής θερμοκρασίας και λειτουργίας.

Η επιλογή των συνθηκών της υδροθερμικής ανθρακοποίησης έγινε με βάση τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό (CCD) της μεθοδολογίας επιφανειακής απόκρισης καθώς επιτρέπει τη λεπτομερή διερεύνηση της καμπυλότητας των επιφανειών απόκρισης. Για να πραγματοποιηθεί ένας κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός πρέπει να οριστούν 3 παράμετροι (Mäkelä, 2017):

- ο αριθμός των πειραμάτων που θα πραγματοποιηθούν ο οποίος δίνεται από τη σχέση  $N=2^k+2k+C_p$ , όπου  $k$  είναι ο αριθμός των παραγόντων και  $C_p$  είναι ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου.
- οι τιμές του  $\alpha$  που εξαρτώνται από τον αριθμό των μεταβλητών και μπορούν να υπολογιστούν από τη σχέση  $\alpha=[2^{-k}]^{1/4}$ . Εδώ συγκεκριμένα η τιμή του  $\alpha$  ορίζεται ως 1,68 για 3 μελετώμενες μεταβλητές.
- τα σημεία του παραγοντικού σχεδιασμού τα οποία μελετώνται σε πέντε επίπεδα (- $\alpha$ , -1, 0, +1, + $\alpha$ )

Ο αριθμός των παραγόντων που μελετήθηκε ήταν τρεις ( $k=3$ ) η θερμοκρασία, ο χρόνος παραμονής και η αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt) και ο αριθμός των επαναλαμβανόμενων μετρήσεων του κεντρικού σημείου ορίστηκε τρία ( $C_p=3$ ). Επομένως προέκυψε ο παρακάτω αναλυτικός πίνακας με τον αριθμό των πειραμάτων και τις ακριβείς συνθήκες της υδροθερμικής επεξεργασίας.

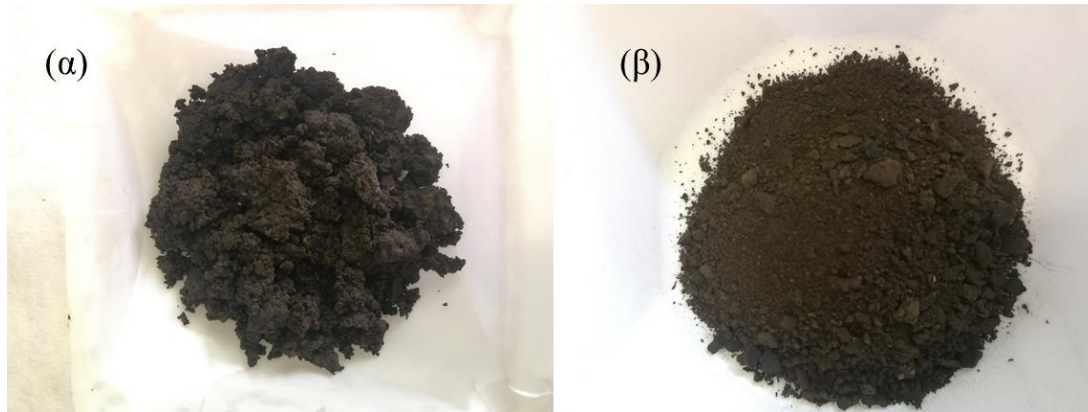
**Πίνακας 6.1:** Πειραματικές συνθήκες των κρίσιμων παραμέτρων της υδροθερμικής ανθρακοποίησης (HTC).

Αριθμός Πειραμάτων	Παράγοντας 1 A: Θερμοκρασία °C	Παράγοντας 2 B: Χρόνος min	Παράγοντας 3 A: %wt
1	195,00	270,00	7,50
2	210,00	360,00	10,00
3	195,00	421,36	7,50
4	180,00	180,00	10,00
5	195,00	270,00	11,70
6	220,23	270,00	7,50
7	195,00	270,00	7,50
8	195,00	270,00	3,30
9	210,00	180,00	5,00
10	169,77	270,00	7,50
11	210,00	180,00	10,00
12	180,00	360,00	5,00
13	180,00	180,00	5,00
14	195,00	118,64	7,50
15	210,00	360,00	5,00
16	195,00	270,00	7,50
17	180,00	360,00	10,00

Εκτελέστηκαν 17 πειράματα στα οποία ο αντιδραστήρας τροφοδοτούταν με το μίγμα λυματολάσπης – νερού με τις αντίστοιχες αναλογίες, τοποθετούταν η κεφαλή και το μίγμα αναδευόταν καθ' όλη την διάρκεια της υδροθερμικής επεξεργασίας. Η ψύξη του ηλεκτρικού αναδευτήρα γινόταν με κυκλοφορία νερού. Ο εφαρμοζόμενος ρυθμός θέρμανσης ορίστηκε από 5,6-7,3 °C / λεπτό και εφαρμοζόταν σε διάστημα 30 λεπτών για κάθε πείραμα. Μετά την παρέλευση των 30 λεπτών και την επίτευξη της θερμοκρασίας της αντίδρασης, ο χρόνος παραμονής για την παραγωγή υδροεξανθρακωμάτων καθορίστηκε από τον πίνακα 6.1. Η αυτογενής πίεση κατά την διάρκεια των χρόνων παραμονής και στα 17 πειράματα κυμάνθηκε από 18 έως 22 bar. Μετά την παρέλευση του χρόνου, η λειτουργία του θερμομανδύα διακόπηκε και απομακρύνθηκε από τον αντιδραστήρα, έτσι ώστε αυτός να ψυχθεί με ομαλό τρόπο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Η πτώση της θερμοκρασίας μετρούταν διαρκώς από τον ηλεκτρονικό ρυθμιστή θερμοκρασίας ενώ η ανάδευση συνεχίστηκε κατά τη διάρκεια της ψύξης. Όταν ολοκληρώθηκε η ψύξη φτάνοντας τους 25 °C, ο σφραγισμένος αντιδραστήρας αποσυνδέθηκε από την πειραματική διάταξη και μεταφέρθηκε σε απαγωγό, όπου ανοίχτηκε η βαλβίδα εξαγωγής αερίων και απομακρύνθηκε η αέρια φάση των προϊόντων. Αμέσως μετά, ο αντιδραστήρας απασφαλίστηκε, απομακρύνθηκε η κεφαλή και πραγματοποιήθηκε διήθηση υπό κενό, με χρήση διάταξης συσκευής διήθησης υπό κενό, ώστε να διαχωριστεί η υγρή από την στερεή φάση. Μετά το διαχωρισμό, το στερεό ίζημα που βρισκόταν στον ηθμό αποξύστηκε, εκπλύθηκε με αποσταγμένο νερό και μεταφέρθηκε σε ποτήρι ζέσεως. Επίσης, το αυτόκλειστο εκπλύθηκε αρκετές φορές με αποσταγμένο νερό ώστε να ληφθεί όλη η ποσότητα από το στερεό ίζημα στο ποτήρι ζέσεως. Τέλος το ποτήρι ζέσεως μαζί με το ίζημα τοποθετήθηκε στο πυριαντήριο για 24 ώρες στους 104 °C ώστε να εξατμιστεί όλο το νερό και να ξηραθεί το υλικό. Μετά την ολοκλήρωση της ξήρανσης, το υδροεξανθράκωμα (Εικόνα 6.2), απομακρύνθηκε από το πυριαντήριο και αφέθηκε να κρυώσει σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Ακολούθησε ελαφρά λειοτρίβηση με σπάτουλα, ζύγιση και υπολογισμός της απόδοσης της στερεής μάζας σύμφωνα με την εξίσωση (1):

$$\% \text{ wt} = \frac{\text{Μάζα του παραγόμενου υδροεξανθρακώματος}}{\text{Μάζα της αρχικής λυματολάσπης}} \times 100 \quad (1)$$

Κατόπιν το υδροξείδιο άνθρακος φυλάχθηκε σε γυάλινο φιαλίδιο σφραγισμένο με πώμα στην κατάψυξη στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  έως ότου ακολουθήσει η ανάλυσή του. Τα αποτελέσματα από την υδροθερμική άνθρακοποίηση επεξεργάστηκαν με τη μέθοδο της επιφανειακής απόκρισης (RSM) με βάση το λογισμικό Experiment Design 7.0.



**Εικόνα 6.2:** (α) σωματίδια λυματολάσπης πριν την υδροθερμική κατεργασία και (β) σωματίδια υδροξείδιου άνθρακος εκπλυμένων με νερό.

## **Κεφάλαιο 7**

### **Πειραματική Διαδικασία προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών σε υπόστρωμα λυματολάσπης**

#### **7.1 Παρασκευή πρότυπων διαλυμάτων**

Η παραγωγή πυκνών διαλυμάτων των φαρμακευτικών ουσιών αποτέλεσε το στάδιο έναρξης της πειραματικής διαδικασίας. Παρασκευάστηκαν πρότυπα διαλύματα παρακαταθήκης σε ογκομετρικές φιάλες των 10 ml, ζυγίζοντας κατάλληλη ποσότητα σε αναλυτικό ζυγό ακριβείας και διαλυτοποιώντας τα σε μεθανόλη υψηλής καθαρότητας με τελική συγκέντρωση 400-2000 mg/L. Για τη καλύτερη ομογενοποίηση των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε λουτρό υπερήχων. Στη συνέχεια τα διαλύματα διατηρήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια των 12 ml και αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -20 °C έως τη χρήση τους. Οι προσδιοριζόμενες ουσίες δεν υφίστανται διάσπαση για μεγάλο χρονικό διάστημα, παρ' όλα αυτά η σταθερότητα των διαλυμάτων ελεγχόταν και καμία μεταβολή στη συγκέντρωσή τους δεν παρατηρήθηκε.

Μίγματα των πρότυπων φαρμακευτικών ενώσεων παρασκευάστηκαν έπειτα από τις κατάλληλες αραιώσεις των πυκνών προτύπων σε διαλυτή μεθανόλη. Συγκεκριμένα παρασκευάστηκε μικτό πρότυπο διάλυμα συγκέντρωσης 10 mg/L με το σύνολο των δραστικών ουσιών και στη συνέχεια με διαδοχικές αραιώσεις ακολούθησε η παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων εργασίας 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml, 500 ng/ml, 1 mg/L, 2 mg/L, 5mg/L, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα ανάκτησης και επαναληψιμότητας και τη δημιουργία καμπύλης αναφοράς. Τέλος, για την καλύτερη δυνατή λήψη των αποτελεσμάτων παρασκευάστηκε ένα πυκνό διάλυμα εσωτερικού προτύπου 20 mg/L με ορισμένες ισοτοπικές φαρμακευτικές ουσίες το οποίο αραιώθηκε σε συγκέντρωση 1 mg/L ώστε να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση.



## **7.2 Δειγματοληψία και Προ-κατεργασία της λυματολάσπης**

### **7.2.1 Δειγματοληψία της λυματολάσπης**

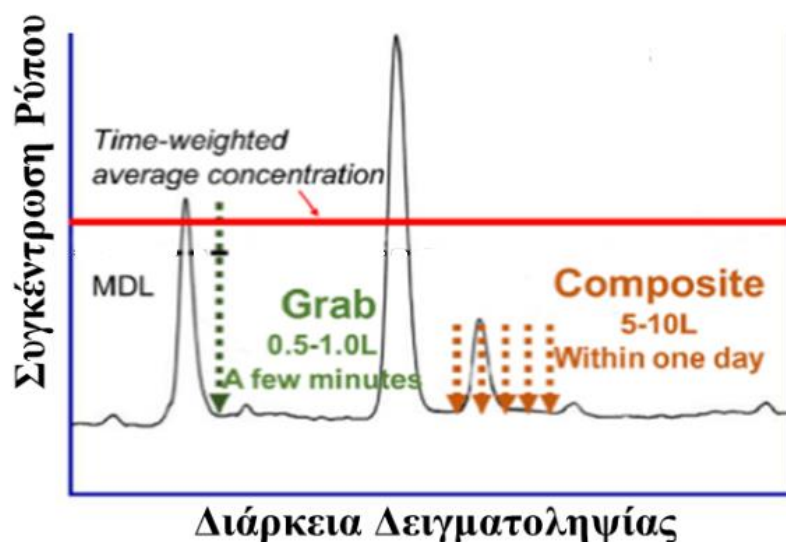
Η δειγματοληψία ενός αντιπροσωπευτικού εργαστηριακού δείγματος αποτελεί το πρώτο και το πιο κρίσιμο στάδιο μίας χημικής ανάλυσης. Οι τοποθεσίες δειγματοληψίας λάσπης στις μονάδες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (MEYA) εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τον τύπο δείγματος λυματολάσπης που απαιτείται για την ακόλουθη ανάλυση. Η δειγματοληψία διαφόρων τύπων λάσπης είναι ιδιαίτερα σημαντική ώστε να αξιολογήσει κάποιος την κατανομή των φαρμακευτικών ενώσεων κατά μήκος της γραμμής ύψους (Martín-Pozo et al., 2019). Ενώ οι περισσότεροι συγγραφείς επιλέγουν τη δειγματοληψία λάσπης μετά και το τελικό στάδιο αφυδάτωσης (φίλτρα πρέσας ή φυγοκέντρηση) προκειμένου να ληφθεί μια αναπαράσταση του συνολικού βιοστερεού του προϊόντος που αφαιρείται από τις MEYA (Chen et al., 2013), κάποιιοι άλλοι προτιμούν τη δειγματοληψία μετά το στάδιο της αναερόβιας χώνευσης στο οποίο αφαιρείται το μεγαλύτερο μέρος της οργανικής ύλης (Subedi et al., 2014), (Evans et al., 2015).

Η μακροπρόθεσμη σύνθετη δειγματοληψία (composite) (πολλές ώρες) επιτυγχάνει την καλύτερη εκπροσώπηση της συνολικής λάσπης λυμάτων και χαμηλά όρια ανίχνευσης, δείχνοντας με ακρίβεια τις διακυμάνσεις και τη μέση απόδοση της παρτίδας παραγωγής για μεγάλο χρονικό διάστημα. Ωστόσο αυτός ο τύπος δειγματοληψίας αποτελεί μια απαιτητική διαδικασία και ως εκ τούτου, δεν είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιημένη επιλογή (Albero et al., 2012), (R. Liu, Ruan, et al., 2015). Αντίθετα η μέθοδος της άμεσης δειγματοληψίας (grab) (λιγότερο από 15 λεπτά, 1 μέρα) κατά τη διάρκεια λειτουργίας των MEYA απαιτεί λιγότερο και ευκολότερο χειρισμό και τα δείγματα μπορούν να θεωρηθούν συγκρίσιμα με ένα σύνθετο δείγμα 20-30 ημερών, καθώς η διαυγή ροή και οι χρόνοι κράτησης του χωνευτήρα μειώνουν τη μεταβλητότητα στις ιδιότητες της λάσπης και παράγουν ένα ομογενές μίγμα, όμως με υψηλότερα όρια ανίχνευσης (USEPA, 1988), (Ekpeghere et al., 2017). Συνεπώς, η άμεση λήψη δειγμάτων (grab) προτιμάται ως εναλλακτική λύση για τη συλλογή δειγμάτων λυματολάσπης (Σχήμα 7.1).

Μια επαρκής ποσότητα λάσπης συχνά κυμαίνεται από 500 mg έως 5 kg και εξαρτάται από την επιλεγμένη θέση δειγματοληψίας. Σκουρόχρωμα γυάλινα μπουκάλια από κεχριμπάρι και βάζα ή δοχεία από ανοξείδωτο χάλυβα είναι συνήθως η κοινή επιλογή για τη συλλογή δειγμάτων, καθώς αποφεύγεται η παρεμβολή των ολιγοφαινολενο αιθυνολενομορίων (OPEs) και προστατεύονται οι ενώσεις που περιέχονται στο δείγμα από φωτοαποδόμηση, υγρασία και άλλους εξωτερικούς παράγοντες (Albero et al., 2012). Άλλες εναλλακτικές λύσεις για τη

δειγματοληψία περιλαμβάνουν τη χρήση αλουμινόχαρτου ή και πολυαιθυλενικών σακουλιών ή δοχείων τα οποία είναι κατάλληλα για ανάλυση μετάλλων (Dorival-García et al., 2012). Πριν από τη δειγματοληψία, τα γυαλικά καθαρίζονται συνήθως με υπερκάθαρο νερό και έναν οργανικό διαλύτη όπως ακετόνη, εξάνιο ή συνήθως μεθανόλη (R. Liu, Song, et al., 2015), (R. Liu, Ruan, et al., 2015). Μετά τη δειγματοληψία, τα δείγματα μεταφέρονται στο εργαστήριο υπό ψύξη και αποθηκεύονται αργότερα στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι την εξαγωγή και την ανάλυση του δείγματος.

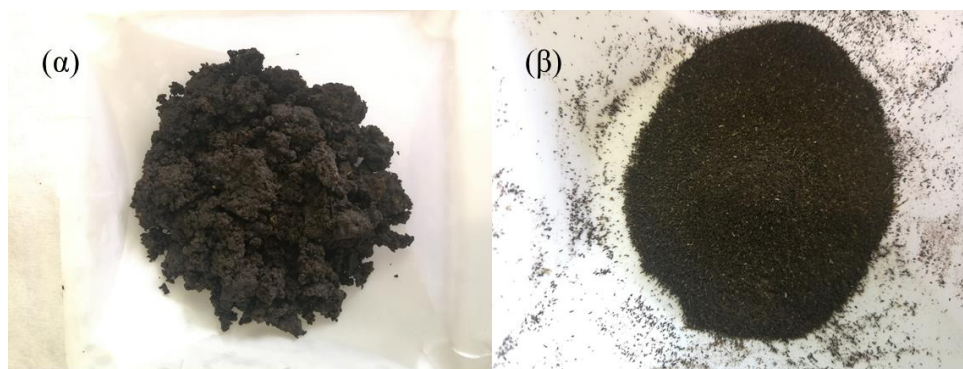
Για τον σκοπό της συγκεκριμένης εργαστηριακής έρευνας η δειγματοληψία της λυματολάσπης πραγματοποιήθηκε τον Ιούνιο του 2020 με την σύνθετη λήψη δείγματος 5 Kg σε πολυαιθυλενική σακούλα για την προστασία του δείγματος και μεταφέρθηκε υπό ψύξη στο χώρο του εργαστηρίου όπου και αποθηκεύτηκε στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  μέχρι τη διεξαγωγή των πειραμάτων.



**Σχήμα 7.1:** Η διαφορά μεταξύ της σύνθετης και της άμεσης δειγματοληψίας ως προς τον όγκο των δειγμάτων εκφρασμένο σε λίτρα, τη διάρκεια δειγματοληψίας και τα όρια ανίχνευσης (Meng et al., 2021).

### 7.2.2 Προ-κατεργασία της λυματολάσπης

Η προετοιμασία των περιβαλλοντικών δειγμάτων αποτελεί το δεύτερο κρίσιμο στάδιο καθώς οι ενώσεις-στόχοι υπάρχουν σε ίχνη πάνω σε πολύπλοκες μήτρες και απαιτούν ιδιαίτερη προσοχή στην ακόλουθη οργανική ανάλυση (Meng et al., 2021). Η λυματολάσπη μετά την απόψυξη στους  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , έρχεται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$  και βρίσκεται με τη μορφή υδαρούς μίγματος που περιέχει μεγάλη ποσότητα νερού. Έτσι, το πρώτο βήμα πριν από την αρχή της εκχύλισης είναι η αφαίρεση της υγρασίας η οποία εξασφαλίζει την κατάλληλη επαφή μεταξύ του διαλύτη έκλουσης και του υποστρώματος κατά τη διαδικασία της εκχύλισης. Υπάρχουν αρκετές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση του νερού από τα δείγματα λάσπης, ανάλογα βέβαια και με τις ενώσεις που πρόκειται να αναλυθούν. Συγκεκριμένα, έχει χρησιμοποιηθεί φυγοκέντριση και απόχυση του υπερκείμενου διαλύματος (Martín et al., 2012), ξήρανση σε φούρνο για την εξάτμιση του νερού σε χαμηλή θερμοκρασία καθώς κάποιοι αναλύτες είναι δυνατόν να αποδομηθούν σε υψηλές θερμοκρασίες (Dorival-García et al., 2012). Ως εκ τούτου, οι περισσότεροι συγγραφείς επιλέγουν τη διαδικασία της λυοφιλοποίησης των δειγμάτων, καθώς είναι μια απλή, χρονοβόρα μεν μέθοδος κατά την οποία όμως οι αναλύτες δεν αποδομούνται και ούτε εξατμίζονται (García-Rodríguez et al., 2014). Τα δείγματα λυματολάσπης τοποθετήθηκαν σε falcons των 50 ml και λυοφιλοποιήθηκαν για 48 ώρες (Εικόνα 7.1).



**Εικόνα 7.1:** α) λυματολάσπη μη λυοφιλιωμένη και β) λυοφιλιωμένα σωματίδια λυματολάσπης με μέγεθος  $<250\text{ }\mu\text{m}$ .

Μετά από την ανασκόπηση της σχετικής βιβλιογραφίας, προέκυψε ότι η λάσπη θα πρέπει να βρίσκεται σε μορφή σωματιδίων με μέγεθος μικρότερο των  $250\text{ }\mu\text{m}$  (Herrero et al., 2014), (Peysson & Vulliet, 2013), (Malvar et al., 2020). Για να επιτευχθεί η ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων η ξηρή λυματολάσπη λειοτριβήθηκε σε εργαστηριακό σφαιρόμυλο πορσελάνης, ασυνεχούς λειτουργίας, διαστάσεων  $(D \times L) = 0.15\text{ m} \times 0.23\text{ m}$  (Εικόνα..). Ο σφαιρόμυλος, συμπληρώθηκε μέχρι το  $1/2$  του εσωτερικού ύψους του, με κεραμικές σφαίρες

διαμέτρου 2,5 cm και μεταφέρθηκε σε αυτόν η ποσότητα της λάσπης. Ο σφαιρόμυλος, περιστρεφόταν για 20 λεπτά με συχνότητα περιστροφής 30 στροφές ανά λεπτό ( $N = 30 \text{ rpm}$ ). Μετά την ολοκλήρωση της λειοτριβήσης, για να παραληφθεί το κοκκομετρικό κλάσμα μεγέθους μικρότερο των 250  $\mu\text{m}$ , αφαιρέθηκαν οι σφαίρες από τον σφαιρόμυλο και το υλικό που είχε καταταμηθεί, ταξινομήθηκε σε κόσκινα με άνοιγμα βροχίδων 500  $\mu\text{m}$  και 250  $\mu\text{m}$  έτσι ώστε να επιτρέπεται η διέλευση σωματιδίων μεγέθους μικρότερου των 250  $\mu\text{m}$  ενώ ταυτόχρονα συγκρατιόταν το υπόλειμμα (Εικόνα 7.2).



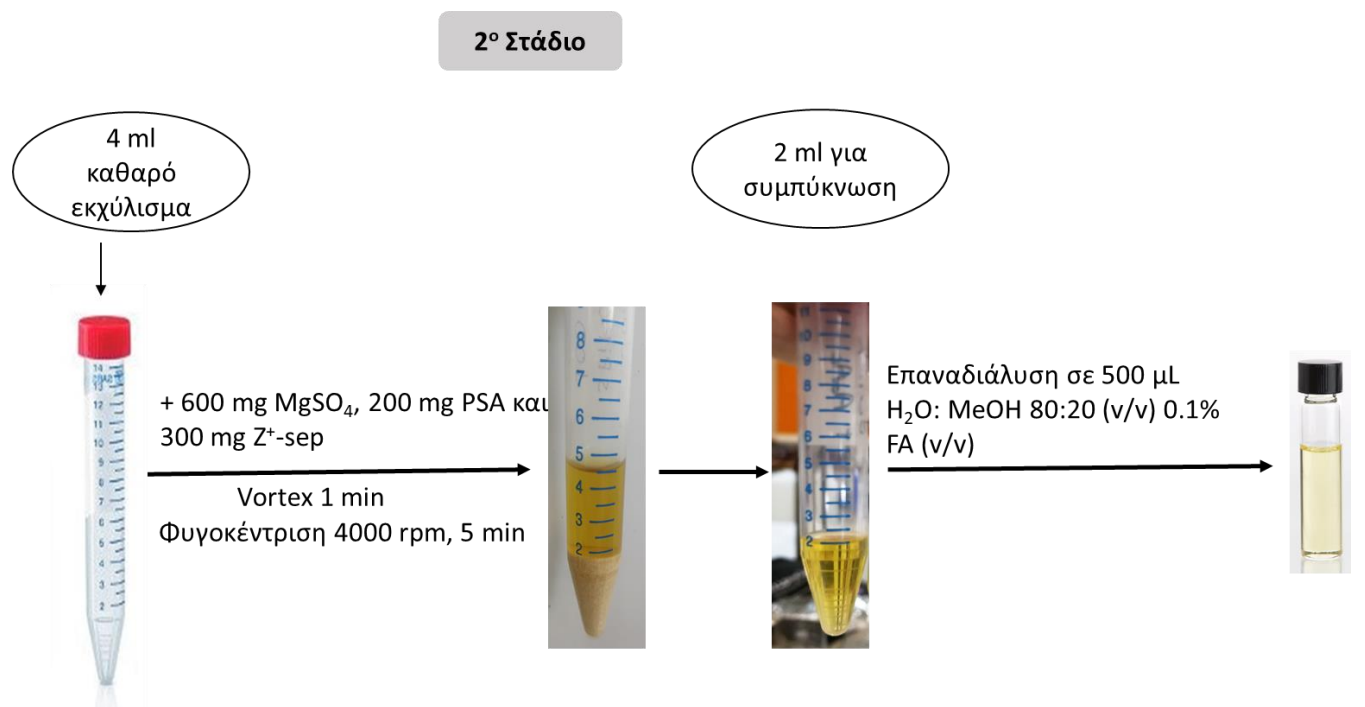
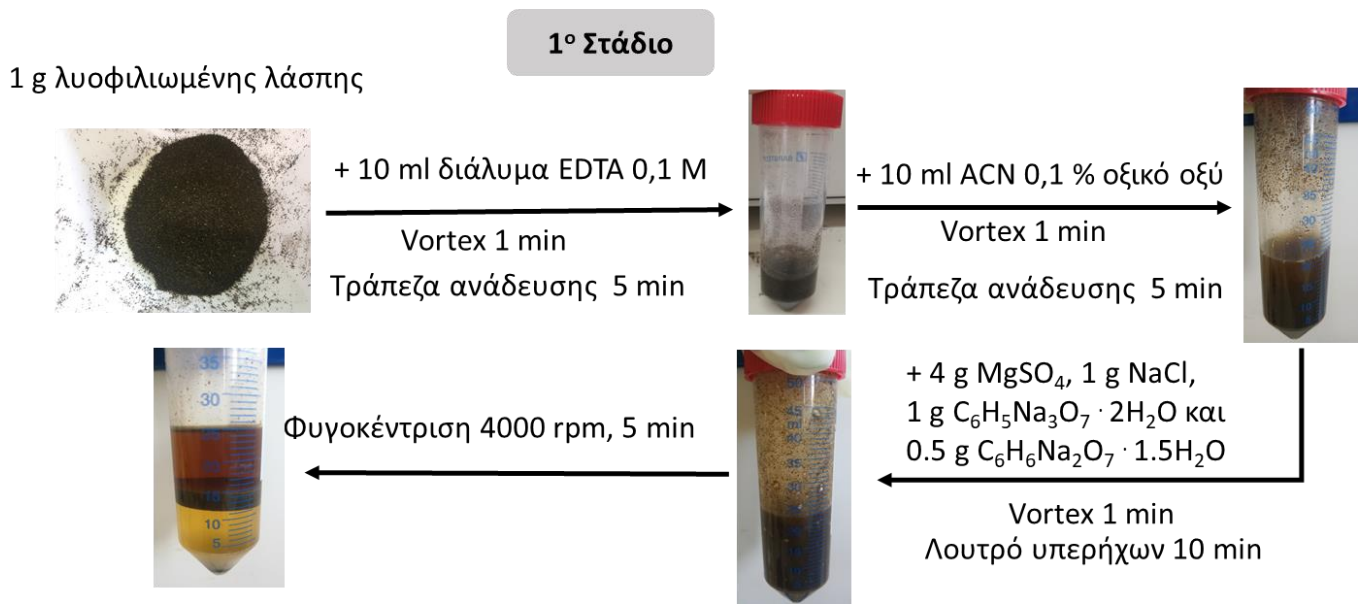
**Εικόνα 7.2:** Εργαστηριακός σφαιρόμυλος που χρησιμοποιήθηκε για την ελάττωση του μεγέθους των σωματιδίων της λυματολάσπης (αριστερά) και εργαστηριακά κόσκινα των 500 και 250  $\mu\text{m}$  για την κατανομή μεγέθους σωματιδίων.

### 7.3 Ανάπτυξη μεθόδου Quechers για την εκχύλιση φαρμακευτικών ουσιών από υπόστρωμα λυματολάσπης

Η εκχύλιση αποτελεί μία διαδικασία μεγίστης σπουδαιότητας καθώς συμβάλει στην απελευθέρωση των ουσιών από το υπόστρωμα ώστε να είναι εφικτή η τελική ανάλυσή τους. Για την απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών από το υπόστρωμα, στην παρούσα μελέτη, χρησιμοποιήθηκε η τεχνική εκχύλισης Quechers διερευνώντας τις κατάλληλες συνθήκες για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Το τελικό πρωτόκολλο της κατεργασίας παρουσιάζεται στο σχήμα 7.2. Για την πραγματοποίηση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε 1g δείγματος λάσπης το οποίο εμβολιάστηκε με το μίγμα των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων σε επίπεδο συγκέντρωσης 100 ng/g για τη βελτιστοποίηση της QuEChERS, ενώ για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου ο εμβολιασμός των δειγμάτων έγινε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, 25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g. Για τον εμβολιασμό, χρησιμοποιήθηκε συνολικός όγκος 300  $\mu$ L πρότυπου μίγματος των επιλεγμένων ενώσεων και διάλυμα εσωτερικού προτύπου με ορισμένες ισοτοπικές φαρμακευτικές ουσίες. Στη συνέχεια, τα δείγματα λυματολάσπης αφέθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά ώστε να εξασφαλιστεί η αλληλεπίδραση των αναλυτών με το υπόστρωμα και να εξατμιστεί όλος ο διαλύτης. Μετά από αυτό το βήμα τα δείγματα ήταν έτοιμα για εκχύλιση με τη μέθοδο QuEChERS.

Στο πρώτο στάδιο της εκχύλισης, 1 g λυοφιλιωμένου δείγματος ζυγίστηκε, εμβολιάστηκε με το κατάλληλο πρότυπο διάλυμα και τοποθετήθηκε σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου, τύπου falcon, χωρητικότητας 50 ml. Έπειτα για την επαρκή ενυδάτωση του δείγματος προστέθηκαν 10 ml διαλύματος EDTA 0,1 M, το δείγμα ανακινήθηκε σε συσκευή ανάδευσης Vortex για 1 λεπτό και στη συνέχεια για 5 λεπτά στην τράπεζα ανάδευσης ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ομογενοποίηση του δείγματος. Μετά προστέθηκαν 10 mL ακετονιτριλίου (ACN) οξινισμένο με 0,1% διάλυμα οξικού οξέος, το δείγμα ανακινήθηκε σε συσκευή ανάδευσης Vortex για 1 λεπτό και στη συνέχεια για 5 λεπτά στην τράπεζα ανάδευσης ώστε να επιτευχθεί επαρκή αλληλεπίδραση του διαλύτη με όλο το δείγμα. Ακολούθως, προστέθηκαν 4 g άνυδρου  $MgSO_4$ , 1 g NaCl, 1g κιτρικού νατρίου και 0,5 g σεσκιδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου. Αμέσως μετά την προσθήκη των αλάτων το falcon ανακινήθηκε έντονα, στην αρχή χειροκίνητα για 10 s, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυσταλλικών συσσωματωμάτων, και στη συνέχεια ανακινήθηκε για 1 λεπτό στο vortex. Τέλος, για την επαρκή ομογενοποίηση του δείγματος το falcon τοποθετήθηκε για 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων και ακολούθησε φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 4000 στροφές ανά λεπτό (Reps per minute ή RPM).

Το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης περιλαμβάνει το στάδιο καθαρισμού (clean-up) με εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (d-SPE). Για το στάδιο αυτό 4 mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκαν σε σωλήνα φυγοκέντρησης, τύπου falcon των 15 mL ο οποίος περιείχε 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA, 75 mg Z<sup>+</sup>-sep για κάθε mL εκχυλίσματος. Ακολούθησε έντονη ανάδευση στο vortex για 1 λεπτό και φυγοκέντρηση για 5 λεπτά σε 4000 rpm. Στη συνέχεια, 2 mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρθηκε σε falcon των 15 mL και το δείγμα συμπυκνώθηκε σε ήπιο ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Ακολούθησε επαναδιάλυση του δείγματος σε 0,5 mL H<sub>2</sub>O:MeOH με 0,1% φορμικό οξύ 80:20 (v/v), διήθηση με φίλτρα σύριγγας με μεμβράνη PTFE, 0,22 μm για να μεταφερθούν τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa τεφλόν-σιλικόνης, συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C έως ότου αναλυθούν στον αντίστοιχο χρωματογράφο. Τέλος, ακολούθησε εκχύλιση και ανάλυση άγνωστων δειγμάτων λυματολάσπης για την ανίχνευση υπολειμματικών συγκεντρώσεων φαρμακευτικών ουσιών.



**Σχήμα 7. 2:** Πρωτόκολλο Quechers σε λυματολάσπη

## **Κεφάλαιο 8**

### ***Πειραματική διαδικασία προσδιορισμού φαρμακευτικών ουσιών σε υπόστρωμα υδροεξανθρακώματος***

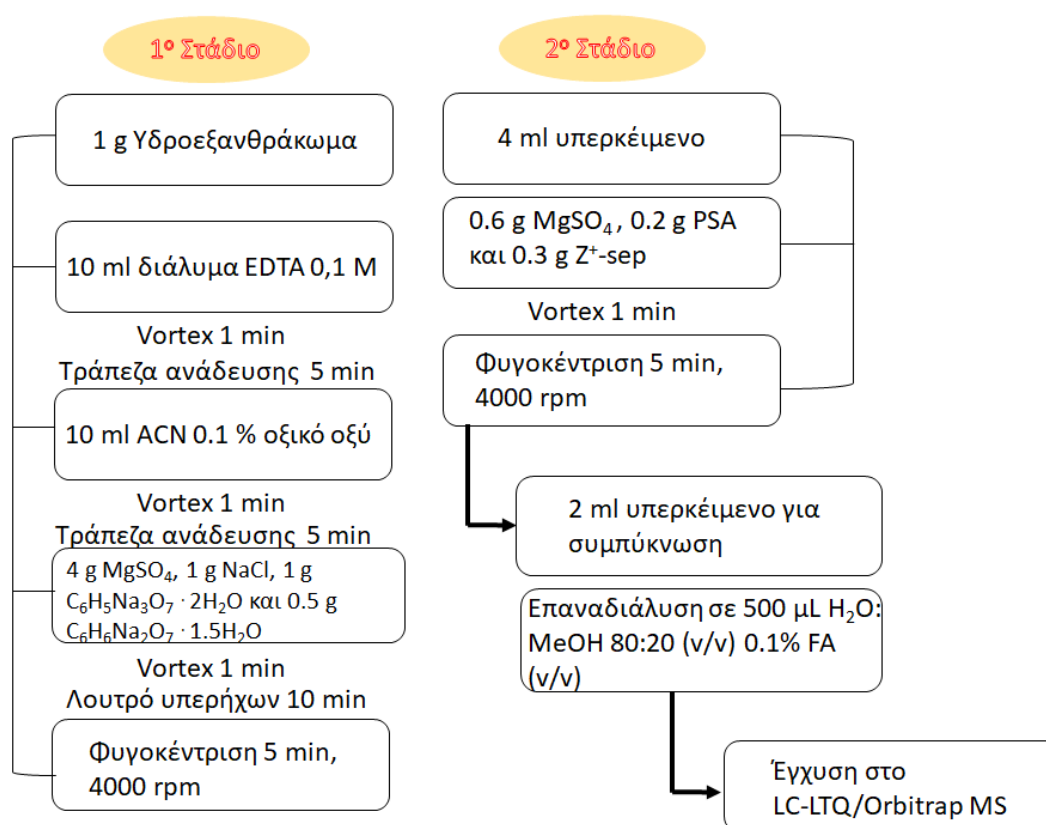
#### ***8.1 Πρωτόκολλο Quechers σε υδροεξανθράκωμα***

Για την απομόνωση των εξεταζόμενων ουσιών από το συγκεκριμένο υπόστρωμα, εφαρμόστηκε η τεχνική εκχύλισης Quechers χρησιμοποιώντας τις βέλτιστες συνθήκες που ερευνήθηκαν από την εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων στη λυματολάσπη. Συγκεκριμένα για την επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου ο εμβολιασμός των δειγμάτων έγινε σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης, 25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g και ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο του σχήματος 8.1. Αρχικά ζυγίζεται 1 g υδροεξανθρακώματος το οποίο παράχθηκε από την υδροθερμική κατεργασία της λυματολάσπης που αναφέρθηκε παραπάνω, εμβολιάζεται με το κατάλληλο πρότυπο διάλυμα και τοποθετείται σε φυγοκεντρικό σωλήνα πολυπροπυλενίου, τύπου falcon, χωρητικότητας 50 ml. Έπειτα, προστίθενται 10 ml διαλύματος EDTA 0,1 M, το δείγμα ανακινείται σε συσκευή ανάδευσης Vortex για 1 λεπτό και στη συνέχεια για 5 λεπτά στην τράπεζα ανάδευσης ώστε να επιτευχθεί καλύτερη ομογενοποίηση του δείγματος. Μετά προστίθενται 10 mL ακετονιτριλίου (ACN) οξιμισμένο με 0,1% διάλυμα οξικού οξέος, το δείγμα ανακινείται ξανά σε συσκευή ανάδευσης Vortex για 1 λεπτό και στη συνέχεια για 5 λεπτά στην τράπεζα ανάδευσης ώστε να επιτευχθεί επαρκή αλληλεπίδραση του διαλύτη με όλο το δείγμα. Ακολούθως, προστίθενται τα άλατα από την μέθοδο EN 15662, παραλλαγή της Quechers. Αμέσως μετά την προσθήκη των αλάτων το falcon ανακινείται έντονα, στην αρχή χειροκίνητα για 10 s, έτσι ώστε να αποφευχθεί ο σχηματισμός κρυσταλλικών συσσωματωμάτων, και στη συνέχεια για 1 λεπτό στο vortex. Τέλος, για την επαρκή ομογενοποίηση του δείγματος το falcon τοποθετείται για 10 λεπτά σε λουτρό υπερήχων και ακολούθως φυγοκέντριση για 5 λεπτά σε 4000 στροφές ανά λεπτό (Reps per minute ή RPM).

Το δεύτερο στάδιο της εκχύλισης περιλαμβάνει το στάδιο καθαρισμού (clean-up) με εκχύλιση στερεάς φάσης με διασπορά (d-SPE). Για το στάδιο αυτό 4 mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρονται σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, τύπου falcon των 15 mL ο οποίος περιέχει 150 mg MgSO<sub>4</sub>, 50 mg PSA, 75 mg Z<sup>+</sup>-sep για κάθε mL εκχυλίσματος. Ακολουθεί έντονη ανάδευση στο vortex για 1 λεπτό και φυγοκέντρωση για 5 λεπτά σε 4000 rpm. Στη συνέχεια, 2 mL από το υπερκείμενο διάλυμα μεταφέρονται σε falcon των 15 mL και το δείγμα συμπυκνώνεται σε ήπιο ρεύμα αζώτου μέχρι ξηρού. Ακολουθεί επαναδιάλυση του δείγματος σε 0,5 mL H<sub>2</sub>O:MeOH με 0,1% φορμικό οξύ 80:20 (v/v), διήθηση με φίλτρα



σύριγγας με μεμβράνη PTFE, 0,22 μm για να μεταφερθούν τελικά σε υάλινα φιαλίδια των 2 mL με βιδωτά πώματα με septa τεφλόν-σιλικόνης, συμβατά με αυτόματους δειγματολήπτες για τη χρωματογραφική ανάλυση. Τα δείγματα αποθηκεύτηκαν στους -20 °C έως ότου αναλυθούν στον αντίστοιχο χρωματογράφο. Τέλος, πραγματοποιήθηκε εκχύλιση και ανάλυση των 17 δειγμάτων που προέκυψαν από την υδροθερμική κατεργασία ως προς την ανίχνευση υπολειμμάτων φαρμακευτικών ουσιών με σκοπό να υπολογιστεί το ποσοστό απομάκρυνσής τους από τη λυματολάσπη.



**Σχήμα 8.1:** Πρωτόκολλο Quechers σε Υδροξυανθράκωμα

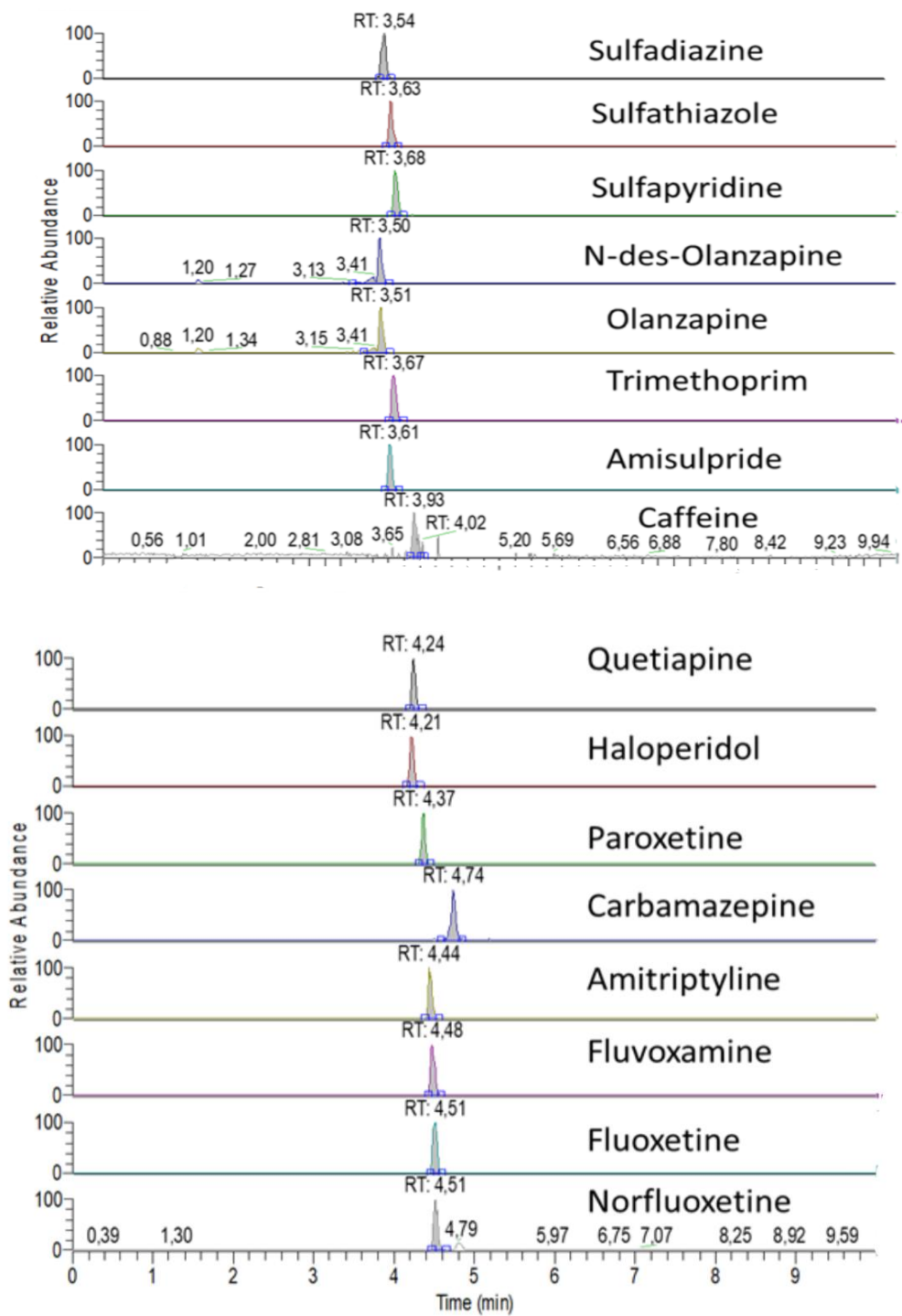
## Κεφάλαιο 9

### Χρωματογραφικές συνθήκες και επικύρωση μεθόδου

#### 9.1 Ανάλυση με υγρή χρωματογραφία υπερ-υψηλής πίεσης συζευγμένη με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και ακρίβειας UHPLC/LTQ-ORBITRAP XL

Μετά από βιβλιογραφική ανασκόπηση επιλέχθηκε το κατάλληλο εκλουστικό σύστημα για τον χρωματογραφικό διαχωρισμό των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων και για τα δύο υποστρώματα. Έτσι, η χρωματογραφική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με βαθμωτό πρόγραμμα έκλουσης, όπου η κινητή φάση αποτελούταν από (Α) νερό με 0,1% φορμικό οξύ και (Β) μεθανόλη με 0,1% φορμικό οξύ σε αναλογία (Α:Β, 80:20) ώστε να επιτευχθεί ο καλύτερος δυνατός διαχωρισμός και η καλύτερη δυνατή μορφή των κορυφών. Η προσθήκη του φορμικού οξέος στην κινητή φάση βελτιώνει την απόκριση των περισσότερων ενώσεων, μετατοπίζοντας την ισορροπία διάστασης των ιόντων προς την πρωτονιωμένη τους μορφή μέσα στο διάλυμα, διευκολύνοντας έτσι τον ιοντισμό. Ο όγκος έγχυσης του δείγματος (injection volume) ήταν 5  $\mu\text{L}$ , η ταχύτητα ροής (flow rate) ήταν σταθερή στα 250  $\mu\text{L}/\text{min}$  και η θερμοκρασία του φούρνου (oven temperature) ήταν σταθεροποιημένη στους 35  $^{\circ}\text{C}$ . Το πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν συνολικής διάρκειας 10 λεπτών και παρουσιάζεται στον πίνακα 9.1 Η αρχική σύσταση διαλυτών ήταν 95% (Α) και 5% (Β). Η σύσταση αυτή παρέμεινε σταθερή για 1 min και στη συνέχεια το ποσοστό της μεθανόλης αυξήθηκε μέχρι το 70% στα 2min. Ακολούθησε περαιτέρω αύξηση του ποσοστού της μεθανόλης έως ότου φτάσει το 100% στα 3 min, οπότε και διατηρήθηκε σταθερή μέχρι τα 7 min. Έπειτα, το ποσοστό της μεθανόλης μειώθηκε στο 5% και τελικά το σύστημα επανήλθε στις αρχικές συνθήκες. Για τον προσδιορισμό των ουσιών επιλέχθηκε η λειτουργία πλήρους σάρωσης (full scan) στη μέθοδο θετικού ιοντισμού σε τιμή διακριτικής ικανότητας 60000 FWHM ενώ για την ταυτοποίηση των προσδιοριζόμενων ουσιών επιλέχθηκαν τα ψευδομοριακά ιόντα  $[\text{M}+\text{H}]^+$  για το θετικό ιοντισμό, στη μέθοδο ανίχνευσης επιλεγμένων ιόντων (Selected Ion Monitoring). Επιπλέον για την επιβεβαίωση θετικών ανιχνεύσεων στα άγνωστα δείγματα λυματολάσπης και υδροεξανθρακώματος χρησιμοποιήθηκε η θραυσματοποίηση στη λειτουργία MS-MS σε τιμή διακριτικής ικανότητας 1500 FWHM. Στον πίνακα που ακολουθεί (Πίνακας 9.2) παρουσιάζονται, τα ψευδομοριακά ιόντα και οι χρόνοι κατακράτησης ( $t_{\text{R}}$ ) των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων σε υπόστρωμα λυματολάσπης αλλά και υδροεξανθρακώματος ενώ στην εικόνα 9.1. δίνονται ενδεικτικά

χρωματογραφήματα ορισμένων ιόντων από το σύνολο του μίγματος των φαρμακευτικών ουσιών σε εκχυλισμένο πρότυπο διάλυμα λυματολάσπης εμβολιασμένο σε 500 µg/L.



**Εικόνα 9.1:** Χρωματογράφημα επιλεγμένων ιόντων UHPLC/LTQ-Orbitrap εκχυλισμένου προτύπου μίγματος λυματολάσπης (500 µg/L) φαρμακευτικών ενώσεων

**Πίνακας 9.1:** Πρόγραμμα βαθμωτής έκλουσης φαρμακευτικών ενώσεων.

Χρόνος (min)	% A (H <sub>2</sub> O-0,1% FA)	% B (MeOH-0,1% FA)	Ταχύτητα ροής (μL/min)
1	95	5	250
2	30	70	250
5	0	100	250
7	0	100	250
7,10	95	5	250
10	95	5	250

**Πίνακας 9 2:** Δεδομένα από την ανάλυση στο σύστημα UHPLC/LTQ-Orbitrap MS/MS για τις φαρμακευτικές ενώσεις

Φαρμακευτικές Ενώσεις	Ψευδομοριακό ιόν	Θεωρητική Μάζα (M + H) <sup>+</sup>	t <sub>R</sub> (min) (λυματολάσπη/υδροεξανθράκωμα)	Θραύσματα Orbitrap MS/MS
Sulfadiazine	C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	251,0597	3,53 / 3,44	156,0103
Sulfathiazole	C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> <sup>+</sup>	256,0209	3,62 / 3,50	156,0103
Sulfapyridine	C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	250,0645	3,69 / 3,55	156,0112
N-desmethyl-olanzapine	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	299,1325	3,49 / 3,47	256,0885
Olanzapine	C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	313,1476	3,50 / 3,48	256,0885
Trimethoprim	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	291,1462	3,66 / 3,60	230,1145
Amisulpride	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sup>+</sup>	370,1795	3,62 / 3,55	242,0463
Caffeine	C <sub>8</sub> H <sub>11</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	195,0877	3,89 / 3,72	138,0651
O-desmethyl-venlafaxine	C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	264,1954	3,85 / 3,79	246,1834
Sulfamethoxazole	C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S <sup>+</sup>	254,0594	3,98 / 3,79	(195,0923)
Mirtazapine	C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> <sup>+</sup>	266,1649	3,89 / 3,82	195,0904
Bupropion	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> OCIN <sup>+</sup>	240,1145	4,02 / 4,01	184,0512

Risperidone	C <sub>23</sub> H <sub>28</sub> FN <sub>4</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	411,2190	3,95 / 3,89	191,1165
Venlafaxine	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	278,2111	4,10 / 4,05	260,1989
Clozapine	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>4</sub> <sup>+</sup>	327,1374	4,16 / 4,12	270,0775
Citalopram	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> FN <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	325,1712	4,13 / 4,06	262,1009
Quetiapine	C <sub>21</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	384,1739	4,21 / 4,19	253,0776
Haloperidol	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> ClFNO <sub>2</sub> <sup>+</sup>	376,1473	4,18 / 4,16	165,0697
Paroxetine	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> FNO <sub>3</sub> <sup>+</sup>	330,1501	4,33 / 4,32	192,1169
Carbamazepine	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	237,1021	4,70 / 4,48	194,0951
Amitriptyline	C <sub>20</sub> H <sub>24</sub> N <sup>+</sup>	278,1903	4,43 / 4,45	233,1308
Fluvoxamine	C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup>	319,1210	4,46 / 4,48	200,0652
Fluoxetine	C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> F <sub>3</sub> NO <sup>+</sup>	310,1416	4,49 / 4,52	148,1110
Norfluoxetine	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> F <sub>3</sub> NO <sup>+</sup>	296,1257	4,49 / 4,53	134,0952
Sertraline	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	306,0812	4,57 / 4,63	275,0370
N-desmethyl-sertraline	C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> Cl <sub>2</sub> N <sup>+</sup>	292,0656	4,65 / 4,73	231,1181
Bezafibrate	C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> ClNO <sub>4</sub> <sup>+</sup>	362,1144	5,14 / 4,90	316,1078
Budensonide	C <sub>25</sub> H <sub>35</sub> O <sub>6</sub> <sup>+</sup>	431,2423	5,55 / 5,33	413,2293
Atenolol	C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	267,1703	3,35 / 3,34	225,1218
Sulfaquinoxaline	C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S <sup>+</sup>	301,0754	4,27 / 4,06	235,0767
Valsartan	C <sub>24</sub> H <sub>30</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub> <sup>+</sup>	436,2343	5,20 / 4,95	418,2208
Diazepam	C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	285,0789	5,26 / 5,06	257,0822
Phenazone	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sup>+</sup>	189,1022	4,05 / 3,88	161,1060

## 9.2 Επικύρωση Μεθόδου

Η επικύρωση της αναλυτικής μεθόδου βασίστηκε σε πρωτόκολλα διασφάλισης ποιότητας και ελέγχου ποιότητας (QA/QC). Η ακρίβεια της μεθόδου μελετήθηκε ως συνδυασμός της επί τοις εκατό ανάκτησης (%Recovery, %R) και της πιστότητας. Η πιστότητα είναι εκφρασμένη ως επαναληψιμότητα εντός της ίδιας ημέρας (repeatability, RSD<sub>r</sub>) και ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα (within-lab-reproducibility, RSD<sub>R</sub>). Μελετήθηκαν επίσης τα όρια ανίχνευσης (limit of detection, LOD) και τα όρια ποσοτικοποίησης (limit of quantification, LOQ) της μεθόδου, η γραμμικότητα (linearity), η

αποτελεσματικότητα της μεθόδου (%Process efficiency), η επίδραση του υποστρώματος (matrix effect) και η αβεβαιότητα της μεθόδου μαζί με την αναλογία Horrat. Πραγματοποιήθηκε έλεγχος της γραμμικότητας (linearity) κατασκευάζοντας καμπύλη αναφοράς προσομοιωμένου υποστρώματος (matrix-matched calibration curves) οκτώ σημείων. Για τον έλεγχο της γραμμικότητας εξετάστηκε αν η ευθεία ακολουθεί τη γραμμική παλινδρόμηση, της οποίας οι συντελεστές υπολογίζονται με τη μέθοδο των ελαχίστων τετραγώνων.

Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν με την πραγματοποίηση πέντε διαδοχικών εκχυλίσεων (n=5) εμβολιασμένων δειγμάτων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g). Ταυτόχρονα εκχυλίστηκε και ένα τυφλό δείγμα, ώστε η συγκέντρωση τυχόν αναλυτών που υπήρχαν στο δείγμα πριν τον εμβολιασμό να αφαιρεθεί από τις συγκεντρώσεις που υπολογίστηκαν για τα εμβολιασμένα δείγματα. Για τον υπολογισμό της % ανάκτησης συγκρίθηκε η συγκέντρωση μετά την εφαρμογή της εκχύλισης με την αρχική συγκέντρωση εμβολιασμού, με βάση την Εξίσωση 2:

$$\% R = \frac{C \text{ πειραματική} - C \text{ τυφλού}}{C \text{ εμβολιασμού}} \times 100 \quad (2)$$

Η πιστότητα της μεθόδου προσδιορίστηκε ως η σχετική τυπική απόκλιση (Relative Standard Deviation, RSD) που προκύπτει για πέντε διαδοχικές εκχυλίσεις (n=5) εμβολιασμένου δείγματος την ίδια ημέρα, από τον ίδιο αναλυτή, οπότε εκφράζει την επαναληψιμότητα καθώς και για την ίδια διαδικασία σε πέντε διαφορετικές μέρες, οπότε εκφράζει την αναπαραγωγιμότητα. Οι τιμές της σχετικής τυπικής απόκλισης που θεωρούνται αποδεκτές είναι  $\leq \pm 20\%$ .

Για να συσχετιστεί η επίδραση της μήτρας και οι ληφθείς ανακτήσεις προσδιορίζεται η αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Process efficiency, %PE) που δίνεται στην Εξίσωση 3. Πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ του εμβαδού του εμβολιασμένου δείγματος στην αρχή πριν την εκχύλιση και του εμβαδού πρότυπου διαλύματος στην αντίστοιχη συγκέντρωση εμβολιασμού. Υπολογίστηκε το %PE και στα τρία επίπεδα εμβολιασμού (25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g) και λήφθηκε ο μέσος όρος της αποτελεσματικότητας της μεθόδου.

$$\% PE = \frac{\text{Εμβαδόν εμβολιασμένου δείγματος πριν την εκχύλιση}}{\text{Εμβαδόν πρότυπου διαλύματος}} \times 100 \quad (3)$$

Ο προσδιορισμός της αβεβαιότητας μπορεί να επιτευχθεί σε γενικές γραμμές με βάση δύο προσεγγίσεις: τη μοντελοποιημένη προσέγγιση (ISO GUM Modeling approach) και τη στατιστική προσέγγιση που στηρίζεται σε δεδομένα επικύρωσης (Single laboratory validation approach, SLV). Και οι δύο προσεγγίσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της αβεβαιότητας στην ανάλυση υγρής χρωματογραφίας με φασματοσκοπία μάζας. Στη παρούσα διπλωματική εργασία για τον προσδιορισμό της αβεβαιότητας εφαρμόστηκε η στατιστική προσέγγιση (SLV) στην οποία δεν διεξάγεται λεπτομερής έρευνα των πηγών αβεβαιότητας. Αντ' αυτού εξετάζονται και ποσοτικοποιούνται πολύ γενικές συνεισφορές στην αβεβαιότητα, οι οποίες περιλαμβάνουν έναν μεμονωμένο αριθμό πηγών αβεβαιότητας. Η πιο γνωστή επισημοποίηση αυτής της προσέγγισης έγινε από τη Nordtest (Kruve et al., 2015). Στον οδηγό που δημοσίευσαν υπολογίζουν τη συνδυασμένη τυπική αβεβαιότητα ( $U_c$ ) (Εξίσωση 4) η οποία αποτελείται από την ακρίβεια της επαναληψιμότητας μέσα στην ίδια μέρα ( $U_{Rw}$ ) και την αβεβαιότητα λόγω πιθανού συστηματικού σφάλματος του εργαστηρίου/μεθόδου ( $U_{bias}$ ). Στη συνέχεια από την Εξίσωση 5 υπολογίζεται η διευρυμένη αβεβαιότητα ( $U$ ) και συμπληρώνεται στην αναφορά (Krysell et al., 2003).

$$U_c = \sqrt{(U_{Rw})^2 + (U_{bias})^2} \quad (4)$$

$$U = 2 * U_c \quad (5)$$

Ο όρος  $U_{Rw}$  συνήθως λαμβάνεται είτε από διαγράμματα ελέγχου είτε από τη τυπική απόκλιση μίας σειράς επαναλήψιμων μετρήσεων ( $S_{Rw}$ ). Ο όρος  $bias$ , δηλαδή συστηματικό σφάλμα ενός εργαστηρίου ή μίας μεθόδου σημαίνει τη διαφορά μεταξύ της μέσης μετρούμενης τιμής από μία μεγάλη σειρά αποτελεσμάτων και μιας αποδεκτής τιμής αναφοράς. Η μέτρηση της πιστότητας εκφράζεται κανονικά με το  $bias$ . Έτσι, η αβεβαιότητα λόγω του  $bias$  προκύπτει από την Εξίσωση 6, όπου ο όρος  $RMS_{bias}$  αποτελεί τη μέση ρίζα των τετραγώνων των συστηματικών σφαλμάτων και ο όρος  $U_{Cref}$  αποτελεί την αβεβαιότητα της πιστοποιημένης τιμής (Krysell et al., 2003).

$$U_{bias} = \sqrt{(RMS_{bias})^2 + (U_{Cref})^2} \quad (6)$$

Η τελευταία παράμετρος που μελετήθηκε για την αποδοχή και επικύρωση της μεθόδου Quechers ήταν η αναλογία Horwitz (HorRat). Η τιμή αυτή είναι μια απλή παράμετρος απόδοσης που αντικατοπτρίζει την αποδοχή μιας χημικής ανάλυσης σε σχέση με την

ακρίβεια. Η αναλογία HorRat παρέχει έναν δείκτη εργαστηριακής ακρίβειας ως συνάρτηση της συγκέντρωσης σε όλο το πεδίο της πρακτικής αναλυτικής χημείας. Είναι ο λόγος της σχετικής τυπικής απόκλισης RSD μεταξύ των εργαστηρίων (αναπαραγωγιμότητα),  $RSD_R$ , σε ποσοστό, όπως υπολογίζεται από μια διεργαστηριακή δοκιμή μεθόδου, προς το προβλεπόμενο RSD,  $PRSD_R$ , σε ποσοστό όπως υπολογίζεται από μία απλή εκθετική εξίσωση (Εξίσωση 7) όπου C είναι η μέση συγκέντρωση που βρίσκεται, εκφρασμένη ως κλάσμα μάζας. Παραδόξως, αυτή η αναλογία είναι λίγο πολύ ανεξάρτητη της αναλυόμενης ουσίας, της μεθόδου και της μήτρας. Η σχετική τυπική απόκλιση εντός του εργαστηρίου  $RSD_I$  (επαναληψιμότητα), αποτελεί συνήθως το μισό έως τα δύο τρίτα του RSD του εργαστηρίου.

$$RSD_R, \% = 2 C^{-0.15} \quad (7)$$

Η τιμή HorRat είναι πλέον ένα από τα κριτήρια αποδοχής για πολλές από τις πρόσφατα υιοθετημένες χημικές μεθόδους ανάλυσης όπως της AOAC INTERNATIONAL, της Ευρωπαϊκής Ένωσης και άλλων ευρωπαϊκών οργανισμών που ασχολούνται με την ανάλυση τροφίμων (π.χ., Ευρωπαϊκή Επιτροπή Τυποποίησης και Σκανδιναβική Αναλυτική Επιτροπή). Το αποδεκτό εύρος για τη τιμή HorRat είναι από 0,5 έως 2. Όταν η τιμή ισούται με 1 υπάρχει ακριβής αντιστοιχία. Η ακρίβεια είναι καλύτερη από την αναμενόμενη εάν ο λόγος είναι μικρότερος από 1, και ανεπαρκής εάν είναι μεγαλύτερος από 1. Οι συνεχείς αποκλίσεις από την αναλογία στη χαμηλή πλευρά (τιμές <0,5) μπορεί να υποδηλώνουν μη αποδεκτό μέσο όρο ή άριστη εκπαίδευση και εμπειρία του αναλυτή. Αντίθετα συνεχείς αποκλίσεις στην υψηλή πλευρά (τιμές >2) μπορεί να υποδεικνύει ανομοιογένεια των δειγμάτων δοκιμής, ανάγκη για περαιτέρω βελτιστοποίηση μεθόδων ή εκπαίδευση αναλυτών, λειτουργία κάτω από το όριο προσδιορισμού ή μη ικανοποιητική μέθοδο (Horwitz & Albert, 2006). Οι τιμές της εκτεταμένης αβεβαιότητας και η αναλογία HorRat προσδιορίστηκαν με την πραγματοποίηση πέντε διαδοχικών εκχυλίσεων (n=5) εμβολιασμένων δειγμάτων σε τρία επίπεδα συγκέντρωσης (25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g).



### 9.3 Επίδραση του υποστρώματος

Η απόκριση των αναλυτών στο εκχύλισμα μπορεί να είναι είτε αυξημένη (ενίσχυση σήματος) είτε μειωμένη (καταστολή σήματος) σε σχέση με το σήμα τους στο διαλύτη. Πρόκειται για το ανεπιθύμητο φαινόμενο της «επίδρασης του υποστρώματος» (matrix effect), το οποίο δυσκολεύει την ανάλυση και μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την ανθεκτικότητα της μεθόδου, και κατά συνέπεια την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων (Weitzel et al., 2011). Κατά τις αναλύσεις με τη χρήση του LC-MS και κυρίως κατά τον ιοντισμό με ηλεκτροψεκασμό η επίδραση του υποστρώματος αποτελεί σημαντικό γεγονός αφού η πηγή ESI θεωρείται ιδιαίτερα επιρρεπής στο να ιονίζει άλλες ουσίες. Έτσι, η επίδραση υποστρώματος προκαλείται κυρίως από τη συνέκλουση συστατικών από το υπόστρωμα, τα οποία επηρεάζουν την ικανότητα ιοντισμού των αναλυτών. Συγκεκριμένα, τα συστατικά του υποστρώματος ανταγωνίζονται με τους αναλύτες για την πρόσβαση στην επιφάνεια των σταγονιδίων. Επίσης, έχει αναφερθεί η επίδραση του υποστρώματος σε περιπτώσεις όπου οι φαρμακευτικές ουσίες προσροφούνται στην οργανική ύλη μέσα στα δείγματα, με αποτέλεσμα να προκαλείται μείωση της συγκέντρωσης των ελεύθερα διαλυμένων ουσιών και να παρεμποδίζεται έτσι η ανίχνευσή τους (Κοσμά, 2013). Τέλος, η ύπαρξη διαφόρων παρεμποδιζουσών ουσιών στο αρχικό υπόστρωμα έχει ως αποτέλεσμα την αλλοίωση των χρωματογραφικών κορυφών (αύξηση της γραμμής αναφοράς-base line) και κατ' επέκταση τις λανθασμένες μετρήσεις στο εμβαδό τους (Renew & Huang, 2004). Η επίδραση του υποστρώματος εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως ο τύπος του δείγματος, η προκατεργασία που υφίσταται, η τεχνική εκχύλισης ή/και καθαρισμού, η σύσταση της κινητής φάσης, η γεωμετρία και ο σχεδιασμός της πηγής ιοντισμού ηλεκτροψεκασμού κ.ά. Η επίδραση του υποστρώματος εκτιμήθηκε με την ακόλουθη εξίσωση (8):

$$\% \text{ ME} = \left( \left( \frac{\text{Κλίση της καμπύλης αναφοράς στο εκχύλισμα}}{\text{Κλίση της καμπύλης αναφοράς στο διαλύτη}} \right) - 1 \right) \times 100 \quad (8)$$

Όταν το ME είναι 0% δεν υφίσταται καμία επίδραση μεταξύ υποστρώματος και αναλύτη. Όταν οι τιμές της ME είναι μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ όταν είναι μεγαλύτερες το ενισχύει. Για τιμές ME% μεταξύ -20% και 20% θεωρείται πως το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος και η επίδραση θεωρείται μη σημαντική. Για τιμές μεταξύ -50% και -20% ή 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια, ενώ για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή (Nannou et al., 2018).

## **IV. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ**

### ***Κεφάλαιο 10***

#### ***Βελτιστοποίηση της μεθόδου Quechers για την εκχύλιση φαρμακευτικών ενώσεων από στερεά υποστρώματα***

##### ***A. Βελτιστοποίηση μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ουσιών στη λυματολάσπη***

###### ***10.1 Εισαγωγή***

Η Quechers είναι μία απλή και γρήγορη τεχνική εκχύλισης που εφαρμόστηκε για πρώτη φορά για την ανίχνευση φυτοφαρμάκων σε ποικίλα αγροδιατροφικά προϊόντα υψηλής περιεκτικότητας σε νερό. Η κλασική αυτή μέθοδος συνεχώς βελτιώνεται και πλέον είναι κατάλληλη και αποτελεσματική για την ανάλυση όλο και περισσότερων αναλυτών και διαφορετικών υποστρωμάτων (González-curbelo et al., 2015). Η ανάλυση πολύπλοκων και επιβαρυσμένων υποστρωμάτων, όπως είναι η λυματολάσπη, απαιτεί την κατάλληλη προκατεργασία του δείγματος ώστε να επιτευχθεί μία επαναλήψιμη και επαρκώς ευαίσθητη ανάλυση με χαμηλά όρια ανίχνευσης (στην περιοχή των ng/g) (Perestrelo et al., 2019). Για την εφαρμογή της Quechers μελετήθηκε τόσο το πρώτο στάδιο της εκχύλισης όσο και το δεύτερο στάδιο του καθαρισμού (clean-up) έτσι ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη επίδοση της μεθόδου για τις προσδιοριζόμενες ενώσεις, οι οποίες παρουσιάζουν διαφορετικά φυσικοχημικά χαρακτηριστικά και δυσχεραίνουν τη βελτιστοποίηση της μεθόδου. Μετά από τη σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση εφαρμόστηκε το πρωτόκολλο CEN standard Method EN 15662 για την βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου. Η μέθοδος CEN προσθέτει ρυθμιστικά κιτρικά άλατα (1g κιτρικό νάτριο και 0,5 g σεσκιυδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου) με σχετικά χαμηλή ρυθμιστική ικανότητα ώστε να προσαρμόσει το pH του διαλύτη εκχύλισης κοντά στο 5, το οποίο είναι ιδανικό για την εκχύλιση ενώσεων από οποιοδήποτε υπόστρωμα. Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί ευρέως από πολλά εργαστήρια ανά τον κόσμο και είναι κατάλληλη για ενώσεις εξαρτώμενες από το pH (Choi, 2019). Το κριτήριο επιλογής των βέλτιστων παραμέτρων της εκχύλισης ήταν η απόδοση της εκχύλισης εκφρασμένη ως η εκατοστιαία ανάκτηση (%Recovery) των ενώσεων μετά τον εμβολιασμό του δείγματος λυματολάσπης σε συγκέντρωση 100 ng/g. Οι ανακτήσεις άνω του 100% εξηγούνται είτε από

κάποιο λάθος της μεθόδου είτε από συμβολές της εγγενούς ανομοιογένειας του στερεού υποστρώματος.

### ***10.2 Μελέτη παραμέτρων που επηρεάζουν την εκχύλιση QuEChERS***

Οι παράμετροι που επηρεάζουν την εκχύλιση μελετήθηκαν ξεχωριστά για το μίγμα των φαρμακευτικών ενώσεων, εξετάζοντας μία μόνο παράμετρο κάθε φορά και διατηρώντας τις υπόλοιπες σταθερές καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας. Τα βήματα πριν και μετά την εκχύλιση που βελτιστοποιήθηκαν ήταν:

- › Άλατα εκχύλισης Quechers
- › Η προσθήκη νερού και διαλύματος EDTA 0.1 M
- › Η μάζα της λυματολάσπης (0.5, 1 και 2 g)
- › Ο όγκος του εκχυλίσματος που οδηγείται προς καθαρισμό
- › Η μάζα των προσροφητικών υλικών καθαρισμού
- › Ο όγκος του καθαρού εκχυλίσματος που οδηγείται προς εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου

#### Βελτιστοποίηση της εκχύλισης ως προς τα άλατα

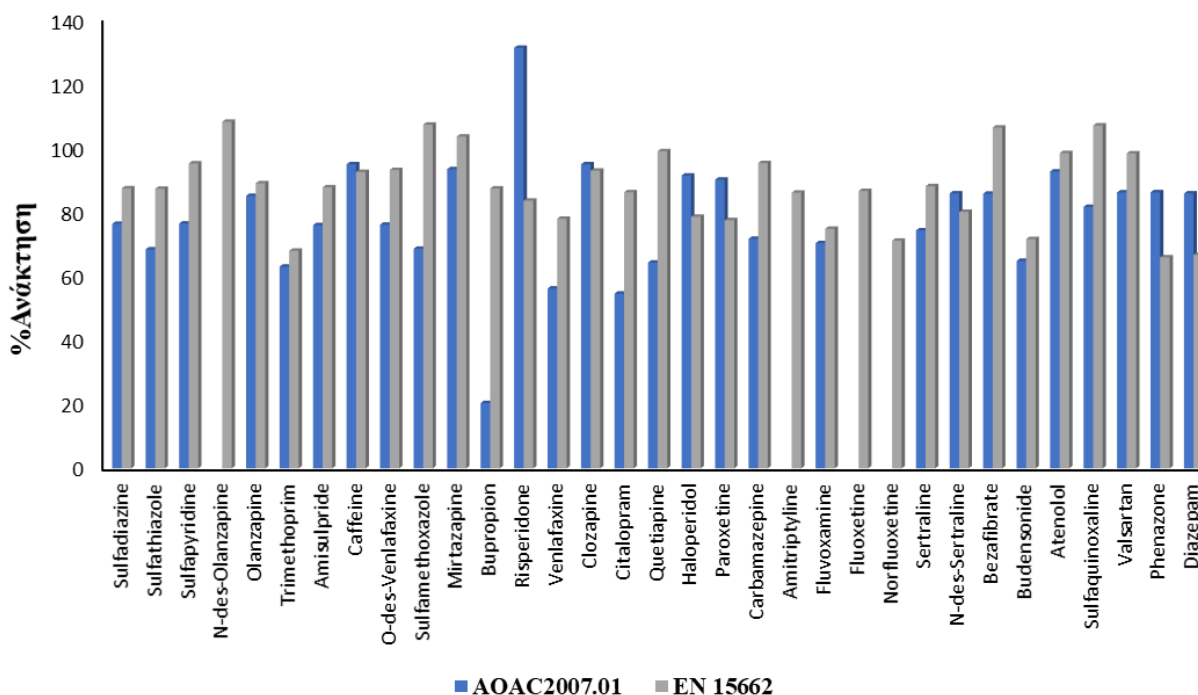
Το πρώτο βήμα για τη βελτιστοποίηση της μεθόδου ήταν η δοκιμή δύο διαφορετικών πρωτοκόλλων, τα οποία προτείνονται από τη διεθνή βιβλιογραφία. Αυτά τα δύο πρωτόκολλα παρουσιάζουν διαφορετικούς συνδυασμούς και ποσότητες αλάτων εκχύλισης χρησιμοποιώντας ως διαλύτη εκχύλισης το ακετονιτρίλιο. Τα πρωτόκολλα αυτά είναι:

- ❖ 6 g  $MgSO_4$  και 1.5 g  $CH_3COONa$  (acetic buffer) για τη μέθοδο AOAC2007.01 (AOAC, 2007)
- ❖ 4 g  $MgSO_4$ , 1 g  $NaCl$ , 1 g διένυδρο κιτρικό τρι-νάτριο ( $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$ ) και 0,5 g σεσκιδρίτη διβασικού κιτρικού νατρίου ( $C_6H_6Na_2O_7 \cdot 1.5H_2O$ ) (citrate buffers) για τη μέθοδο EN 15662 (British Standard, 2008)

Η προσθήκη του  $MgSO_4$  απομακρύνει το νερό και αυξάνει την ιοντική ισχύ του υδατικού μίγματος που προκύπτει, ενισχύοντας τον καλύτερο διαχωρισμό της οργανικής φάσης του ακετονιτρίλιου από την υδατική. Αντίστοιχα η προσθήκη του  $NaCl$  βοηθά στην άρση των πολικών παρεμποδίσεων και στην αποφυγή δημιουργίας γαλακτωμάτων. Επιπλέον, η χρήση τροποποιητών (buffers) όπως τα ακετοξικά και τα κιτρικά άλατα αποτελούν παραλλαγές της κλασικής μεθόδου και συμβάλουν στη ρύθμιση και τη διατήρηση του pH σταθερού στη βέλτιστη τιμή με ρυθμιστικά διαλύματα, εμποδίζοντας ταυτόχρονα τη διάσπαση των ευαίσθητων στο pH ενώσεων (Santana-Mayor et al., 2019).

Όπως παρουσιάζεται στο Σχήμα 10.1 οι ανακτήσεις ήταν ικανοποιητικές και συγκρίσιμες για τις περισσότερες ενώσεις και με τις δύο παραλλαγές. Ωστόσο, η χρήση της EN 15662 μεθόδου (δεύτερη) επιλέχθηκε ως η καλύτερη για το μίγμα των φαρμακευτικών ενώσεων, αφού είχε υψηλότερο μέσο όρο ανακτήσεων (%88) από την AOAC2007.01 μέθοδο (πρώτη) (%78). Συνολικά, από τις 33 φαρμακευτικές ενώσεις που μελετήθηκαν, οι 30 από αυτές παρουσίασαν ανακτήσεις που κυμάνθηκαν από 70-120% με την εφαρμογή της EN 15662, ενώ με την εφαρμογή της AOAC2007.01 ο αριθμός των ενώσεων που είχαν ανακτήσεις από 70-120% ήταν 25 και συγκεκριμένα τρεις ενώσεις (Amitriptyline, Fluoxetine, Norfluoxetine) δεν εκχυλίστηκαν καθόλου. Έτσι, η EN 15662 μέθοδος επιλέχθηκε και εφαρμόστηκε στη συνέχεια σε όλη την πειραματική διαδικασία βελτιστοποίησης της μεθόδου. Παρόμοια αποτελέσματα προκύπτουν και από άλλες εργασίες (Peysson & Vulliet, 2013), (Herrero et al., 2014), (Ajibola et al., 2020).

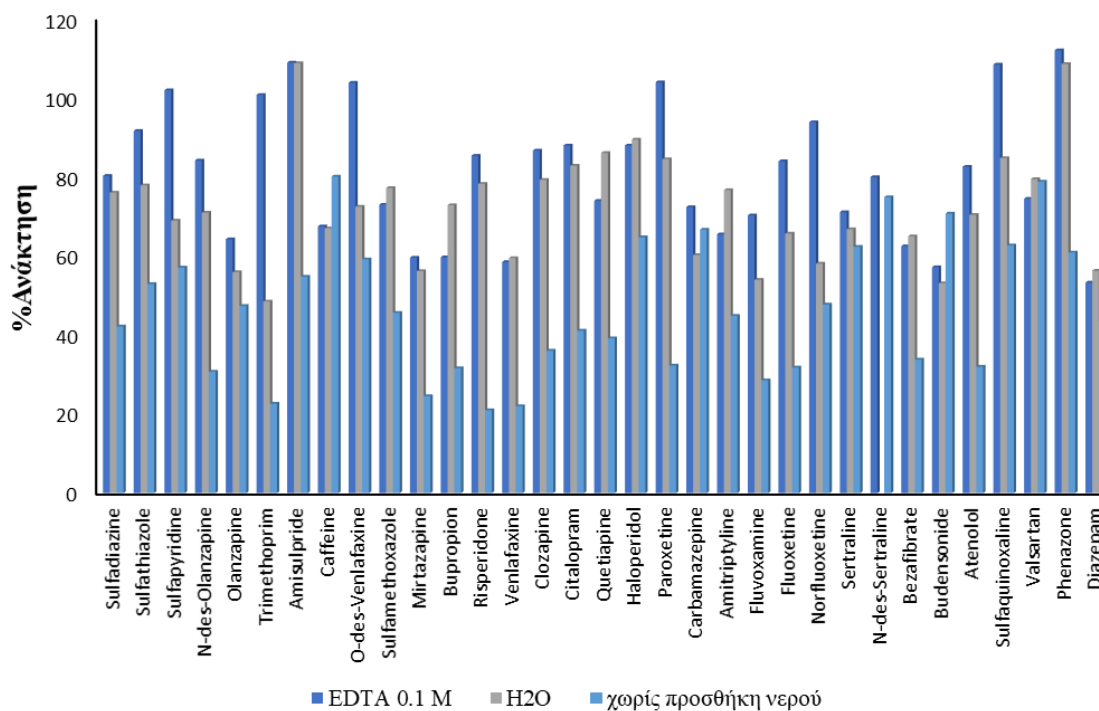
Αναλυτικότερα παρατηρήθηκαν ανακτήσεις εκτός των αποδεκτών ορίων για τις ενώσεις Bupropion (20%) και Risperidone (131%) με την πρώτη μέθοδο, ενώ με τη δεύτερη μέθοδο οι ανακτήσεις ήταν αρκετά βελτιωμένες. Στην πρώτη μέθοδο οι ενώσεις: Sulfathiazole (68%), Trimethoprim (63%), Sulfamethoxazole (68%), Bupropion (20%), Venlafaxine (56%), Citalopram (55%), Quetiapine (64%) και Budenonide (65%) είχαν σχετικά χαμηλότερες ανακτήσεις συγκριτικά με αυτές στη δεύτερη ενώ στη δεύτερη μέθοδο μόνο τρεις ενώσεις: Trimethoprim (68%), Diazepam (67%) και Phenazone (66%) εμφάνισαν λίγο χαμηλότερη ανάκτηση αλλά πολύ κοντά στο αποδεκτό όριο 70%. Τέλος, οι ενώσεις που εμφάνισαν ανάκτηση >90% για τη δεύτερη μέθοδο ήταν οι: Sulfapyridine, N-desmethyl-Olanzapine, O-desmethyl-Venlafaxine, Sulfamethoxazole, Mirtazapine, Bupropion, Clozapine, Quetiapine, Carbamazepine, Bezafibrate, Atenolol, Sulfaquinoxaline και Valsartan.



**Σχήμα 10.1:** Επίδραση των αλάτων εκχύλισης στις ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων.

#### Βελτιστοποίηση ως προς την προσθήκη νερού και διαλύματος EDTA 0,1 M

Επιπρόσθετα μελετήθηκε η προσθήκη νερού αλλά και διαλύματος EDTA 0,1 M πριν τη διαδικασία της εκχύλισης. Συγκεκριμένα η προσθήκη νερού στο δείγμα πριν την εκχύλιση έχει ως στόχο τη μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των αναλυτών του υποστρώματος αλλά και την καλύτερη κατανομή των αναλυτών μεταξύ της υδατικής και της οργανικής φάσης. Η προσθήκη του EDTA σε συγκέντρωση 0,1 M δρα ως χηλικός παράγοντας και αποτρέπει τη πρόσδεση/συμπλοκοποίηση δισθενών μεταλλικών κατιόντων όπως  $Mg^{2+}$  και  $Ca^{2+}$  με τους αναλύτες (Ajibola et al., 2020, Salvia et al., 2012). Εκτελέστηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας 10 ml  $H_2O$  και 10 ml EDTA τη φορά και ένα πείραμα χωρίς την προσθήκη νερού. Για τον υπολογισμό των ανακτήσεων κατασκευάστηκαν τρεις καμπύλες αναφορές που η καθεμία αντιστοιχούσε στον παράγοντα που εξεταζόταν.



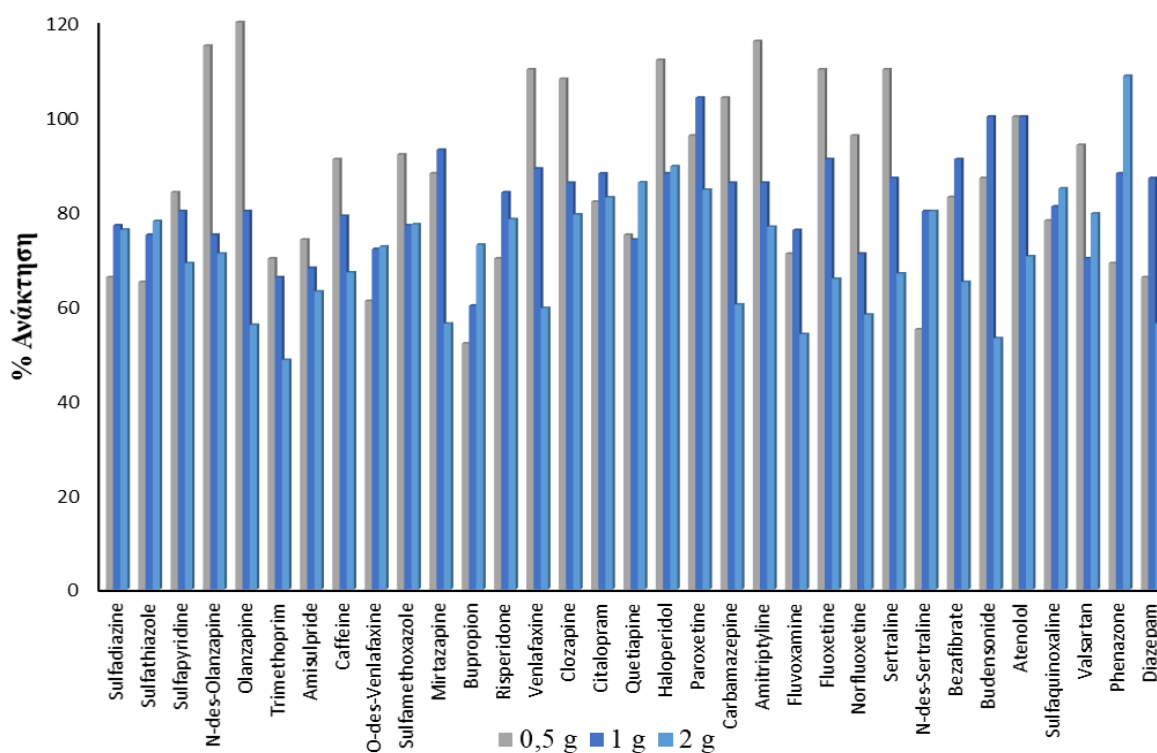
**Σχήμα 10.2:** Επίδραση της προσθήκης H<sub>2</sub>O και 0,1 M EDTA κατά το στάδιο ενυδάτωσης του δείγματος

Από το σχήμα 10.2 συμπεραίνεται πως η ενυδάτωση της λάσπης είτε με την προσθήκη νερού είτε με την προσθήκη του EDTA 0,1 M βελτιώνει σημαντικά τις ανακτήσεις καθώς επιτυγχάνεται καλύτερη ομογενοποίηση της ιλύος. Δισθενή κατιόντα είναι δυνατόν να υπάρχουν σε περιβαλλοντικά υποστρώματα και θα μπορούσαν να μειώσουν τις ανακτήσεις των αντιβιοτικών (Bourdat-Deschamps et al., 2014), γι' αυτό πραγματοποιήθηκαν πειράματα με τη προσθήκη ενός χηλικού μέσου, του EDTA. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων με την προσθήκη EDTA 0,1 M ήταν λίγο υψηλότερος (81%) συγκριτικά με το μέσο όρο των ανακτήσεων με την προσθήκη νερού (72%). Μόνο για τις ενώσεις (Sulfamethoxazole, Bupropion, Quetiapine, Haloperidol, Amitriptyline, Bezafibrate και Diazepam) η προσθήκη νερού λειτούργησε καλύτερα στην εκχύλιση αντί της προσθήκης EDTA, ενώ ο μεταβολίτης N-desmethyl-sertraline δεν εκχυλίστηκε καθόλου στο πείραμα με την προσθήκη νερού. Αντίθετα, η προσθήκη μόνο του διαλύτη εκχύλισης χωρίς την ενυδάτωση του δείγματος πριν από την εκχύλιση δεν είχε τα επιθυμητά αποτελέσματα αφού οι ανακτήσεις για τις περισσότερες ενώσεις ήταν αρκετά χαμηλές (30-40%) εκτός του επιτρεπτού ορίου. Γενικά, εάν το δείγμα περιέχει υψηλό ποσοστό υγρασίας όπως για παράδειγμα η ιλύς και έχει υποστεί κάποια επεξεργασία για την απομάκρυνση του νερού (π.χ λυοφυλίωση), το δείγμα θεωρείται πλέον ξηρό και επομένως συνίσταται ένα επιπλέον βήμα ενυδάτωσης πριν από την

εκχύλιση για τη βελτίωση του ποσοστού ανάκτησης, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Meng et al., 2021). Συνεπώς επιλέχθηκε η προσθήκη 10 ml EDTA 0.1 M για τη συνέχεια της μεθόδου Quechers.

#### Βελτιστοποίηση ως προς την μάζα της λυματολάσπης

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση της μάζας του αρχικού δείγματος ως προς την ανάκτηση των υπό εξέταση ουσιών από τη μήτρα. Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν 3 διαφορετικές μάζες λυματολάσπης 0,5, 1 και 2g και η σύγκριση έγινε με βάση τις ανακτήσεις που υπολογίζονται με διαλύματα αναφοράς προσαρμοσμένα στη μήτρα του δείγματος και εμβολιασμένο δείγμα σε συγκέντρωση 100 ng/L. Η τάση που αποτυπώνεται από το σχήμα 10.3 είναι ότι σχεδόν για όλα τα φάρμακα λαμβάνονται μεγαλύτερες ανακτήσεις σε μάζα 0,5 g και 1g λάσπης, γεγονός που οφείλεται στις λιγότερες παρεμποδίσεις της μήτρας λόγω της χρήσης μικρότερης ποσότητας δείγματος. Οι ανακτήσεις που λαμβάνονται είναι μέσα στα επιθυμητά όρια 70-120%. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων για δείγμα λάσπης 0,5 g είναι 87%, ελαφρώς υψηλότερος από το δείγμα λάσπης του 1 g (82%) και αρκετά μεγαλύτερος από το δείγμα λάσπης των 2 g (71%). Για τη συνέχεια της πορείας του πειράματος επιλέχθηκε η ποσότητα του 1 g λυματολάσπης.

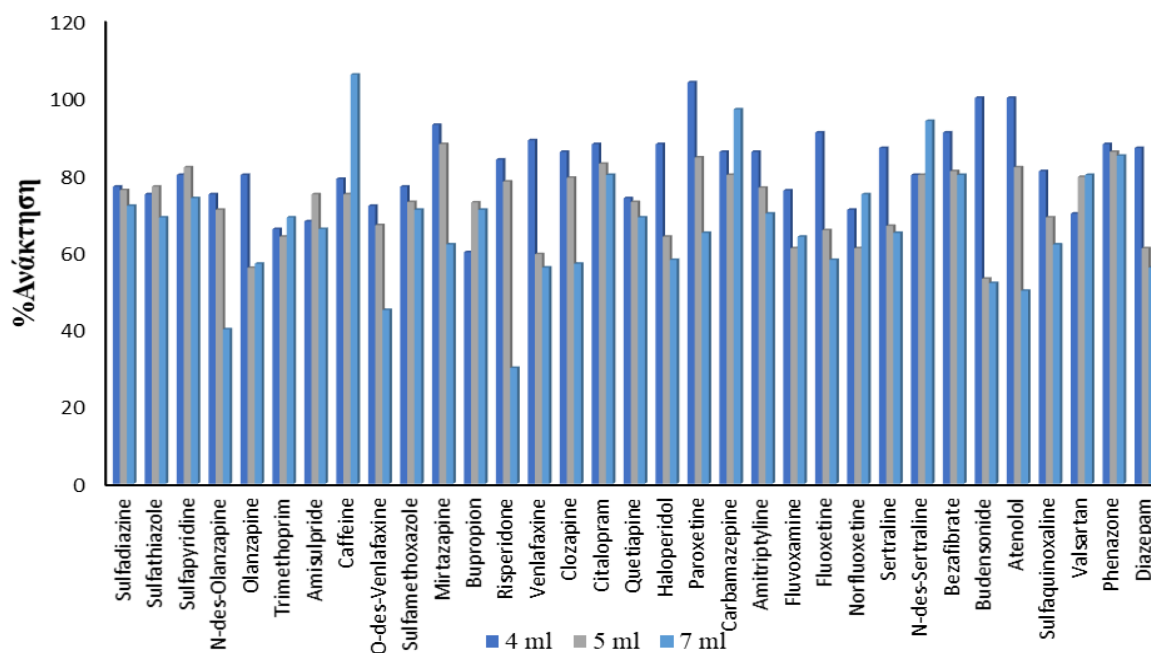


**Σχήμα 10.3:** Επίδραση της μάζας του αρχικού δείγματος για τη βελτιστοποίηση της εκχύλισης

### Βελτιστοποίηση του όγκου του εκχυλίσματος που οδηγείται προς καθαρισμό

Στο επόμενο βήμα εξετάστηκε ο όγκος του εκχυλίσματος που οδηγείται προς καθαρισμό συγκρίνοντας τις ανακτήσεις των επιλεγμένων ενώσεων στόχων. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 4 ml, 5 ml, και 7 ml. Από το σχήμα 10.4 εξάγεται το συμπέρασμα πως η μελέτη της συγκεκριμένης παραμέτρου δεν ήταν τόσο σημαντική ως προς τη βελτίωση των ανακτήσεων αφού όλες οι μελετώμενες ενώσεις εκχυλίστηκαν και είχαν ανακτήσεις μέσα στα επιτρεπτά όρια χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των πειραμάτων. Ωστόσο για τρεις ενώσεις ο όγκος που οδηγείται προς καθαρισμό φάνηκε να επηρεάζει τα ποσοστά ανάκτησης. Συγκεκριμένα στο πείραμα που χρησιμοποιήθηκε όγκος 7 ml οι μεταβολίτες N-des-Olanzapine και O-des-Venlafaxine παρουσίασαν ποσοστό ανάκτησης 40 και 45% αντίστοιχα, ενώ η ένωση Risperidone παρουσίασε ποσοστό ανάκτησης 30%. Σε αντίθετη περίπτωση η ένωση της καφεΐνης παρουσίασε την υψηλότερη ανάκτηση 106% χρησιμοποιώντας όγκο 7ml, γεγονός που οφείλεται είτε σε πειραματικό λάθος είτε σε αυξημένη επίδραση της μήτρας του υποστρώματος. Τα πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν όγκοι 4 ml και 5 ml εμφάνισαν παρόμοιες ανακτήσεις στην κλίμακα του 70-90% εκτός από τις ενώσεις Budenonide, Atenolol που είχαν καλύτερη ανάκτηση σε όγκο 4 ml, 100% και οι δύο, αντί του όγκου 5 ml, 53% και 82% αντίστοιχα. Εν συνεχεία για την ευκολία και την απλούστευση της μεθόδου ως προς τη βελτιστοποίηση, ο όγκος που επιλέχθηκε για τη συνέχεια του πειράματος ήταν τα 4 ml.





**Σχήμα 10.4:** Επίδραση του όγκου του εκχυλίσματος που οδηγείται προς καθαρισμό στη διαδικασία της εκχύλισης

#### Βελτιστοποίηση της μάζας των προσροφητικών υλικών καθαρισμού

Στις περισσότερες τεχνικές εκχύλισης φαρμακευτικών ενώσεων από πολύπλοκα υποστρώματα όπως είναι το έδαφος, τα ιζήματα και η λυματολάσπη, το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) αποτελεί απαραίτητο βήμα για τη βελτίωση της ευαισθησίας και της ανθεκτικότητας της μεθόδου, αλλά και την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων. Επιπλέον, ένας αποτελεσματικός καθαρισμός του δείγματος μειώνει σημαντικά την επιβάρυνση και επιμόλυνση των ενόργανων διατάξεων (Mejías et al., 2021). Με τον καθαρισμό επιτυγχάνεται η μείωση των παρεμποδίσεων που προέρχονται από το υπόστρωμα έτσι ώστε το τελικό αναλυτικό σήμα που θα ληφθεί, να είναι μεγαλύτερης έντασης. Το αντιδραστήριο τροποποιημένη με οκταδέκυλο πυριτία (C18, octadecyl silica) είναι ένα προσροφητικό καθαρισμού που χρησιμοποιείται αρκετά συχνά για την απομάκρυνση λιπιδίων και λιπόφιλων ενώσεων που περιέχονται στα εκχυλίσματα σε οργανικούς διαλύτες. Σε συνδυασμό με το πρώτο, το προσροφητικό πρωτογενής και δευτερογενής αμίνη (Primary Secondary Amine, PSA) είναι ένας ασθενής ιονανταλλάκτης και έχει επίσης αποδειχθεί αποτελεσματικός για την απομάκρυνση των όξινων παρεμβολών όπως τα χουμικά και τα φουλβικά οξέα (Dorival-García et al., 2013). Στην παρούσα διπλωματική εργασία εφαρμόστηκε η εκχύλιση στερεάς φάσης σε διασπορά (dispersive Solid Phase Extraction, d-

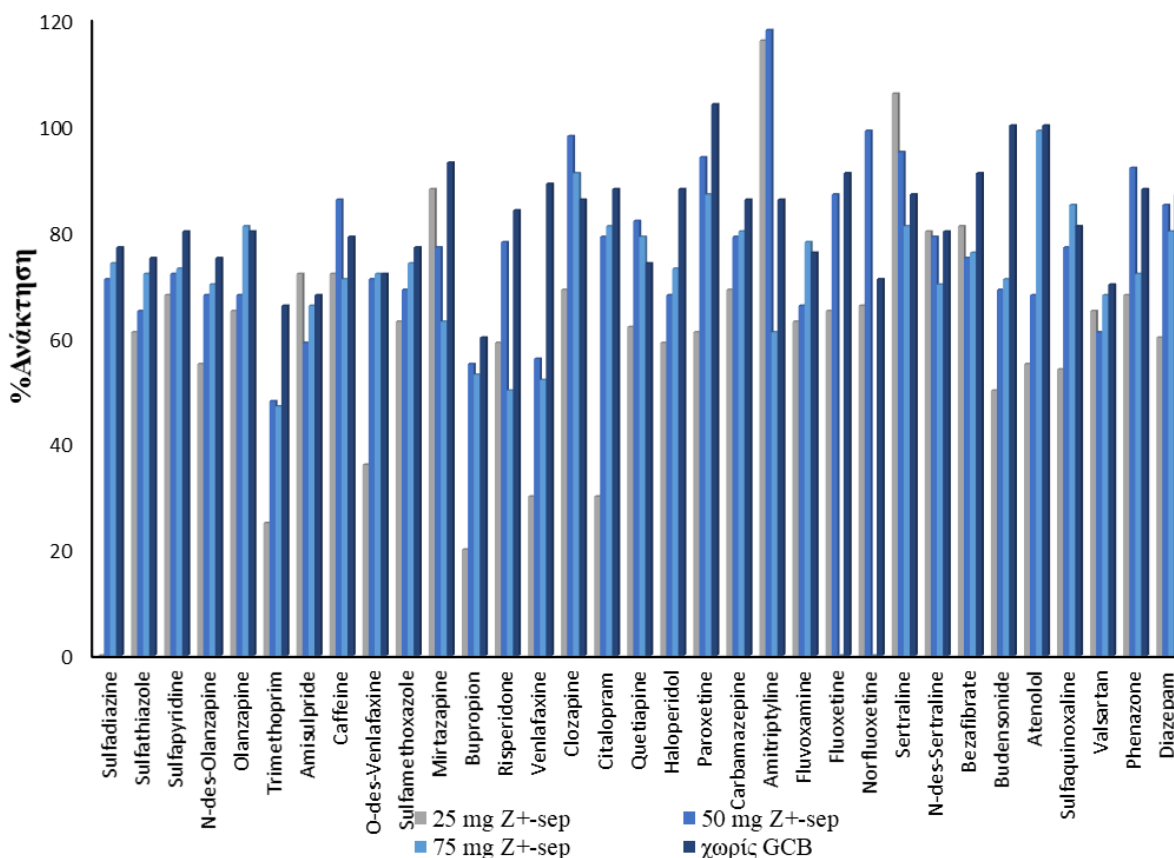
SPE) ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική καθαρισμού που ακολουθεί μετά τη τεχνική εκχύλισης Quechers. Τα κυριότερα βήματα που περιλαμβάνει η d-SPE είναι η ανάμειξη ενός κλάσματος της οργανικής φάσης με μικρή ποσότητα προσροφητικού υλικού, καλή ανάδευση και ομογενοποίηση του δείγματος και τελικά, φυγοκέντρωση για το διαχωρισμό μεταξύ των δύο φάσεων (Varela-marti & Gonza, 2020). Στη διατριβή αυτή χρησιμοποιήθηκαν τα κυριότερα εμπορικά διαθέσιμα προσροφητικά: (α) θειικό μαγνήσιο  $MgSO_4$ , (β) πρωτογενής και δευτερογενής αμίνη PSA, (γ)  $Z^+$ -sep και (δ) γραφίτικος ενεργός άνθρακας (GCB). Έγινε σύγκριση για τους παρακάτω συνδυασμούς προσροφητικών:

- 1) 150 mg  $MgSO_4$ , 50 mg PSA, 25 mg  $Z^+$ -sep, 2,5 mg GCB
- 2) 150 mg  $MgSO_4$ , 50 mg PSA, 50 mg  $Z^+$ -sep, 2,5 mg GCB
- 3) 150 mg  $MgSO_4$ , 50 mg PSA, 75 mg  $Z^+$ -sep, 2,5 mg GCB
- 4) 150 mg  $MgSO_4$ , 50 mg PSA, 75 mg  $Z^+$ -sep

ενώ η μάζα της λάσπης ήταν 1 g και ο όγκος προς εξάτμιση 2 mL σύμφωνα με το πρωτόκολλο του σχήματος 7.2. Η χρήση του PSA βοηθά στην απομάκρυνση σακχάρων, οργανικών οξέων, λιπαρών οξέων, ορισμένων χρωστικών, και άλλων συστατικών που μπορεί να συνεκλούνται από το υπόστρωμα. Το προσροφητικό  $Z^+$ -sep είναι ένα καινοτόμο αντιδραστήριο όμοιας δραστηριότητας με το προσροφητικό C18 που κυκλοφόρησε στην αγορά από την εταιρεία Supelco και συμβάλλει στην απομάκρυνση των λιπών και των μη πολικών ενώσεων από διάφορα υποστρώματα. Αποτελείται από οξείδιο του ζirkονίου και C18 συνδεδεμένα στα ίδια σωματίδια πυριτίας. Το C18 δεσμεύει τα λίπη μέσω υδρόφοβης αλληλεπίδρασης, ενώ το ζirkόνιο δρα ως οξύ κατά Lewis προσελκύνοντας ενώσεις δότες ηλεκτρονίων (Ponce-Robles et al., 2017). Αυτή η συγκεκριμένη αλληλεπίδραση δεν εξαρτάται από το υδατικό περιεχόμενο του εκχυλίσματος με αποτέλεσμα να προκύπτει ένα αποδοτικότερο βήμα καθαρισμού (d-SPE) (Herrero et al., 2014). Ένα άλλο προσροφητικό το οποίο εξετάζεται συχνά ως προς τη βελτιστοποίηση της μεθόδου αλλά εν τέλει δε χρησιμοποιείται στο τελικό πρωτόκολλο, είναι ο γραφίτικος ενεργός άνθρακας (GCB). Το GCB είναι ένα ισχυρό προσροφητικό ανάστροφης φάσης και χρησιμοποιείται για την αφαίρεση χρωστικών από τα δείγματα, όπως για παράδειγμα τη χλωροφύλλη και μπορεί να δώσει καθαρά εκχυλίσματα για ανάλυση (Nannou et al., 2019). Ωστόσο, επειδή περιέχει υψηλής πολικότητας ομάδες στην επιφάνειά του (κυρίως σύμπλοκα οξυγόνου), με δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, υπάρχει έντονη κατακράτηση των ενώσεων στόχων που διαθέτουν μία ή περισσότερες δραστικές ομάδες στη δομή τους (Cerqueira,

Caldas, et al., 2014, Hennion laboratoire, 2000). Συνεπώς οι ενώσεις προσροφούνται στην επιφάνειά του, δεν εκχυλίζονται και δίνουν χαμηλότερες ανακτήσεις.

Για την επιλογή του βέλτιστου συνδυασμού προσροφητικών με σκοπό τον αποτελεσματικό καθαρισμό του δείγματος λήφθηκαν υπόψη οι ανακτήσεις των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων που εκχυλίστηκαν προηγουμένως με τις βέλτιστες συνθήκες. Ο συνδυασμός 1) παρουσίασε τις χαμηλότερες ανακτήσεις με μέσο όρο 62% σε σύγκριση με τους υπόλοιπους συνδυασμούς προσροφητικών. Συγκεκριμένα το αντιβιοτικό Sulfadiazine δεν εκχυλίστηκε καθόλου με 25 mg Z<sup>+</sup>-sep, ενώ για τις ενώσεις Trimethoprim, Bupropion, Venlafaxine, Citalopram οι ανακτήσεις ήταν 25, 20, 30 και 30% αντίστοιχα. Επομένως ο συνδυασμός 1) απορρίφθηκε στην απόφαση επιλογής των βέλτιστων συνθηκών. Στη συνέχεια η διπλάσια ποσότητα του προσροφητικού Z<sup>+</sup>-sep, δηλαδή η χρήση 50 mg Z<sup>+</sup>-sep οδήγησε σε αρκετά υψηλότερες ανακτήσεις με το μέσο όρο να φτάνει το 76%. Με το συνδυασμό 2) εκχυλίστηκαν όλες οι ενώσεις και εμφάνισαν ανακτήσεις μέσα στα επιτρεπτά όρια 70-120% με εξαίρεση την ένωση Trimethoprim που συνεχίζει να εμφανίζει χαμηλή ανάκτηση στο 48%. Ακόμη, η χρήση 75 mg Z<sup>+</sup>-sep φάνηκε να βελτιώνει λίγο περισσότερο τις ανακτήσεις για κάποιες ενώσεις ενώ για κάποιες άλλες λειτούργησε αρνητικά. Όπως παρουσιάζεται και στο σχήμα 10.5, για όλες τις σουλφοναμίδες η χρήση 75 mg Z<sup>+</sup>-sep αύξησε το μέσο όρο ανακτήσεων από 72% σε 76%. Αντίθετα για τις ενώσεις Amisulpride, Mirtazapine, Risperidone, Amitriptyline, Phenazone, Sertraline και το μεταβολίτη N-des-Sertraline η αυξημένη ποσότητα Z<sup>+</sup>-sep μείωσε την ανάκτηση των ενώσεων ενώ η ένωση Fluoxetine και ο μεταβολίτης του Norfluoxetine δεν εκχυλίστηκαν. Τέλος για την εύρεση των ευνοϊκότερων συνθηκών καθαρισμού εκτελέστηκε ένα πείραμα με το συνδυασμό 4) χωρίς τη χρήση γραφιτικού άνθρακα. Στην περίπτωση αυτή οι ανακτήσεις για όλες τις εκχυλιζόμενες ενώσεις ήταν μέσα στα επιτρεπτά όρια χωρίς να αποκλίνει κάποια ανάκτηση. Στο συνδυασμό 4) ο μέσος όρος των ανακτήσεων ήταν 82% σε σχέση με το συνδυασμό 3) που ήταν 72% και περιλάμβανε τη χρήση 2,5 mg GCB. Συνεπώς είναι σαφές από το σχήμα ότι ο συνδυασμός 4) αποτελεί τον καλύτερο συνδυασμό προσροφητικών για την εκχύλιση των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων από τη λυματολάσπη, γι' αυτό και επιλέχθηκε για τη συνέχεια.

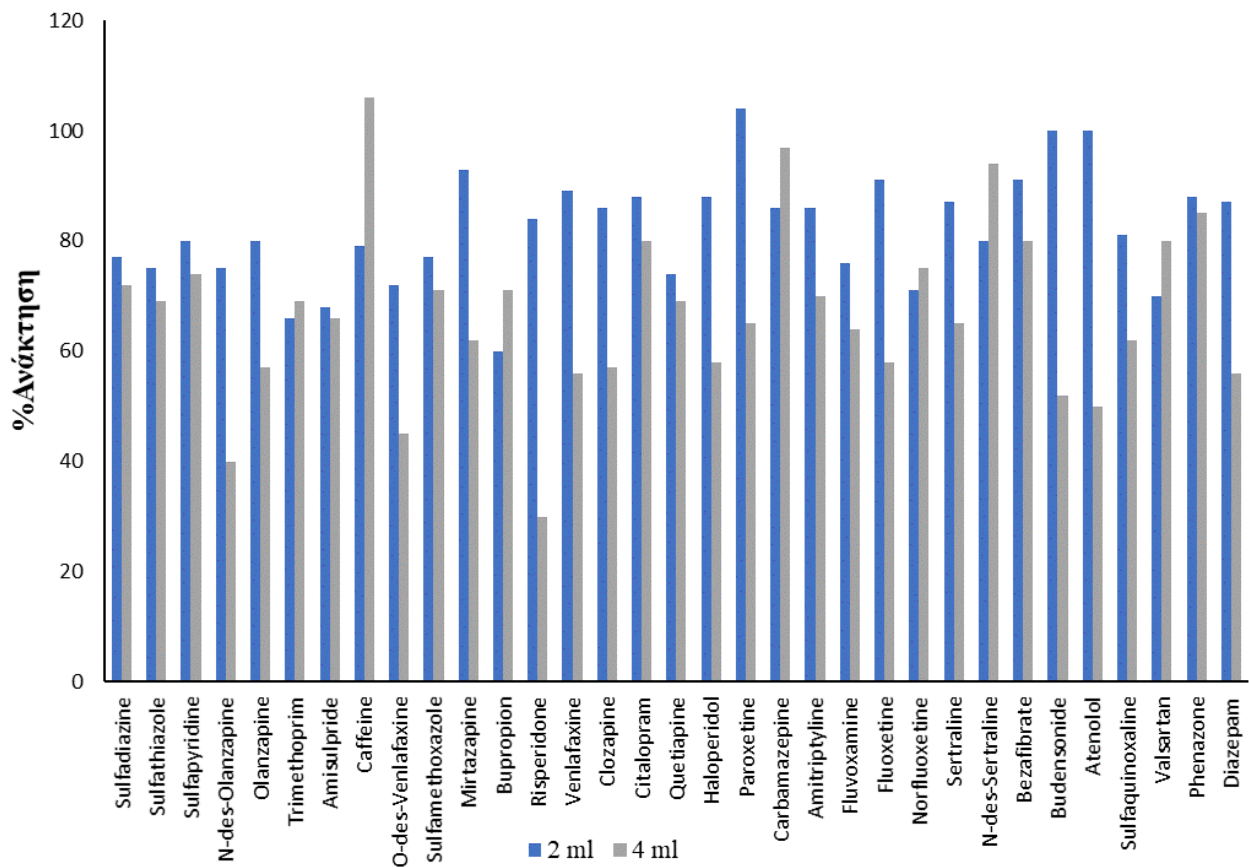


**Σχήμα 10.5:** Επίδραση MgSO<sub>4</sub>, PSA, Z<sup>+</sup>-sep και GCB στις ανακτήσεις των φαρμακευτικών ενώσεων.

### Βελτιστοποίηση του όγκου του καθαρού εκχυλίσματος που οδηγείται προς εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου

Στην επόμενη σειρά παραμέτρων βελτιστοποιήθηκε ο όγκος του διαλύματος που έπειτα από την εκχύλιση και τον καθαρισμό οδηγείται προς εξάτμιση υπό ήπιο ρεύμα αζώτου. Σκοπός είναι η εξάτμιση του ακετονιτριλίου, που χρησιμοποιήθηκε για την εκχύλιση, και η ανασύσταση των αναλυτών σε κινητή φάση συμβατή με το χρωματογραφικό σύστημα. Εξετάστηκαν οι περιπτώσεις εξάτμισης 4 mL και 2 mL του καθαρού εκχυλίσματος. Η σύγκριση γίνεται και εδώ με βάση τις ανακτήσεις που παρέχονται από την καμπύλη αναφοράς και σε εμβολιασμένο δείγμα 100 ng/g. Από το σχήμα 10.6 παρατηρείται αύξηση των ανακτήσεων σχεδόν για όλους τους αναλύτες χρησιμοποιώντας το μέγιστο βαθμό προσυγκέντρωσης 1 προς 4, δηλαδή τα 2 ml που εξατμίζονται και εν συνεχεία επαναδιαλύονται σε 0,5 ml. Όλες οι ανακτήσεις βρίσκονται μέσα στα επιτρεπτά όρια 70-120%. Ο μέσος όρος των ανακτήσεων χρησιμοποιώντας όγκο 4 ml ήταν 67% ενώ για όγκο 2

ml ήταν 82%. Ωστόσο για κάποιες ενώσεις λειτούργησε καλύτερα ο μικρότερος βαθμός προσυγκέντρωσης (1 προς 8) αφού εμφάνισαν καλύτερες ανακτήσεις. Συγκεκριμένα η ένωση Caffeine εμφάνισε ανάκτηση 106% έναντι 79%, το Bupropion με ανάκτηση 71% έναντι 60%, το Carbamazepine με 97% έναντι 86%, το N-des-Sertraline με 94% έναντι 80% και τέλος το Valsartan με ανάκτηση 80% έναντι 70%. Εφόσον η μέθοδος λειτούργησε καλύτερα για την πλειοψηφία των ενώσεων με τη χρήση 2 ml για συμπύκνωση σε ήπιο ρεύμα αζώτου, ο όγκος αυτός επιλέχθηκε για τη συνέχεια της πειραματικής διαδικασίας.



**Σχήμα 10.6:** Επίδραση του όγκου του καθαρού εκχυλίσματος που οδηγείται προς εξάτμιση σε ρεύμα αζώτου

## ***B. Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων στη λυματολάσπη***

### ***10.3 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου Quechers***

Η εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα λυματολάσπης. Αναλυτικότερα, εμβολιάστηκαν πέντε δείγματα ( $n=5$ ) τα οποία αναλύθηκαν μέσα στην ίδια μέρα, για να υπολογιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου ( $RSD_r$ ) και σε πέντε διαδοχικές ημέρες, για να υπολογιστεί παράλληλα η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ( $RSD_R$ ), συνθέτοντας έτσι την πιστότητα της μεθόδου. Τα επίπεδα εμβολιασμού για τις φαρμακευτικές ενώσεις ήταν 25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g. Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε μετά και την εφαρμογή της μεθόδου στα εμβολιασμένα δείγματα με το αντίστοιχο επίπεδο εμβολιασμού. Παράλληλα αναλύθηκαν και τυφλά δείγματα ώστε τυχόν συγκεντρώσεις των αναλυτών να αφαιρεθούν από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων δειγμάτων. Για τις περισσότερες ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ( $n=5$ ) για το χαμηλό επίπεδο κυμάνθηκαν από 60% (Trimethoprim, Bupropion) έως 98% (Paroxetine) ενώ για το μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 66% (Trimethoprim) έως 104% (Paroxetine). Για το μεγάλο επίπεδο εμβολιασμού οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 66% (Bupropion) έως 104% (Norfluoxetine). Όπως φαίνεται από τον πίνακα 10.1 οι ενώσεις Trimethoprim, Amisulpride και Bupropion εμφάνισαν σχετικά χαμηλές ανακτήσεις στα δύο επίπεδα εμβολιασμού 25 ng/g, 100 ng/g, 60% και 66%, 63% και 68%, 60% και 60% αντίστοιχα, ήταν όμως εντός των αποδεκτών ορίων.

Στον Πίνακα 10.1 παρουσιάζονται η επαναληψιμότητα της μεθόδου ( $\%RSD_r$ ) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ( $\%RSD_R$ ) στα τρία επίπεδα εμβολιασμού. Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα της μεθόδου ( $\%RSD_r$ ) ήταν μικρότερη από 19%, κυμαινόμενη από 3% έως 19% για επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, από 2% έως 16% για επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g και από 2% έως 16% για επίπεδο εμβολιασμού 250 ng/g. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ( $\%RSD_R$ ), ήταν μικρότερη από 20%, που είναι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 2% έως 17% για επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, από 4% έως 20% για επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g και από 2% έως 17% για επίπεδο εμβολιασμού 250 ng/g. Οι χαμηλές τιμές  $\%RSD$  είναι σημαντικές κατά την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, όπως η λυματολάσπη, λόγω των παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα αλλά και λόγω των περισσότερων σταδίων ανάλυσης με

συνέπεια τη μεγαλύτερη πιθανότητα εισαγωγής σφαλμάτων στην πειραματική διαδικασία. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί πως η ποσοτικοποίηση του Olanzapine, N-des-Olanzapine έγινε με το εσωτερικό πρότυπο d<sub>3</sub>-Olanzapine, του Mirtazapine, Clozapine, Quetiapine, Amitriptyline, Sertraline, N-des-Sertraline πραγματοποιήθηκε με το d<sub>6</sub>-Amitriptyline, του Risperidone, Haloperidol, Atenolol έγινε με το d<sub>4</sub>-Haloperidol, του Paroxetine, Fluvoxamine, Fluoxetine, Norfluoxetine έγινε με το d<sub>5</sub>-Fluoxetine και όλων των υπόλοιπων ενώσεων με το d<sub>10</sub>-Carbamazepine.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (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. Για τις μελετώμενες ενώσεις, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,3 ng/g έως 15 ng/g και από 2,1 ng/g έως 50 ng/g, αντίστοιχα. Τα χαμηλά όρια της μεθόδου αποδεικνύουν πως ο παράγοντας προσυγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετός για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων ακόμα και σε ίχνη.

Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης προσομοιωμένου υποστρώματος, επτά σημείων, που ακολούθησαν τη γραμμική παλινδρόμηση. Μια σειρά δειγμάτων εμβολιάστηκε με πρότυπα διαλύματα μίγματος των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων για εύρος συγκεντρώσεων από 5 ng/g έως 750 ng/g. Η μέθοδος παρουσίασε εξαιρετική γραμμικότητα καθώς ο συντελεστής συσχέτισης ( $r^2$ ) είχε για τις περισσότερες ενώσεις τιμές μεγαλύτερες από 0,99 και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,9677 έως 0,9997.

Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Process efficiency, %PE) ελέγχθηκε με την παρασκευή πρότυπων εμβολιασμένων διαλυμάτων σε διαλύτη ανασύστασης (H<sub>2</sub>O:MeOH με 0,1% FA), συγκέντρωσης 25, 100 και 250 ng/g και την παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων, πριν την εκχύλιση, σε συγκέντρωση 25, 100 και 250 ng/g. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ του εμβαδού του πρότυπου διαλύματος σε σχέση με το εμβαδό του εμβολιασμένου δείγματος στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Από τον πίνακα 10.1 και το σχήμα 10.7 φαίνεται ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 59% (Quetiapine, Diazepam) έως 97% (Mirtazapine) και η μέση αποτελεσματικότητα της μεθόδου για όλες τις ενώσεις ήταν περίπου 70%.

Τέλος, υπολογίστηκε η εκτεταμένη αβεβαιότητα της μεθόδου (%U) με βάση τη στατιστική προσέγγιση από τη Nordtest όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στο χαμηλό επίπεδο

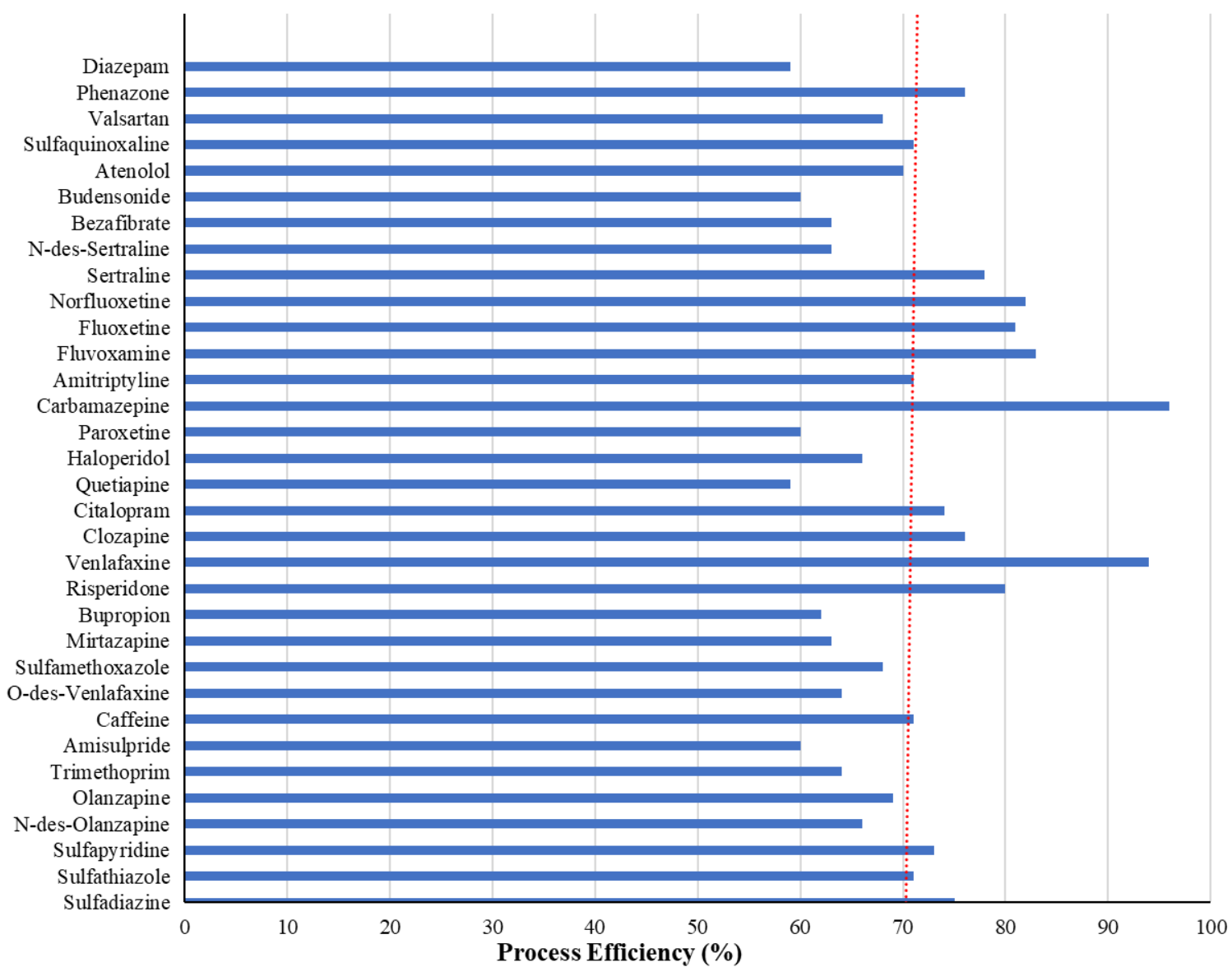
εμβολιασμού 25 ng/g, η %U ήταν μικρότερη από 27,88% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) για όλες τις ενώσεις και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 8% (Venlafaxine) έως 27% (Caffeine). Στο μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g η αποδεκτή τιμή αναφοράς της αβεβαιότητας ήταν 23,40%. Οι πειραματικές τιμές που υπολογίστηκαν κυμάνθηκαν από 8% (Sulfadiazine, Sulfamethoxazole) έως 21% (Caffeine, Bupropion). Στο επίπεδο εμβολιασμού 250 ng/g όλες οι %U που βρέθηκαν ήταν χαμηλότερες από 20,39% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) και κυμάνθηκαν από 4% (Sulfamethoxazole, Fluvoxamine, Norfluoxetine) έως 16% (Caffeine, Bupropion, Citalopram, Amitriptyline). Είναι λογικό πως όσο αυξάνει το επίπεδο εμβολιασμού να μειώνεται η επί τοις εκατό τιμή της αβεβαιότητας, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Maroto et al., 2001), (Rasul et al., 2018).

Επιπλέον στον πίνακα 10.1 παρουσιάζεται η τιμή HorRat στα τρία επίπεδα εμβολιασμού. Στο χαμηλότερο επίπεδο η τιμή αυτή είναι μικρότερη από 0,5 για τις περισσότερες ενώσεις, γεγονός που υποδηλώνει καλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων ως προς την επαναληψιμότητα, τις ανακτήσεις κλπ. Εξαιρέση αποτέλεσαν οι ενώσεις Olanzapine, Caffeine, O-des-Venlafaxine, Citalopram, Quetiapine, Carbamazepine και Atenolol, οι οποίες είχαν τιμή HorRat μεγαλύτερη από 0,5 αλλά μικρότερη από 1. Στην ίδια φιλοσοφία κυμάνθηκαν και οι τιμές HorRat στο επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g με τη χαμηλότερη τιμή να είναι 0,1 για την ένωση Trimethoprim ενώ η υψηλότερη τιμή 0,88 για την ένωση Fluoxetine. Στο μεγαλύτερο επίπεδο εμβολιασμού η αναλογία HorRat κυμάνθηκε από 0,06 για την ένωση Caffeine έως 0,68 για την ένωση Paroxetine.



**Πίνακας 10.1:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά επικύρωσης μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων σε υπόστρωμα λυματολάσπης

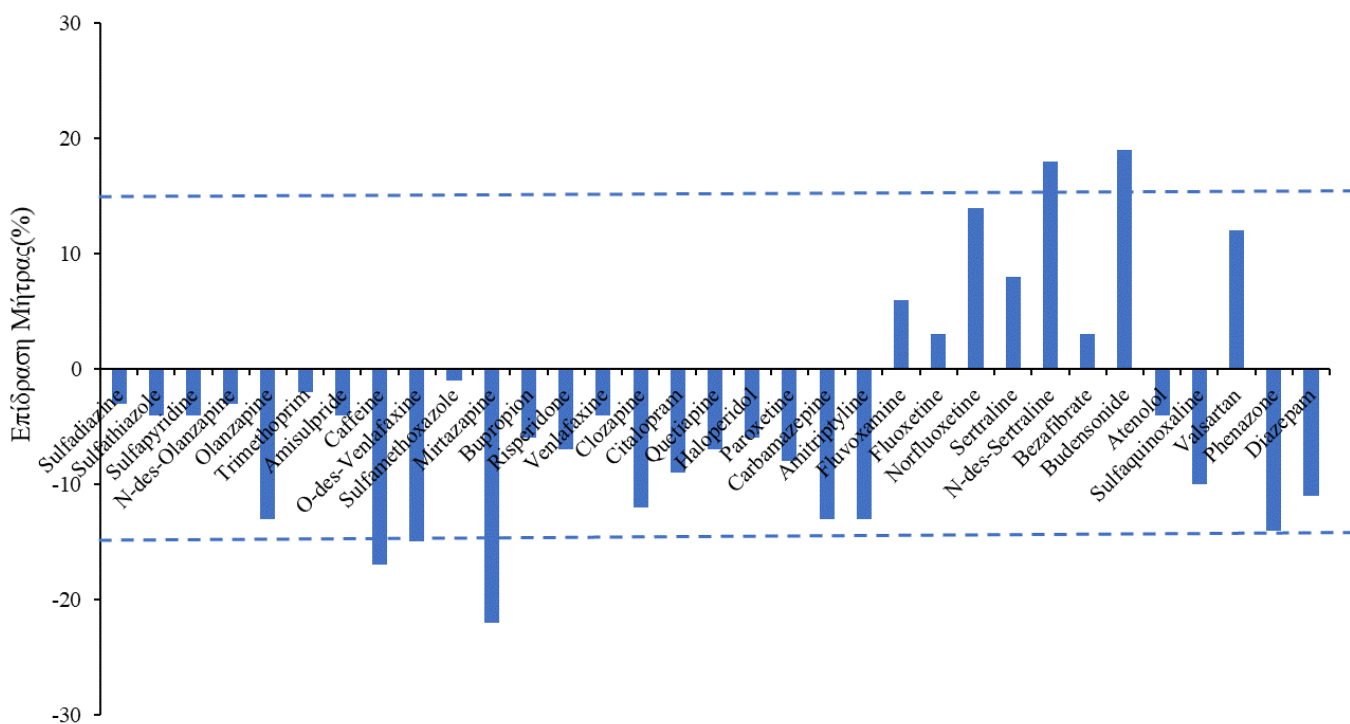
Αναλύτης	%Recoveries (n=5)			Καμπύλη αναφοράς προσαρμοσμένη στη μήτρα (ng ml <sup>-1</sup> )		LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Intra-day RSDr% (n=5)			Inter-day RSDr% (n=5)			%PE	%U / Horrat ratio		
	Επίπεδο εμβολιασμού ( ng g <sup>-1</sup> )			Γραμμικό εύρος	R <sup>2</sup>			Επίπεδο εμβολιασμού ( ng g <sup>-1</sup> )							Επίπεδο εμβολιασμού ( ng g <sup>-1</sup> )		
	25	100	250			25	100	250	25	100	250	25	100	250	25	100	250
Sulfadiazine	79	77	89	5-750	0,9932	8,1	24	5	9	10	2	9	12	75	11 / 0,34	8 / 0,33	9 / 0,39
Sulfathiazole	74	75	89	5-750	0,9958	7,5	25	3	6	6	3	10	13	71	11 / 0,35	12 / 0,07	7 / 0,26
Sulfapyridine	71	80	85	5-750	0,9940	7,5	25	6	7	9	5	6	12	73	10 / 0,32	10 / 0,34	7 / 0,29
N-des-Olanzapine	77	75	100	5-750	0,9952	2,1	7,1	4	2	10	6	17	11	66	19 / 0,23	12 / 0,33	11 / 0,48
Olanzapine	64	80	76	5-750	0,9928	1,9	6,2	6	5	8	9	7	13	69	23 / 0,73	11 / 0,41	12 / 0,26
Trimethoprim	60	66	81	5-750	0,9981	1,9	6,2	6	13	9	16	11	14	64	25 / 0,29	15 / 0,10	12 / 0,49
Amisulpride	63	68	70	5-750	0,9946	0,5	1,8	8	15	4	10	10	11	60	14 / 0,25	9 / 0,20	12 / 0,22
Caffeine	64	79	75	5-750	0,9912	3,8	12,5	3	13	6	16	4	3	71	27 / 0,85	21 / 0,35	16 / 0,06
O-des-venlafaxine	68	72	78	5-750	0,9990	1,4	4,5	4	7	5	14	5	10	64	18 / 0,58	12 / 0,35	13 / 0,49
Sulfamethoxazole	78	77	82	5-750	0,9968	9,5	31,2	4	6	4	8	4	2	68	13 / 0,30	8 / 0,28	4 / 0,19
Mirtazapine	65	93	85	5-750	0,9997	0,9	3,1	5	10	9	6	6	8	63	26 / 0,49	13 / 0,48	10 / 0,34
Bupropion	60	60	66	5-750	0,9970	3,3	10	4	6	10	6	20	8	62	24 / 0,30	21 / 0,69	16 / 0,62
Risperidone	82	84	87	5-750	0,9948	1,2	3,8	8	7	5	14	13	4	80	8 / 0,26	10 / 0,23	12 / 0,50
Venlafaxine	83	89	90	5-750	0,9992	0,9	3,1	6	12	16	12	12	4	94	14 / 0,42	10 / 0,35	8 / 0,35
Clozapine	80	86	90	5-750	0,9885	0,7	3	11	13	6	12	4	4	76	17 / 0,47	13 / 0,51	12 / 0,51
Citalopram	80	88	96	5-750	0,9950	0,6	2,1	10	8	3	10	9	10	74	23 / 0,58	18 / 0,68	16 / 0,09
Quetiapine	67	74	87	5-750	0,9965	0,6	2,1	14	16	9	15	9	11	59	18 / 0,56	12 / 0,27	13 / 0,55
Haloperidol	74	88	86	5-750	0,9958	2,2	7,1	14	10	7	17	15	4	66	14 / 0,43	13 / 0,28	10 / 0,39
Paroxetine	98	104	102	5-750	0,9913	1,1	3,6	5	2	5	3	15	17	60	10 / 0,32	10 / 0,24	9 / 0,34
Carbamazepine	74	86	88	5-750	0,9921	0,3	1,1	9	3	5	9	7	6	96	19 / 0,56	16 / 0,64	9 / 0,20
Amitriptyline	72	86	106	5-750	0,9972	0,6	1,9	14	6	7	10	6	4	71	24 / 0,30	12 / 0,46	16 / 0,52
Fluvoxamine	79	76	83	5-750	0,9992	3,8	12,5	19	3	2	11	29	12	83	14 / 0,41	17 / 0,20	4 / 0,15
Fluoxetine	88	91	104	5-750	0,9946	1,9	6,2	12	14	8	31	20	11	81	9 / 0,27	11 / 0,40	8 / 0,22
Norfluoxetine	64	71	79	5-750	0,9963	0,7	2,3	9	13	10	36	15	16	82	10 / 0,29	12 / 0,26	4 / 0,16
Sertraline	74	87	89	5-750	0,9961	0,9	3,1	8	12	4	8	5	10	78	22 / 0,38	15 / 0,48	9 / 0,38
N-des-Sertraline	79	80	96	5-750	0,9931	5,5	16,6	13	14	8	6	5	5	63	18 / 0,30	11 / 0,42	8 / 0,29
Bezafibrate	78	91	93	5-750	0,9677	3,8	12,5	13	10	9	2	6	3	63	13 / 0,43	16 / 0,65	13 / 0,13
Budensonide	93	100	94	5-750	0,9969	1,9	6,2	9	10	7	6	10	13	60	16 / 0,45	16 / 0,63	15 / 0,43
Atenolol	63	100	95	5-750	0,9584	0,7	2,5	8	7	6	1	11	10	70	24 / 0,72	16 / 0,64	12 / 0,07
Sulfaquinolaxaline	90	81	97	5-750	0,9942	1,5	5	5	2	9	2	8	2	71	12 / 0,35	14 / 0,20	10 / 0,21
Valsartan	63	70	75	5-750	0,9666	0,7	2,3	3	6	5	10	5	5	68	22 / 0,22	12 / 0,37	12 / 0,49
Diazepam	71	88	86	5-750	0,9938	1,9	6,2	3	8	2	3	8	6	76	22 / 0,23	15 / 0,54	12 / 0,37
Phenazone	65	87	89	5-750	0,9988	0,9	3,1	4	3	11	3	4	8	59	14 / 0,33	15 / 0,39	15 / 0,29



**Σχήμα 10.7:** Αποτελεσματικότητα της μεθόδου (%PE) για τις προσδιοριζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις

#### 10.4 Επίδραση υποστρώματος

Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι παράγοντες στους οποίους μπορεί να οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί παραπάνω. Η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης προσομοιωμένου υποστρώματος σε συνδυασμό με τα εσωτερικά πρότυπα συνέβαλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων στους υπολογισμούς λόγω του βαθμού στον οποίο επηρεάζεται ο ιοντισμός. Για τιμές μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες τιμές το ενισχύει. Παράλληλα για τιμές μεταξύ -20% και 20% θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος ενώ για τιμές από -50% έως -20% ή από 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια και για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή (Κοσμά, 2013). Από τον πίνακα 10.1 παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν αρκετές διακυμάνσεις στις τιμές της επί τοις εκατό επίδρασης του υποστρώματος (%ME), υποδηλώνοντας είτε ενίσχυση είτε μείωση του σήματος. Για όλες σχεδόν τις ενώσεις η επίδραση της μήτρας κυμάνθηκε μεταξύ -20% και 20%, συνεπώς το υπόστρωμα προκάλεσε μία ελαφρά μείωση/αύξηση στο αναλυτικό σήμα, το οποίο είναι λογικό λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος. Μόνο για την ένωση Mirtazapine η επίδραση της μήτρας ήταν -22% που ανήκει στην κατηγορία από -50% έως -20% και προκαλεί μέτρια μείωση του σήματος (Σχήμα 10.8).



Σχήμα 10.8: Επίδραση υποστρώματος (%) για τις φαρμακευτικές ενώσεις.

## ***Γ. Επικύρωση μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων στο υδροεξανθράκωμα***

### ***10.5 Αναλυτικά χαρακτηριστικά της μεθόδου Quechers***

Η εκτίμηση της ορθότητας της μεθόδου βασίστηκε στον υπολογισμό των ανακτήσεων σε εμβολιασμένα δείγματα λυματολάσπης. Αναλυτικότερα, εμβολιάστηκαν πέντε δείγματα υδροεξανθρακώματος ( $n=5$ ) τα οποία αναλύθηκαν μέσα στην ίδια μέρα, για να υπολογιστεί η επαναληψιμότητα της μεθόδου ( $RSD_r$ ) και σε πέντε διαδοχικές ημέρες, για να υπολογιστεί παράλληλα η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ( $RSD_R$ ), συνθέτοντας έτσι την πιστότητα της μεθόδου. Τα επίπεδα εμβολιασμού για τις φαρμακευτικές ενώσεις ήταν 25 ng/g, 100 ng/g και 250 ng/g. Οι ανακτήσεις προσδιορίστηκαν συγκρίνοντας τη συγκέντρωση που υπολογίστηκε μετά και την εφαρμογή της μεθόδου στα εμβολιασμένα δείγματα με το αντίστοιχο επίπεδο εμβολιασμού. Παράλληλα αναλύθηκαν και τυφλά δείγματα ώστε τυχόν υπολείμματα συγκεντρώσεων των αναλυτών να αφαιρεθούν από τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των εμβολιασμένων δειγμάτων. Για τις περισσότερες ενώσεις, οι μέσες τιμές των ανακτήσεων ( $n=5$ ) για το χαμηλό επίπεδο κυμάνθηκαν από 51% (Norfluoxetine) έως 97% (Haloperidol) ενώ για το μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 56% (Norfluoxetine) έως 103% (Amisulpride). Για το μεγάλο επίπεδο εμβολιασμού οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 73% (Fluvoxamine) έως 100% (Amisulpride). Όπως φαίνεται από τον πίνακα 10.2 οι ενώσεις Norfluoxetine και Atenolol εμφάνισαν σχετικά χαμηλές ανακτήσεις και στα δύο επίπεδα εμβολιασμού 25 ng/g, 100 ng/g, 51% και 56% και 52% και 58% αντίστοιχα, ήταν όμως οριακά εντός των αποδεκτών ορίων. Επιπλέον κάποιες ενώσεις, όπως Sulfadiazine (62%), N-des-Olanzapine (56%), Trimethoprim (53%), Venlafaxine (55%) και Sulfaquinoxaline (58%), παρουσίασαν χαμηλές ανακτήσεις μόνο στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού αλλά βελτιώθηκαν στα άλλα δύο επίπεδα εμβολιασμού.

Στον Πίνακα 10.2 παρουσιάζονται η επαναληψιμότητα της μεθόδου ( $\%RSD_r$ ) και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ( $\%RSD_R$ ) στα τρία επίπεδα εμβολιασμού. Σε όλες τις περιπτώσεις η επαναληψιμότητα της μεθόδου ( $\%RSD_r$ ) ήταν μικρότερη από 16%, κυμαινόμενη από 0,6% έως 16% για επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, από 0,4% έως 13% για επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g και από 2% έως 13% για επίπεδο εμβολιασμού 250 ng/g. Η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα ( $\%RSD_R$ ), ήταν μικρότερη από 20%, που είναι το ανώτατο αποδεκτό όριο για όλες τις περιπτώσεις. Πιο συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,8% έως 18% για επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, από 0,5% έως 18% για επίπεδο εμβολιασμού 100

ng/g και από 2% έως 17% για επίπεδο εμβολιασμού 250 ng/g. Οι χαμηλές τιμές %RSD είναι σημαντικές κατά την ανάλυση πολύπλοκων υποστρωμάτων, όπως η επεξεργασμένη λυματολάσπη, λόγω των παρεμποδίσεων από το υπόστρωμα αλλά και λόγω των περισσότερων σταδίων ανάλυσης με συνέπεια τη μεγαλύτερη πιθανότητα εισαγωγής σφαλμάτων στην πειραματική διαδικασία. Είναι σημαντικό επίσης να αναφερθεί πως η ποσοτικοποίηση του Olanzapine, N-des-Olanzapine έγινε με το εσωτερικό πρότυπο d<sub>3</sub>-Olanzapine, του Mirtazapine, Clozapine, Quetiapine, Amitriptyline, Sertraline, N-des-Sertraline πραγματοποιήθηκε με το d<sub>6</sub>-Amitriptyline, του Risperidone, Haloperidol έγινε με το d<sub>4</sub>-Haloperidol, του Paroxetine, Fluvoxamine, Fluoxetine, Norfluoxetine έγινε με το d<sub>5</sub>-Fluoxetine και όλων των υπόλοιπων ενώσεων με το d<sub>10</sub>-Carbamazepine.

Τα όρια ανίχνευσης της μεθόδου (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. Για τις μελετώμενες ενώσεις, τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,2 ng/g έως 12,1 ng/g και από 0,8 ng/g έως 40 ng/g, αντίστοιχα. Τα χαμηλά όρια της μεθόδου αποδεικνύουν πως ο παράγοντας προσυγκέντρωσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αρκετός για την ποσοτικοποίηση των ενώσεων ακόμα και σε ίχνη.

Η γραμμικότητα της μεθόδου μελετήθηκε με την κατασκευή καμπυλών βαθμονόμησης προσομοιωμένου υποστρώματος, επτά σημείων, που ακολούθησαν τη γραμμική παλινδρόμηση. Μια σειρά δειγμάτων εμβολιάστηκε με πρότυπα διαλύματα μίγματος των επιλεγμένων φαρμακευτικών ενώσεων για εύρος συγκεντρώσεων από 5 ng/g έως 750 ng/g. Η μέθοδος παρουσίασε εξαιρετική γραμμικότητα καθώς ο συντελεστής συσχέτισης ( $r^2$ ) είχε για τις περισσότερες ενώσεις τιμές μεγαλύτερες από 0,99 και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,9516 έως 0,9990.

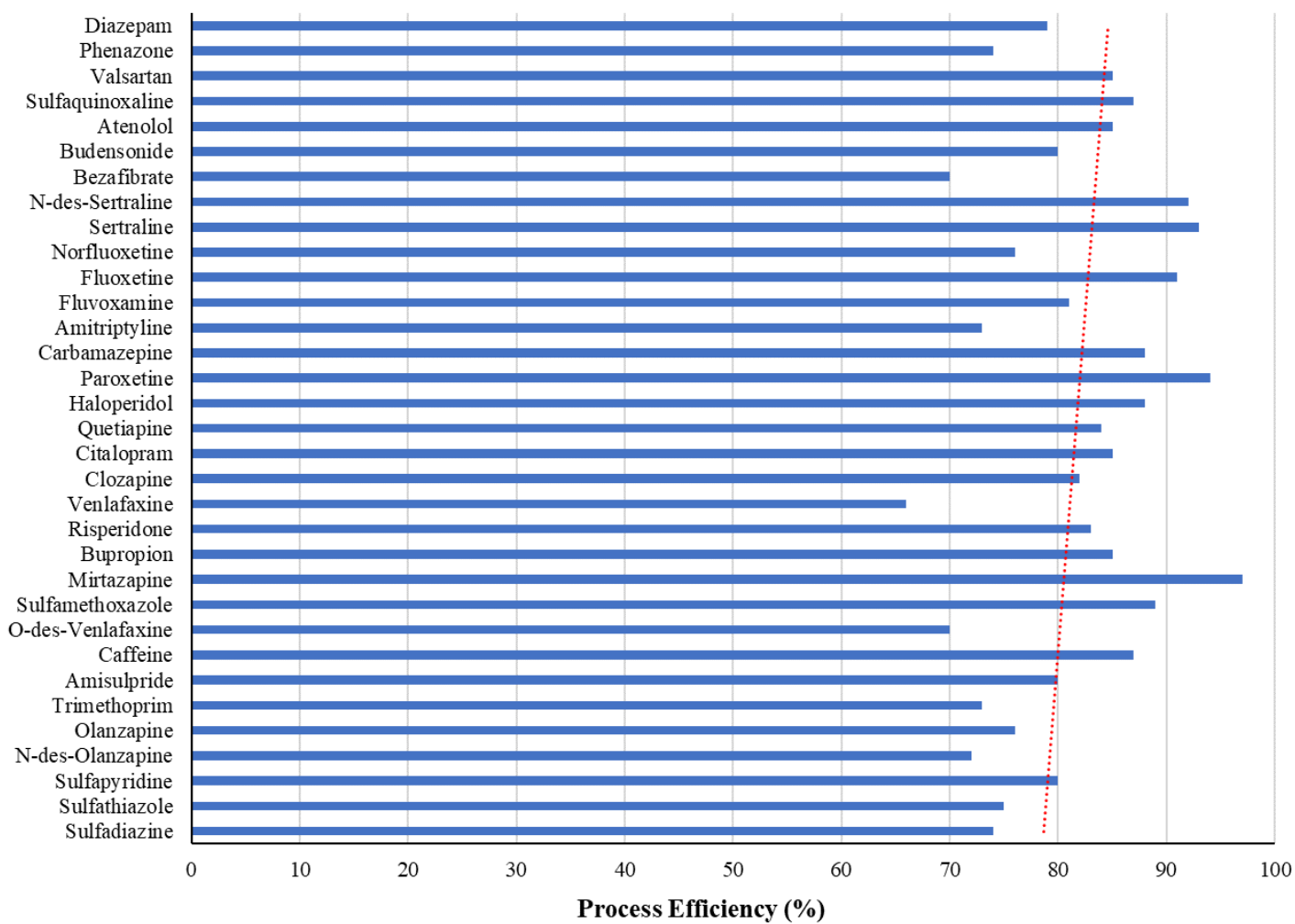
Η αποτελεσματικότητα της μεθόδου (Process efficiency, %PE) ελέγχθηκε με την παρασκευή πρότυπων εμβολιασμένων διαλυμάτων σε διαλύτη ανασύστασης, συγκέντρωσης 25, 100 και 250 ng/g και την παρασκευή εμβολιασμένων δειγμάτων, πριν την εκχύλιση, σε συγκέντρωση 25, 100 και 250 ng/g. Η σύγκριση πραγματοποιήθηκε μεταξύ του εμβαδού του πρότυπου διαλύματος σε σχέση με το εμβαδό του εμβολιασμένου δείγματος στην αντίστοιχη συγκέντρωση. Από τον πίνακα 10.2 και το σχήμα 10.9 φαίνεται ότι η αποτελεσματικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 66% (Venlafaxine) έως 97% (Mirtazapine).

Τέλος, υπολογίστηκε η εκτεταμένη αβεβαιότητα της μεθόδου (%U) με βάση τη στατιστική προσέγγιση από τη Nordtest όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού 25 ng/g, η %U ήταν μικρότερη από 27,88% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) για όλες τις ενώσεις και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 8% (Venlafaxine) έως 27% (Caffeine). Στο μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g η αποδεκτή τιμή αναφοράς της αβεβαιότητας ήταν 23,40%. Οι πειραματικές τιμές που υπολογίστηκαν κυμάνθηκαν από 8% (Sulfadiazine, Sulfamethoxazole) έως 21% (Caffeine, Bupropion). Στο επίπεδο εμβολιασμού 250 ng/g όλες οι %U που βρέθηκαν ήταν χαμηλότερες από 20,39% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) και κυμάνθηκαν από 4% (Sulfamethoxazole, Fluvoxamine, Norfluoxetine) έως 16% (Caffeine, Bupropion, Citalopram, Amitriptyline). Είναι λογικό πως όσο αυξάνει το επίπεδο εμβολιασμού να μειώνεται η επί τοις εκατό τιμή της αβεβαιότητας, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τη βιβλιογραφία (Maroto et al., 2001), (Rasul et al., 2018).

Επιπλέον στον πίνακα 10.2 παρουσιάζεται η τιμή HorRat στα τρία επίπεδα εμβολιασμού. Στο χαμηλότερο επίπεδο η τιμή αυτή είναι μικρότερη από 0,5 για τις περισσότερες ενώσεις, γεγονός που υποδηλώνει καλύτερη ακρίβεια των αποτελεσμάτων ως προς την επαναληψιμότητα, τις ανακτήσεις κλπ. Εξαίρεση αποτέλεσαν οι ενώσεις Sulfadiazine, Sulfathiazole, Caffeine, O-des-Venlafaxine, Clozapine, Citalopram, Haloperidol, Carbamazepine Bezafibrate και Phenazone, οι οποίες είχαν τιμή HorRat μεγαλύτερη από 0,5 αλλά μικρότερη από 1. Στην ίδια φιλοσοφία κυμάνθηκαν και οι τιμές HorRat στο επίπεδο εμβολιασμού 100 ng/g με τη χαμηλότερη τιμή να είναι 0,03 για την ένωση Paroxetine ενώ η υψηλότερη τιμή 0,88 για την ένωση Budenonide. Στο μεγαλύτερο επίπεδο εμβολιασμού η αναλογία HorRat κυμάνθηκε από 0,1 για την ένωση Sulfadiazine έως 0,58 για την ένωση Bupropion και Sertraline.

**Πίνακας 10.2:** Αναλυτικά χαρακτηριστικά επικύρωσης μεθόδου για τον προσδιορισμό φαρμακευτικών ενώσεων σε υπόστρωμα υδροξυανθρακώματος

Αναλύτης	%Recoveries (n=5)			Καμπύλη αναφοράς προσαρμοσμένη στη μήτρα (ng ml <sup>-1</sup> )		LOD (ng g <sup>-1</sup> )	LOQ (ng g <sup>-1</sup> )	Intra-day RSDr% (n=5)			Inter-day RSD <sub>R</sub> %			%PE	% U / Horrat ratio		
	Επίπεδο εμβολιασμού (ng g <sup>-1</sup> )			Γραμμικό εύρος	R <sup>2</sup>			Επίπεδο εμβολιασμού (ng g <sup>-1</sup> )							Επίπεδο εμβολιασμού (ng g <sup>-1</sup> )		
	25	100	250					25	100	250	25	100	250		25	100	250
Sulfadiazine	62	93	96	5-750	0,9951	7,3	22,3	10	6	3	10	9	14	74	23 / 0,57	5 / 0,15	2 / 0,10
Sulfathiazole	80	95	91	5-750	0,9979	3,4	11,4	10	2	3	18	9	3	75	20 / 0,60	9 / 0,18	9 / 0,37
Sulfapyridine	79	83	87	5-750	0,9986	2,7	8,9	9	10	13	7	16	9	80	16 / 0,51	11 / 0,34	8 / 0,33
N-des-Olanzapine	56	93	95	5-750	0,9854	4,3	14,2	4	3	3	2	11	2	72	8 / 0,17	12 / 0,43	13 / 0,56
Olanzapine	81	89	96	5-500	0,9880	1,2	3,8	5	8	7	6	7	8	76	10 / 0,32	13 / 0,24	10 / 0,22
Trimethoprim	53	78	86	5-750	0,9988	0,5	1,6	6	6	2	13	0,5	2	73	18 / 0,50	7 / 0,25	7 / 0,18
Amisulpride	96	103	100	5-750	0,9988	1,6	5,2	13	5	7	7	10	17	80	20 / 0,34	12 / 0,41	11 / 0,37
Caffeine	90	92	96	5-500	0,9947	3,8	12,5	10	9	8	13	10	10	87	22 / 0,72	10 / 0,41	6 / 0,19
O-des-venlafaxine	95	98	98	5-750	0,9976	0,5	1,5	9	7	5	9	12	9	70	20 / 0,65	15 / 0,58	13 / 0,57
Sulfamethoxazole	82	94	92	5-750	0,9901	5,9	19,4	8	9	9	8	17	13	89	17 / 0,43	7 / 0,29	10 / 0,48
Mirtazapine	71	86	87	5-750	0,9990	0,6	2,0	9	11	3	9	18	10	97	20 / 0,49	14 / 0,49	8 / 0,34
Bupropion	72	82	78	5-750	0,9985	0,6	2,1	10	7	6	8	9	11	85	12 / 0,37	15 / 0,14	15 / 0,58
Risperidone	63	87	88	5-500	0,9897	4,3	14,2	16	5	4	6	9	10	83	13 / 0,14	14 / 0,51	17 / 0,63
Venlafaxine	55	87	99	5-750	0,9983	3,8	12,5	14	13	9	12	16	13	66	17 / 0,45	16 / 0,12	10 / 0,43
Clozapine	83	96	94	5-500	0,9823	1,5	5,0	7	4	3	12	6	10	82	17 / 0,54	11 / 0,31	16 / 0,37
Citalopram	93	102	96	5-750	0,9988	0,2	0,8	13	13	5	14	4	5	85	18 / 0,54	17 / 0,13	6 / 0,17
Quetiapine	95	81	82	5-500	0,9811	0,9	2,9	0,6	5	6	1	5	5	84	13 / 0,31	13 / 0,20	7 / 0,27
Haloperidol	97	94	92	5-500	0,9934	6	20	11	9	10	7	9	10	88	17 / 0,53	10 / 0,39	10 / 0,47
Paroxetine	76	86	82	5-750	0,9950	0,4	1,3	2	0,4	8	2	6	5	94	11 / 0,07	8 / 0,03	10 / 0,44
Carbamazepine	95	95	100	5-750	0,9985	0,2	0,8	12	16	8	14	10	8	88	18 / 0,54	15 / 0,32	12 / 0,53
Amitriptyline	71	73	75	5-750	0,9859	1,9	6,2	9	9	4	2	12	12	73	15 / 0,50	22 / 0,24	13 / 0,26
Fluvoxamine	59	82	73	5-500	0,9910	0,4	1,3	3	5	5	9	11	9	81	22 / 0,18	20 / 0,47	17 / 0,14
Fluoxetine	65	80	84	5-750	0,9928	1	3,6	2	6	7	0,8	10	7	91	10 / 0,06	16 / 0,51	16 / 0,54
Norfluoxetine	51	56	79	5-500	0,9930	0,3	1,1	9	9	2	5	15	4	76	20 / 0,36	23 / 0,38	5 / 0,19
Sertraline	69	77	99	5-750	0,9886	2,3	7,7	13	1	6	11	13	8	93	19 / 0,37	13 / 0,34	13 / 0,58
N-des-Sertraline	63	79	97	5-750	0,9684	4,3	14,2	10	8	10	9	14	14	92	24 / 0,38	13 / 0,51	14 / 0,51
Bezafibrate	90	100	93	5-500	0,9974	4,2	13,8	9	11	8	7	12	10	70	18 / 0,59	14 / 0,33	9 / 0,35
Budensonide	66	88	83	5-750	0,9929	2,5	8,3	14	2	7	7	12	10	80	23 / 0,36	22 / 0,88	17 / 0,52
Atenolol	52	58	69	5-500	0,9964	0,9	3,1	12	4	10	7	11	12	85	16 / 0,45	12 / 0,20	16 / 0,16
Sulfaquinoxaline	58	76	91	5-750	0,9516	0,8	2,7	12	8	8	12	10	16	87	21 / 0,51	19 / 0,70	9 / 0,33
Valsartan	82	103	86	5-500	0,9953	0,8	2,7	7	8	3	11	7	4	85	18 / 0,30	14 / 0,57	6 / 0,25
Diazepam	81	85	91	5-750	0,9905	1	3,5	10	5	11	13	13	14	74	21 / 0,52	12 / 0,20	11 / 0,46
Phenazone	72	96	97	5-750	0,9633	0,4	1,4	6	8	5	14	8	10	79	17 / 0,57	16 / 0,31	7 / 0,17

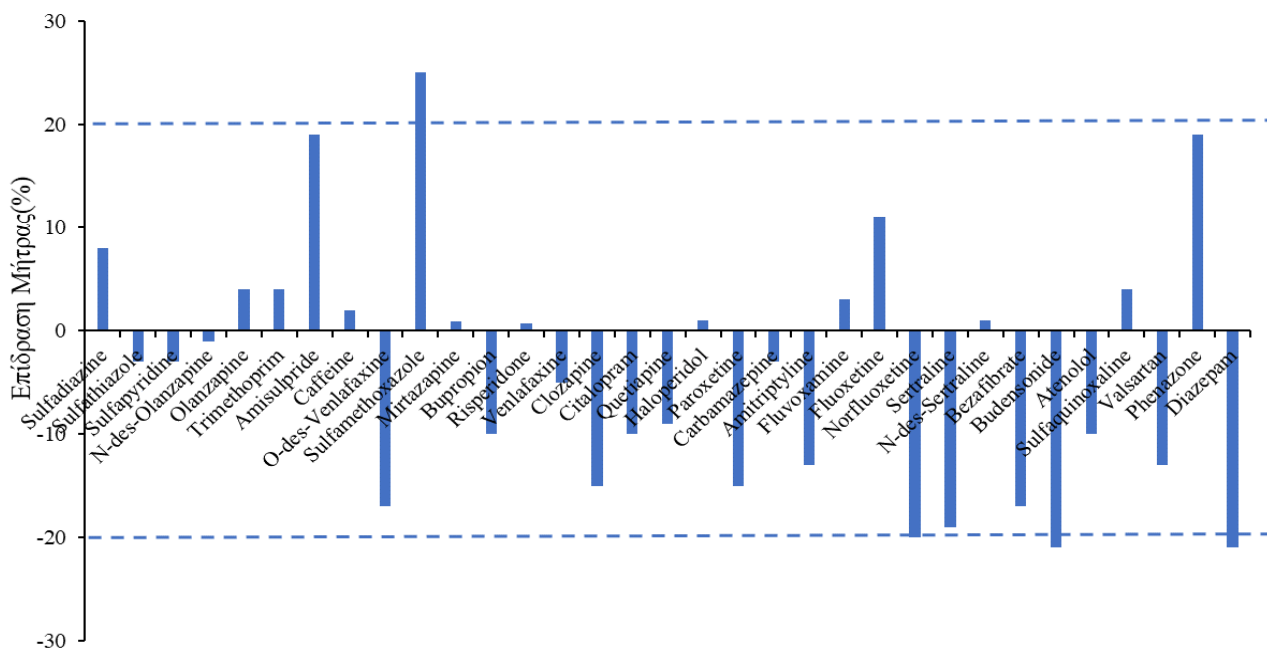


**Σχήμα 10.9:** Αποτελεσματικότητα της μεθόδου (%PE) για τις προσδιοριζόμενες φαρμακευτικές ενώσεις



## 10.6 Επίδραση υποστρώματος

Το φαινόμενο της επίδρασης του υποστρώματος και οι παράγοντες στους οποίους μπορεί να οφείλεται έχουν ήδη περιγραφεί παραπάνω. Η χρήση καμπυλών βαθμονόμησης προσομοιωμένου υποστρώματος σε συνδυασμό με τα εσωτερικά πρότυπα συνέβαλε σημαντικά στην ελαχιστοποίηση των σφαλμάτων στους υπολογισμούς λόγω του βαθμού στον οποίο επηρεάζεται ο ιοντισμός. Για τιμές μικρότερες του 0% η επίδραση του υποστρώματος μειώνει το χρωματογραφικό σήμα, ενώ για μεγαλύτερες τιμές το ενισχύει. Παράλληλα για τιμές μεταξύ -20% και 20% θεωρείται ότι το υπόστρωμα προκαλεί ελαφριά μείωση ή ενίσχυση του σήματος ενώ για τιμές από -50% έως -20% ή από 20% έως 50% η επίδραση θεωρείται μέτρια και για τιμές μικρότερες του -50% ή μεγαλύτερες του 50% η επίδραση θεωρείται ισχυρή. Από τον πίνακα 10.2 παρατηρήθηκε ότι υπήρχαν αρκετές διακυμάνσεις στις τιμές της επί τοις εκατό επίδρασης του υποστρώματος (%ME), υποδηλώνοντας είτε ενίσχυση είτε μείωση του σήματος. Για όλες σχεδόν τις ενώσεις η επίδραση της μήτρας κυμάνθηκε μεταξύ -20% και 20%, συνεπώς το υπόστρωμα προκάλεσε μία ελαφρά μείωση/αύξηση στο αναλυτικό σήμα, το οποίο είναι λογικό λόγω της πολυπλοκότητας του υποστρώματος. Μόνο για τις ενώσεις Sulfamethoxazole, Budenonide και Phenazone η επίδραση της μήτρας ήταν 25%, -21% και -21% αντίστοιχα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία από -50% έως -20% και προκαλούν μέτρια αύξηση και μείωση του σήματος (Σχήμα 10.10).



Σχήμα 10.10: Επίδραση υποστρώματος (%) για τις φαρμακευτικές ενώσεις.

## ***Κεφάλαιο 11***

### ***Υδροθερμική κατεργασία λυματολάσπης για την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων***

#### ***11.1 Εισαγωγή***

Μετά και την ανάπτυξη, τη βελτιστοποίηση και την επικύρωση της μεθόδου Quechers για τον προσδιορισμό των φαρμακευτικών ενώσεων, ακολούθησε η εφαρμογή της μεθόδου για την ανίχνευση ουσιών σε άγνωστο δείγμα λυματολάσπης που ελήφθη από τη δευτεροβάθμια επεξεργασία της Μονάδας Επεξεργασίας Υγρών αποβλήτων (ΜΕΥΑ) της πόλης των Ιωαννίνων τον Ιούνιο του 2021. Στη συνέχεια δείγματα λυματολάσπης επεξεργάστηκαν υδροθερμικά με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων και εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Quechers για την ανίχνευση τυχόν υπολειμμάτων φαρμακευτικών ουσιών στο υπόστρωμα του υδροεξανθρακώματος. Η μελέτη της επίδρασης σημαντικών παραμέτρων και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της υδροθερμικής κατεργασίας πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της μεθοδολογίας της επιφανειακής απόκρισης.

#### ***11.2 Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού***

Η επιλογή των παραμέτρων πραγματοποιήθηκε μετά από σχετική βιβλιογραφική ανασκόπηση με έμφαση σε έρευνες που εφαρμόζουν την υδροθερμική επεξεργασία της λυματολάσπης και μελετούν την μεθοδολογία της επιφανειακής απόκρισης (He et al., 2013), (vom Eyser et al., 2015), (Tasca et al., 2020). Επιλέχθηκαν τρεις σημαντικοί παράμετροι: η θερμοκρασία της υδροθερμικής (Α), ο χρόνος αντίδρασης (Β) και η αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt) (Γ). Εφαρμόστηκε ο κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός όπου πραγματοποιήθηκαν 17 πειράματα στα οποία συνδυάστηκαν οι τρεις παράμετροι με έξι αξονικά και τρία κεντρικά σημεία ( $2^k+2k+3 = 2^3+2\cdot 3+3 = 17$ ). Η θερμοκρασία της υδροθερμικής κυμάνθηκε από 169,77 °C έως 220,23 °C, ο χρόνος από 118,64 min έως 421,36 min και τέλος η παράμετρος %wt από 3,30% έως 11,70%. Η επί τοις % απομάκρυνση των φαρμακευτικών ουσιών και η επί τοις % απόδοση της στερεής μάζας του υδροεξανθρακώματος αποτελούν τις μετρήσιμες αποκρίσεις για κάθε σειρά πειραμάτων. Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα πειραματικά αποτελέσματα των μετρήσιμων αποκρίσεων παρουσιάζονται στον πίνακα 11.1.

**Πίνακας 11.1:** Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών και της επί τοις % απόδοσης της στερεής μάζας του υδροεξανθρακώματος

Παράμετροι	Επίπεδα			Αξονικά σημεία ( $\alpha=1$ )	
	Χαμηλό (-1)	Κεντρικό (0)	Υψηλό (+1)	- $\alpha$	+ $\alpha$
Θερμοκρασία °C (A)	180,00	195,00	210,00	180,00	210,00
Χρόνος (min) (B)	180,00	270,00	360,00	180,00	360,00
%wt (Γ)	5,00	7,50	10,00	5,00	10,00

Αριθμός Πειραμάτων	Παράγοντας 1 A: Θερμοκρασία °C	Παράγοντας 2 B: Χρόνος min	Παράγοντας 3 A: %wt	%απομάκρυνση φ.ε	%απόδοση στερεής μάζας
1	195,00	270,00	7,50	74,96	43,13
2	210,00	360,00	10,00	79,10	38,58
3	195,00	421,36	7,50	83,11	42,33
4	180,00	180,00	10,00	64,79	46,77
5	195,00	270,00	11,70	71,48	45,38
6	220,23	270,00	7,50	88,63	39,54
7	195,00	270,00	7,50	75,89	45,59
8	195,00	270,00	3,30	72,46	49,65
9	210,00	180,00	5,00	77,74	44,86
10	169,77	270,00	7,50	66,01	42,39
11	210,00	180,00	10,00	79,51	44,01
12	180,00	360,00	5,00	78,75	43,18
13	180,00	180,00	5,00	55,79	46,27
14	195,00	118,64	7,50	69,89	46,43
15	210,00	360,00	5,00	77,62	40,46
16	195,00	270,00	7,50	74,16	44,83
17	180,00	360,00	10,00	71,61	51,43

### 11.3 Μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση της απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών από τη λυματολάσπη με τη μέθοδο της επιφανειακής απόκρισης

Στον πίνακα 11.2 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) η οποία απέδειξε τη σημαντικότητα του πρωτοβάθμιου πολυωνυμικού μοντέλου σύμφωνα με την υψηλή τιμή του λόγου F (137,51) και τη μικρή τιμή ( $p < 0,0002$ ) στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Η μη σημαντική έλλειψη προσαρμογής (Lack of fit), οι σχετικά υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (0,8983), καθώς επίσης και του διορθωμένου (ως προς τους βαθμούς ελευθερίας) συντελεστή προσδιορισμού συσχέτισης  $R_{Adj}^2$  (0,8373) επιβεβαιώνουν το υψηλό επίπεδο σημαντικότητας και την καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Έτσι από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το πολυωνυμικό μοντέλο συσχέτισης δύο παραγόντων (2FI) είναι το καταλληλότερο και περιγράφει τη συσχέτιση των παραμέτρων με την κωδικοποιημένη τους μορφή με την επί τοις % απομάκρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων (φ.ε.) σύμφωνα με την Εξίσωση 1:

$$\% \text{Απομάκρυνση φ.ε} = +74,21 + 5,94 * A + 3,77 * B + 0,25 * C - 3,79 * A * B + 0,17 * A * C - 2,05 * B * C \quad (1)$$

όπου A είναι η παράμετρος της θερμοκρασίας, B ο χρόνος και Γ η επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt). Παράλληλα η πολυωνυμική εξίσωση με τις πραγματικές παραμέτρους έχει την εξής μορφή (Εξίσωση 2):

$$\% \text{Απομάκρυνση φ.ε} = -174,51 + 1,11 * \text{Temp} + 0,65 * \text{Time} + 1,66 * \% \text{wt} - 2,80E-003 * \text{Temp} * \text{Time} + 4,63E-003 * \text{Temp} * \% \text{wt} - 9,128E-003 * \text{Time} * \% \text{wt} \quad (2)$$

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του πίνακα 11.2 για τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό η παράμετρος της θερμοκρασίας (A), ο χρόνος (B) και οι αλληλεπιδράσεις τους (AB) αποτελούν σημαντικές παραμέτρους με  $p < 0,0001$ ,  $p < 0,0010$  και  $p < 0,0057$  αντίστοιχα. Όσο μικρότερο είναι το επίπεδο της στατιστικής σημαντικότητας τόσο πιο σημαντική επίδραση εμφανίζει ο όρος στην απομάκρυνση του υποστρώματος (Chong et al., 2010). Σε αντίθεση με τα παραπάνω η παράμετρος Γ και οι αλληλεπιδράσεις με τις παραμέτρους A και B παρουσίασαν αυξημένο επίπεδο σημαντικότητας και συγκεκριμένα η παράμετρος Γ εμφάνισε  $p < 0,7655$  ενώ οι αλληλεπιδράσεις ΑΓ και ΒΓ,  $p < 0,8754$  και  $p < 0,0865$  αντίστοιχα. Συνεπώς αποδείχθηκαν στατιστικά μη σημαντικά στην απόκριση του σήματος.

Επιπλέον, το πρόσημο των συντελεστών στις εξισώσεις (1) και (2) υποδεικνύει θετικές ή αρνητικές επιδράσεις στην απόκριση Y του σήματος. Έτσι, ο θετικός συντελεστής

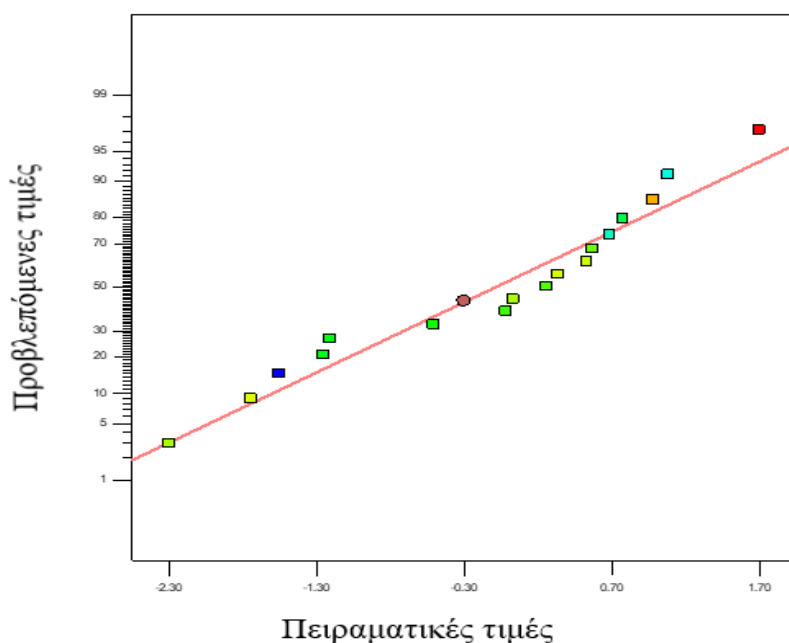
υποδηλώνει ότι η απομάκρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων ευνοείται παρουσία υψηλών τιμών των αντίστοιχων μεταβλητών, εντός του μελετώμενου εύρους, ενώ ο αρνητικός συντελεστής υποδηλώνει ότι η απομάκρυνση ευνοείται παρουσία χαμηλών τιμών. Παράλληλα οι αρνητικοί συντελεστές των AB, AC και BC υποδηλώνουν ανταγωνιστική δράση μεταξύ των μεταβλητών, ενώ οι θετικοί συντελεστές υποδηλώνουν τη συνεργιστική δράση μεταξύ των (Sakkas et al., 2010), (Antonopoulou & Konstantinou, 2013). Έτσι, το θετικό πρόσημο στους συντελεστές A, B και Γ της εξίσωσης (1) υποδηλώνει την αύξηση της επί τοις % απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε υψηλές τιμές θερμοκρασίας (A), χρόνου (B) και %wt (Γ) (Αντωνοπούλου, 2013).

**Πίνακας 11.2:** Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση των φαρμακευτικών ουσιών από τη λυματολάσπη

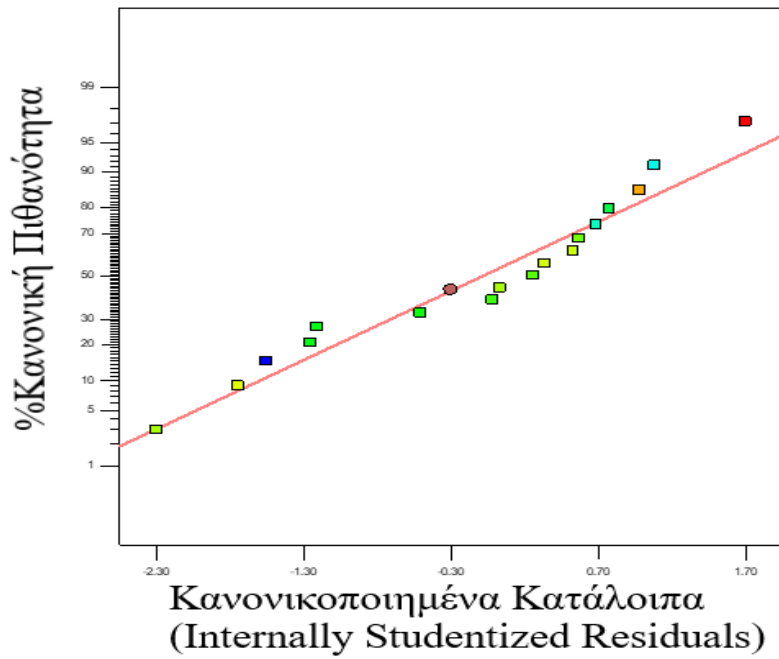
Παράμετροι	Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p
Μοντέλο	825,05	6	137,51	14,72	0,0002
A-Θερμοκρασία	481,27	1	481,27	51,53	<0,0001 <b>σημαντικό</b>
B-Χρόνος	194,08	1	194,08	20,78	0,0010
Γ-%wt	0,88	1	0,88	0,094	0,7655
A B	114,84	1	114,84	12,30	0,0057
A Γ	0,24	1	0,24	0,026	0,8754
B Γ	33,74	1	33,74	3,61	0,0865
Υπόλειμμα	93,39	10	9,34		
Έλλειψη προσαρμογής	91,89	8	11,49	15,32	0,0627 <b>μη σημαντικό</b>
Καθαρό Σφάλμα	1,50	2	0,75		
Διορθωμένο Σύνολο	918,45	16			

Οι θεωρητικές τιμές των ποσοστών απομάκρυνσης που δίνονται από το μοντέλο και οι πειραματικές τιμές συγκρίνονται και παρουσιάζονται στο σχήμα 11.1. Η σύγκρισή τους ακολουθεί γραμμική συσχέτιση υποδηλώνοντας την καταλληλότητα του μοντέλου να περιγράψει την υπό μελέτη απόκριση. Στο σχήμα 11.2 εμφανίζεται το διάγραμμα κανονικής πιθανότητας των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals)

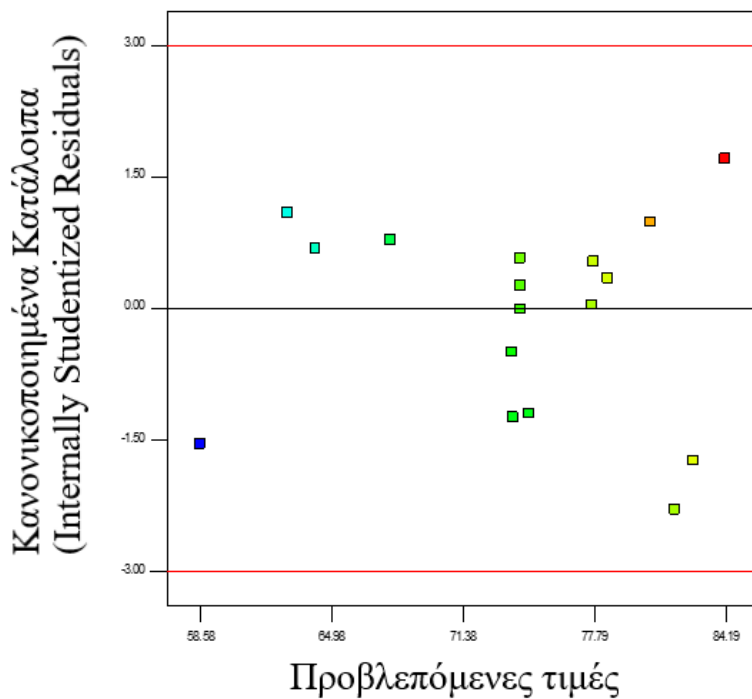
αποτυπώνοντας μία κανονική κατανομή των σημείων που προσεγγίζουν την ευθεία γραμμή υποδηλώνοντας την καλή προσαρμογή του μοντέλου. Η καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά αποτελέσματα στηρίζεται και στη χαμηλή τιμή του συντελεστή διακύμανσης (CV= 4,12%). Επιπλέον στο σχήμα 11.3 απεικονίζεται το διάγραμμα των προβλεπόμενων τιμών με τα όρια των κανονικοποιημένων καταλοίπων για την κατανομή του σφάλματος αποτυπώνοντας όλα τα σημεία των πειραματικών τιμών, τα οποία ανήκουν μέσα σε αυτά τα όρια.



**Σχήμα 11.1:** Συσχέτιση πειραματικών και προβλεπόμενων τιμών της επί τοις % απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ενώσεων.



**Σχήμα 11.2:** Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals).



**Σχήμα 11.3:** Διάγραμμα των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals) με τις προβλεπόμενες τιμές.

Η επίδραση της κάθε παραμέτρου αλλά και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους αναπαρίστανται γραφικά με τις επιφάνειες απόκρισης (τρισδιάστατη μορφή) και τα ισομετρικά γραφήματα (δισδιάστατη μορφή) στα σχήματα (11.4-11.6) τα οποία παρουσιάζουν την επίδραση ανά δύο παραμέτρων συναρτήσεως του ποσοστού απομάκρυνσης των ουσιών από το υπόστρωμα της λυματολάσπης μετά την υδροθερμική κατεργασία. Αρκετές χημικές αντιδράσεις που είναι δυνατό να εμφανιστούν κατά τη διάρκεια της υδροθερμικής ανθρακοποίησης έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία, αλλά λίγες μόνο έχουν αποτελέσει το επίκεντρο λεπτομερών ερευνών. Κατά κύριο λόγο η υδροθερμική ανθρακοποίηση διεξάγεται μέσω αντιδράσεων αφυδάτωσης και αποκαρβοξυλίωσης γεγονός που σημαίνει πως η διαδικασία της υδροθερμικής είναι μία εξώθερμη διαδικασία. Αναλυτικότερα στο σχήμα 11.4 τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας της υδροθερμικής όσο και του χρόνου της αντίδρασης επιταχύνουν το ποσοστό απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών. Αύξηση της θερμοκρασίας από τους 180 °C στους 205 °C και ταυτόχρονη αύξηση του χρόνου αντίδρασης από τα 180 λεπτά στα 360 λεπτά οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού απομάκρυνσης από 63,95% σε 76,91%. Αν και οι φαρμακευτικές ενώσεις παρουσιάζουν ένα ευρύ φάσμα θερμικής σταθερότητας, η απομάκρυνσή τους είναι δυνατόν να οφείλεται στην περιορισμένη θερμική σταθερότητα που μπορεί να παρουσιάζουν ορισμένες ενώσεις. Τα όρια θερμοκρασιών που εφαρμόζεται μία υδροθερμική κατεργασία είναι συνήθως από 200-250 °C και αρκετές φαρμακευτικές ουσίες παρουσιάζουν τάσεις διάσπασης σε αυτές τις συνθήκες (vom Eyser et al., 2015). Για παράδειγμα η ουσία υδροχλωριομένη-Sertraline μπορεί να απελευθερώσει σε πρώτο στάδιο μεθυλαμίνη σε θερμοκρασία 199 °C και σε υψηλότερη θερμοκρασία να επιτευχθεί η απώλεια της τετραλίνης, του διχλωροβενζολίου και του υδροχλωρίου (Ferreira et al., 2018). Επιπλέον το μόριο fluoxetine αποσυντίθεται σε θερμοκρασία >160 °C απελευθερώνοντας μεθυλαμίνη και 4-τριφλουορομεθυλ-φαινόλη (Pinto et al., 2017) ενώ η ουσία citalopram παρουσιάζει τάση διάσπασης σε θερμοκρασία >190 °C (Pinto et al., 2018). Αντίθετα η ουσία carbamazepine υφίσταται θερμική αποσύνθεση σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 377 °C (Dołęga et al., 2021) και επομένως στις συνθήκες διεξαγωγής του συγκεκριμένου πειράματος παραμένει ως υπόλειμμα στο παραγόμενο υδροεξανθράκωμα. Ταυτόχρονα, κατά την εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας είναι δυνατό οι λειτουργικές ομάδες των αντιβιοτικών να εξαλείφονται σε κάποιο βαθμό αλλά το πολύπλοκο δίκτυο των αντιδράσεων που πραγματοποιούνται δεν είναι ακόμη γνωστό με λεπτομέρειες. Έτσι, προς το παρόν, μόνο μια συζήτηση για τις γενικές αντιδράσεις που έχουν ταυτοποιηθεί μπορούν να παρέχουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις δυνατότητες χειρισμού της



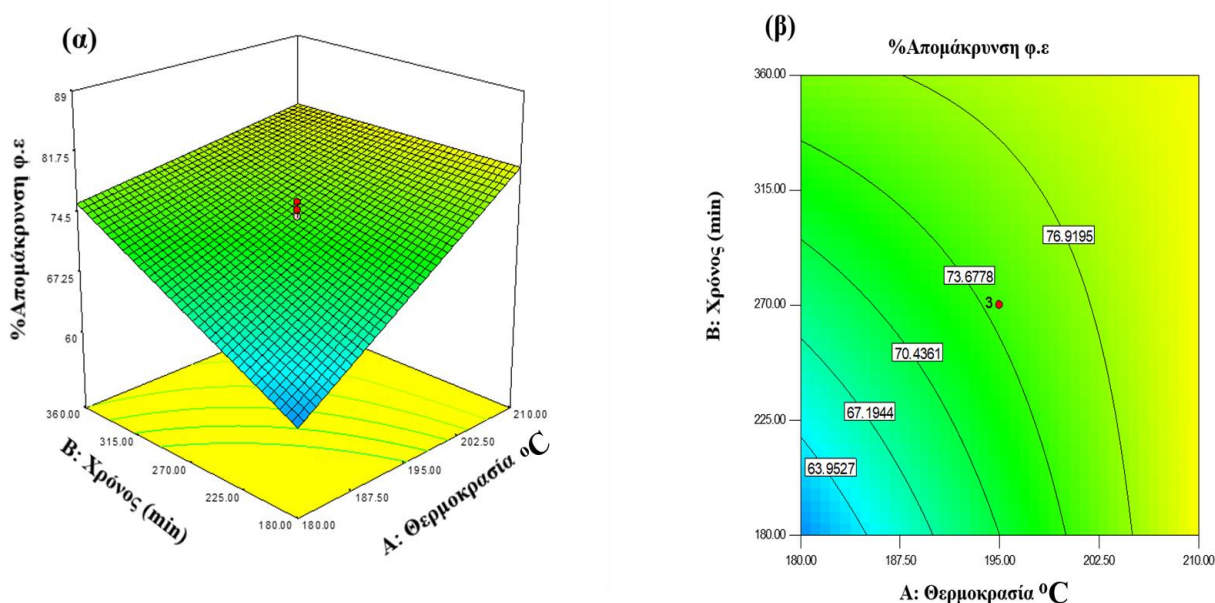
υδροθερμικής αντίδρασης. Αυτοί οι μηχανισμοί περιλαμβάνουν την υδρόλυση, την αφυδάτωση, την αποκαρβοξυλίωση, τον πολυμερισμό και τον αρωματισμό. Φυσικά δεν αντιπροσωπεύουν τα διαδοχικά βήματα μιας αντίδρασης αλλά μάλλον σχηματίζουν ένα παράλληλο δίκτυο διαφορετικών διαδρομών της αντίδρασης. Είναι κατανοητό ότι η λεπτομερής φύση αυτών των μηχανισμών, καθώς και η σχετική σημασία τους κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, εξαρτώνται κυρίως από τον τύπο του υποστρώματος που εισάγεται στην υδροθερμική.

Στο επόμενο σχήμα 11.5 απεικονίζεται η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας και της αναλογίας νερού/λυματολάσπης στην επί τοις % απομάκρυνση φ.ε. Από το σχήμα παρατηρείται ότι η επί τοις % αναλογία νερού/λυματολάσπης δεν επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό απομάκρυνσης αφού αύξηση της αναλογίας αυτής από 5% σε 10%, το ποσοστό απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών φτάνει ένα μέγιστο πλατό στο 70% χωρίς περαιτέρω αύξηση. Παράλληλα η αύξηση της θερμοκρασίας επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό απομάκρυνσης όπως αναφέρθηκε προηγουμένως.

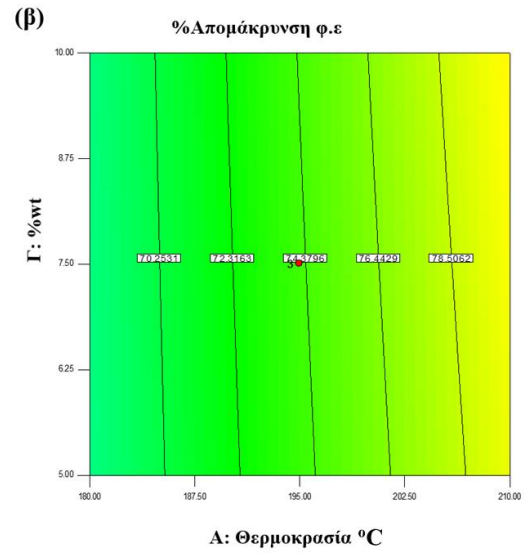
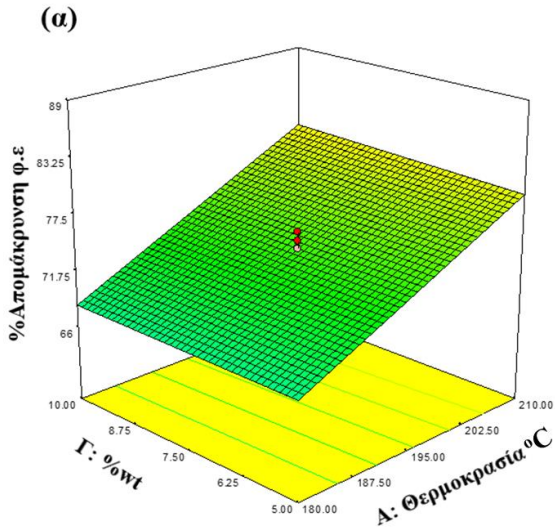
Η επιφάνεια απόκρισης που απεικονίζει τη μεταβολή του ποσοστού απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών συναρτήσει της αναλογίας νερού/λυματολάσπης (παράγοντας Γ) και του χρόνου της υδροθερμικής επεξεργασίας (παράγοντας Β) παρουσιάζεται στο σχήμα 11.6. Καθώς ο χρόνος επαφής νερού και λυματολάσπης αυξάνεται μέσα στο αυτόκλειστο δοχείο από τα 190 λεπτά στα 360 λεπτά παρατηρείται σημαντική αύξηση του ποσοστού απομάκρυνσης των ουσιών από 65% σε 80% ενώ με αύξηση του παράγοντα Γ παρατηρείται μικρή άνοδος του ποσοστού στο 73%. Ο χρόνος παραμονής αποτελεί σημαντικό παράγοντα και έχει παρόμοια αλλά μικρότερη επίδραση στην ανάκτηση στερεών προϊόντων σε σύγκριση με τη θερμοκρασία επειδή ένας μεγάλος χρόνος παραμονής ενισχύει την υδροθερμική αντίδραση (Wang et al., 2018). Αντίθετα η ποσότητα λυματολάσπης που εισάγεται στο αυτόκλειστο φαίνεται να μην επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό απομάκρυνσης των ενώσεων. Έχει αποδειχθεί βιβλιογραφικά πως η εισαγωγή μικρή ποσότητα λάσπης και μεγαλύτερης αναλογίας νερού προωθεί την πλήρη υδρόλυση της λυματολάσπης αφήνοντας ένα πολύ μικρό υπόλειμμα ενώ η αύξηση της ποσότητας της λάσπης με ταυτόχρονη εξάτμιση του νερού ανακτά μεγάλα τμήματα του διαλυμένου οργανικού φορτίου ως στερεό υλικό το οποίο εμποδίζει σε επόμενο στάδιο την περαιτέρω επεξεργασία του δείγματος (Axelsson et al., 2012).

Ο παράγοντας της αυξημένης αυτογενούς πίεσης του συστήματος (περίπου 18-22 bar) κατά τη διάρκεια της υδροθερμικής ανθρακοποίησης μπορεί επίσης να επηρεάσει την

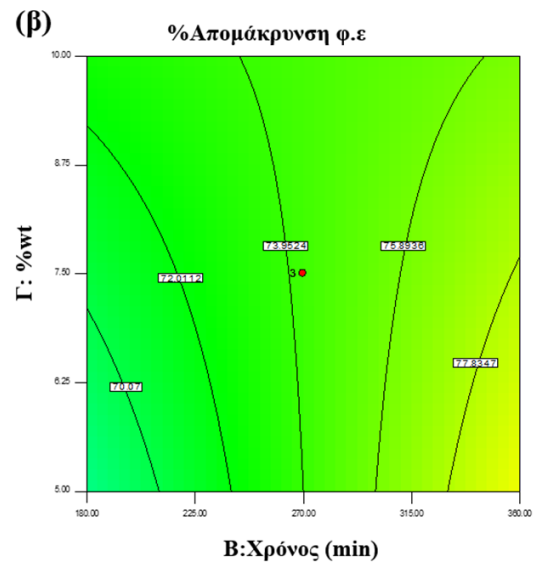
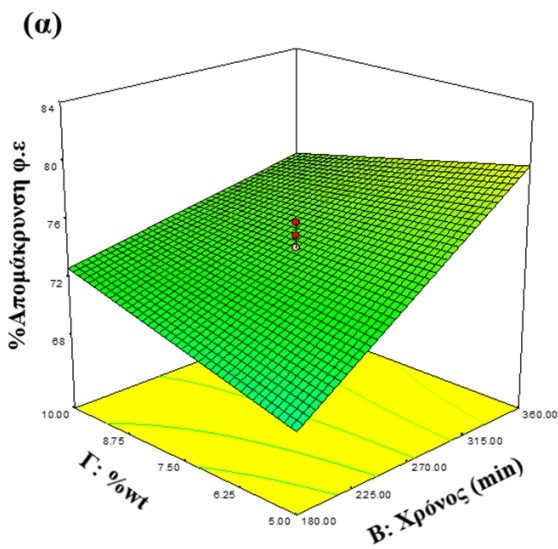
απομάκρυνση των ρύπων. Επιπλέον, τα φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να προσροφηθούν στη λυματολάσπη, να δεσμευτούν μη αναστρέψιμα ή ακόμα και να σχηματίσουν σύμπλοκα που δεν διασπώνται. Είναι γνωστό ότι η αποσύνθεση της αποδομήσιμης οργανικής ύλης και των νεκρών βακτηρίων ξεκινά περίπου στους 200 °C, ενώ το μη βιο-αποδομήσιμο υλικό παραμένει σταθερό έως και πάνω από 300 °C (Conesa et al., 1997). Εναλλακτικά, άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες των φαρμακευτικών ενώσεων θα μπορούσαν να εξηγήσουν το ποσοστό απομάκρυνσής τους συσχετίζοντάς το με τη σταθερά ιοντισμού τους ( $pK_a$ ). Ο vom Eyser et al. το 2015 μελέτησε την απομάκρυνση 8 αντιβιοτικών από τη λυματολάσπη με τη διαδικασία της υδροθερμικής ανθρακοποίησης και προσπάθησε να εξηγήσει το ποσοστό απομάκρυνσής τους συσχετίζοντας τη σταθερά διάστασης ( $K_d$ ) και τα  $pK_a$  των ενώσεων αυτών. Ενώ κάποιες ενώσεις με παρόμοια  $pK_a$  παρουσίασαν ίδια ποσοστά απομάκρυνσης, υπήρχαν και ενώσεις με παραπλήσιες τιμές  $\log K_d$  που παρουσίασαν ποσοστά που διέφεραν κατά 20% όπως για παράδειγμα ήταν η ουσία Ibuprofen ( $\log K_d=1,58$ ) με ποσοστό απομάκρυνσης 60% και η ουσία Carbamazepine ( $\log K_d=1,55$ ) με ποσοστό απομάκρυνσης 80%.



**Σχήμα 11.4:** Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικό γράφημα του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε συνάρτηση της θερμοκρασίας (A) και του χρόνου της αντίδρασης (B).



**Σχήμα 11.5:** Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικό γράφημα του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε συνάρτηση της θερμοκρασίας (A) και επί τοις % αναλογίας λυματολάσπης/νερού (Γ).



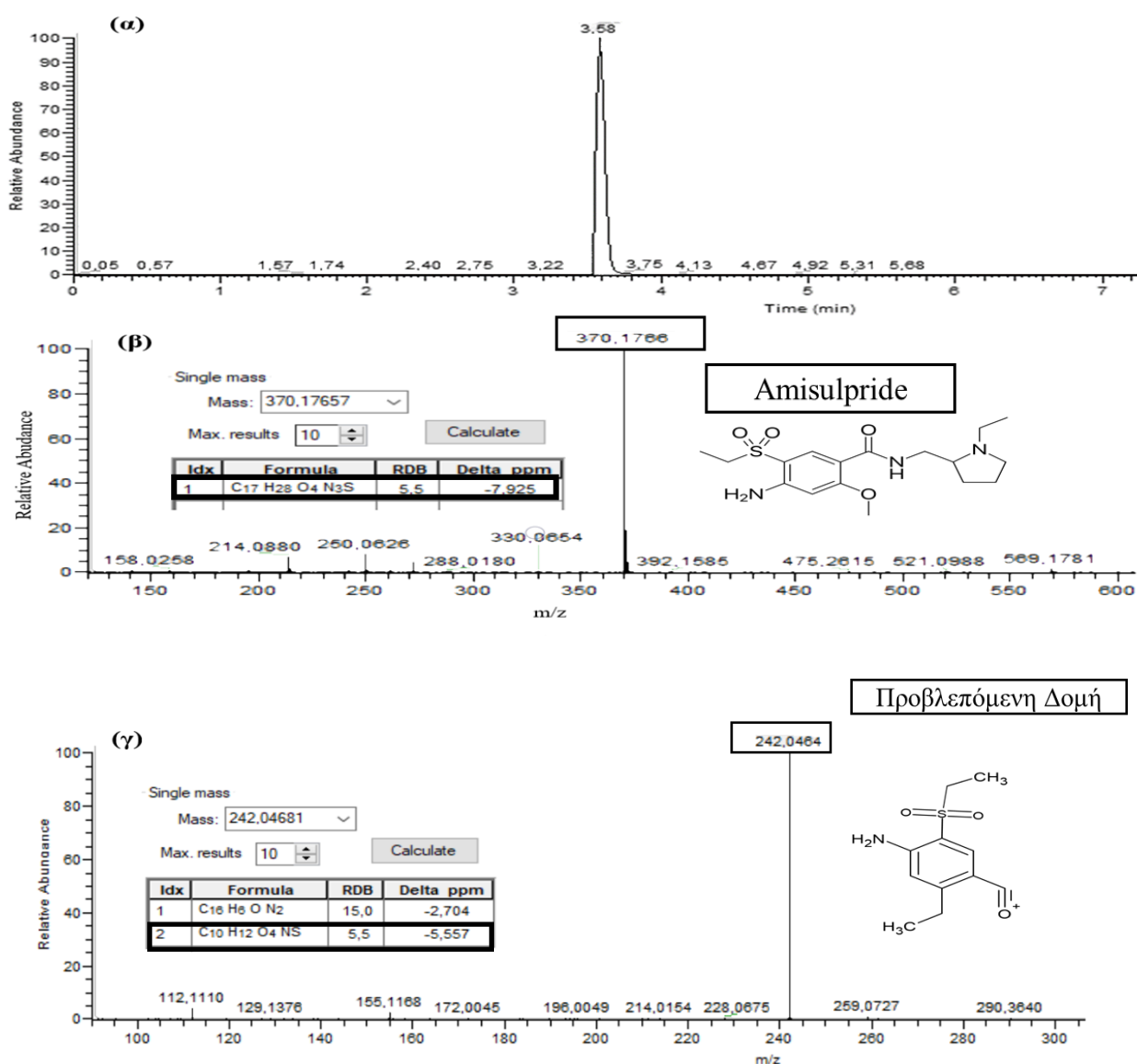
**Σχήμα 11.6:** Επιφάνεια απόκρισης και ισομετρικό γράφημα του ποσοστού απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών σε συνάρτηση του χρόνου (B) και επί τοις % αναλογίας λυματολάσπης/νερού (Γ).

Η βελτιστοποίηση μίας ή περισσότερων αποκρίσεων, μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε με τη χρήση γραφικών μεθόδων (μέσω των επιφανειών απόκρισης ή των ισομετρικών διαγραμμάτων), είτε με τη χρήση μαθηματικών μεθόδων (συνάρτηση επιθυμίας, desirability function, D). Για τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών χρησιμοποιήθηκε η συνάρτηση επιθυμητότητας (Desirability function, D). Η απόκριση (% απομάκρυνση) ορίζεται ως συνάρτηση επιθυμίας και υπολογίζεται η τιμή της που σε βέλτιστες συνθήκες ισούται με 1, ενώ για τιμές εκτός στόχου η συνάρτηση τείνει προς το μηδέν. Οι βέλτιστες τιμές που υπολογίστηκαν με την παραπάνω μέθοδο ανήκουν στις εξής περιοχές: θερμοκρασία από 205,35 έως 210, χρόνος από 297 έως 360 λεπτά και %αναλογία λυματολάσπης/νερού (actual factor) 8,89%. Η % απομάκρυνση των ενώσεων στις συνθήκες αυτές κυμαίνεται από 72,23% έως 88,63%.

## 11.4 Μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση αντιπροσωπευτικών φαρμακευτικών ενώσεων από τη λυματολάσπη με τη μέθοδο της επιφανειακής απόκρισης

### (α) Amisulpride

Στο δείγμα λυματολάσπης μία από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκε σε υψηλή συγκέντρωση ήταν η ένωση Amisulpride με συγκέντρωση 506,5 ng L<sup>-1</sup>. Στο σχήμα 11.7 απεικονίζεται η θετική ανίχνευση της ένωσης σε δείγμα λάσπης χρησιμοποιώντας αρχικά ως φίλτρο την ακριβή θεωρητική μάζα της ένωσης και έπειτα το ιόν θραυσματοποίησης με τη χρήση MS/MS.



**Σχήμα 11.7:** (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Amisulpride.

Όμοια με την απομάκρυνση του συνόλου των φαρμακευτικών ενώσεων από τη λυματολάσπη, η επίδραση των παραμέτρων στην απομάκρυνση της ουσίας Amisulpride με τη μέθοδο της υδροθερμικής αναθρακοποίησης μελετήθηκε με τη χρήση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της επιφανειακής απόκρισης. Σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν 17 πειράματα συνδυάζοντας τις τρεις παραμέτρους (Α:Θερμοκρασία, Β:Χρόνος και Γ:%wt) με τις ίδιες συνθήκες του προηγούμενου υπό μελέτη συστήματος. Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις εκατό απομάκρυνσης της ουσίας Amisulpride παρουσιάζονται στον πίνακα 11.3.

**Πίνακας 11.3:** Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ένωσης Amisulpride.

Αριθμός Πειραμάτων	Παράγοντας 1 Α: Θερμοκρασία °C	Παράγοντας 2 Β: Χρόνος min	Παράγοντας 3 Α: %wt	%απομάκρυνση Amisulpride
1	195,00	270,00	7,50	94,72
2	210,00	360,00	10,00	99,84
3	195,00	421,36	7,50	99,84
4	180,00	180,00	10,00	91,92
5	195,00	270,00	11,70	96,05
6	220,23	270,00	7,50	96,54
7	195,00	270,00	7,50	95,57
8	195,00	270,00	3,30	94,49
9	210,00	180,00	5,00	94,76
10	16977	270,00	7,50	95,85
11	210,00	180,00	10,00	99,84
12	180,00	360,00	5,00	99,84
13	180,00	180,00	5,00	95,14
14	195,00	118,64	7,50	94,84
15	210,00	360,00	5,00	95,32
16	195,00	270,00	7,50	95,04
17	180,00	360,00	10,00	94,64

Επιπλέον, στον πίνακα 11.4 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) η οποία απέδειξε τη σημαντικότητα του δευτεροβάθμιου πολυωνυμικού μοντέλου σύμφωνα με την υψηλή τιμή του λόγου F (16,05) και τη μικρή τιμή ( $p < 0,0007$ ) στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Η μη σημαντική έλλειψη προσαρμογής (Lack of fit), οι σχετικά υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (0,9538), καθώς επίσης και του διορθωμένου (ως προς τους βαθμούς ελευθερίας) συντελεστή προσδιορισμού συσχέτισης  $R_{Adj}^2$  (0,8944) επιβεβαιώνουν το υψηλό επίπεδο σημαντικότητας και την καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Έτσι από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το πολυωνυμικό τετραεδρικό μοντέλο (Quadratic) είναι το

καταλληλότερο και περιγράφει τη συσχέτιση των παραμέτρων με την κωδικοποιημένη τους μορφή με την επί τοις % απομάκρυνση της ουσίας Amisulpride σύμφωνα με την Εξίσωση 3:

$$\% \text{Απομάκρυνση Amisulpride} = +95,11 + 0,69 *A + 1,20 *B + 0,28 *C - 0,86 *A*B + 2,25 *A*C - 0,32 *B*C + 0,40 A^2 + 0,80 B^2 + 0,073 C^2 \quad (3)$$

όπου A είναι η παράμετρος της θερμοκρασίας, B ο χρόνος και Γ η επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt). Παράλληλα η πολυωνυμική εξίσωση με τις πραγματικές παραμέτρους έχει την εξής μορφή (Εξίσωση 4):

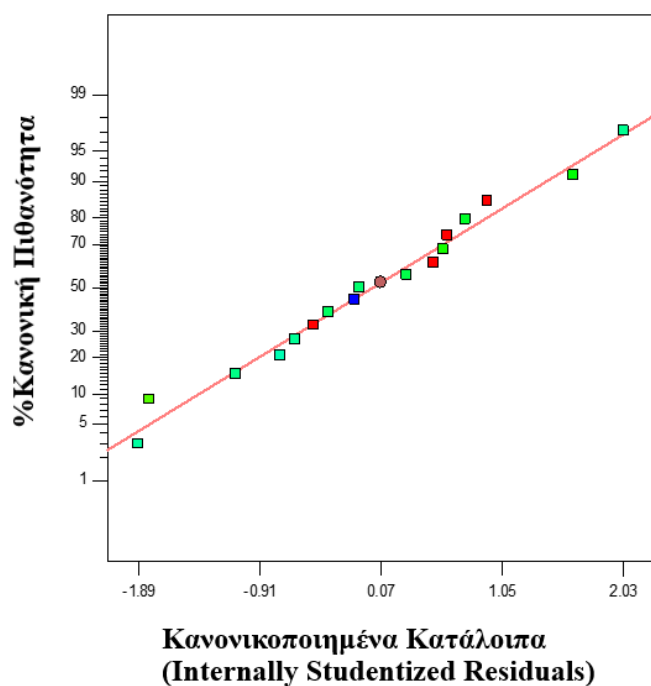
$$\% \text{Απομάκρυνση Amisulpride} = +208,79 - 0,93 *A + 0,09*B - 11,4 *C - 6,35 *A*B + 0,06 *A*C - 1,41 *B*C + 1,77 A^2 + 9,93 B^2 + 0,01 C^2 \quad (4)$$

**Πίνακας 11.4:** Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Amisulpride από τη λυματολάσπη.

Παράμετροι	Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p
Μοντέλο	82,61	9	9,18	16,05	0,0007 <b>σημαντικό</b>
A-Θερμοκρασία	6,44	1	6,44	11,27	0,0121
B-Χρόνος	19,67	1	19,67	34,39	0,0006
Γ-%wt	1,06	1	1,06	1,85	0,2157
A B	5,88	1	5,88	10,29	0,0149
A Γ	40,59	1	40,59	70,98	<0,0001
B Γ	0,81	1	0,81	1,41	0,2737
A <sup>2</sup>	1,80	1	1,80	3,15	0,1190
B <sup>2</sup>	7,30	1	7,30	12,77	0,0091
Γ <sup>2</sup>	0,060	1	0,060	0,10	0,7554
Υπόλειμμα	4,00	7	0,57		
Έλλειψη προσαρμογής	3,63	5	0,73	3,94	0,2146 <b>μη σημαντικό</b>
Καθαρό Σφάλμα	0,37	2	0,18		
Διορθωμένο Σύνολο	86,61	16			

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα για τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό η παράμετρος του χρόνου (B), η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με την επί τοις %αναλογία

λυματολάσπης/νερού (ΑΓ) και η επίδραση δευτέρου βαθμού του χρόνου ( $B^2$ ) αποτελούν σημαντικές παραμέτρους με  $p < 0,0006$ ,  $p < 0,0001$  και  $p < 0,0091$  αντίστοιχα. Σε αντίθεση με τα παραπάνω η παράμετρος Γ παρουσίασε αυξημένο επίπεδο σημαντικότητας με  $p < 0,2157$ . Οι τετραγωνικοί όροι στις εξισώσεις (3) και (4) υποδηλώνουν τον τρόπο κύρτωσης της επιφάνειας απόκρισης με το θετικό πρόσημο να δηλώνει αποκλίνουσα επιφάνεια και το αρνητικό πρόσημο να δηλώνει συγκλίνουσα (Mäkelä, 2017). Στο σχήμα 11.8 εμφανίζεται το διάγραμμα κανονικής πιθανότητας των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals) αποτυπώνοντας μία κανονική κατανομή των σημείων που προσεγγίζουν την ευθεία γραμμή υποδηλώνοντας την καλή προσαρμογή του μοντέλου ενώ η καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά αποτελέσματα στηρίζεται και στη χαμηλή τιμή του συντελεστή διακύμανσης ( $CV = 0,79\%$ ).

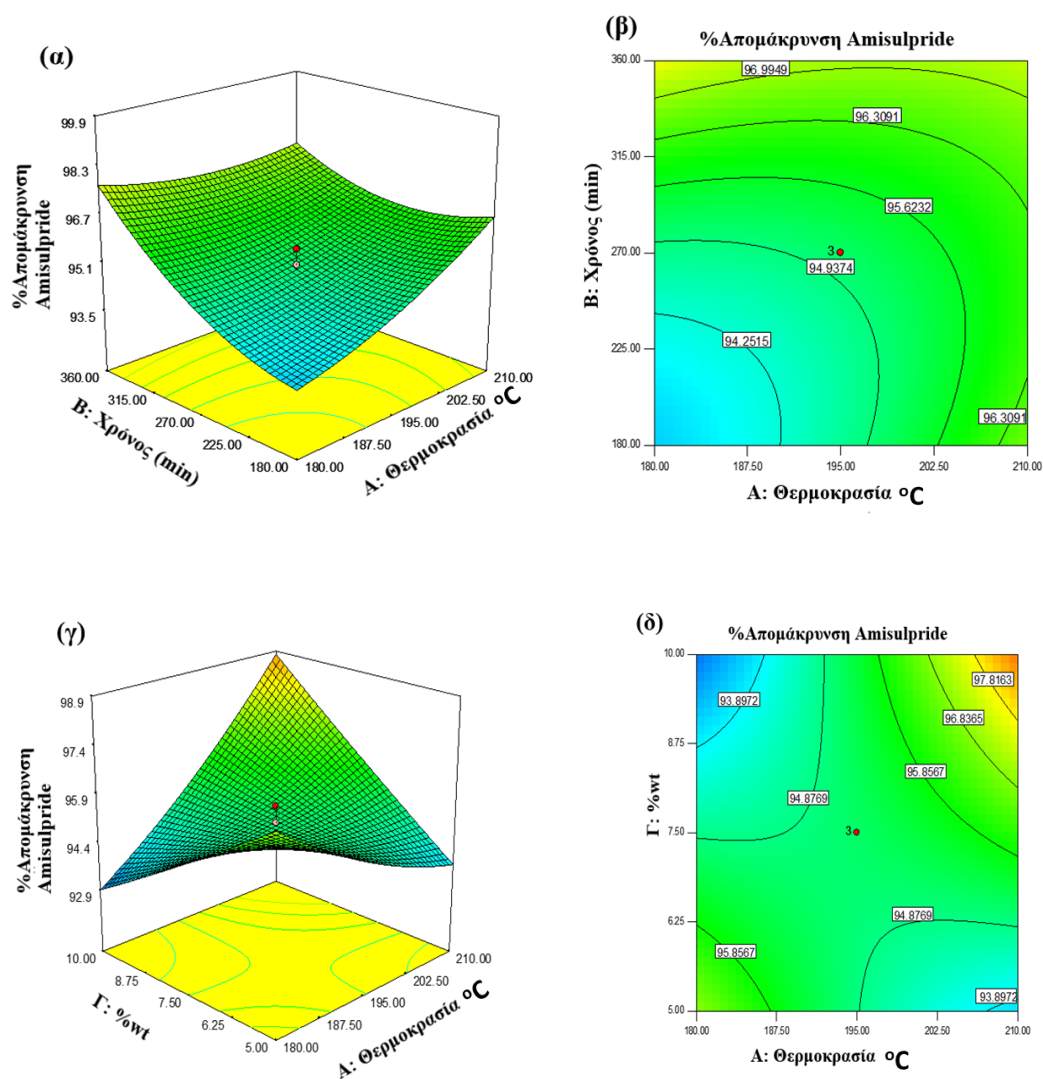


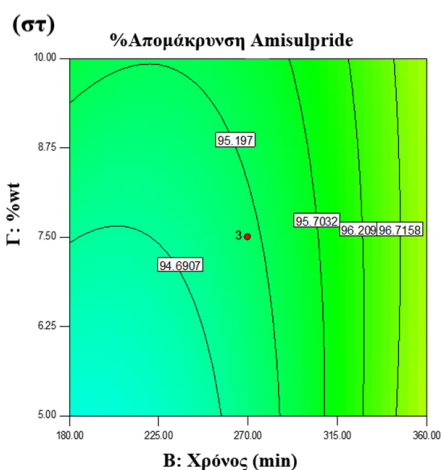
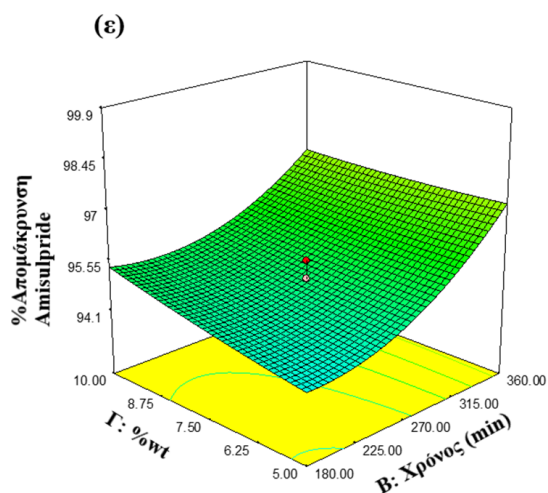
**Σχήμα 11.8:** Διάγραμμα κανονικής πιθανότητας των κανονικοποιημένων καταλοίπων (Internally Studentized Residuals).

Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα που απεικονίζουν τη μεταβολή του ποσοστού απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών συναρτήσει των αναλογιών νερού/λυματολάσπης (παράγοντας Γ), του χρόνου της υδροθερμικής επεξεργασίας (παράγοντας Β) και της θερμοκρασίας (Α) παρουσιάζονται στο σχήμα 11.9. Στα σχήματα α) και β) καθώς η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης της υδροθερμικής αυξάνονται, επιταχύνεται το ποσοστό απομάκρυνσης του φαρμάκου. Συγκεκριμένα όταν η θερμοκρασία



αυξήθηκε από τους 180°C στους 210°C και ο χρόνος από τα 180 λεπτά στα 360 λεπτά επιτεύχθηκε η πλήρης αποδόμηση της ένωσης αφού το ποσοστό απομάκρυνσης αυξήθηκε από 90% σε 98,3%. Αντίστοιχα το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα σχήματα (γ)-(δ) και (ε)-(στ) αφού στις μέγιστες τιμές των παραμέτρων Α,Β και Γ επιτεύχθηκε η πλήρης απομάκρυνση της ουσίας Amisulpride από τη λυματολάσπη. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία αφού η ένωση Amisulpride κατά τη θερμική ανάλυση (TG/DTA) αρχίζει και διασπάται σε θερμοκρασία υψηλότερη από τους 202°C (Salama et al., 2015).

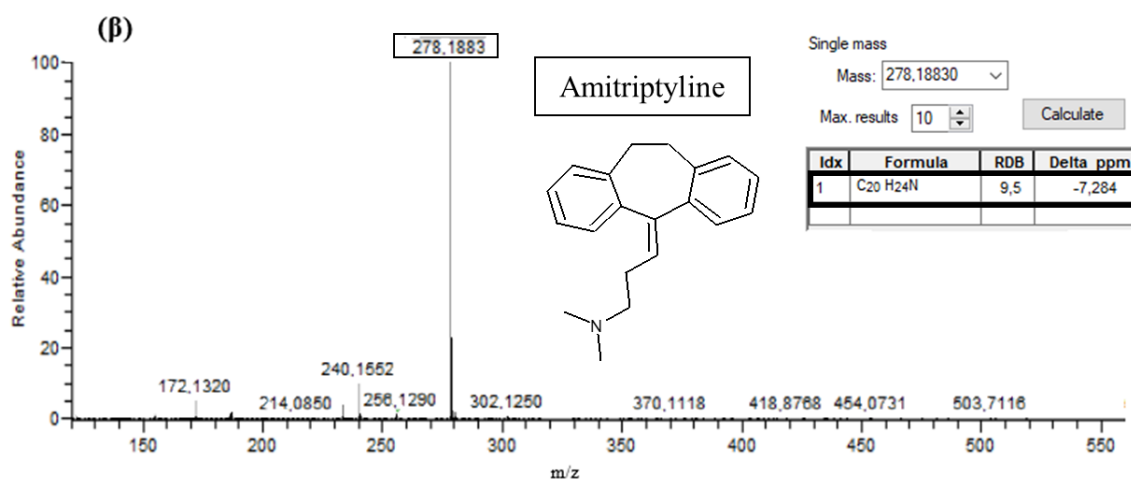
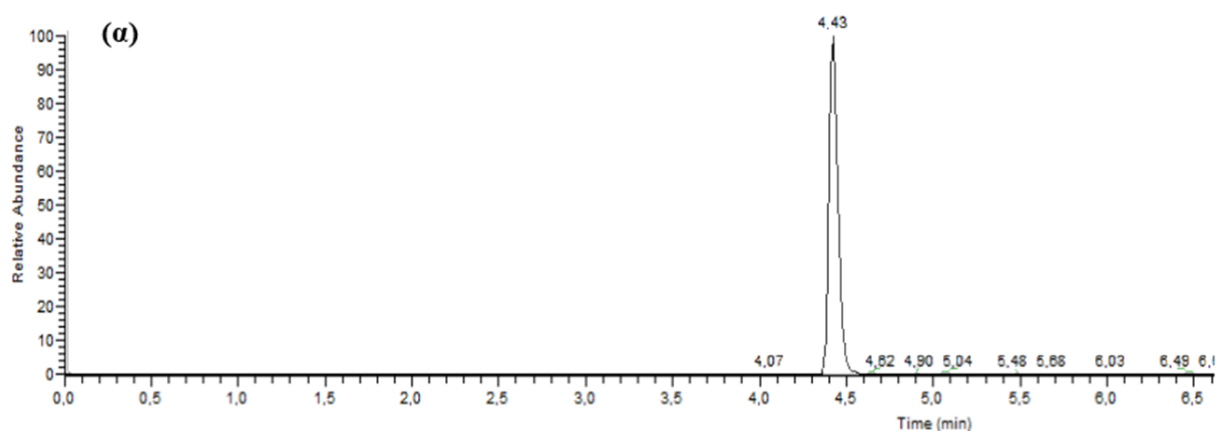


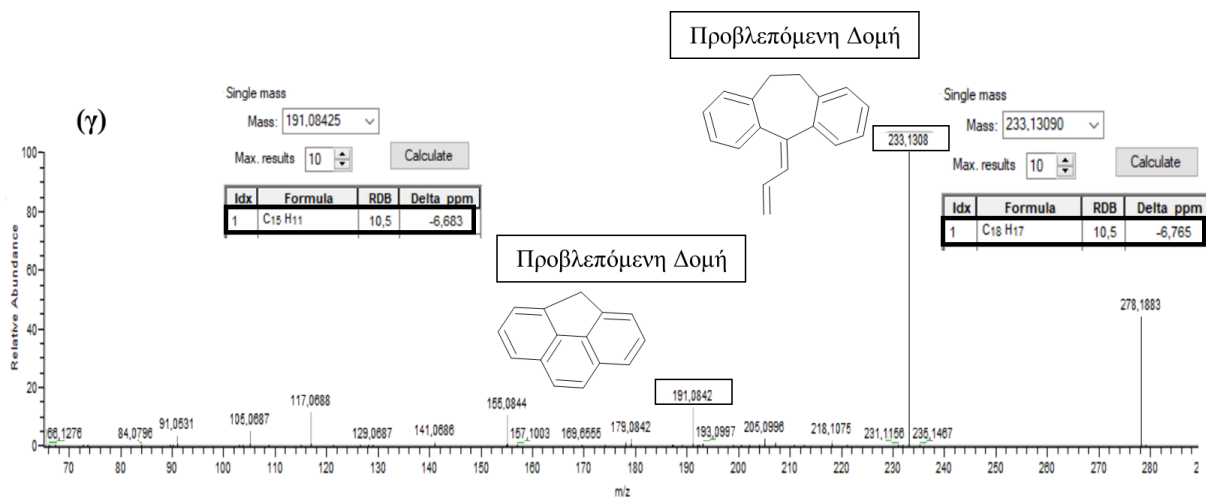


**Σχήμα 11.9:** Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Amisulpride: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ).

## (β) Amitriptyline

Στο δείγμα λυματολάσπης μία από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκε σε υψηλή συγκέντρωση ήταν η ένωση Amitriptyline με συγκέντρωση 239,4 ng L<sup>-1</sup>. Στο σχήμα 11.10 απεικονίζεται η θετική ανίχνευση της ένωσης σε δείγμα λάσπης χρησιμοποιώντας αρχικά ως φίλτρο την ακριβή θεωρητική μάζα της ένωσης και έπειτα το ιόν θραυσματοποίησης με τη χρήση MS/MS.





**Σχήμα 11. 10:** (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Amitriptyline.

Όμοια με την απομάκρυνση της ουσίας Amisulpride από τη λυματολάσπη, η επίδραση των παραμέτρων στην απομάκρυνση της ουσίας Amitriptyline με τη μέθοδο της υδροθερμικής αναθρακοποίησης μελετήθηκε με τη χρήση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της επιφανειακής απόκρισης. Σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν 17 πειράματα συνδυάζοντας τις τρεις παραμέτρους (Α:Θερμοκρασία, Β:Χρόνος και Γ:%wt) με τις ίδιες συνθήκες του προηγούμενου υπό μελέτη συστήματος. Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις εκατό απομάκρυνσης της ουσίας Amitriptyline παρουσιάζονται στον πίνακα 11.5.

**Πίνακας 11.5:** Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ένωσης Amitriptyline.

Αριθμός Πειραμάτων	Παράγοντας 1 A: Θερμοκρασία °C	Παράγοντας 2 B: Χρόνος min	Παράγοντας 3 A: %wt	%απομάκρυνση Amitriptyline
1	195,00	270,00	7,50	95,32
2	210,00	360,00	10,00	99,58
3	195,00	421,36	7,50	98,70
4	180,00	180,00	10,00	93,10
5	195,00	270,00	11,70	99,33
6	220,23	270,00	7,50	98,83
7	195,00	270,00	7,50	93,98
8	195,00	270,00	3,30	97,91
9	210,00	180,00	5,00	95,53
10	169,77	270,00	7,50	98,32
11	210,00	180,00	10,00	97,57
12	180,00	360,00	5,00	97,45
13	180,00	180,00	5,00	96,36
14	195,00	118,64	7,50	96,65
15	210,00	360,00	5,00	95,65
16	195,00	270,00	7,50	93,52
17	180,00	360,00	10,00	92,14

Επιπλέον, στον πίνακα 11.6 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) με βάση την οποία το δευτεροβάθμιο πολυωνυμικό μοντέλο δεν αποτελεί σημαντική παράμετρο με χαμηλή τιμή του λόγου F (1,48) και μεγαλύτερη τιμή ( $p < 0,3085$ ) στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το πολυωνυμικό τετραεδρικό μοντέλο (Quadratic) είναι το καταλληλότερο παρουσιάζοντας σχετικά υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (0,6560), καθώς επίσης και του διορθωμένου (ως προς τους βαθμούς ελευθερίας) συντελεστή προσδιορισμού συσχέτισης  $R_{Adj}^2$  (0,2137) σε σύγκριση με την εφαρμογή των υπόλοιπων μοντέλων ως προς την απομάκρυνση του Amitriptyline. Έτσι η συσχέτιση των παραμέτρων με την κωδικοποιημένη τους μορφή με την επί τοις % απομάκρυνση της ουσίας Amitriptyline περιγράφεται σύμφωνα με την Εξίσωση 5:

$$\% \text{Απομάκρυνση Amitriptyline} = +94,43 + 0,74 *A + 0,54 *B - 0,016 *C + 0,25 *A*B + 1,82 *A*C - 0,020 *B*C + 0,98 A^2 + 0,49 B^2 + 1,00 C^2 \quad (5)$$

όπου A είναι η παράμετρος της θερμοκρασίας, B ο χρόνος και Γ η επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt). Παράλληλα η πολυωνυμική εξίσωση με τις πραγματικές παραμέτρους έχει την εξής μορφή (Εξίσωση 6):

$$\% \text{Απομάκρυνση Amitriptyline} = +342,68 - 2,06 * A - 0,06 * B - 11,82 * C + 0,0002 * A * B + 0,05 * A * C - 0,00008 * B * C + 0,004 A^2 + 0,00006 B^2 + 0,15 C^2 \quad (6)$$

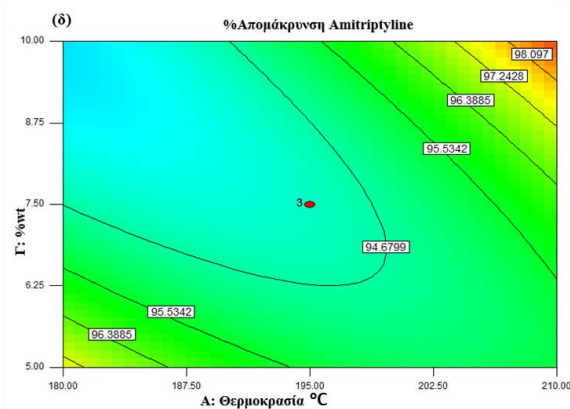
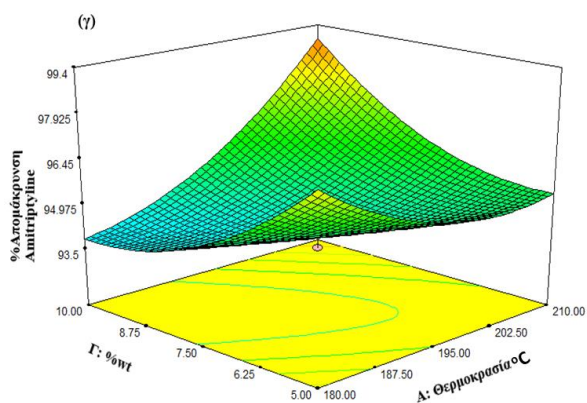
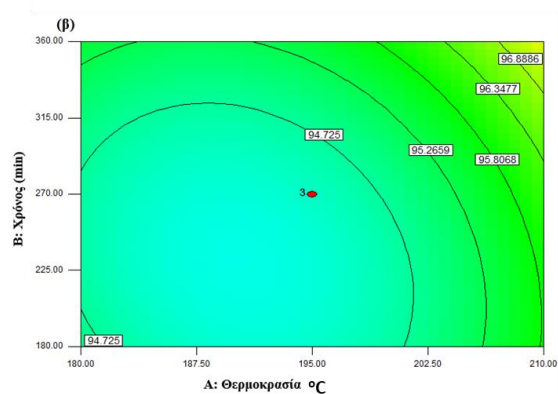
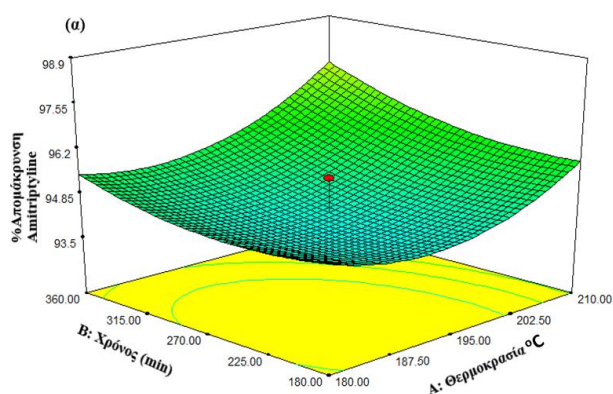
**Πίνακας 11.6:** Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Amitriptyline από τη λυματολάσπη.

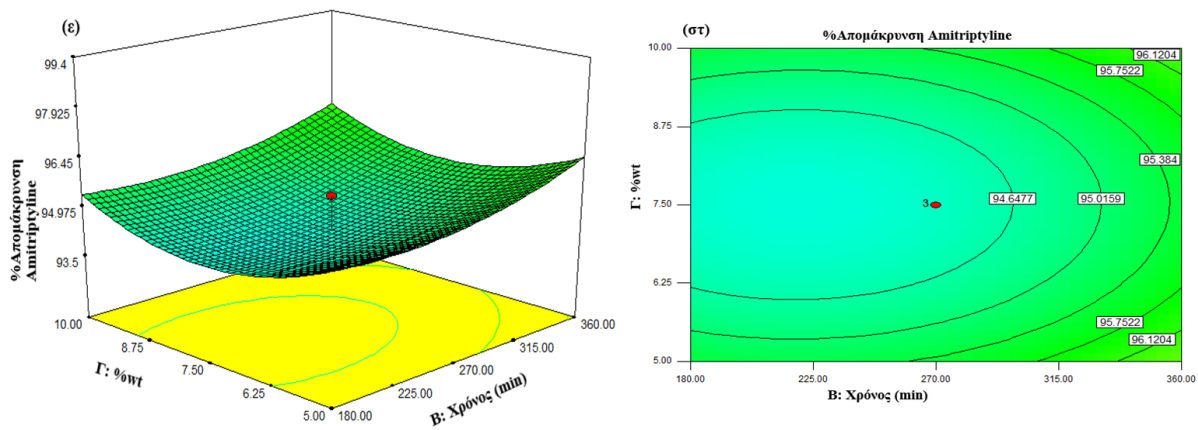
Παράμετροι	Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p
Μοντέλο	55,48	9	6,16	1,48	0,3085
A-Θερμοκρασία	7,53	1	7,53	1,81	<b>μη σημαντικό</b> 0,2204
B-Χρόνος	4,00	1	4,00	0,96	0,3593
Γ-%wt	0,003	1	0,003	0,0008	0,9784
A B	0,50	1	0,50	0,12	0,7389
A Γ	26,43	1	26,43	6,36	0,0397
B Γ	0,003	1	0,003	0,0008	0,9786
A <sup>2</sup>	10,84	1	10,84	2,61	0,1504
B <sup>2</sup>	2,66	1	2,66	0,64	0,4502
Γ <sup>2</sup>	11,19	1	11,19	2,69	0,1448
Υπόλειμμα	29,09	7	4,16		
Έλλειψη προσαρμογής	27,34	5	5,47	6,25	0,1436 <b>μη σημαντικό</b>
Καθαρό Σφάλμα	1,75	2	0,87		
Διορθωμένο Σύνολο	84,57	16			

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα για τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό η παράμετρος της θερμοκρασίας και η αλληλεπίδραση της θερμοκρασίας με την επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (ΑΓ) με  $p < 0,2204$  και  $p < 0,0397$  αντίστοιχα αποτελούν σημαντικές παραμέτρους. Σε αντίθεση με τα παραπάνω η παράμετρος Γ παρουσίασε αυξημένο επίπεδο σημαντικότητας με  $p < 0,9784$ . Το παραπάνω τετραεδρικό πολωνιμικό μοντέλο παρουσιάζει μία μέτρια προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά αποτελέσματα εμφανίζοντας χαμηλή τιμή του συντελεστή διακύμανσης ( $CV = 2,11\%$ ).

Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα που απεικονίζουν τη μεταβολή του ποσοστού απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών συναρτήσει των αναλογιών

νερού/λυματολάσπης (παράγοντας Γ), του χρόνου της υδροθερμικής επεξεργασίας (παράγοντας Β) και της θερμοκρασίας (Α) παρουσιάζονται στο σχήμα 11.11. Στα σχήματα α) και β) καθώς η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης της υδροθερμικής αυξάνονται, επιταχύνεται το ποσοστό απομάκρυνσης του φαρμάκου. Συγκεκριμένα όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 180°C στους 210°C και ο χρόνος από τα 180 λεπτά στα 360 λεπτά επιτεύχθηκε η πλήρης αποδόμηση της ένωσης αφού το ποσοστό απομάκρυνσης αυξήθηκε από 92% σε 99%. Αντίστοιχα το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα σχήματα (γ)-(δ) και (ε)-(στ) αφού στις μέγιστες τιμές των παραμέτρων Α, Β και Γ επιτεύχθηκε η πλήρης απομάκρυνση της ουσίας Amitriptyline από τη λυματολάσπη. Η ουσία Amitriptyline ανήκει στην ευρύτερη ομάδα των αντικαταθλιπτικών φαρμάκων (Imipramine). Οι ουσίες αυτής της ομάδας κατά τη θερμική ανάλυση αρχίζουν και χάνουν το 80% της μάζας τους σε θερμοκρασίες από 200 °C έως 400 °C ενώ παρουσιάζουν μία μικρή απώλεια μάζας της τάξεως του 1-2% σε θερμοκρασίες από 30 °C έως 200 °C (Ali et al., 2020).



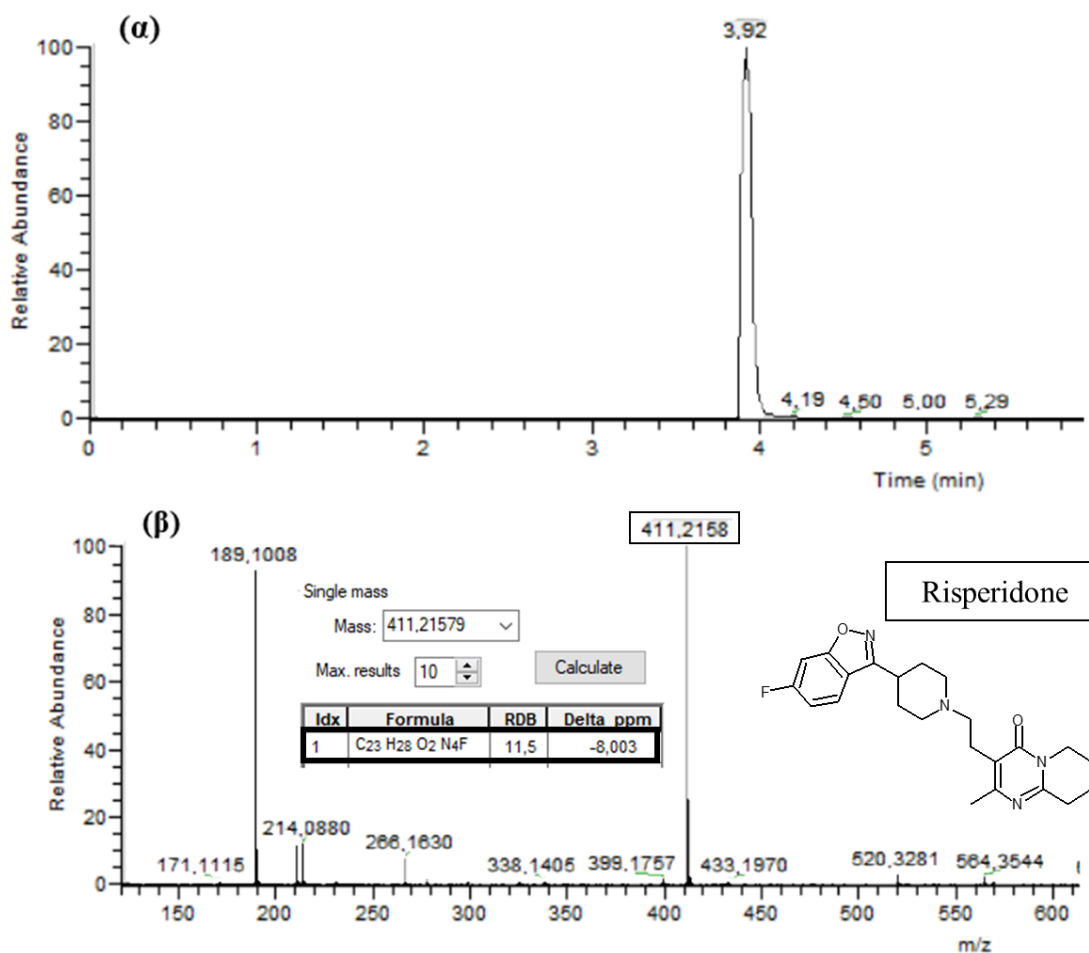


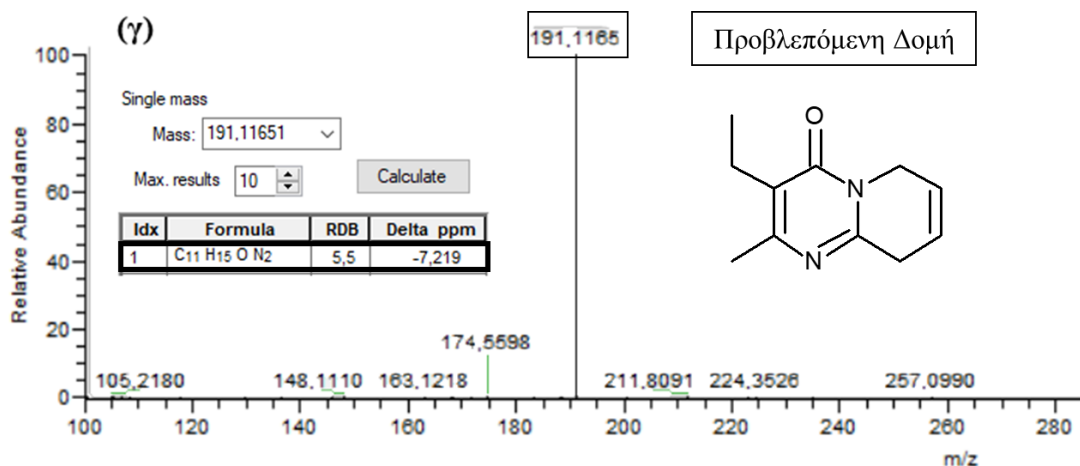
**Σχήμα 11.11:** Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Amitriptyline: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ).



(γ) *Risperidone*

Στο δείγμα λυματολάσπης μία από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκε σε υψηλή συγκέντρωση ήταν η ένωση Risperidone με συγκέντρωση 76,2 ng L<sup>-1</sup>. Στο σχήμα 11.12 απεικονίζεται η θετική ανίχνευση της ένωσης σε δείγμα λάσπης χρησιμοποιώντας αρχικά ως φίλτρο την ακριβή θεωρητική μάζα της ένωσης και έπειτα το ιόν θραυσματοποίησης με τη χρήση MS/MS.





**Σχήμα 11.12:** (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Risperidone.

Όμοια με την απομάκρυνση της ουσίας Amitriptyline από τη λυματολάσπη, η επίδραση των παραμέτρων στην απομάκρυνση της ουσίας Risperidone με τη μέθοδο της υδροθερμικής αναθρακοποίησης μελετήθηκε με τη χρήση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της επιφανειακής απόκρισης. Σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν 17 πειράματα συνδυάζοντας τις τρεις παραμέτρους (Α:Θερμοκρασία, Β:Χρόνος και Γ:%wt) με τις ίδιες συνθήκες του προηγούμενου υπό μελέτη συστήματος. Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις εκατό απομάκρυνσης της ουσίας Risperidone παρουσιάζονται στον πίνακα 11.7.

**Πίνακας 11.7:** Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ένωσης Risperidone.

Αριθμός Πειραμάτων	Παράγοντας 1 A: Θερμοκρασία °C	Παράγοντας 2 B: Χρόνος min	Παράγοντας 3 A: %wt	%απομάκρυνση Risperidone
1	195,00	270,00	7,50	73,09
2	210,00	360,00	10,00	97,11
3	195,00	421,36	7,50	99,14
4	180,00	180,00	10,00	32,93
5	195,00	270,00	11,70	71,65
6	220,23	270,00	7,50	98,42
7	195,00	270,00	7,50	73,75
8	195,00	270,00	3,30	97,11
9	210,00	180,00	5,00	97,11
10	169,77	270,00	7,50	68,76
11	210,00	180,00	10,00	97,11
12	180,00	360,00	5,00	59,71
13	180,00	180,00	5,00	98,80
14	195,00	118,64	7,50	25,59
15	210,00	360,00	5,00	97,11
16	195,00	270,00	7,50	72,44
17	180,00	360,00	10,00	97,11

Επιπλέον, στον πίνακα 11.8 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) με βάση την οποία το δευτεροβάθμιο πολυωνυμικό μοντέλο δεν αποτελεί σημαντική παράμετρο με χαμηλή τιμή του λόγου F (2,39) και μεγαλύτερη τιμή ( $p < 0,1074$ ) στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Αντίθετα η έλλειψη προσαρμογής αποτελεί σημαντικό παράγοντα με υψηλή τιμή του λόγου F (1046.9) και υψηλό επίπεδο σημαντικότητας με μικρή τιμή ( $p < 0,0010$ ). Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το πολυωνυμικό μοντέλο δύο παραγόντων (2FI) είναι το καταλληλότερο παρουσιάζοντας σχετικά υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (0,5889), καθώς επίσης και του διορθωμένου (ως προς τους βαθμούς ελευθερίας) συντελεστή προσδιορισμού συσχέτισης  $R_{Adj}^2$  (0,3423) σε σύγκριση με την εφαρμογή των υπόλοιπων μοντέλων ως προς την απομάκρυνση του Risperidone. Έτσι η συσχέτιση των παραμέτρων με την κωδικοποιημένη τους μορφή με την επί τοις % απομάκρυνση της ουσίας Risperidone περιγράφεται σύμφωνα με την Εξίσωση 7:

$$\begin{aligned} \% \text{Απομάκρυνση Risperidone} = & +79,82 + 10,97 *A + 10,89 *B - 5,22 *C - 3,14 *A*B + 3,56 \\ & *A*C + 12,91 *B*C \end{aligned} \quad (7)$$

όπου A είναι η παράμετρος της θερμοκρασίας, B ο χρόνος και Γ η επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt). Παράλληλα η πολυωνυμική εξίσωση με τις πραγματικές παραμέτρους έχει την εξής μορφή (Εξίσωση 8):

$$\% \text{Απομάκρυνση Risperidone} = +52,88 + 0,64 *A + 0,14*B - 36,08 *C - 0,002 *A*B + 0,09 *A*C - 0,05 *B*C \quad (8)$$

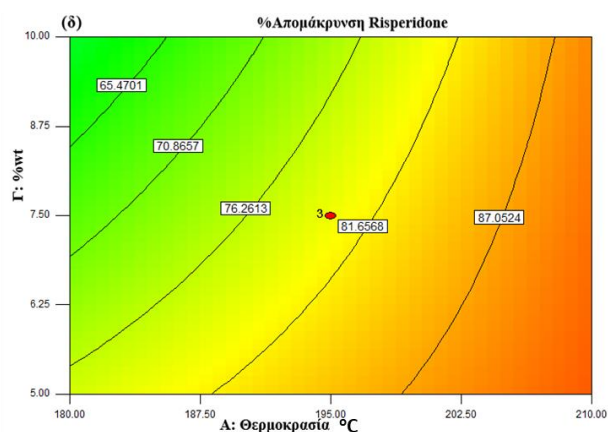
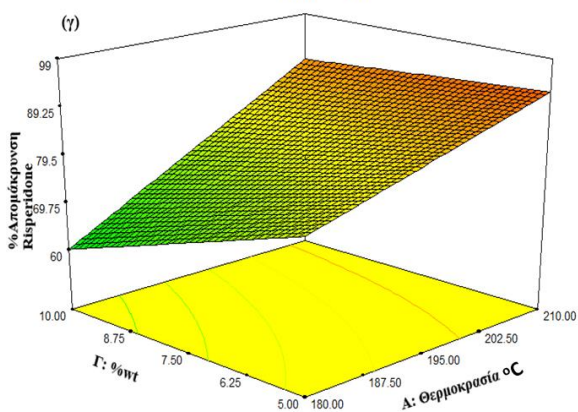
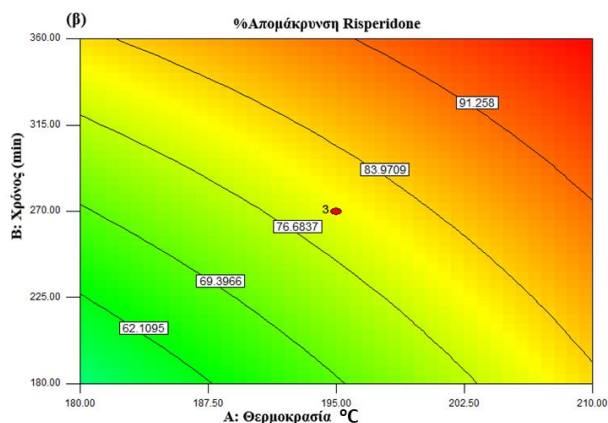
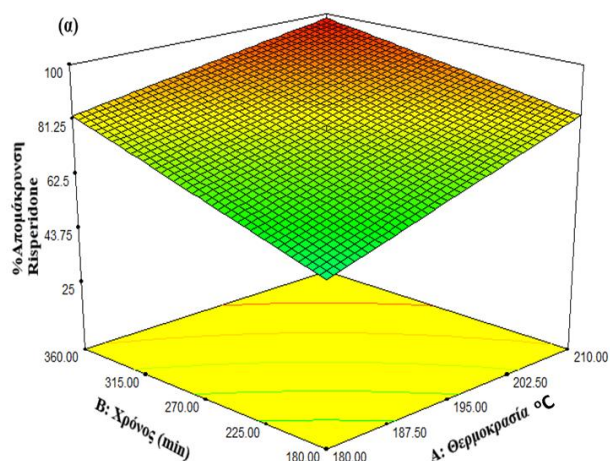
**Πίνακας 11.8:** Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Risperidone από τη λυματολάσπη.

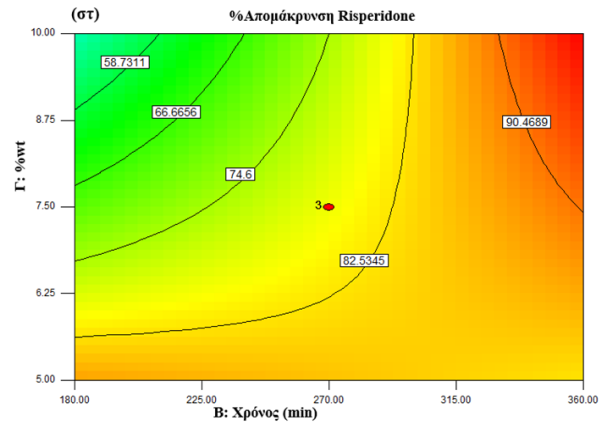
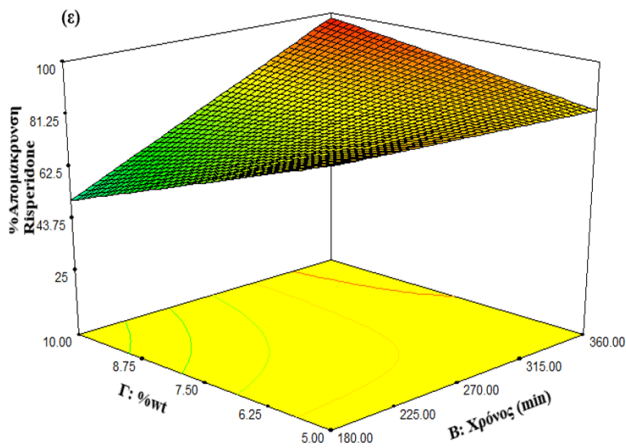
Παράμετροι	Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p
Μοντέλο	5148,70	6	858,12	2,39	0,1074
A-Θερμοκρασία	1642,52	1	1642,52	4,57	<b>μη σημαντικό</b> 0,0583
B-Χρόνος	1620,96	1	1620,96	4,51	0,0597
Γ-%wt	372,12	1	372,12	1,04	0,3329
A B	78,69	1	78,69	0,22	0,6499
A Γ	101,32	1	101,32	0,28	0,6070
B Γ	1333,09	1	1333,09	3,71	0,0830
Υπόλειμμα	3594,08	10	359,41		
Έλλειψη προσαρμογής	3593,22	8	449,15	1046,9	<b>0,0010 σημαντικό</b>
Καθαρό Σφάλμα	0,86	2	0,43		
Διορθωμένο Σύνολο	8742,78	16			

Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα για τον κεντρικό σύνθετο σχεδιασμό η παράμετρος της θερμοκρασίας, του χρόνου και η αλληλεπίδραση του χρόνου με την επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (BΓ) με  $p < 0,0583$ ,  $p < 0,0597$  και  $p < 0,0830$  αντίστοιχα αποτελούν σημαντικές παραμέτρους. Σε αντίθεση με τα παραπάνω η παράμετρος Γ παρουσίασε αυξημένο επίπεδο σημαντικότητας με  $p < 0,3329$ . Το παραπάνω πολυωνυμικό μοντέλο παρουσιάζει μία μέτρια προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά αποτελέσματα εμφανίζοντας τιμή συντελεστή διακύμανσης ( $CV = 23,75\%$ ).

Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα που απεικονίζουν τη μεταβολή του ποσοστού απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών συναρτήσει των αναλογιών

νερού/λυματολάσπης (παράγοντας Γ), του χρόνου της υδροθερμικής επεξεργασίας (παράγοντας Β) και της θερμοκρασίας (Α) παρουσιάζονται στο σχήμα 11.13. Στα σχήματα α) και β) καθώς η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης της υδροθερμικής αυξάνονται, επιταχύνεται το ποσοστό απομάκρυνσης του φαρμάκου. Συγκεκριμένα όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 180°C στους 210°C και ο χρόνος από τα 180 λεπτά στα 360 λεπτά επιτεύχθηκε η πλήρης αποδόμηση της ένωσης αφού το ποσοστό απομάκρυνσης εκτοξεύθηκε από 26% σε 99%. Αντίστοιχα το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα σχήματα (γ)-(δ) και (ε)-(στ) αφού στις μέγιστες τιμές των παραμέτρων Α, Β και Γ επιτεύχθηκε η πλήρης απομάκρυνση της ουσίας Risperidone από τη λυματολάσπη. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. Αν και η ένωση Citalopram είναι θερμικά σταθερή μέχρι και τους 206 °C, η μελέτη θερμικής ανάλυσης (TG/DTA) απέδειξε ότι αρχίζει και διασπάται σε τρία στάδια: στο πρώτο στάδιο παρατηρείται απώλεια μάζας σε θερμοκρασία μεταξύ 200-226 °C, το δεύτερο στάδιο απώλειας στους 226-350 °C και το τρίτο στάδιο σε θερμοκρασία 350-474 °C (Sbârcea et al., 2021).

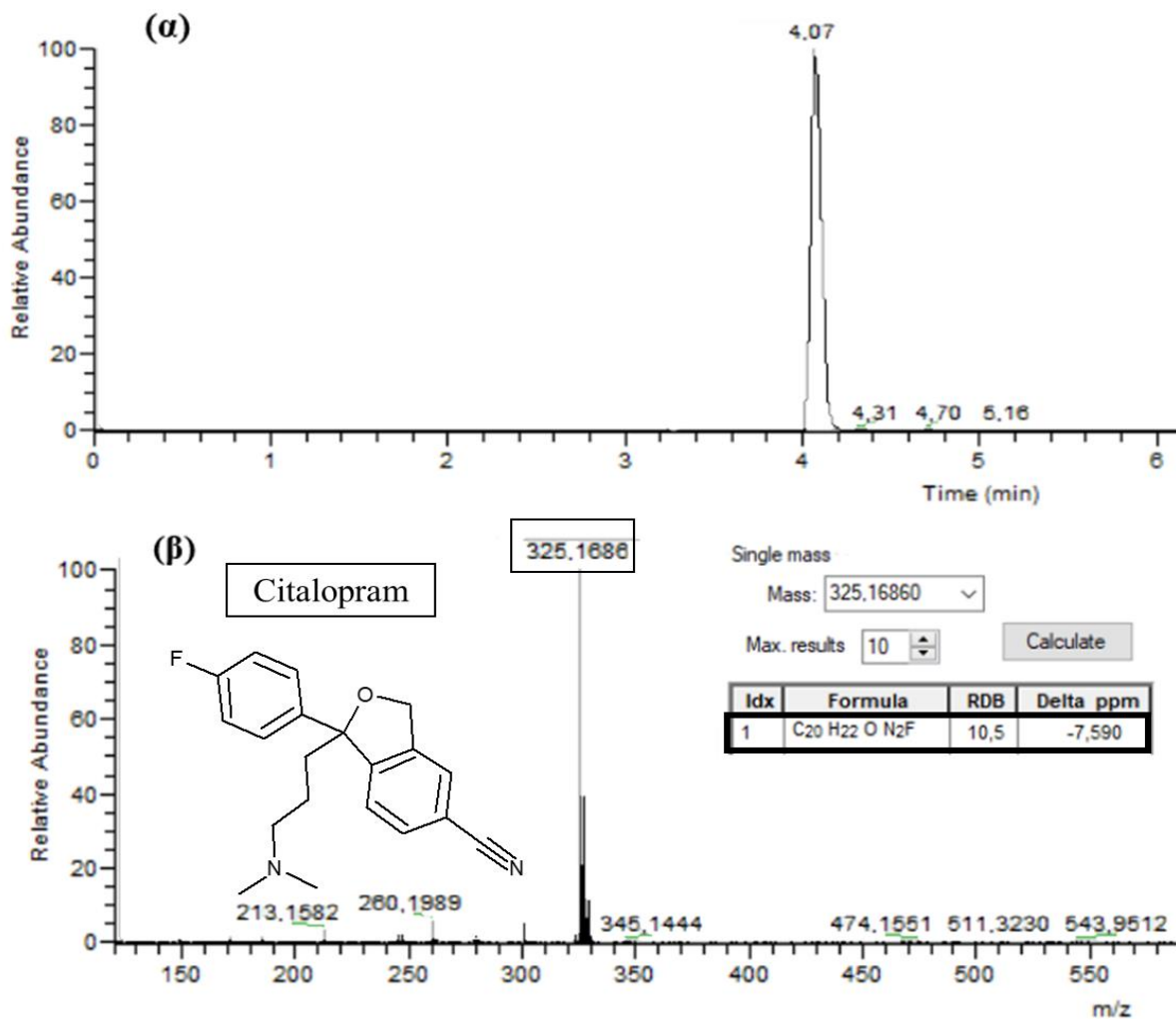


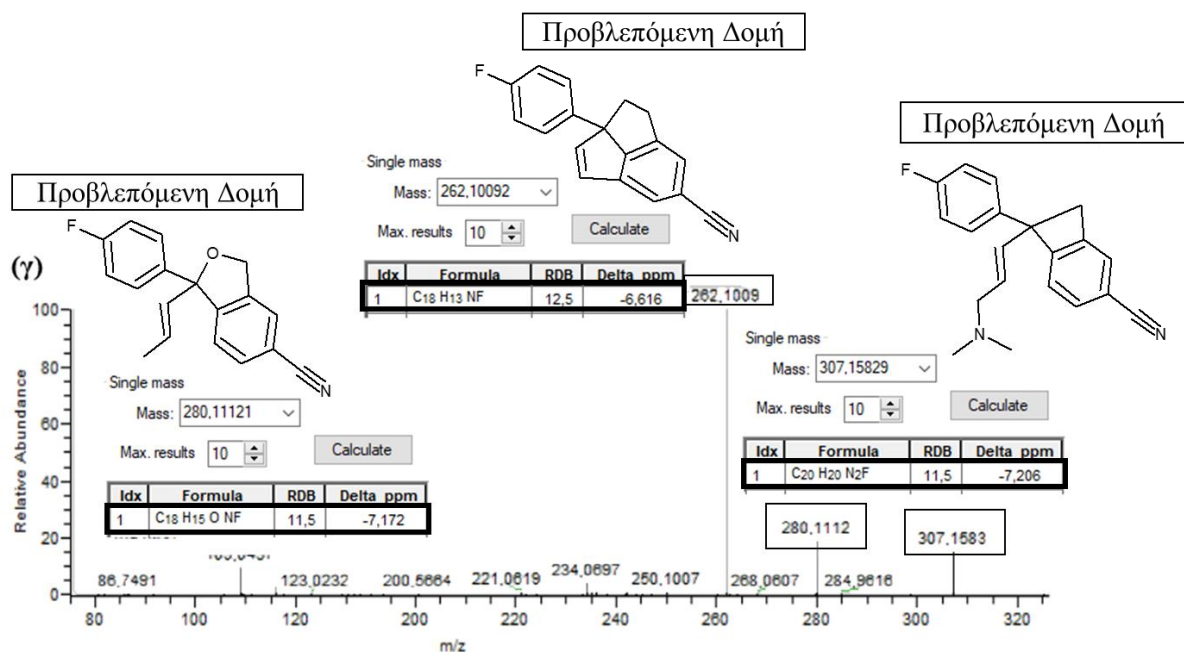


**Σχήμα 11.13:** Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Risperidone: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ).

**(δ) Citalopram**

Στο δείγμα λυματολάσπης μία από τις ενώσεις που ανιχνεύθηκε σε υψηλή συγκέντρωση ήταν η ένωση Citalopram με συγκέντρωση 42,4 ng L<sup>-1</sup>. Στο σχήμα 11.14 απεικονίζεται η θετική ανίχνευση της ένωσης σε δείγμα λάσπης χρησιμοποιώντας αρχικά ως φίλτρο την ακριβή θεωρητική μάζα της ένωσης και έπειτα το ιόν θραυσματοποίησης με τη χρήση MS/MS.





**Σχήμα 11.14:** (α) Φάσμα πλήρους σάρωσης με εφαρμογή της ακριβούς θεωρητικής μάζας ως φίλτρο, (β) Φάσμα πλήρους σάρωσης (full scan) και (γ) Φάσμα ιόντος θραυσματοποίησης για την ουσία Citalopram.

Όμοια με την απομάκρυνση των υπολοίπων ουσιών από τη λυματολάσπη, η επίδραση των παραμέτρων στην απομάκρυνση της ουσίας Citalopram με τη μέθοδο της υδροθερμικής αναθρακοποίησης μελετήθηκε με τη χρήση κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της επιφανειακής απόκρισης. Σχεδιάστηκαν και εκτελέστηκαν 17 πειράματα συνδυάζοντας τις τρεις παραμέτρους (A:Θερμοκρασία, B:Χρόνος και Γ:%wt) με τις ίδιες συνθήκες του προηγούμενου υπό μελέτη συστήματος. Ο πειραματικός σχεδιασμός και τα πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις εκατό απομάκρυνσης της ουσίας Citalopram παρουσιάζονται στον πίνακα 11.9.



**Πίνακας 11.9:** Κεντρικός Σύνθετος Σχεδιασμός τριών παραμέτρων και πειραματικά αποτελέσματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ένωσης Citalopram.

Αριθμός Πειραμάτων	Παράγοντας 1 A: Θερμοκρασία °C	Παράγοντας 2 B: Χρόνος min	Παράγοντας 3 A: %wt	%απομάκρυνση Citalopram
1	195,00	270,00	7,50	57,31
2	210,00	360,00	10,00	53,06
3	195,00	421,36	7,50	58,96
4	180,00	180,00	10,00	52,83
5	195,00	270,00	11,70	65,80
6	220,23	270,00	7,50	51,41
7	195,00	270,00	7,50	57,54
8	195,00	270,00	3,30	-
9	210,00	180,00	5,00	99,76
10	169,77	270,00	7,50	53,53
11	210,00	180,00	10,00	-
12	180,00	360,00	5,00	-
13	180,00	180,00	5,00	49,29
14	195,00	118,64	7,50	49,29
15	210,00	360,00	5,00	-
16	195,00	270,00	7,50	46,22
17	180,00	360,00	10,00	55,66

Επιπλέον, στον πίνακα 11.10 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ανάλυσης ANOVA για επίπεδο εμπιστοσύνης 95% ( $p < 0,05$ ) με βάση την οποία το δευτεροβάθμιο πολυωνυμικό μοντέλο δεν αποτελεί σημαντική παράμετρο με χαμηλή τιμή του λόγου F (1,32) και μικρότερο επίπεδο σημαντικότητας ( $p < 0,3727$ ) στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης. Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το πολυωνυμικό μοντέλο δύο παραγόντων (2FI) είναι το καταλληλότερο παρουσιάζοντας σχετικά υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (0,5987), καθώς επίσης και του διορθωμένου (ως προς τους βαθμούς ελευθερίας) συντελεστή προσδιορισμού συσχέτισης  $R_{Adj}^2$  (0,137) σε σύγκριση με την εφαρμογή των υπόλοιπων μοντέλων ως προς την απομάκρυνση του Citalopram. Έτσι η συσχέτιση των παραμέτρων με την κωδικοποιημένη τους μορφή με την επί τοις % απομάκρυνση της ουσίας Citalopram περιγράφεται σύμφωνα με την Εξίσωση 9:

$$\% \text{Απομάκρυνση Citalopram} = +55,54 + 4,59 * A - 1,45 * B - 2,54 * C - 0,69 * A * B - 12,56 * A * C + 8,89 * B * C \quad (9)$$

όπου A είναι η παράμετρος της θερμοκρασίας, B ο χρόνος και Γ η επί τοις % αναλογία λυματολάσπης/νερού (%wt). Παράλληλα η πολυωνυμική εξίσωση με τις πραγματικές παραμέτρους έχει την εξής μορφή (Εξίσωση 10):

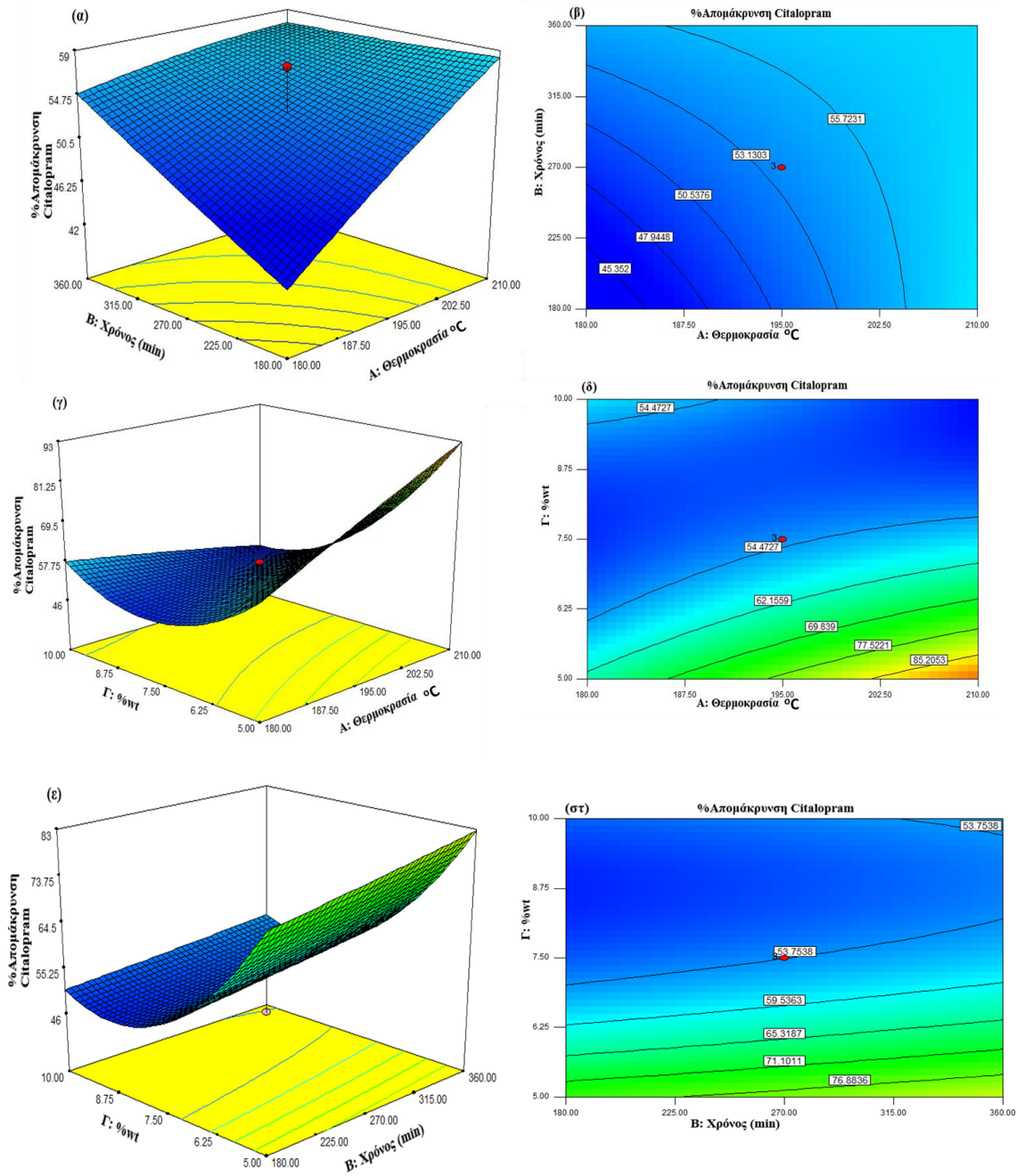
$$\% \text{Απομάκρυνση Citalopram} = -429,09 + 2,95 * A - 0,21 * B + 53,62 * C - 0,0005 * A * B - 0,33 * A * C + 0,04 * B * C \quad (10)$$

**Πίνακας 11.10:** Ανάλυση διακύμανσης ANOVA για την επί τοις % απομάκρυνση της ένωσης Citalopram από τη λυματολάσπη.

Παράμετροι	Άθροισμα Τετραγώνων	Βαθμοί Ελευθερίας	Μέσο Τετράγωνο	Τιμή F	Τιμή p
Μοντέλο	1260,46	6	210,08	1,32	0,3727
A-Θερμοκρασία	203,82	1	203,82	1,28	<b>μη σημαντικό</b> 0,3012
B-Χρόνος	15,02	1	15,02	0,094	0,7692
Γ-%wt	31,12	1	31,12	0,20	0,6740
A B	0,80	1	0,80	0,005	0,9458
A Γ	261,53	1	261,53	1,64	0,2474
B Γ	205,52	1	205,52	1,29	0,2993
Υπόλειμμα	955,79	6	159,30		
Έλλειψη προσαρμογής	872,06	4	218,02	5,21	<b>μη σημαντικό</b> 0,1675
Καθαρό Σφάλμα	83,73	2	41,86		
Διορθωμένο Σύνολο	2216,26	12			

Οι επιφάνειες απόκρισης και τα ισομετρικά διαγράμματα που απεικονίζουν τη μεταβολή του ποσοστού απομάκρυνσης φαρμακευτικών ουσιών συναρτήσει των αναλογιών νερού/λυματολάσπης (παράγοντας Γ), του χρόνου της υδροθερμικής επεξεργασίας (παράγοντας Β) και της θερμοκρασίας (Α) παρουσιάζονται στο σχήμα 11.15. Στα σχήματα α) και β) καθώς η θερμοκρασία και ο χρόνος της αντίδρασης της υδροθερμικής αυξάνονται, επιταχύνεται το ποσοστό απομάκρυνσης του φαρμάκου. Συγκεκριμένα όταν η θερμοκρασία αυξήθηκε από τους 180°C στους 210°C και ο χρόνος από τα 180 λεπτά στα 360 λεπτά αυξήθηκε και το ποσοστό απομάκρυνσης από 50% σε 62% χωρίς να επέλθει πλήρης αποδόμηση της ουσίας. Αντίστοιχα το ίδιο φαινόμενο παρατηρείται και στα σχήματα (γ)-(δ) και (ε)-(στ) με αύξηση του ποσοστού από 30% έως 68% και από 45% έως 63% αντίστοιχα. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία αφού η ένωση Citalopram κατά

τη θερμική ανάλυση (TG/DTA) αρχίζει και διασπάται σε θερμοκρασία υψηλότερη από τους 190 °C (Pinto et al., 2018).



**Σχήμα 11.15:** Επιφάνειες απόκρισης και ισομετρικά διαγράμματα της επί τοις %απομάκρυνσης της ουσίας Citalopram: (α)-(β) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με το χρόνο (B), (γ)-(δ) της θερμοκρασίας (A) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ) και (ε)-(στ) του χρόνου (B) σε συνάρτηση με την επί τοις εκατό αναλογία λυματολάσπης/νερού (Γ).

## ***Κεφάλαιο 12***

### ***Συμπεράσματα***

- ✓ Με την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, αναπτύχθηκε και επικυρώθηκε η αναλυτική μέθοδος Quechers για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό τριαντατριών (33) φαρμακευτικών ενώσεων σε δείγματα λυματολάσπης. Παράλληλα εφαρμόστηκε η υδροθερμική ανθρακοποίηση της λυματολάσπης, μία σημαντική τεχνολογία επεξεργασίας ενεργούς ιλύος, για τον προσδιορισμό του ποσοστού απομάκρυνσης των υπολειμμάτων των φαρμακευτικών ουσιών από αυτή.
- ✓ Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των επιλεγμένων ενώσεων πραγματοποιήθηκε με σύστημα υγρής χρωματογραφίας υπέρ-υψηλής πίεσης συζευγμένης με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας και συγκεκριμένα με τον υβριδικό αναλυτή μαζών LTQ/Orbitrap MS. Η ποσοτικοποίηση έγινε με καμπύλες αναφοράς σε όλες τις περιπτώσεις προσομοιωμένες στο υπόστρωμα (matrix-match calibration curves) ενώ παράλληλα χρησιμοποιήθηκε και εσωτερικό πρότυπο με σκοπό να αποφευχθεί η ανακριβής ποσοτικοποίηση. Με βάση τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη βελτιστοποίηση και επικύρωση της μεθόδου Quechers προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα:
- ✓ Όσον αφορά τα άλατα της εκχύλισης, επιλέχθηκε ο συνδυασμός των 4 g άνυδρου  $MgSO_4$  / 1 g  $NaCl$  / 1 g κιτρικού νατρίου / 0,50 g σεσκιδρύτη διβασικού κιτρικού νατρίου (EN method). Η ποσότητα της λυματολάσπης κατέληξε να είναι το 1 g ενώ η προσθήκη 10 ml διαλύματος EDTA συνέβαλε στην αποτροπή της πρόσδεσης/συμπλοκοποίησης δισθενών μεταλλικών κατιόντων πριν την εκχύλιση. Το στάδιο του καθαρισμού (clean-up) πραγματοποιήθηκε με την εκχύλιση υγρής-στερεής φάσης με διασπορά (dispersive SPE) ο όγκος εκχυλίσματος που οδηγείται προς καθαρισμό ήταν 4 ml και επιλέχθηκε ο συνδυασμός των προσροφητικών που περιείχε 150 mg  $MgSO_4$  / 50 mg PSA / 75 mg  $Z^+$ -sep για κάθε ml εκχυλίσματος παρέχοντας πολύ πιο καθαρά εκχυλίσματα χωρίς να υπάρχει κίνδυνος απώλειας αναλυτών. Τέλος ακολούθησε συμπύκνωση μέχρι ξηρού χρησιμοποιώντας όγκο 2 ml από το καθαρό εκχύλισμα, επαναδιάλυση σε 500  $\mu L$  με 0,1% φορμικό οξύ σε αναλογία νερό : μεθανόλη 80:20 (v/v) και διήθηση των δειγμάτων με φίλτρα σύριγγας με μεμβράνη PTFE 0.22 $\mu m$  πριν την εισαγωγή τους στην οργανολογία (LC-MS(MS)).
- ✓ Η μέθοδος Quechers επικυρώθηκε για το υπόστρωμα της λυματολάσπης ως προς την ανάκτηση όπου οι μέσες τιμές των ανακτήσεων (n=5) για το χαμηλό επίπεδο κυμάνθηκαν από 60% έως 98%, για το μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού από 66% έως 104% και για το μεγάλο

επίπεδο εμβολιασμού από 66% έως 104%. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,3 ng/g έως 15 ng/g και τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 2,1 ng/g έως 50 ng/g. Όσον αφορά τη γραμμικότητα, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είχε για τις περισσότερες ενώσεις τιμές μεγαλύτερες από 0,99 και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,9677 έως 0,9997. Ακόμα, η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκε κάτω από 19% και 20% αντίστοιχα για όλες τις ενώσεις ενώ η αποτελεσματικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 59% έως 97%. Επιπλέον στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού, η αβεβαιότητα της μεθόδου (%U) ήταν μικρότερη από 27,88% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) για όλες τις ενώσεις και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 8% έως 27%. Στο μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού η αποδεκτή τιμή αναφοράς της αβεβαιότητας ήταν 23,40% και οι πειραματικές τιμές που υπολογίστηκαν κυμάνθηκαν από 8% έως 21%. Στο μεγαλύτερο επίπεδο εμβολιασμού όλες οι %U που βρέθηκαν ήταν χαμηλότερες από 20,39% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) και κυμάνθηκαν από 4% έως 16% ενώ η τιμή Horrat ήταν μικρότερη από 1,00 για όλες τις ενώσεις. Τέλος, η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος φανέρωσε αρκετές διακυμάνσεις για αρκετές ενώσεις χωρίς όμως κάποια ισχυρή μείωση ή αύξηση του σήματος.

✓ Η παραπάνω αναλυτική μεθοδολογία εφαρμόστηκε σε πραγματικά δείγματα λυματολάσπης στα οποία ανιχνεύθηκαν οι είκοσι έξι (26) ενώσεις από το σύνολό τους με συγκεντρώσεις έως 19 ng/g και μάλιστα οι ενώσεις Amisulpride, Clozapine και Amitriptyline ανιχνεύθηκαν σε υψηλές συγκεντρώσεις των 506, 135, 239 ng/g αντίστοιχα.

✓ Η μέθοδος Quechers επικυρώθηκε για το υπόστρωμα του υδροεξανθρακώματος ως προς την ανάκτηση όπου οι μέσες τιμές των ανακτήσεων (n=5) για το χαμηλό επίπεδο κυμάνθηκαν από 51% έως 97%, για το μεσαίο επίπεδο εμβολιασμού οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 56% έως 103% και για το μεγάλο επίπεδο εμβολιασμού οι μέσες ανακτήσεις κυμάνθηκαν από 73% έως 100%. Τα όρια ανίχνευσης κυμάνθηκαν από 0,2 ng/g έως 12,1 ng/g και τα όρια ποσοτικοποίησης κυμάνθηκαν από 0,8 ng/g έως 40 ng/g. Όσον αφορά τη γραμμικότητα, ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης είχε για τις περισσότερες ενώσεις τιμές μεγαλύτερες από 0,99 και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 0,9515 έως 0,9990. Ακόμα, η επαναληψιμότητα και η ενδοεργαστηριακή αναπαραγωγιμότητα εκφρασμένη ως σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) υπολογίστηκε κάτω από 16% και 20% αντίστοιχα για όλες τις ενώσεις ενώ η αποτελεσματικότητα της μεθόδου κυμάνθηκε από 66% έως 97%. Επιπλέον στο χαμηλό επίπεδο εμβολιασμού, η %U ήταν μικρότερη από 27,88% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) για όλες τις ενώσεις και συγκεκριμένα κυμάνθηκε από 8% έως 27%. Στο μεσαίο

επίπεδο εμβολιασμού η αποδεκτή τιμή αναφοράς της αβεβαιότητας ήταν 23,40% και οι πειραματικές τιμές που υπολογίστηκαν κυμάνθηκαν από 8% έως 21%. Στο μεγαλύτερο επίπεδο εμβολιασμού όλες οι %U που βρέθηκαν ήταν χαμηλότερες από 20,39% (αποδεκτή τιμή αναφοράς) και κυμάνθηκαν από 4% έως 16%. ενώ η τιμή Horrat ήταν μικρότερη από 0,5 για τις περισσότερες ενώσεις. Τέλος, η μελέτη της επίδρασης του υποστρώματος φανέρωσε αρκετές διακυμάνσεις για αρκετές ενώσεις χωρίς όμως κάποια ισχυρή μείωση ή αύξηση του σήματος.

✓ Στη συνέχεια δείγματα λυματολάσπης επεξεργάστηκαν υδροθερμικά με σκοπό την απομάκρυνση υπολειμμάτων φαρμακευτικών ενώσεων και εκχυλίστηκαν με τη μέθοδο Quechers για την ανίχνευση τυχόν υπολειμμάτων φαρμακευτικών ουσιών στο υπόστρωμα του υδροξείνου άνθρακα. Η μελέτη της επίδρασης σημαντικών παραμέτρων και η εύρεση των βέλτιστων συνθηκών της υδροθερμικής κατεργασίας πραγματοποιήθηκε με την εφαρμογή του κεντρικού σύνθετου σχεδιασμού και της μεθοδολογίας της επιφανειακής απόκρισης. Η μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση της υδροθερμικής ανθρακοποίησης για την επί τοις εκατό απομάκρυνση πραγματοποιήθηκε τόσο για το σύνολο των ενώσεων όσο και για τέσσερις αντιπροσωπευτικές ενώσεις με μεγάλη συγκέντρωση στη λυματολάσπη (Amisulpride, Amitriptyline, Risperidone και Citalopram).

✓ Σύμφωνα με την ανάλυση διακύμανσης ANOVA η επίδραση της θερμοκρασίας, του χρόνου και οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους αποτέλεσαν τις πιο σημαντικές παραμέτρους στη διαδικασία της υδροθερμικής. Τόσο η αύξηση της θερμοκρασίας της υδροθερμικής όσο και του χρόνου της αντίδρασης επιτάχυναν το ποσοστό απομάκρυνσης των φαρμακευτικών ουσιών. Αντίθετα, η επί τοις % αναλογία νερού/λυματολάσπης που εισήχθη στο αυτόκλειστο δοχείο δεν επηρέασε σημαντικά το ποσοστό απομάκρυνσης των φαρμάκων. Γενικά οι αντιδράσεις που έχουν ταυτοποιηθεί και μπορούν να δώσουν χρήσιμες πληροφορίες σχετικά με τις δυνατότητες χειρισμού της υδροθερμικής αντίδρασης είναι οι αντιδράσεις υδρόλυσης, αφυδάτωσης, αποκαρβοξυλίωσης, πολυμερισμού και αρωματισμού.

✓ Εν συνεχεία από την ανάλυση των αποτελεσμάτων προκύπτει ότι το πολυωνυμικό μοντέλο συσχέτισης δύο παραγόντων (2FI) ήταν το καταλληλότερο για τον προσδιορισμό απομάκρυνσης του συνόλου των φαρμακευτικών ενώσεων. Η υψηλή τιμή του λόγου F (137,51), το μικρό επίπεδο σημαντικότητας ( $p < 0,0002$ ) στο επιλεγμένο επίπεδο εμπιστοσύνης, η μη σημαντική έλλειψη προσαρμογής (Lack of fit), η χαμηλή τιμή του συντελεστή διακύμανσης ( $CV = 4,12\%$ ), οι σχετικά υψηλές τιμές του συντελεστή προσδιορισμού  $R^2$  (0,8983), καθώς επίσης και του διορθωμένου (ως προς τους βαθμούς

ελευθερίας) συντελεστή προσδιορισμού συσχέτισης  $R_{Adj}^2$  (0,8373) επιβεβαίωσαν την καλή προσαρμογή του μοντέλου στα πειραματικά δεδομένα. Οι βέλτιστες συνθήκες για την επί τοις εκατό απομάκρυνση των φαρμακευτικών ενώσεων προσδιορίστηκαν με την συνάρτηση επιθυμίας κατά Derringer και περιλαμβάνουν τις εξής περιοχές τιμών: θερμοκρασία από 205,35 έως 210, χρόνος από 297 έως 360 λεπτά και %αναλογία λυματολάσπης/νερού (actual factor) 8,89%.

✓      Εν κατακλείδι, η τεχνική QuEChERS σε συνδυασμό με την υγρή χρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μάζας είναι μια καλή μεθοδολογία για την ταυτόχρονη ανάλυση φαρμακευτικών ενώσεων με διαφορετικές φυσικοχημικές ιδιότητες σε δείγματα λυματολάσπης. Από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της μεθοδολογίας που αναπτύχθηκε είναι ο μικρός συνολικός χρόνος ανάλυσης, ο μικρός αριθμός των σταδίων και το δυναμικό εύρος των προσδιοριζόμενων ενώσεων. Επιπλέον, όσο αφορά την υδροθερμική αναθρακοποίηση, η πρώτη ύλη που χρησιμοποιείται στη διεργασία, καθώς και οι συνθήκες που τηρούνται κατά την παραγωγή, είναι καθοριστικές για τις ιδιότητες των παραγόμενων υδροεξανθρακωμάτων. Έτσι, η υδροθερμική αναθρακοποίηση της λυματολάσπης αποτελεί μία σύγχρονη τεχνολογία επεξεργασίας της λυματολάσπης με σκοπό την παραγωγή βελτιωμένων υποστρωμάτων και την περαιτέρω απομάκρυνση επικίνδυνων μολυσματικών ουσιών που δεν απομακρύνονται πλήρως από τις μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων. Η παρούσα διατριβή αποτέλεσε μία ολοκληρωμένη προσέγγιση τόσο για την ανάπτυξη και εφαρμογή μίας αναλυτικής μεθοδολογίας σε πραγματικά δείγματα λυματολάσπης όσο και για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητας της υδροθερμικής αναθρακοποίησης στην απομάκρυνση οργανικών ρύπων από στερεά υποστρώματα.

## Κεφάλαιο 13

### Ξενόγλωσση Βιβλιογραφία

- Albanis, T.A., Pomonis, P.J. and Sdoukos, A.T. (1991), "Model of pesticide movement in soil", Chapter 11 in the Book *"Modelling in Environmental Chemistry"*, ed. S.E. Jorgensen, Elsevier, Amsterdam, London, New York, Tokyo, pp. 381-412.
- Abdelmoez, W., Yoshida, H., & Nakahasi, T. (2010). Pathways of amino acid transformation and decomposition in saturated subcritical water conditions. *International Journal of Chemical Reactor Engineering*, 8, 5286–5294. <https://doi.org/10.2202/1542-6580.1903>
- Afif, E., Azadi, P., & Farnood, R. (2011). Catalytic hydrothermal gasification of activated sludge. *Applied Catalysis B: Environmental*, 105(1–2), 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2011.04.003>
- Ajibola, A. S., Tisler, S., & Zwiener, C. (2020). Simultaneous determination of multiclass antibiotics in sewage sludge based on QuEChERS extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Methods*, 12(4), 576–586. <https://doi.org/10.1039/c9ay02188d>
- Albero, B., Pérez, R. A., Sánchez-Brunete, C., & Tadeo, J. L. (2012). Occurrence and analysis of parabens in municipal sewage sludge from wastewater treatment plants in Madrid (Spain). *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.05.017>
- Ali, A. E., Elasala, G. S., Mohamed, E. A., & Kolkaila, S. A. (2020). Structural and thermal analysis of some imipramine complexes. *Materials Today: Proceedings*, 45, 3692–3698. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.12.403>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and. *Journal of AOAC International*, 86, 412–431. <https://doi.org/10.2478/s11687-011-0011-9>
- Antonopoulou, M., & Konstantinou, I. (2013). Optimization and Modeling of the Photocatalytic Degradation of the Insect Repellent DEET in Aqueous TiO<sub>2</sub> Suspensions. *Clean - Soil, Air, Water*, 41(6), 593–600. <https://doi.org/10.1002/clen.201200405>
- AOAC. (2007). Official Method 2007.01: Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *Journal of AOAC International*, 90(2), 17–26. [http://lib3.dss.go.th/fulltext/E\\_content/1060-3271/2007v90n2.pdf](http://lib3.dss.go.th/fulltext/E_content/1060-3271/2007v90n2.pdf)
- Aragón-Briceño, C., Ross, A. B., & Camargo-Valero, M. A. (2017). Evaluation and



- comparison of product yields and bio-methane potential in sewage digestate following hydrothermal treatment. *Applied Energy*, 208(April), 1357–1369. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2017.09.019>
- Axelsson, L., Franzén, M., Ostwald, M., Berndes, G., Lakshmi, G., & Ravindranath, N. H. (2012). Perspective: Jatropha cultivation in southern India: Assessing farmers' experiences. *Biofuels, Bioproducts and Biorefining*, 6(3), 246–256. <https://doi.org/10.1002/bbb>
- Banerjee, S., & Mazumdar, S. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 1–40. <https://doi.org/10.1155/2012/282574>
- Bargmann, I., Rillig, M. C., Kruse, A., Greef, J. M., & Kücke, M. (2014). Effects of hydrochar application on the dynamics of soluble nitrogen in soils and on plant availability. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 177(1), 48–58. <https://doi.org/10.1002/jpln.201300069>
- Barker, S. A. (2007). Matrix solid phase dispersion (MSPD) Matrix solid phase dispersion (MSPD). *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 70(2), 151–162. <https://doi.org/10.1016/j.jbbm.2006.06.005>
- Barón, E., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2014). Gas chromatography/tandem mass spectrometry method for the simultaneous analysis of 19 brominated compounds in environmental and biological samples. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406(29), 7667–7676. <https://doi.org/10.1007/s00216-014-8196-7>
- Barry, D., Barbiero, C., Briens, C., & Berruti, F. (2019). Pyrolysis as an economical and ecological treatment option for municipal sewage sludge. *Biomass and Bioenergy*, 122, 472–480. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2019.01.041>
- Benedetti, B., Majone, M., Cavaliere, C., Montone, C. M., Fatone, F., Frison, N., Laganà, A., & Capriotti, A. L. (2020). Determination of multi-class emerging contaminants in sludge and recovery materials from waste water treatment plants: Development of a modified QuEChERS method coupled to LC–MS/MS. *Microchemical Journal*, 155(December 2019), 104732. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104732>
- Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., & Escaleira, L. A. (2008). Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. *Talanta*, 76(5), 965–977. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2008.05.019>

- Bo, L., Feng, L., Fu, J., Li, X., Li, P., & Zhang, Y. (2015). The fate of typical pharmaceuticals in wastewater treatment plants of Xi'an city in China. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 3(3), 2203–2211. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2015.08.001>
- Bourdat-Deschamps, M., Leang, S., Bernet, N., Daudin, J. J., & Nélieu, S. (2014). Multi-residue analysis of pharmaceuticals in aqueous environmental samples by online solid-phase extraction-ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Optimisation and matrix effects reduction by quick, easy, cheap, effective, . *Journal of Chromatography A*, 1349, 11–23. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.05.006>
- Brand, S., Hardi, F., Kim, J., & Suh, D. J. (2014). Effect of heating rate on biomass liquefaction: Differences between subcritical water and supercritical ethanol. *Energy*, 68, 420–427. <https://doi.org/10.1016/j.energy.2014.02.086>
- Brereton, R. G. (2003). *Chemometrics: Data Analysis for the Laboratory and Chemical Plant*. Chichester: John Wiley & Sons.
- British Standard. (2008). CEN15662:2008 Foods of plant origin — Determination of pesticide residues using GC-MS and / or LC-MS / MS following acetonitrile extraction / partitioning and cleanup by dispersive SPE — QuEChERS-method. *British Standard*, 24, 1–83.
- Capriotti, A. L., Cavaliere, C., Giansanti, P., Gubbiotti, R., Samperi, R., & Laganà, A. (2010). Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction. *Journal of Chromatography A*, 1217(16), 2521–2532. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2010.01.030>
- Cerqueira, M. B. R., Caldas, S. S., & Primel, E. G. (2014). New sorbent in the dispersive solid phase extraction step of quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe for the extraction of organic contaminants in drinking water treatment sludge. *Journal of Chromatography A*, 1336, 10–22. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.002>
- Cerqueira, M. B. R., Guilherme, J. R., Caldas, S. S., Martins, M. L., Zanella, R., & Primel, E. G. (2014). Evaluation of the QuEChERS method for the extraction of pharmaceuticals and personal care products from drinking-water treatment sludge with determination by UPLC-ESI-MS/MS. *Chemosphere*, 107, 74–82. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.03.026>
- Chemat, F., Rombaut, N., Sicaire, A. G., Meullemiestre, A., Fabiano-Tixier, A. S., & Abert-Vian, M. (2017). Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review.

- Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 540–560. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2016.06.035>
- Chen, Y., Cao, Q., Deng, S., Huang, J., Wang, B., & Yu, G. (2013). Determination of pharmaceuticals from various therapeutic classes in dewatered sludge by pressurized liquid extraction and high performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS). *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 93(11), 1159–1173. <https://doi.org/10.1080/03067319.2012.717271>
- Chevalier, F., Far, C. E. A., Ircm, D. S. V., & Roses, F. (1966). Mass Spectrometric Methods. *Methods in Geochemistry and Geophysics*, 2(C), 67–82. <https://doi.org/10.1016/B978-1-4832-3031-3.50009-3>
- CHIRILA, E. S., DRAGHICI, C., & DOBRINAS, S. (2006). SAMPLING AND SAMPLE PRETREATMENT FOR ENVIRONMENTAL ANALYSIS. In L. Simeonov & E. Chirila (Eds.), *Chemicals as Intentional and Accidental Global Environmental Threats* (pp. 7–28). Springer Netherlands.
- Choi, S. (2019). Trend of the QuEChERS research The QuEChERS method used for pesticide analysis is applied to POPs . SC. *Biochemical Pharmacology*, e00063. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2019.e00063>
- Chong, M. N., Zhu, H. Y., & Jin, B. (2010). Response surface optimization of photocatalytic process for degradation of Congo Red using H-titanate nanofiber catalyst. *Chemical Engineering Journal*, 156(2), 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2009.10.017>
- Conesa, J. A., Marcilla, A., Prats, D., & Rodriguez-Pastor, M. (1997). Kinetic study of the pyrolysis of sewage sludge. *Waste Management and Research*, 15(3), 293–305. <https://doi.org/10.1006/wmre.1996.0085>
- Danso-Boateng, E., Holdich, R. G., Shama, G., Wheatley, A. D., Sohail, M., & Martin, S. J. (2013). Kinetics of faecal biomass hydrothermal carbonisation for hydrochar production. *Applied Energy*, 111, 351–357. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.090>
- Danso-Boateng, E., Shama, G., Wheatley, A. D., Martin, S. J., & Holdich, R. G. (2015). Hydrothermal carbonisation of sewage sludge: Effect of process conditions on product characteristics and methane production. *Bioresource Technology*, 177, 318–327. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.11.096>
- De la Rubia, M. A., Villamil, J. A., Rodriguez, J. J., & Mohedano, A. F. (2018). Effect of inoculum source and initial concentration on the anaerobic digestion of the liquid fraction from hydrothermal carbonisation of sewage sludge. *Renewable Energy*, 127, 697–704. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2018.05.002>

- Díaz-Cruz, M. S., López De Alda, M. J., & Barceló, D. (2003). Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 22(6), 340–351. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00603-4](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00603-4)
- Ding, A., Zhang, R., Ngo, H. H., He, X., Ma, J., Nan, J., & Li, G. (2021). Life cycle assessment of sewage sludge treatment and disposal based on nutrient and energy recovery: A review. *Science of the Total Environment*, 769. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.144451>
- Dołęga, A., Juszyńska-Gałązka, E., Osiecka-Drewniak, N., Natkański, P., Kuśtrowski, P., Krupa, A., & Zieliński, P. M. (2021). Study on the thermal performance of carbamazepine at different temperatures, pressures and atmosphere conditions. *Thermochimica Acta*, 703(June). <https://doi.org/10.1016/j.tca.2021.178990>
- Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Camino-Sánchez, F. J., Navalón, A., & Vílchez, J. L. (2013). Analysis of quinolone antibiotic derivatives in sewage sludge samples by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Comparison of the efficiency of three extraction techniques. *Talanta*, 106, 104–118. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.11.080>
- Dorival-García, N., Zafra-Gómez, A., Navalón, A., & Vílchez, J. L. (2012). Improved sample treatment for the determination of bisphenol A and its chlorinated derivatives in sewage sludge samples by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 101, 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.08.045>
- Ekpeghere, K. I., Lee, J. W., Kim, H. Y., Shin, S. K., & Oh, J. E. (2017). Determination and characterization of pharmaceuticals in sludge from municipal and livestock wastewater treatment plants. *Chemosphere*, 168, 1211–1221. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.10.077>
- Ekpo, U., Ross, A. B., Camargo-Valero, M. A., & Williams, P. T. (2016). A comparison of product yields and inorganic content in process streams following thermal hydrolysis and hydrothermal processing of microalgae, manure and digestate. *Bioresource Technology*, 200, 951–960. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.11.018>
- European Commission. (2001). Part 2: regulatory report. In *Disposal and recycling routes for sewage sludge* (Vol. 0, Issue 75).
- Evans, S. E., Davies, P., Lubben, A., & Kasprzyk-Hordern, B. (2015). Determination of chiral pharmaceuticals and illicit drugs in wastewater and sludge using microwave assisted extraction, solid-phase extraction and chiral liquid chromatography coupled with tandem

- mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, 882, 112–126. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.03.039>
- Fang, J., Zhan, L., Ok, Y. S., & Gao, B. (2018). Minireview of potential applications of hydrochar derived from hydrothermal carbonization of biomass. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 57, 15–21. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2017.08.026>
- Ferreira, A. P. G., Pinto, B. V., & Cavalheiro, T. G. (2018). Thermal decomposition investigation of paroxetine and sertraline. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 136(September), 232–241. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2018.09.022>
- Funke, A., Ziegler, F., (2010). Hydrothermal carbonization of biomass: A summary and discussion of chemical mechanisms for process engineering. *Biofuels, Bioprod. Bioref.* 4, 160–177. <https://doi.org/10.1002/bbb.198>
- Gai, C., Zhang, F., Guo, Y., Peng, N., Liu, T., Lang, Q., Xia, Y., & Liu, Z. (2017). Hydrochar-Supported, in Situ-Generated Nickel Nanoparticles for Sorption-Enhanced Catalytic Gasification of Sewage Sludge. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 5(9), 7613–7622. <https://doi.org/10.1021/acssuschemeng.7b00924>
- Ganorkar, S. B., & Shirkhedkar, A. A. (2017). Design of experiments in liquid chromatography (HPLC) analysis of pharmaceuticals: Analytics, applications, implications and future prospects. *Reviews in Analytical Chemistry*, 36(3). <https://doi.org/10.1515/revac-2016-0025>
- Garcia-Rodríguez, A., Sagristà, E., Matamoros, V., Fontàs, C., Hidalgo, M., & Salvadó, V. (2014). Determination of pharmaceutical compounds in sewage sludge using a standard addition method approach. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 94(12), 1199–1209. <https://doi.org/10.1080/03067319.2014.921292>
- Gong, M., Zhu, W., Xu, Z. R., Zhang, H. W., & Yang, H. P. (2014). Influence of sludge properties on the direct gasification of dewatered sewage sludge in supercritical water. *Renewable Energy*, 66, 605–611. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2014.01.006>
- Grant, D. J. W., Jacobson, H., Fairbrother, J. E., & Patel, C. G. (1980). Phases in the paracetamol-phenazone system. *International Journal of Pharmaceutics*, 5(2), 109–116. [https://doi.org/10.1016/0378-5173\(80\)90015-0](https://doi.org/10.1016/0378-5173(80)90015-0)
- González-curbelo, M. Á., Socas-rodríguez, B., & Herrera-herrera, A. V. (2015). Trends in Analytical Chemistry Evolution and applications of the QuEChERS method. *Trends in Analytical Chemistry*, 71, 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.012>
- Hardman, M., & Makarov, A. A. (2003). Interfacing the orbitrap mass analyzer to an

- electrospray ion source. *Analytical Chemistry*, 75(7), 1699–1705. <https://doi.org/10.1021/ac0258047>
- Hashaikeh, R., Fang, Z., Butler, I. S., Hawari, J., & Kozinski, J. A. (2007). Hydrothermal dissolution of willow in hot compressed water as a model for biomass conversion. *Fuel*, 86(10–11), 1614–1622. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2006.11.005>
- He, C., Chen, C. L., Giannis, A., Yang, Y., & Wang, J. Y. (2014). Hydrothermal gasification of sewage sludge and model compounds for renewable hydrogen production: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 39, 1127–1142. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.07.141>
- He, C., Giannis, A., & Wang, J. Y. (2013). Conversion of sewage sludge to clean solid fuel using hydrothermal carbonization: Hydrochar fuel characteristics and combustion behavior. *Applied Energy*, 111, 257–266. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2013.04.084>
- He, C., Wang, K., Yang, Y., Amaniampong, P. N., & Wang, J. Y. (2015). Effective nitrogen removal and recovery from dewatered sewage sludge using a novel integrated system of accelerated hydrothermal deamination and air stripping. *Environmental Science and Technology*, 49(11), 6872–6880. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b00652>
- Hennion laboratoire, M.-C. (2000). Graphitized carbons for solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 885, 73–95. [www.elsevier.com/locate/chroma](http://www.elsevier.com/locate/chroma)
- Herrero, P., Borrull, F., Pocurull, E., & Marcé, R. M. (2014). A quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction method followed by liquid chromatography-(Orbitrap) high resolution mass spectrometry to determine benzotriazole, benzothiazole and benzenesulfonamide derivatives in sewage sludge. *Journal of Chromatography A*, 1339, 34–41. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.02.081>
- Hoffmann, E., & Stroobant, V. (2016). Mass spectrometry Mass spectrometry. In *Journal of Chromatography A* (Vol. 1040, Issue 2).
- Horwitz, W., & Albert, R. (2006). The Horwitz ratio (HorRat): A useful index of method performance with respect to precision. *Journal of AOAC International*, 89(4), 1095–1109. <https://doi.org/10.1093/jaoac/89.4.1095>
- Inoue, S., Sawayama, S., Dote, Y., Ogi, T., (1997). Behavior of nitrogen during liquefaction of dewatered sewage sludge. *Biomass and Bioenergy* Vol. 12, No. 6, pp. 473-475.
- Islas, G., Ibarra, I. S., Hernandez, P., Miranda, J. M., & Cepeda, A. (2017). *Islas2017.Pdf. 2017.*
- Kacprzak, M., Neczaj, E., Fijałkowski, K., Grobelak, A., Grosser, A., Worwag, M., Rorat, A.,

- Brattebo, H., Almås, Å., & Singh, B. R. (2017). Sewage sludge disposal strategies for sustainable development. *Environmental Research*, 156(August 2016), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.010>
- Kambo, H. S., & Dutta, A. (2015). A comparative review of biochar and hydrochar in terms of production, physico-chemical properties and applications. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 45(May), 359–378. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2015.01.050>
- Karagöz, S., Bhaskar, T., Muto, A., & Sakata, Y. (2005). Comparative studies of oil compositions produced from sawdust, rice husk, lignin and cellulose by hydrothermal treatment. *Fuel*, 84(7–8), 875–884. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2005.01.004>
- Karayildirim, T., Sinağ, A., & Kruse, A. (2008). Char and coke formation as unwanted side reaction of the hydrothermal biomass gasification. *Chemical Engineering and Technology*, 31(11), 1561–1568. <https://doi.org/10.1002/ceat.200800278>
- Kelessidis, A., & Stasinakis, A. S. (2012). Comparative study of the methods used for treatment and final disposal of sewage sludge in European countries. *Waste Management*, 32(6), 1186–1195. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2012.01.012>
- Kosma, C. I., Lambropoulou, D. A., & Albanis, T. A. (2014). Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment. *Science of the Total Environment*, 466–467, 421–438. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.07.044>
- Kruve, A., Rebane, R., Kipper, K., Oldekop, M. L., Evard, H., Herodes, K., Ravio, P., & Leito, I. (2015). Tutorial review on validation of liquid chromatography-mass spectrometry methods: Part II. *Analytica Chimica Acta*, 870(1), 8–28. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2015.02.016>
- Krysell, M. (2003). *HANDBOOK FOR CALCULATION OF MEASUREMENT UNCERTAINTY IN Håvard Hovind*.
- Lazic, Z., (2004). Design of Experiments in Chemical Engineering: A Practical Guide. Book. <https://doi.org/10.1002/3527604162>, ISBN: 9783527311422
- Lehotay, S. J., De Kok, A., Hiemstra, M., & Van Bodegraven, P. (2005). Validation of a fast and easy method for the determination of residues from 229 pesticides in fruits and vegetables using gas and liquid chromatography and mass spectrometric detection. *Journal of AOAC International*, 88(2), 595–614. <https://doi.org/10.1093/jaoac/88.2.595>
- Li, M., Sun, Q., Li, Y., Lv, M., Lin, L., Wu, Y., Ashfaq, M., & Yu, C. ping. (2016). Simultaneous analysis of 45 pharmaceuticals and personal care products in sludge by

- matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(18), 4953–4964. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9590-0>
- Lillenberg, M. (2011). *Residues of some Pharmaceuticals in Sewage Sludge in Estonia, their Stability in the Environment and Accumulation into Food Plants via Fertilizing*.
- Lindholm-Lehto, P. C., Ahkola, H. S. J., & Knuutinen, J. S. (2017). Procedures of determining organic trace compounds in municipal sewage sludge—a review. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(5), 4383–4412. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8202-z>
- Liu, R., Ruan, T., Song, S., Lin, Y., & Jiang, G. (2015). Determination of synthetic phenolic antioxidants and relative metabolites in sewage treatment plant and recipient river by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1381, 13–21. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2014.11.042>
- Liu, R., Song, S., Lin, Y., Ruan, T., & Jiang, G. (2015). Occurrence of synthetic phenolic antioxidants and major metabolites in municipal sewage sludge in China. *Environmental Science and Technology*, 49(4), 2073–2080. <https://doi.org/10.1021/es505136k>
- Liu, T., Guo, Y., Peng, N., Lang, Q., Xia, Y., Gai, C., & Liu, Z. (2017). Nitrogen transformation among char, tar and gas during pyrolysis of sewage sludge and corresponding hydrochar. *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis*, 126, 298–306. <https://doi.org/10.1016/j.jaap.2017.05.017>
- Llompart, M., Garcia-Jares, C., Celeiro, M., & Dagnac, T. (2019). Extraction | Microwave-Assisted Extraction. In *Encyclopedia of Analytical Science* (3rd ed., Issue June). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409547-2.14442-7>
- López-Serna, R., Marín-de-Jesús, D., Irusta-Mata, R., García-Encina, P. A., Lebrero, R., Fdez-Polanco, M., & Muñoz, R. (2018). Multiresidue analytical method for pharmaceuticals and personal care products in sewage and sewage sludge by online direct immersion SPME on-fiber derivatization – GCMS. *Talanta*, 186(November 2017), 506–512. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.04.099>
- Luciano, G., Traverso, P., & Letardi, P. (2010). Applications of chemometric tools in corrosion studies. *Corrosion Science*, 52(9), 2750–2757. <https://doi.org/10.1016/j.corsci.2010.05.016>
- Luque-Muñoz, A., Vílchez, J. L., & Zafra-Gómez, A. (2017). Multiclass method for the



- determination of pharmaceuticals and personal care products in compost from sewage sludge using ultrasound and salt-assisted liquid–liquid extraction followed by ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1507, 72–83. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.05.051>
- Mailler, R., Gasperi, J., Patureau, D., Vulliet, E., Delgenes, N., Danel, A., Deshayes, S., Eudes, V., Guerin, S., Moilleron, R., Chebbo, G., & Rocher, V. (2017). Fate of emerging and priority micropollutants during the sewage sludge treatment: Case study of Paris conurbation. Part 1: Contamination of the different types of sewage sludge. *Waste Management*, 59, 379–393. <https://doi.org/10.1016/j.wasman.2016.11.010>
- Makarov, A. (2000). *Makarov2000.Pdf*. 72(6), 1156–1162.
- Mäkelä, M. (2017). Experimental design and response surface methodology in energy applications: A tutorial review. *Energy Conversion and Management*, 151(August), 630–640. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2017.09.021>
- Malghani, S., Gleixner, G., & Trumbore, S. E. (2013). Chars produced by slow pyrolysis and hydrothermal carbonization vary in carbon sequestration potential and greenhouse gases emissions. *Soil Biology and Biochemistry*, 62, 137–146. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2013.03.013>
- Malvar, J. L., Santos, J. L., Martín, J., Aparicio, I., & Alonso, E. (2020). Comparison of ultrasound-assisted extraction, QuEChERS and selective pressurized liquid extraction for the determination of metabolites of parabens and pharmaceuticals in sludge. *Microchemical Journal*, 157(May), 104987. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104987>
- Martín-Pozo, L., de Alarcón-Gómez, B., Rodríguez-Gómez, R., García-Córcoles, M. T., Çipa, M., & Zafra-Gómez, A. (2019). Analytical methods for the determination of emerging contaminants in sewage sludge samples. A review. *Talanta*, 192(June 2018), 508–533. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.09.056>
- Maroto, A., Boqué, R., Riu, J., & Rius, F. X. (2001). Measurement uncertainty in analytical methods in which trueness is assessed from recovery assays. *Analytica Chimica Acta*, 440(2), 171–184. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)01058-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)01058-3)
- Martín, J., Camacho-Muñoz, D., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2012). Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, 239–240, 40–47.

<https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2012.04.068>

- Masoumi, S., Borugadda, V. B., Nanda, S., & Dalai, A. K. (2021). Hydrochar: A review on its production technologies and applications. *Catalysts*, *11*(8). <https://doi.org/10.3390/catal11080939>
- Mejías, C., Martín, J., Santos, J. L., Aparicio, I., & Alonso, E. (2021). Occurrence of pharmaceuticals and their metabolites in sewage sludge and soil: A review on their distribution and environmental risk assessment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *30*. <https://doi.org/10.1016/j.teac.2021.e00125>
- Meng, Y., Liu, W., Liu, X., Zhang, J., Peng, M., & Zhang, T. (2021). A review on analytical methods for pharmaceutical and personal care products and their transformation products. *Journal of Environmental Sciences (China)*, *101*, 260–281. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2020.08.025>
- Michael, I., Rizzo, L., Mc Ardell, C. S., Manai, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., & Fatta-Kassinos, D. (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research*, *47*(3), 957–995. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2012.11.027>
- Mohan, D., Pittman, C. U., & Philip, S. (2017). Pyrolysis of Wood/Biomass for Bio-oil: A Critical Review Dinesh. *Progress in Energy and Combustion Science*, *62*(4), 848–889. <http://dx.doi.org/10.1016/j.peccs.2017.05.004>
- Möller, M., Nilges, P., Harnisch, F., & Schröder, U. (2011). Subcritical water as reaction environment: Fundamentals of hydrothermal biomass transformation. *ChemSusChem*, *4*(5), 566–579. <https://doi.org/10.1002/cssc.201000341>
- Munir, M. T., Li, B., Boiarkina, I., Baroutian, S., Yu, W., & Young, B. R. (2017). Phosphate recovery from hydrothermally treated sewage sludge using struvite precipitation. *Bioresource Technology*, *239*, 171–179. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.04.129>
- Nannou, C. I., Boti, V. I., & Albanis, T. A. (2018). Trace analysis of pesticide residues in sediments using liquid chromatography–high-resolution Orbitrap mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *410*(7), 1977–1989. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-0864-6>
- Nannou, C. I., Boti, V. I., & Albanis, T. A. (2019). A modified QuEChERS approach for the analysis of pharmaceuticals in sediments by LC-Orbitrap HRMS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *411*(7), 1383–1396. <https://doi.org/10.1007/s00216-018-01570-8>

- Olivero, R. A., Nocerino, J. M., & Deming, S. N. (1995). Experimental Design and Optimization. *Handbook of Environmental Chemistry*, 2, 73–122. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-49148-4\\_3](https://doi.org/10.1007/978-3-540-49148-4_3)
- Olsen, J. V., de Godoy, L. M. F., Li, G., Macek, B., Mortensen, P., Pesch, R., Makarov, A., Lange, O., Horning, S., & Mann, M. (2005). Parts per million mass accuracy on an orbitrap mass spectrometer via lock mass injection into a C-trap. *Molecular and Cellular Proteomics*, 4(12), 2010–2021. <https://doi.org/10.1074/mcp.T500030-MCP200>
- Parshetti, G. K., Liu, Z., Jain, A., Srinivasan, M. P., & Balasubramanian, R. (2013). Hydrothermal carbonization of sewage sludge for energy production with coal. *Fuel*, 111, 201–210. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.04.052>
- Perestrelo, R., Silva, P., Porto-figueira, P., Pereira, J. A. M., Medina, S., & Câmara, J. S. (2019). AC SC. *Analytica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>
- Pérez-Lemus, N., López-Serna, R., Pérez-Elvira, S. I., & Barrado, E. (2020). Sample pre-treatment and analytical methodology for the simultaneous determination of pharmaceuticals and personal care products in sewage sludge. *Chemosphere*, 258. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.127273>
- Peterson, A. A., Vogel, F., Lachance, R. P., Fröling, M., Antal, M. J., & Tester, J. W. (2008). Thermochemical biofuel production in hydrothermal media: A review of sub- and supercritical water technologies. *Energy and Environmental Science*, 1(1), 32–65. <https://doi.org/10.1039/b810100k>
- Peysson, W., & Vulliet, E. (2013). Determination of 136 pharmaceuticals and hormones in sewage sludge using quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction followed by analysis with liquid chromatography-time-of-flight-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1290, 46–61. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.03.057>
- Pinto, B. V., Ferreira, A. P. G., & Cavalheiro, E. T. G. (2017). A mechanism proposal for fluoxetine thermal decomposition. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 130(3), 1553–1559. <https://doi.org/10.1007/s10973-017-6305-5>
- Pinto, B. V., Ferreira, A. P. G., & Cavalheiro, E. T. G. (2018). Thermal degradation mechanism for citalopram and escitalopram. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 133(3), 1509–1518. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7226-7>
- Ponce-Robles, L., Rivas, G., Esteban, B., Oller, I., Malato, S., & Agüera, A. (2017). Determination of pesticides in sewage sludge from an agro-food industry using QuEChERS extraction followed by analysis with liquid chromatography-tandem mass

- spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 409(26), 6181–6193. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0558-5>
- Puig-Arnabat, M., Bruno, J. C., & Coronas, A. (2010). Review and analysis of biomass gasification models. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 14(9), 2841–2851. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2010.07.030>
- Rahman, M. M., Abd El-Aty, A. M., Kim, S. W., Shin, S. C., Shin, H. C., & Shim, J. H. (2017). Quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe sample preparation approach for pesticide residue analysis using traditional detectors in chromatography: A review. *Journal of Separation Science*, 40(1), 203–212. <https://doi.org/10.1002/jssc.201600889>
- Rajski, Ł., Lozano, A., Uclés, A., Ferrer, C., & Fernández-Alba, A. R. (2013). Determination of pesticide residues in high oil vegetal commodities by using various multi-residue methods and clean-ups followed by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1304, 109–120. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.06.070>
- Rasul, S., Kajal, A. M., & Khan, A. (2018). Quantifying Uncertainty in Analytical Measurements. *Journal of Bangladesh Academy of Sciences*, 41(2), 145–163. <https://doi.org/10.3329/jbas.v41i2.35494>
- Renew, J. E., & Huang, C. H. (2004). Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1042(1–2), 113–121. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.05.056>
- Rillig, M. C., Wagner, M., Salem, M., Antunes, P. M., George, C., Ramke, H. G., Titirici, M. M., & Antonietti, M. (2010). Material derived from hydrothermal carbonization: Effects on plant growth and arbuscular mycorrhiza. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 238–242. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.04.011>
- Robbiani, Z. (2013). *Hydrothermal carbonization of biowaste / fecal sludge Conception and construction of a HTC prototype*. April, 88.
- Román, S., Valente Nabais, J. M., Ledesma, B., González, J. F., Laginhas, C., & Titirici, M. M. (2013). Production of low-cost adsorbents with tunable surface chemistry by conjunction of hydrothermal carbonization and activation processes. *Microporous and Mesoporous Materials*, 165, 127–133. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2012.08.006>
- Romero-Anaya, A. J., Ouzzine, M., Lillo-Ródenas, M. A., & Linares-Solano, A. (2014). Spherical carbons: Synthesis, characterization and activation processes. *Carbon*, 68,

296–307. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2013.11.006>

- Rossini, D., Ciofi, L., Ancillotti, C., Checchini, L., Bruzzoniti, M. C., Rivoira, L., Fibbi, D., Orlandini, S., & Del Bubba, M. (2016). Innovative combination of QuEChERS extraction with on-line solid-phase extract purification and pre-concentration, followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs and their metabolites. *Analytica Chimica Acta*, *935*, 269–281. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.06.023>
- Saidur, R., Abdelaziz, E. A., Demirbas, A., Hossain, M. S., & Mekhilef, S. (2011). A review on biomass as a fuel for boilers. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, *15*(5), 2262–2289. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2011.02.015>
- Sakkas, V. A., Islam, M. A., Stalikas, C., & Albanis, T. A. (2010). Photocatalytic degradation using design of experiments: A review and example of the Congo red degradation. *Journal of Hazardous Materials*, *175*(1–3), 33–44. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.10.050>
- Salama, N. N., Mohammad, M. A., & Fattah, T. A. (2015). Thermal behavior study and decomposition kinetics of amisulpride under non-isothermal and isothermal conditions. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, *120*(1), 953–958. <https://doi.org/10.1007/s10973-015-4419-1>
- Salvia, M. V., Vulliet, E., Wiest, L., Baudot, R., & Cren-Olivé, C. (2012). Development of a multi-residue method using acetonitrile-based extraction followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of steroids and veterinary and human drugs at trace levels in soil. *Journal of Chromatography A*, *1245*, 122–133. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2012.05.034>
- Santana-Mayor, Á., Socas-Rodríguez, B., Herrera-Herrera, A. V., & Rodríguez-Delgado, M. Á. (2019). Current trends in QuEChERS method. A versatile procedure for food, environmental and biological analysis. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, *116*, 214–235. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.04.018>
- Santos, L. H. M. L. M., Ramalhosa, M. J., Ferreira, M., & Delerue-Matos, C. (2016). Development of a modified acetonitrile-based extraction procedure followed by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of psychiatric drugs in sediments. *Journal of Chromatography A*, *1437*, 37–48. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2016.01.079>
- Sarabia, L. A., Ortiz, M. C., & Sánchez, M. S. (2020). Response Surface Methodology. In

- Comprehensive Chemometrics* (2nd ed., Issue November). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14756-0>
- Savage, P. E. (1999). Organic Chemical Reactions in Supercritical Water. *Chemical Reviews*, 99(2–3), 603–621. <https://doi.org/10.1021/cr9700989>
- Sbârcea, L., Tănase, I. M., Ledeti, A., Cîrcioban, D., Vlase, G., Barvinschi, P., Miclău, M., Văruț, R. M., Suci, O., & Ledeti, I. (2021). Risperidone/randomly methylated  $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex—compatibility study with pharmaceutical excipients. *Molecules*, 26(6), 1–17. <https://doi.org/10.3390/molecules26061690>
- Scheurer, M., Ramil, M., Metcalfe, C. D., Groh, S., & Ternes, T. A. (2010). The challenge of analyzing beta-blocker drugs in sludge and wastewater. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 396(2), 845–856. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3225-7>
- Schoeman, C., Dlamini, M., & Okonkwo, O. J. (2017). The impact of a Wastewater Treatment Works in Southern Gauteng, South Africa on efavirenz and nevirapine discharges into the aquatic environment. *Emerging Contaminants*, 3(2), 95–106. <https://doi.org/10.1016/j.emcon.2017.09.001>
- Sevilla, M., & Fuertes, A. B. (2009). The production of carbon materials by hydrothermal carbonization of cellulose. *Carbon*, 47(9), 2281–2289. <https://doi.org/10.1016/j.carbon.2009.04.026>
- Shahid, M., & Yusuf, M. (2015). Plant phenolics: A Review on Modern extraction techniques. *Researchgate*, 41(11).
- Shen, C. shuai, & Zhou, C. rong. (2016). Investigation of the thermal decomposition kinetics of bezafibrate. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry*, 126(2), 959–967. <https://doi.org/10.1007/s10973-016-5565-9>
- Smith, S.R., CABI International, Wallingford, Oxon OX10 8DE, UK. 1996. 382 p. ISBN 0-85198-980-2.
- Subedi, B., Lee, S., Moon, H. B., & Kannan, K. (2014). Emission of artificial sweeteners, select pharmaceuticals, and personal care products through sewage sludge from wastewater treatment plants in Korea. *Environment International*, 68, 33–40. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.03.006>
- Tarpani, R. R. Z., Alfonsín, C., Hospido, A., & Azapagic, A. (2020). Life cycle environmental impacts of sewage sludge treatment methods for resource recovery considering ecotoxicity of heavy metals and pharmaceutical and personal care products. *Journal of Environmental Management*, 260, 109643.

- <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.109643>
- Tasca, A. L., Nessi, S., & Rigamonti, L. (2017). Environmental sustainability of agri-food supply chains: An LCA comparison between two alternative forms of production and distribution of endive in northern Italy. *Journal of Cleaner Production*, *140*, 725–741. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2016.06.170>
- Tasca, A. L., Stefanelli, E., Raspolli Galletti, A. M., Gori, R., Mannarino, G., Vitolo, S., & Puccini, M. (2020). Hydrothermal Carbonization of Sewage Sludge: Analysis of Process Severity and Solid Content. *Chemical Engineering and Technology*, *43*(12), 2382–2392. <https://doi.org/10.1002/ceat.202000095>
- Titirici, M. M., Thomas, A., & Antonietti, M. (2007). Back in the black: Hydrothermal carbonization of plant material as an efficient chemical process to treat the CO<sub>2</sub> problem? *New Journal of Chemistry*, *31*(6), 787–789. <https://doi.org/10.1039/b616045j>
- USEPA. (1988). *Sampling Procedures and Protocols for the National Sewage Sludge Survey*. august, 69.
- Van De Steene, J. C., & Lambert, W. E. (2008). Validation of a solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometric method for the determination of nine basic pharmaceuticals in wastewater and surface water samples. *Journal of Chromatography A*, *1182*(2), 153–160. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2008.01.012>
- Varela-martí, D. A., & Gonza, J. (2020). *Chapter 14*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816911-7.00014-1>
- Varela-martí, D. A., Gonza, J., González-curbelo, M. Á., Socas-rodríguez, B., Herrera-herrera, A. V, Perestrello, R., Silva, P., Porto-figueira, P., Pereira, J. A. M., Medina, S., Câmara, J. S., & Choi, S. (2019). AC SC. *Analytica Chimica Acta*, *71*, 169–185. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2019.02.036>
- Villamil, J. A., De La Rubia, M. A., Diaz, E., & Mohedano, A. F. (2019). Technologies for wastewater sludge utilization and energy production: Hydrothermal carbonization of lignocellulosic biomass and sewage sludge. In *Wastewater Treatment Residues as Resources for Biorefinery Products and Biofuels*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816204-0.00007-2>
- vom Eyser, C., Palmu, K., Schmidt, T. C., & Tuerk, J. (2015). Pharmaceutical load in sewage sludge and biochar produced by hydrothermal carbonization. *Science of the Total Environment*, *537*, 180–186. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.021>

- Wallman, H. Laboratory studies of a hydrothermal pretreatment process for municipal solid waste. United States: N. p., 1995. Web. doi:10.2172/82402.
- Wang, K., Zhuang, T., Su, Z., Chi, M., Wang, H., Rodriguez-Mozaz, S., Vaz-Moreira, I., Varela Della Giustina, S., Llorca, M., Barceló, D., Schubert, S., Berendonk, T. U., Michael-Kordatou, I., Fatta-Kassinos, D., Martinez, J. L., Elpers, C., Henriques, I., Jaeger, T., Schwartz, T., ... Barcelo, D. (2011). Antibiotic residues in wastewaters from sewage treatment plants and pharmaceutical industries: Occurrence, removal and environmental impacts. *Water Research*, 788(December 2019), 147811. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2010.11.010>
- Wang, L., Chang, Y., & Li, A. (2019). Hydrothermal carbonization for energy-efficient processing of sewage sludge: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 108(June 2018), 423–440. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2019.04.011>
- Wang, T., Zhai, Y., Zhu, Y., Li, C., & Zeng, G. (2018). A review of the hydrothermal carbonization of biomass waste for hydrochar formation: Process conditions, fundamentals, and physicochemical properties. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 90(December 2016), 223–247. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2018.03.071>
- Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2007). Chapter 8. Electrospray Ionization. In *Introduction to Mass Spectrometry: Instrumentation, Applications, and Strategies for Data Interpretation*. <http://dx.doi.org/10.1002/9780470516898.ch8>
- Watson, J. T., & Sparkman, O. D. (2008). The Mass Spectrometer. In *Introduction to Mass Spectrometry*. <https://doi.org/10.1002/9780470516898.ch2>
- Weitzel, K., Chemie, F., Rev, M. S., Introduction, I., & Reference, C. (2011). Bond-Dissociation Energies of Cations — Pushing the. *WHO Library Cataloguing-in-Publication Data*, i, 221–235. <https://doi.org/10.1002/mas>
- Wiedner, K., Naisse, C., Rumpel, C., Pozzi, A., Wieczorek, P., & Glaser, B. (2013). Chemical modification of biomass residues during hydrothermal carbonization - What makes the difference, temperature or feedstock? *Organic Geochemistry*, 54, 91–100. <https://doi.org/10.1016/j.orggeochem.2012.10.006>
- Xu, C., & Lancaster, J. (2008). Conversion of secondary pulp/paper sludge powder to liquid oil products for energy recovery by direct liquefaction in hot-compressed water. *Water Research*, 42(6–7), 1571–1582. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2007.11.007>
- Xu, Q., Qian, Q., Quek, A., Ai, N., Zeng, G., & Wang, J. (2013). Hydrothermal carbonization of macroalgae and the effects of experimental parameters on the properties of



- hydrochars. *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 1(9), 1092–1101. <https://doi.org/10.1021/sc400118f>
- Zhao, P., Shen, Y., Ge, S., & Yoshikawa, K. (2014). Energy recycling from sewage sludge by producing solid biofuel with hydrothermal carbonization. *Energy Conversion and Management*, 78, 815–821. <https://doi.org/10.1016/j.enconman.2013.11.026>
- Zhou, S., Di Paolo, C., Wu, X., Shao, Y., Seiler, T. B., & Hollert, H. (2019). Optimization of screening-level risk assessment and priority selection of emerging pollutants – The case of pharmaceuticals in European surface waters. *Environment International*, 128(October 2018), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.04.034>
- Zuloaga, O., Navarro, P., Bizkarguenaga, E., Iparraguirre, A., Vallejo, A., Olivares, M., & Prieto, A. (2012). Overview of extraction, clean-up and detection techniques for the determination of organic pollutants in sewage sludge: A review. *Analytica Chimica Acta*, 736, 7–29. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2012.05.016>

### ***Ελληνική Βιβλιογραφία***

- Άγγελος, Φ. (2009). Διαχείριση Ιλύων Από Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων Στην Ευρώπη Με Έμφαση Στην Ελλάδα.
- Αλμπάνης, Τ. (1999). Ρύπανση Και Τεχνολογία Προστασίας Περιβάλλοντος.
- Ανδρεαδάκης Α. (2000). Σημειώσεις για το μάθημα: Ρύπανση Περιβάλλοντος: Έργα καθαρισμού νερού και υγρών αποβλήτων. ΔΠΜΣ Περιβάλλον και Ανάπτυξη ΕΜΠ.
- Ανδρεαδάκης Α. (2002). Σημειώσεις για το μάθημα: Διαχείριση Στερεών Αποβλήτων και Ιλύος. ΔΠΜΣ Επιστήμη και Τεχνολογία Υδατικών Πόρων ΕΜΠ.
- Αντωνοπούλου, Μ (2013). Φωτοκαταλυτική διάσπαση οργανικών ρύπων προτεραιότητας σε υδατικά συστήματα, Διδακτορική Διατριβή, τμήμα διαχείρισης περιβάλλοντος και φυσικών πόρων, Πάτρα.
- Κοσμά, Χ. (2013). Ανίχνευση, Μεταφορά και Φωτολυτική διάσπαση φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον, Διδακτορική Διατριβή, Σχολή Θετικών επιστημών, τμήμα Χημείας, Ιωάννινα.
- Λέκκα Α,Θ. (2013). Επεξεργασία υγρών αποβλήτων- περιγραφή και λειτουργία μονάδας επεξεργασίας λυμάτων Ιωαννίνων, Πτυχιακή εργασία, Σχολή Τεχνολογικών Τφαρμογών, τμήμα Μηχανολογίας, Ηράκλειο.

- Μάλλιου Μ. (2006). Ποιοτικά χαρακτηριστικά ιλύος από εγκαταστάσεις λυμάτων του ελλαδικού χώρου. Χαροκόπειο Πανεπιστήμιο, τμήμα Οικιακής Οικονομίας και Οικολογίας, Αθήνα.
- Μπούρας Γ. (2012). Πυρόλυση λυματολάσπης και παραγωγή βιοεξανθρακώματος. Πολυτεχνείο Κρήτης, Διπλωματική εργασία, Τμήμα Μηχανικών Περιβάλλοντος, Χανιά Κρήτη.
- Νταρακάς Ε. (2006). Σημειώσεις για το μάθημα: Στοιχεία Χημείας Περιβάλλοντος. Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Θεσσαλονίκη.
- Νταρακάς Ε. (2010). Σημειώσεις: Διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων. Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Θεσσαλονίκη.
- Παπαδογιάννη,Ι.Ν., “Σύγχρονες διαχωριστικές στην ενόργανη Χημική Ανάλυση”, Θεσσαλονίκη 2004, 31-39, 163-296.
- Σκουντούρογλου Ε. (2019). Μέθοδοι εξυγίανσης και χαρακτηρισμός ιλύος εγκαταστάσεων επεξεργασίας αστικών λυμάτων», Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Θεσσαλονίκη.
- Τζομάκα Β. (2015). Αποτίμηση και λειτουργικά χαρακτηριστικά της Ε.Ε.Λ των Ιωαννίνων, Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης, Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Θεσσαλονίκη.