



MATEJ ŠTAUS

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017



Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*

MATEJ ŠTAUS

SPREMLJANJE PRISOTNOSTI OSTANKOV IZBRANIH
ZDRAVILNIH UČINKOVIN V ODPADNIH VODAH Z
EKSTRAKCIJO NA OSNOVI SORPTIVNEGA MEHANIZMA

MONITORING OF PHARMACEUTICAL RESIDUES IN
WASTEWATER USING THE STIR-BAR SORPTIVE EXTRACTION
APPROACH

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. Eksperimentalni del je bil v celoti opravljen na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. za strokovno pomoč in svetovanje ob nastajanju magistrske naloge. Iskrena zahvala tudi asist. Aniti Klančar, mag. farm., ki mi je med izdelavo magistrske naloge nudila vsestransko strokovno pomoč.

Posebna zahvala gre tudi moji družini, ki mi je stala ob strani ves čas študija. Zahvala tudi vsem prijateljem za nepozabna študentska leta.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Matej Štaus

KAZALO VSEBINE

Kazalo slik	iv
Kazalo preglednic	iv
Povzetek.....	v
Abstract	vi
Seznam okrajšav	vii
1. Uvod	1
1.1. Učinkovine v okolju.....	1
1.1.1. Vstop zdravilnih učinkovin v vodo.....	1
1.1.2. Vpliv prisotnosti učinkovin na okolje.....	2
1.1.3. Ocenjevanje vpliva in regulacija prisotnosti učinkovin v okolju.....	4
1.2. Tipi ekstrakcij za pripravo vzorcev.....	5
1.2.1. Ekstrakcija tekoče-tekoče	5
1.2.2. Ekstrakcija na trdnem nosilcu.....	6
1.2.3. Mikroekstrakcija	7
1.2.4. Ekstrakcija na osnovi sorptivnega mehanizma s pomočjo Twister [®] mešalnih paličic	9
1.2.4.1. Twister [®] mešalne paličice.....	9
1.2.4.2. Izvedba ekstrakcije in desorpcije	10
1.2.4.3. Teoretično ozadje.....	11
1.2.4.4. Prednosti in slabosti SBSE	12
1.2.4.5. Uporaba metode SBSE v praksi.....	12
1.2.4.6. Trendi razvoja stacionarnih faz.....	13
1.3. Masna spektrometrija.....	14
2. Namen dela	16
3. Materiali in metode.....	17

3.1.	Materiali.....	17
	Preostali standardi, ki so bili uporabljeni pri metodi SPE-DEX:	19
3.1.4.	Vzorci odpadne vode	20
3.1.5.	Naprave in pribor	20
	Sistem za Horizon Technology SPE-DEX®:	21
3.1.6.	Priprava standardnih raztopin	22
3.1.6.1.	Primarne osnovne raztopine analitov.....	22
3.1.6.2.	Sekundarne osnovne raztopine	22
3.1.6.3.	Priprava delovne raztopine	23
3.1.6.4.	Priprava raztopine internega standarda.....	23
3.1.7.	Priprava 50 mM fosfatnega pufr: pH 7 in pH 9	23
3.1.8.	Priprava topil.....	23
3.2.	Metode	24
3.2.1.	Uporaba metod na realnih vzorcih.....	24
3.2.1.1.	Metoda SBSE.....	24
3.2.1.2.	Metoda SPE-DEX.....	25
3.2.1.3.	Metoda internega standarda	26
3.2.1.4.	Metoda standardnega dodatka	27
3.2.2.	Analiza vzorcev z masnim spektrometrom.....	28
3.2.3.	Učinkovitost odstranjevanja analitov.....	31
3.2.4.	Vpliv različnih dimenzij Twister® mešalnih paličic na delež vezave posameznega analita	31
3.2.5.	Vrednotenje SBSE	32
3.2.5.1.	Izkoristek metode.....	32
3.2.5.2.	Ponovljivost metode	32
4.	Rezultati in razprava	33
4.1.	Izbrani analiti	33

4.2.	Vrednotenje SBSE	33
4.2.1.	Izkoristek metode.....	33
4.2.2.	Ponovljivost metode	34
4.3.	Primerjava izkoristkov med SBSE in SPE-DEX metodo.....	35
4.4.	Relativni izkoristki različnih dimenzij Twister® mešalnih paličic	36
4.5.	Prisotnost in koncentracije analitov na vtokih in iztokih čistilnih naprav	38
4.5.1.	Primerjava koncentracij analitov na vtoku in iztoku čistilnih naprav.....	41
4.5.2.	Učinkovitost odstranjevanja analitov.....	42
4.5.3.	Vpliv tehnologije čiščenja v čistilni napravi na učinkovitost odstranjevanja analitov	44
4.5.4.	Vpliv tehnologije čiščenja na delež analitov v posameznem koncentracijskem območju	45
4.5.5.	Vpliv demografskih značilnosti na prisotnost učinkovin v čistilnih napravah.....	46
4.5.6.	Pogled v koncentracije farmacevtikov na vtokih in iztokih čistilnih naprav določenih širom Evrope.....	48
5.	Sklep.....	51
6.	Literatura	53

Kazalo slik

Slika 1: Pot učinkovin za humano uporabo do pitne vode.	2
Slika 2: Twister [®] mešalna palica (povzeto po (31)).	9
Slika 3: Teoretični izkoristek glede na različne vrednosti log K (povzeto po (32)).	11
Slika 4: Metoda standardnega dodatka.	27
Slika 5: Koncentracije analitov na vtoku in iztoku čistilnih naprav.	41
Slika 6: Delež koncentracijskih območij analitov glede na tehnologijo čiščenja.	46

Kazalo preglednic

Preglednica 1: Dodatki internega standarda in standardnega dodatka.	25
Preglednica 2: Metoda ekstrakcije s tehnologijo SPE-DEX.	26
Preglednica 3: Spreminjanje pretoka in deleža topila med gradientno elucijo.	29
Preglednica 4: Nastavitve ionskega izvora.	29
Preglednica 5: MRM prehodi, kolizijske energije, napetosti fragmentorja, polariteta in retencijski časi analitov uporabljenih pri metodi SBSE.	30
Preglednica 6: Priprava vzorcev za ugotavljanje vpliva različnih dimenzij Twister [®] mešalnih paličic na delež vezave analita.	31
Preglednica 7: Validacijski parametri.	34
Preglednica 8: Primerjava izkoristkov med SBSE in SPE-DEX.	35
Preglednica 9: Relativni izkoristki analitov pri različnih dimenzijah mešalnih paličic.	37
Preglednica 10: Koncentracije analitov na posameznih čistilnih napravah.	39
Preglednica 11: Koncentracijska območja določitve učinkovin in delež prisotnosti v čistilnih napravah.	40
Preglednica 12: Učinkovitost odstranjevanja analitov.	42
Preglednica 13: Tehnologija čiščenja, ki poteka v čistilni napravi.	44
Preglednica 14: Količina prečiščene vode in prisotnost zdravstvenih ustanov in industrije v čistilni napravi.	47
Preglednica 15: Koncentracije učinkovin v nekaterih evropskih državah.	49

Povzetek

Zdravilne učinkovine predstavljajo spojine, s katerimi zdravimo bolezenska stanja oz. preprečujemo njihov nastanek. Poraba omenjenih substanc narašča iz dneva v dan in ne moremo mimo dejstva, da so kot take v vedno večji meri prisotne v okolju. V novejšem času je na voljo vse več študij, ki proučujejo vpliv prisotnosti zdravilnih učinkovin na organizme, ki so jim izpostavljeni in pa tudi potencialnim nevarnostim, ki grozijo tem organizmom ob izpostavitvi. Cilj magistrske naloge je bil preveriti novejši pristop priprave vzorca na osnovi ekstrakcije s sorptivnim mehanizmom (SBSE, ang. *Stir bar sorptive extraction*) na več vzorcih odpadnih vod vtokov in iztokov čistilnih naprav.

Koncentracije ostankov zdravilnih učinkovin smo spremljali na enajstih različnih čistilnih napravah po Sloveniji. Vzorci odpadnih vod, ki so bili zajeti na čistilnih napravah, so se razlikovali v lokaciji zajetja in v časovnem intervalu, v katerem so bili zajeti. Tako smo ločili vzorce, ki predstavljajo vtok v čistilno napravo in iztok iz nje ter vzorce, ki temeljijo na 24-urnem zajemu in tiste, ki so bili zajeti trenutno. Razvita metoda je temeljila na nezahtevni predpripravi vzorca, s katero smo dosegli izolacijo analitov iz kompleksnega ozadja odpadnih voda. Za ekstrakcijo smo uporabili tehniko, ki temelji na osnovi sorptivnega mehanizma (SBSE) in katere stacionarno fazo predstavlja polidimetilsiloksan (PDMS). Tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) smo uporabili za izvedbo instrumentalne analize. V analizah smo zajeli 24 učinkovin, od katerih samo treh nismo uspeli zaznati v nobenem vzorcu. Večina zdravilnih učinkovin je bila prisotna v koncentracijah, ki so bile nižje od 100 ng/L. Izmed 24 učinkovin so azitromicin, escitalopram, sertralin, tramadol, triklosan in venlafaksin presegali to mejo. Tramadol se je nahajal v koncentracijskem območju višjem od 550 ng/L, preostalih pet učinkovin pa je bilo določenih v koncentracijskem intervalu 100 ng/L – 500 ng/L.

Ker je bila metoda razvita in ovrednotena že v preteklosti, smo preverili zgolj nekaj osnovnih validacijskih parametrov, in sicer izkoristek in ponovljivost. Ponovljivost metode je bila ustrezna, saj so RSD vrednosti pri vseh analitih bile manjše od 15 %. Izkoristki so se gibali od 3,3 % do 98,6 % za posamezen analit.

Ključne besede: SBSE, zdravilne učinkovine, odpadne vode, LC-MS/MS

Abstract

Active pharmaceutical ingredients are compounds for treating medical conditions or prevent their onset. The consumption of these substances is increasing every day and we cannot ignore the fact, that they are more and more present in our environment. Nowadays, there is a growing number of studies available that study the impact of active substances on organisms to which they are exposed to and also the potential threats they pose to such organisms. The goal of this master's thesis is to test the performance of the newly developed approach for sample preparation based on sorptive extraction (SBSE) on several influent and effluent samples obtained from wastewater treatment plants.

The concentrations of active pharmaceutical ingredient residues were monitored in eleven different treatment plants in Slovenia. The wastewater samples were collected from various locations and time points. We analysed the samples that were obtained before and after the treatment, and 24-hour composite as well as single time point samples. Our sample preparation method was based on a simple analyte isolation from the complex wastewater matrix. Our extraction method is based on the sorptive mechanism (SBSE), where the stationary phase is polydimethylsiloxane (PDSM). Liquid chromatography, coupled with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), was used to perform the instrumental analysis. During our analysis, we monitored 24 active substances, however, we were unable to detect three of them in any of the analysed samples. The majority of active substances were present in concentrations below 100 ng/L. Azithromycin, escitalopram, sertraline, tramadol, triclosan, and venlafaxine were the only substances out of 24 that surpassed this limit. Tramadol was present in concentrations exceeding 550 ng/L, while the other five substances were found in concentrations between 100 ng/L and 500 ng/L.

Since this method was already developed and assessed by our laboratory in the past, we only verified two basic validation parameters: efficiency and repeatability. The repeatability of the method was suitable with RSD values lower than 15 % for all the tested analytes. The recoveries varied between 3.3 % and 98.6 % for each analyte.

Keywords: SBSE, active pharmaceutical ingredients, wastewater, LC-MS/MS

Seznam okrajšav

ACN – acetonitril

ACPI – kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (ang. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*)

CI – kemijska ionizacija (ang. *Chemical ionization*)

DI-SDME – direktna metoda enokapljične mikroekstrakcije (ang. *Direct-immersion single-drop microextraction*)

DI-SPME – direktna metoda ekstrakcije na trdnem nosilcu (ang. *Direct-immersion solid-phase microextraction*)

DLLME – disperzivna mikroekstrakcija tekoče-tekoče (ang. *Dispersive liquid-liquid microextraction*)

EI – ionizacija z elektroni (ang. *Electron ionisation*)

ESI – elektrorazprševalna ionizacija (ang. *Electrospray ionization*)

EtOAc – etil acetat

HS-SDME – enokapljična mikroekstrakcija s tehniko nadprostora (ang. *Headspace single-drop microextraction*)

HS-SPME – mikroekstrakcija na trdnem nosilcu s tehniko nadprostora (ang. *Headspace solid-phase microextraction*)

HF-LPME – mikroekstrakcija s tekočinsko fazo na osnovi votlega vlakna (ang. *Hollow fiber based-liquid phase microextraction*)

LC₅₀ – srednja smrtna koncentracija

LC-MS/MS – tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo

LD₅₀ – srednja letalna doza

LLE – ekstrakcija tekoče-tekoče (ang. *Liquid-liquid extraction*)

LOQ – meja določitve (ang. *Limit of quantification*)

LPME – mikroekstrakcija s tekočinsko fazo (ang. *Liquid phase microextraction*)

MALDI – ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo (ang. *Matrix-assisted laser desorption/ionisation*)

MeOH – metanol

MIP – molekularno vtisnjeni polimeri (ang. *Molecularly imprinted polymers*)

n.d. – nedoločeno

PAH – policiklični aromatski ogljikovodiki (ang. *Polycyclic aromatic hydrocarbon*)

PDMS – polidimetilsiloksan

PEC – predvidena koncentracija v okolju

PNEC – predvidena koncentracija brez učinkov

POP – obstojna organska onesnažila (ang. *Persistent organic pollutant*)

QQQ – trojni kvadrupol (ang. *Triple quadrupole*)

R² – determinacijski koeficient

RAM – (ang. *Restricted access materials*)

SBSE – ekstrakcija na osnovi sorptivnega mehanizma s pomočjo Twister® mešalnih paličic (ang. *Stir bar sorptive extraction*)

SDME – enokapljična mikroekstrakcija (ang. *Single drop microextraction*)

SPE – ekstrakcija na trdnem nosilcu (ang. *Solid phase extraction*)

SPE-DEX – delno avtomatiziran sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu SPE-DEX® 4790

SPME – mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (ang. *Solid phase microextraction*)

THF – tetrahidrofuran

v/v – volumsko-volumski odstotek

1. Uvod

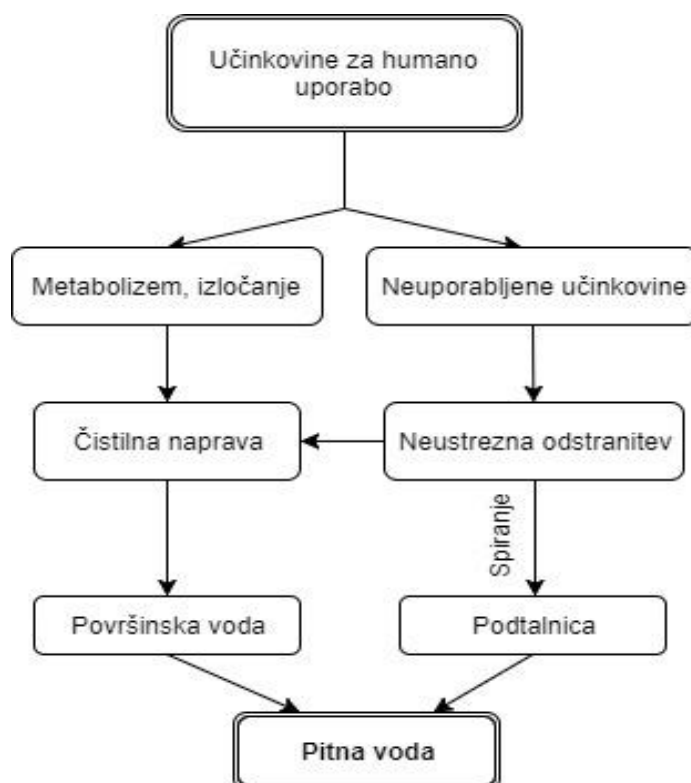
1.1. Učinkovine v okolju

Človek in ostala živa bitja so že v zgodnji fazi svojega razvoja vnašali učinkovine v lasten organizem bodisi zavedno ali nezavedno preko uživanja različnih rastlin. Ugotovili so, da z vnosom nekaterih rastlin lahko izboljšajo počutje, povečajo vzdržljivost in vplivajo na različne funkcije, ki so pripomogle k obstoju vrste. Lahko rečemo, da so učinkovine prisotne v okolju praktično od začetka obstoja življenja na našem planetu. Sčasoma je človek začel ugotavljati, da bi z določenimi snovmi oziroma njihovo mešanico lahko zdravili patofiziološke pojave. Vzporedno s hitrim razvojem farmacevtske znanosti in industrije je začelo naraščati tudi število novih učinkovin in njihova poraba. Po dostopnih podatkih trenutno poznamo okoli 9600 učinkovin. Učinkovin, ki so registrirane za humano in veterinarsko uporabo je bistveno manj (1).

1.1.1. Vstop zdravilnih učinkovin v vodo

Po zaužitju učinkovina doseže svoj farmakološki učinek in se nato izloči v nespremenjeni obliki ali kot metabolit preko urina in blata in kot taka vstopi v okolje (2). Prav iztočna voda, ki priteče v čistilne naprave iz gospodinjstev in zdravstvenih ustanov, predstavlja glavni vir onesnaženja okolja z učinkovinami. Da je temu tako, pripomore tudi dejstvo, da je večina čistilnih naprav, preko katerih se stekajo odpadne vode, narejena tako, da zgolj odstranijo trdne delce, oljne madeže in hranila, ki so prisotni v odplakah. Za razliko od omenjenega pa se učinkovine običajno nahajajo v raztopljenem stanju in jih je brez posebnih tehnik nemogoče v večji meri odstraniti. Med te tehnike sodijo različne vrste naprednih oksidacij (predvsem uporaba ozona), elektrokemična razgradnja in fotodegradacija (3).

Poleg iztočne vode iz čistilnih naprav poznamo še druge načine, kako vstopijo učinkovine v okolje. Omenimo lahko nepravilno odstranitev nerabljenih zdravil, ki se jih odvrže bodisi v odtoke bodisi v komunalne odpadke. Tako zavržena zdravila predstavljajo tveganje predvsem z vidika spiranja teh učinkovin v podtalnico (slika 1).



Slika 1: Pot učinkovin za humano uporabo do pitne vode.

Omeniti velja tudi delež, ki ga prispeva farmacevtska industrija s svojimi izpusti med izdelavo določenega zdravila (4). Ta delež je sicer sorazmerno nizek glede na deleže drugih poti vnosa učinkovin v okolje. Poleg tega lahko naštejemo kot možne poti vstopa učinkovin v okolje tudi preko uporabe v kmetijstvu. S tem mislimo predvsem na uporabo učinkovin v živinoreji (zdravljenje določenih bolezni pri živalih in spodbujanje rasti), poljedelstvu (uporaba gnojil, ki nastanejo kot produkt pri usedanju gošče v čistilnih napravah) ter v ribogojnicah. V slednjih uporabljajo različne farmacevtske pripravke, ki jih koristijo za preprečevanje bolezni ali v namen pospeševanja rasti rib (5, 6). Problem predstavljajo tudi greznične jame, ki niso nikoli popolnoma vodotesne in kot take vedno doprinesejo svoj delež k onesnaženosti okolja. Ločimo nepretočne in pretočne greznične jame z odtokom v ponikovalnico (7).

1.1.2. Vpliv prisotnosti učinkovin na okolje

Prisotnost učinkovin v vodah je zaskrbljujoča, saj predstavlja potencialno grožnjo zaradi mogočih neželenih učinkov predvsem na nižje organizme, ki so izpostavljeni učinkovinam.

Posredno je tem vplivom izpostavljen tudi človek, a je omenjeno področje trenutno dokaj neraziskano. Za veliko večino učinkovin velja, da je njihov vpliv na okolje zanemarljiv, saj so neobstoje, ko pridejo v okolje in posledično nimajo bistvenega toksičnega vpliva. Med skupine zdravil, ki so izkazovale toksične učinke na živa bitja, uvrščamo antiparazitike, antimikotike, antibiotike, hipolipemike, zaviralce receptorjev beta, nesteroidne antirevmatike in spolne hormone (5). Neželene učinke prisotnosti zgoraj omenjenih učinkovin prisotnih v okolju so opazili predvsem na vodnih organizmih. Da je temu tako, pripomore tudi dejstvo, da je bilo ravno največ raziskovalnega dela opravljenega predvsem na analizi vodnih vzorcev. Poleg tega so analize prisotnosti učinkovin izvajali tudi v vzorcih zraka, zemlje in sedimentov (8, 9).

V danih razmerah je običajno težko oceniti, kako toksičen je lahko učinek učinkovine oziroma njihove mešanice na posamezno vrsto. Iz preteklosti sta najbolj znana primera skorajšnjega izumrtja indijskih jastrebov (*Gyps bengalensis*, *Gyps indicus*, *Gyps tenuirostris*) na območju Indijske podceline ter feminizacija moških osebkov črnoglavega pisanca (*Pimephales promelas*) (10). V prvem primeru je bilo v dvajsetem stoletju ugotovljeno, da je poginilo več kot deset milijonov indijskih jastrebov. Šele leta 2003 so odkrili, da vzrok pogina tiči v odpovedi ledvic, povzročeno s strani učinkovine diklofenak, ki so jo jastrebi zaužili preko mrhovine. Omenjeno mrhovino je predstavljalo predvsem govedo, ki je bilo zdravljeno z diklofenakom (11). Pri drugem primeru pa je bila izvedena večletna študija v Kanadi, ki je pokazala, da je kronična izpostavljenost 17α -etinilestradiolu povzročila feminizacijo osebkov moškega spola rib črnoglavega pisanca. 17α -etinilestradiol spada med sintezne spojine in se uporablja kot peroralni kontraceptiv. Feminizacija je bila opažena že pri osebkih, ki so bili izpostavljeni koncentracijam 17α -etinilestradiola, ki so bile nižje od 1 ng/L. Ne glede na to, da je prišlo do feminizacije, pa moramo omenjeno študijo interpretirati z rezervo. Razlog tiči v tem, da so bili samci rib izpostavljeni bistveno dlje časa enakim koncentracijam 17α -etinilestradiola kot so jih zaznali v iztokih iz čistilnih naprav. V naravnem okolju omenjene koncentracije nihajo in bi lahko bila izpostavljenost bistveno nižja (12). Opisana primera še zdaleč nista osamljena, saj je znano, da so se predvsem populacije številnih vrst rib v svetovnih morjih in rekah znižale v primerjavi s preteklostjo. Eden izmed razlogov za upad populacije rib prav gotovo tiči tudi v direktni izpostavljenosti rib steroidnim hormonom. Ta trditev je bila s študijami dokazana sicer samo za določene vrste rečnih rib in je kot take zaenkrat ne moremo posplošiti tudi za morske ribe (13).

1.1.3. Ocenjevanje vpliva in regulacija prisotnosti učinkovin v okolju

Jasno je, da izpostavljenost določenim učinkovinam prinaša tveganja za živa bitja. Prav zaradi tega se zadnja leta na nivoju Evropske unije in nekaterih držav vpeljuje strožja in predvsem boljše opredeljena zakonodaja. EMA (Evropska agencija za zdravila) je leta 2006 izdala smernice glede ocene tveganja za okolje pri uporabi medicinskih produktov za humano uporabo (14). V smernicah je bilo opisano, kako oceniti vpliv določene snovi na okolje. Vpliv snovi na okolje določajo preko razmerja PEC/PNEC. PEC (ang. *Predicted environmental concentration*) predstavlja predvideno koncentracijo snovi v okolju, medtem ko PNEC (ang. *Predicted no effect concentration*) predstavlja tisto koncentracijo snovi, pri kateri ni več možno opaziti mogočih neželenih učinkov snovi na organizmih. PNEC vrednost je določena s pomočjo eksperimentalnih podatkov, kot so LD₅₀ in LC₅₀, deljenih z ustreznim varnostnim faktorjem. Vrednost LD₅₀ je definirana kot količina snovi, ki učinkuje smrtno pri 50 % poskusnih osebkov v 14 dnevih po enkratni izpostavljenosti. Z LD₅₀ običajno ponazarjamo akutno toksičnost neke snovi. Vrednost LC₅₀ pa nam pove, kolikšna količina snovi učinkuje smrtno na 50 % poskusnih osebkov v 14 dnevih po enkratni izpostavljenosti (15). Varnostni faktor ponazarja stopnjo negotovosti, ki jo moramo upoštevati pri prenosu eksperimentalnih dognanj na določenem številu vrst in osebkov v naravni sistem, ki predstavlja kompleksno celoto (16).

Glede same regulative je z vidika učinkovin pravna ureditev dokaj slabo urejena. Vzrok lahko iščemo predvsem v tem, da je tema prisotnosti učinkovin v okolju pridobila na pozornosti predvsem v zadnjem desetletju. V tem času so znotraj Evropske unije že deklarirali koncentracije, v katerih so lahko prisotne nekatere spojine, kot so pesticidi in biocidi. Nekateri predstavniki iz teh skupin so trenutno uvrščeni tudi na Evropsko listo onesnaževal, ki so deležna posebne pozornosti. Na to listo so bile z direktivo Evropske unije uvrščene tudi učinkovine diklofenak, 17 α -etinilestradiol, 17 β -estradiol, estron in makrolidni antibiotiki (eritromicin, klaritromicin, azitromicin) (17, 18).

1.2. Tipi ekstrakcij za pripravo vzorcev

Navkljub pospešenemu razvoju analitike ekstrakcija in sama priprava vzorca ostajata zelo pomemben vidik uspešne identifikacije in nenazadnje tudi kvantifikacije spojin, ki so prisotne v vzorcu. Ocenjeno je, da okoli 50 % do 70 % časa, ki ga porabimo za analizo določenih analitov zajameta prav ekstrakcija in priprava vzorca. Primeren ekstrakcijski sistem nam omogoča ekstrakcijo želenih spojin selektivno od manj želenih. Na tem mestu se moramo vprašati, koliko neželenih spojin je bilo ekstrahiranih skupaj z želenimi in ali lahko kakorkoli pripomoremo k temu, da bo ta delež v ekstrahirani fazi manjši. Metodam, ki se trenutno uporabljajo za ekstrakcijo, je skupna težnja k minimalni porabi organskih topil, čim krajši čas namenjen pripravi vzorca, avtomatiziranost procesa in nenazadnje tudi možnost sklopitve z metodami za nadaljnjo detekcijo (19).

1.2.1. Ekstrakcija tekoče-tekoče

Proces ekstrakcije tekoče-tekoče (LLE) (ang. *Liquid-liquid extraction*) temelji na razporeditvi substance iz ene tekoče faze v drugo, glede na njeno relativno topnost bodisi v eni bodisi v drugi fazi. Običajno imamo na eni strani vodno raztopino, na drugi pa organsko topilo, za katerega želimo, da se ne meša z vodo. Ekstrakcija lahko uporabljamo za ločitev določene substance od zmesi, ki jo imamo na voljo, možna pa je tudi uporaba za odstranitev nečistot, ki so prisotne v raztopini. Za uspešnost ekstrakcije je pomembna ustrezna izbira ekstrakcijskega topila. Ko izbiramo ustrezna topila za ekstrakcijo, so nam v pomoč naslednji faktorji (20, 21):

- porazdelitveni koeficient (predstavlja razmerje med koncentracijo snovi v organski fazi in koncentracijo snovi v vodni fazi)
- gostota (večja bo razlika v gostotah med vodno in organsko fazo, lažja bo ločitev ene od druge faze)
- medfazna napetost (višja medfazna napetost povzroči počasnejši prehod substance iz ene faze v drugo)
- selektivnost (višja selektivnost pomeni manjšo možnost ekstrahiranja drugih snovi zraven želene)

- viskoznost (nizka viskoznost je zaželena, saj visoka viskoznost otežuje difuzijo in ostale načine prehoda substance iz ene faze v drugo)
- toksičnost (če je možno, se izognemo toksičnim topilom)

Iz zgoraj omenjenih faktorjev lahko ugotovimo, da je praktično nemogoče zagotoviti popolno ustreznost topila, ki ga uporabljamo za ekstrakcijo, zato v praksi vedno iščemo približke popolnemu topilu.

1.2.2. Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Prve omembe ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) segajo v 40-ta leta prejšnjega stoletja, pospešen razvoj pa je ta metoda doživela v 70-tih letih (22, 23). Sprva je bila uporabljena za koncentriranje sledi organskih onesnaževal v vzorcih odpadne vode, danes pa je njena uporaba bistveno bolj razširjena. SPE temelji na porazdeljevanju spojin med tekočo in trdno fazo. Želeni analit se bodisi adsorbira bodisi preide v delce stacionarne faze glede na afiniteto do le-te. Kako močno bo naš analit vezan na stacionarno fazo, je odvisno od tvorbe van der Waalsovih vezi, dipol-dipol interakcij, tvorbe H-vezi in tvorbe kation-anion interakcij (ionske interakcije). Na podlagi zgoraj omenjenih interakcij delimo SPE na reverzno fazno-SPE, normalno fazno-SPE in ionsko izmenjevalno-SPE. Kriteriji na katere moramo biti pozorni pri izbiri stacionarne faze, so selektivnost, povišana kapaciteta sorpcije oziroma adsorpcije, mehanska stabilnost in zadostna življenjska doba. Najpogosteje uporabljene stacionarne faze za SPE so iz silikatnih (imajo vezane hidrofobne verige (C2 do C18)) in kopolimernih (hidrofobne in polarne verige) materialov.

Proces ekstrakcije na trdnem nosilcu vključuje faze aktivacije stacionarne faze (največkrat jo aktiviramo z dodatkom MeOH), odstranitev topila, ki služi za aktivacijo stacionarne faze (topilo naj bi izkazovalo podobne lastnosti kot jih ima naš vzorec (polarnost, pH)), nanos vzorca (pri delu z vzorcem, ki je kontaminiran z večjimi delci, lahko izvedemo tudi filtracijo), spiranje stacionarne faze (uporabimo topilo, ki nam bo spralo neželene snovi in ohranilo želene), sušenje, izpiranje (uporabimo majhne volumne topil, ki nam v celoti sperejo želene snovi, polarne snovi se najbolje izpirajo s polarnimi topili (MeOH>ACN>EtOAc>aceton>THF) in priprava za nadaljnjo analizo (uparimo elucijsko topilo, suh preostanek pa raztopimo v začetni mobilni fazi) (24).

Posebno omembo si zasluži tudi SPE-DEX[®] sistem ekstrakcije na trdnem nosilcu, ki predstavlja skorajda v celoti avtomatiziran proces za ekstrakcijo vzorcev na vodni osnovi. Sistem tvorijo naprava za ekstrakcijo, oljna vakuumška črpalka, jeklenka z dušikom, eksplozijsko varne posode s toplili, vsebniki, v katere damo vzorec za analizo, vialo, v katerih zbiramo eluat, posode za odpad (sistem nam loči organske faze od vodnih) in programska oprema. Ekstrakcija analitov iz vzorca se lahko začne takoj, ko zaženemo ustrezen program za izvedbo želene ekstrakcije. Fazi prekondicioniranja sledi nanos vzorca na disk. Temu sledi sušenje diska in po končani fazi sušenja, spiranje diska z organskim topilom. Eluat zbiramo v vialah oziroma drugi primerni laboratorijski steklovini. Prednosti metode so avtomatiziranost procesa, vzorca nam ni potrebno filtrirati, samodejna ločitev organskih topil od vode po koncu procesa in posledično lažja odstranitev le-teh, možnost čiščenja sistema med nanosom posameznih vzorcev in nenazadnje tudi skrajšan čas, ki ga namenimo ekstrakciji. Kot slabost lahko omenimo sorazmerno velik volumen eluata (potrebno je dodatno koncentriranje) in hitro obrabo filtrov in diskov, predvsem takrat, ko imamo opravka z umazanimi vzorci (filter lahko zamenjamo po končani ekstrakciji določenega vzorca in namestimo nov filter, še preden začnemo z ekstrakcijo novega vzorca), kar je stroškovno obremenjujoče (25).

1.2.3. Mikroekstrakcija

Za mikroekstrakcijo je značilen minimalen volumen ekstrakcijske faze in običajno omejena količina analita, ki se veže na stacionarno fazo. Mikroekstrakcijo v grobem delimo na mikroekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPME, ang. *Solid-phase microextraction*) in na mikroekstrakcijo s tekočinsko fazo (LPME, ang. *Liquid-phase microextraction*).

SPME sistem ima obliko brizge. Ključni del predstavljajo vlakna iz kvarčnega stekla, na katera je nanesen primeren material stacionarne faze. Glede na položaj vlaken delimo SPME na direktno metodo mikroekstrakcije na trdnem nosilcu (DI-SPME, ang. *Direct-immersion solid-phase microextraction*), kjer so vlakna iz kvarčnega stekla potopljena v vzorec in mikroekstrakcijo na trdnem nosilcu s tehniko nadprostora (HS-SPME, ang. *Headspace solid-phase microextraction*), kjer se vlakna nahajajo nad gladino vzorca. Na izvedbo SPME vplivajo izbira ustreznega materiala za stacionarno fazo, temperatura in čas, pri katerih izvajamo mikroekstrakcijo. Med pomembnejše pozitivne značilnosti SPME sodijo visoka občutljivost metode, hitra in enostavna izvedba, zelo majhen volumen vzorca, odsotnost

topila in visoka možnost sklopitve z metodami, ki jih uporabljamo za analizo. Slabosti SPME metod so možnost zloma vlaken iz kvarčnega stekla, upogibanje igle, luščenje stacionarne faze in relativno ozek interval, v katerem je izvajanje metode priporočljivo ($T = 240^{\circ}\text{C} - 280^{\circ}\text{C}$).

Mikroekstrakcija s tekočinsko fazo (LPME, ang. *Liquid-phase microextraction*) predstavlja posodobljeno različico LLE. Bistvena izboljšava je bila narejena glede porabe topila, ki ga potrebujemo za ekstrakcijo (pri LPME rabimo za ekstrakcijo nekaj μL topila, medtem ko ga pri LLE rabimo bistveno več). Ekstrakcija temelji na porazdelitvi spojine med kapljicami organskega topila, ki se nahaja na konici igle in vodno raztopino vzorca. Prav tako kot SPME tudi LPME delimo na več podzvrsti, med katere sodijo enokapljična mikroekstrakcija (SDME, ang. *Single-drop microextraction*), disperzivna mikroekstrakcija tekoče-tekoče (DLLME, ang. *Dispersive liquid-liquid microextraction*) in mikroekstrakcija s tekočinsko fazo na osnovi votlega vlakna (HF-LPME, ang. *Hollow fiber based-liquid phase microextraction*). SDME ločimo na direktno enokapljično mikroekstrakcijo (DI-SDME, ang. *Direct-immersion single-drop microextraction*), kjer sta tekoči fazi v stiku, uporabno za vzorce, ki imajo bistveno boljšo topnost v organskem topilu kot v samem vzorcu in enokapljično mikroekstrakcijo s tehniko nadprostora (HS-SDME, ang. *Headspace single-drop microextraction*), pri kateri rabimo hlapljiv analit, ki se po izhlapevanju iz vzorca veže v organsko fazo (25, 26, 27).

DLLME sestoji iz naslednjih faz. Iskani analit se nahaja v vodni raztopini, ki ji dodamo organsko topilo skupaj z disperzijskim topilom. Po dodatku omenjenih topil dobimo motno raztopino, ki jo centrifugiramo. S tem dosežemo ločitev faz. Na dnu vsebnika dobimo želeni analit, ki gre v nadaljnjo analizo. Pri DLLME metodi moramo biti pozorni na ustrezno izbiro topila za ekstrakcijo, saj le-to mora imeti višjo gostoto kot voda, poleg tega mora biti iskani analit boljše topen v tem topilu kot v vodi. Glede disperzijskega topila, upoštevamo zmožnost mešanja tako z organsko kot z vodno fazo (29).

HF-LPME je metoda, pri kateri ekstrahiramo želeni analit iz vodnega vzorca preko membrane, ki predstavlja ločnico med vodnim vzorcem in akceptorsko raztopino, v katero želimo ekstrahirati želeni analit. Pri HF-LPME lahko gre za dvofazni ali trofazni sistem. Dvofazni sistem uporabimo, ko akceptorsko raztopino predstavlja organsko topilo. Membrana je v tem primeru običajno isto organsko topilo, kot je uporabljeno za akceptorsko topilo. Trofazni sistem pa uporabimo v primeru, ko želimo ekstrahirati analit iz ene vodne

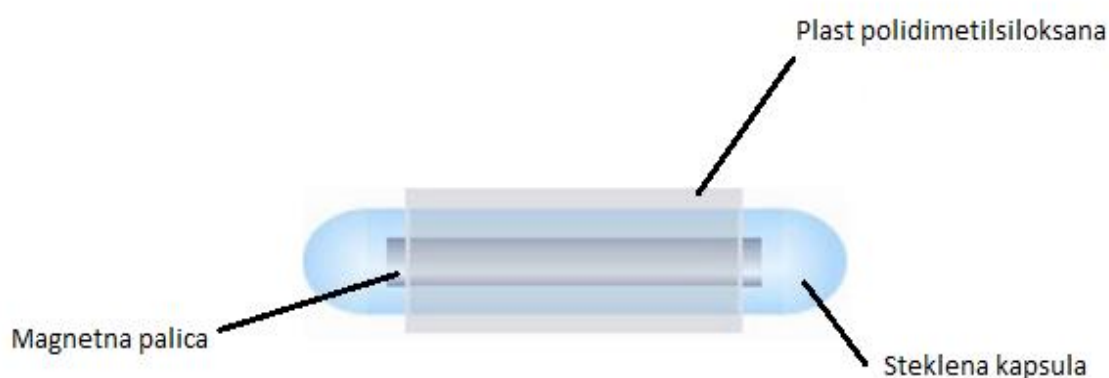
raztopine v drugo. Takrat ločnico med obema vodnima fazama predstavlja membrana, ki se ne meša z vodo.

1.2.4. Ekstrakcija na osnovi sorptivnega mehanizma s pomočjo Twister[®] mešalnih paličic

Ekstrakcijo na osnovi sorptivnega mehanizma s pomočjo Twister[®] mešalnih paličic (v nadaljevanju SBSE (ang. *solid-phase sorptive extraction*)) uporabljamo pretežno za ekstrakcijo učinkovin iz vodnih vzorcev. Učinkovine se običajno v teh vzorcih nahajajo v zelo nizkih koncentracijah. Govorimo o območju ng/L. Če predvidevamo, da se bodo v vzorcu nahajale snovi v visokih koncentracijah, je smiselno uporabiti redčenje vzorca pred izvedbo same ekstrakcije.

1.2.4.1. Twister[®] mešalne paličice

Twister[®] mešalne paličice (slika 2) so proizvod podjetja Gerstel GmbH (Müllheim, Nemčija) in so bile širši javnosti predstavljene leta 1999. Sestavljene so iz magnetne palice, ki se nahaja v stekleni kapsuli, obdani s plastjo polidimetilsiloksana. Funkcija steklene kapsule je v tem, da prepreči razpad polimerne plasti ob izvedbi faze desorpcije (30).



Slika 2: Twister[®] mešalna palica (povzeto po (31)).

Magnetne palice, ki so normalno v uporabi za izvedbo SBSE so velikosti od 10 do 20 mm, v nekaterih primerih pa so uporabili tudi palice, ki so bile velike do 8 cm. Iz literature je znan podatek, da so uporabljali tudi zgolj steklene kapsule obdane s plastjo polidimetilsiloksana (24). V tem primeru so izvajali ekstrakcijo tako, da so vzorce, v katerih

se je nahajala paličica, stresali. Debelina plasti polidimetilsiloksana se giblje od 0,5 mm do 1 mm. Polidimetilsiloksan predstavlja nepolarno fazo, ki je sposobna tvoriti hidrofobne interakcije z analiti. Mehanizem omenjenih interakcij poteka preko tvorbe van der Waalsovih vezi, možna pa je tudi tvorba vodikovih vezi med polidimetilsiloksanom in analiti. Pomembna je tudi termostabilnost PDMS, saj lahko zaradi te lastnosti izvajamo ekstrakcije v širokem temperaturnem intervalu.

1.2.4.2. Izvedba ekstrakcije in desorpcije

Metodo ekstrakcije SBSE lahko izvajamo podobno kot SPME, na dva načina. Pri prvem je mešalna paličica neposredno v stiku z vzorcem, pri drugem pa gre za t.i. metodo nadprostora, kjer se mešalna paličica ne nahaja v mediju. Pri metodi nadprostora se mešalna paličica nahaja na vrhu vsebnika in je v stiku s plinsko fazo vzorca. Prednost te metode pred metodo, pri kateri potopimo mešalno paličico v vzorec je ta, da nam pred fazo desorpcije ni treba spirati mešalne paličice z vodo, da bi se izognili vplivu komponent vzorca, ki bi lahko motile nadaljnjo analizo. Slabost metode nadprostora predstavljajo slabo hlapni oziroma nehlapni analiti. Kako dolgo bomo izvajali ekstrakcijo, je odvisno od volumna vzorca, hitrosti vrtenja in dimenzij mešalnih paličic. Po končani fazi ekstrakcije sledi desorpcija. Mešalno paličico odstranimo iz vsebnika in jo osušimo na čistem papirju, da odstranimo kapljice vode. Kot je bilo že omenjeno, mešalno paličico speremo z destilirano vodo, če smo izvajali ekstrakcijo, pri kateri je mešalna paličica potopljena v vzorec. Spiranje z vodo ne povzroči izgube analitov, saj so le-ti adsorbirani znotraj PDMS-a. Izvajamo lahko bodisi tekočinsko bodisi termalno desorpcijo. Kateri tip desorpcije bomo izvajali, je odvisno od jakosti interakcij, ki jih tvorijo analiti s stacionarno fazo. Termalno desorpcijo bomo uporabili v primeru tvorbe šibkih van der Waalsovih vezi med analiti in stacionarno fazo. V nasprotju s tem pa bomo tekočinsko desorpcijo uporabili, če so bile tvorjene močnejše vodikove vezi. Kljub temu, da nam termalna desorpcija omogoča dokaj enostavno sklopitev s plinsko kromatografijo, ima tekočinska desorpcija širši spekter in je zato pogosteje uporabljena. Prednosti tekočinske desorpcije so boljša primernost za termolabilne, nehlapljive in delno hlapne snovi v primerjavi s termalno desorpcijo. Pri tekočinski desorpciji problem predstavlja primerna izbira desorpcijskega topila, saj imamo običajno opravka z analiti, ki imajo zelo različne fizikalno-kemijske lastnosti in posledično desorpcija ne poteče v celoti. Pri tem si lahko

pomagamo z uporabo ultrazvoka ali stresalnika in s tem zagotovimo desorpcijo analitov (24, 30).

1.2.4.3. Teoretično ozadje

SBSE temelji na porazdeljevanju analitov med stacionarno fazo (običajno PDMS) in vzorcem. Kako se bodo analiti porazdelili med obe fazi, opišemo z uporabo porazdelitvenega koeficienta med fazo PDMS-a in vodnim vzorcem, ki predstavlja dober približek porazdelitvenemu koeficientu med oktanolom in vodo po vzpostavitvi ravnotežja. Porazdelitveni koeficient je definiran kot razmerje med koncentracijo analita v fazi PDMS-a in koncentracijo analita v vodni fazi (31).

$$K_{PDMS/v} \approx K_{o/v} = \frac{c_{PDMS}}{c_v} = \frac{m_{PDMS}}{m_v} \times \frac{V_v}{V_{PDMS}} \quad (\text{Enačba 1})$$

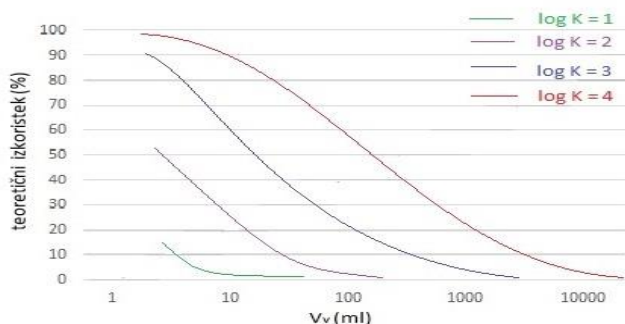
c_{PDMS} in c_v predstavljata koncentracijo analita v polimeru oz. v vodni fazi, m_{PDMS} in m_v maso analita v polimeru oz. v vodni fazi, V_{PDMS} in V_v pa volumna polimera oz. vodne faze. Za nepolarne analite velja, da je njihov $\log K_{o/v}$ večji ali enak 3, medtem je $\log K_{o/v}$ polarnih analitov manjši od omenjene vrednosti. Na porazdeljevanje vpliva tudi fazno razmerje, ki je podano kot razmerje med volumnom vodne faze in faze polidimetilsiloksana in ga označujemo z β .

$$\beta = \frac{V_v}{V_{PDMS}} \quad (\text{Enačba 2})$$

Ko poznamo β , lahko na podlagi enačbe izračunamo teoretični izkoristek (31).

$$\text{teoretični izkoristek} = \frac{\left(\frac{K_{o/v}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{o/v}}{\beta}\right)} \quad (\text{Enačba 7})$$

Izkoristki so višji v primerih, ko ekstrahiramo nepolarne analite in ko so vrednosti faznega razmerja nizke (slika 3).



Slika 3: Teoretični izkoristek glede na različne vrednosti log K (povzeto po (32)).

1.2.4.4. Prednosti in slabosti SBSE

Pred uporabo tehnike SBSE kot metode za ekstrakcijo, je smiselno poznati nekatere lastnosti analitov. Med najpomembnejše prav gotovo sodijo zmožnost adsorpcije analita na izbrano stacionarno fazo (običajno PDMS), hidrofobnost/hidrofilnost in druge fizikalno-kemijske lastnosti. Na podlagi zgoraj omenjenih lastnosti lahko sklepamo na določene prednosti in slabosti izbrane metode za ekstrakcijo (25).

Med glavne prednosti SBSE spadajo enostavnost izvedbe, nizka cena, hitra izvedba termalne desorpcije pri zmernih temperaturah, možnost večkratne uporabe mešalnih paličic (odvisno od narave vzorcev, ki jih analiziramo, ali spiramo mešalno paličico pred fazo desorpcije, v splošnem velja, da lahko opravimo tudi več kot 50 ekstraktij s posamezno mešalno paličico), možnost izvedbe na terenu (smiselno opraviti ekstrakcijo že na samem mestu odvzema vzorca, da preprečimo nastanek novih razgradnih produktov, povzročenim s strani mikroorganizmov) (24, 33).

Ena izmed bistvenih slabosti SBSE-a je težavna avtomatizacija. Čeprav poznamo komercialno dostopne sisteme, ki so sposobni sami kontrolirati določene faze procesa, je človek še vedno nujen, da opravi nekatere stopnje. Izpostaviti velja vstavitve in odstranitve mešalne paličice iz vzorca, spiranje in sušenje mešalne paličice. Ob vseh omenjenih procesih so lahko povzročene napake s strani človeka. Med slabosti, ki jih lahko omenimo, spada tudi pomanjkljiva dostopnost komercialno dostopnih stacionarnih faz. S tem je povezan interval spojin, ki jih sploh lahko ekstrahiramo z našo metodo ob predpostavki, da je naša stacionarna faza polidimetilsiloksan. Spojine, ki pridejo v poštev, imajo $\log K_{o/v} > 2$. Za vrednosti $\log K_{o/v}$, ki se gibljejo pod 2, je potrebna in-situ derivatizacija, dodatek soli ali pa uporaba druge stacionarne faze (33).

1.2.4.5. Uporaba metode SBSE v praksi

Glavno področje uporabe SBSE predstavljajo analiza okoljskih vzorcev, hrane in bioloških vzorcev. Okoljski vzorci in njihova analiza so ob uvedbi SBSE obsegali večji del uporabe te metode. Sčasoma je postala vse pomembnejša tudi analiza hrane in bioloških vzorcev (34). Aplikacija SBSE metode na okoljskih vzorcih obsega predvsem analize pesticidov, policikličnih aromatskih ogljikovodikov (PAHs) in hlapljivih organskih substanc v vodnih vzorcih. Večina predstavnikov omenjenih skupin spada med obstojna organska onesnažila

POP (ang., *Persistent organic pollutant*). Le-ti so bili določeni s Stockholmsko konvencijo. Cilj konvencije je zaščititi zdravje ljudi in okolje pred POP preko različnih ukrepov, ki obsegajo takojšnjo ukinitvev ali zmanjšanje izpostavljenosti teh snovi okolju in posledično tudi človeku (35).

Glede analize hrane na osnovi SBSE lahko razdelimo analizo na tri različne skupine. Te skupine obsegajo analizo sledi kontaminantov (pesticidi), analizo manjših sestavin (aditivi) in sledi snovi, ki povzročajo pokvarjenost živil (aldehidi, haloanizoli). Analize se izvaja predvsem v vinu, pivu, sadju in zelenjavi, sadnih sokovih, kisu, čaju in tobaku (36).

Analiza bioloških vzorcev predvsem obsega spremljanje obnašanja učinkovin v človekovem telesu (telesnih tekočinah), se pravi farmakokinetiko posamezne substance. Ostala področja analize bioloških vzorcev so usmerjena predvsem v klinično in forenzično toksikologijo ter ugotavljanje biološke uporabnosti substanc (37).

1.2.4.6. Trendi razvoja stacionarnih faz

Kot je bilo že omenjeno, se trenutno največkrat uporabljena polidimetilsiloksanska stacionarna faza ne obnese vedno najboljše. Prav zaradi tega so kmalu po uvedbi SBSE začeli iskati alternative, ki bi bile koristne tudi v primerih, ko je uporaba polidimetilsiloksana kot stacionarne faze neprimerna. Polidimetilsiloksan predstavlja nepolarno stacionarno fazo in je zato primeren za ekstrakcijo analitov, ki izkazujejo nizko polarnost. Večina polarnih snovi, ki so jih ekstrahirali s polidimetilsiloksanom, je imela nizek izkoristek ekstrakcije. Kot izjeme lahko omenimo estrogene in bisfenol A, pri katerih pa so izvedli in-situ derivatizacijo. Iz navedenega lahko sklepamo, da je razvoj stacionarnih faz šel v smer, kjer bi lahko ekstrakcije polarnih snovi opravljali z zadovoljivo visokim izkoristkom. Med razvojem SBSE so bile opisane stacionarne faze, katerih gradniki so bili iz monolitnih materialov, RAM (ang. *Restricted access materials*), MIP (ang. *Molecularly imprinted polymers*), poliuretanskih pen, materiali pripravljene z imerzijsko precipitacijsko tehniko, materiali pripravljene po načelu sol-gel in dvojno fazni materiali (38).

Vsak material ima svoje prednosti in slabosti. Prednost monolitnih materialov je v velikosti por, visoki stopnji permeabilnosti in velikemu izboru komercialno dostopnih monomerov z različno polarnostjo (39). RAM materiali so se izkazali kot uporabni predvsem v smislu manjšega vpliva ozadja na analizo komponent. Na njihovi površini so namreč vezane

funkcionalne skupine (dioli), ki onemogočajo večjim molekulam (predvsem proteinom) vstop v notranjost materiala (40). Posebnost MIP materialov tiči v tem, da so sposobni z neke vrste mimikrijo tvoriti podobna vezavna mesta kot jih izkazujejo normalno prisotni receptorji (38).

PDMS je kot nepolarna faza primeren večinoma za ekstrakcijo nepolarnih analitov in kot tak neprimeren za strukture, katere so polarne. Zgoraj omenjeni materiali predstavljajo možno alternativo PDMS-ju in so bili uporabljeni v različnih eksperimentih, ki so jih izvajali z namenom razvitja stacionarnih faz, s katerimi bi bilo možno izvajati ekstrakcije polarnih substanc.

1.3. Masna spektrometrija

Masna spektrometrija predstavlja zmogljivo in občutljivo metodo identifikacije snovi, ki temelji na osnovi molekulske mase le-teh. Izvajamo jo z napravo, ki ji rečemo masni spektrometer. Z masnim spektrometrom izvajamo analizo, pri kateri določamo maso in naboj ioniziranih molekul, ki se nahajajo v vzorcu. Omenjena naprava je sestavljena iz ionskega izvora, masnega analizatorja in detektorja.

Proces izvedbe analize se začne z vstavitvijo vzorca v ionizacijsko komoro, kjer pride do ionizacije molekul. Poznamo več vrst ionizacij, in sicer ionizacijo z elektroni (EI), kemijsko ionizacijo (CI), elektrorazprševalno ionizacijo (ESI), kemijsko ionizacijo pri atmosferskem tlaku (APCI) in ionizacijo v matriksu z lasersko desorpcijo (MALDI) (41). Najpogosteje se pri LC-MS/MS tehnikah za ionizacijo uporablja elektrorazprševalna ionizacija (ESI), ki poteka pri zračnem tlaku in sobni temperaturi. ESI predstavlja tehniko, ki je vsestransko uporabna, a ima tudi določene pomanjkljivosti (42). Opazimo lahko t.i. vpliv matrice (ang. *Matrix effect*) na ionizacijo spojin, ki jih želimo analizirati. Vpliv ozadja lahko bistveno vpliva na analizo preiskovanih snovi, zato želimo, da je čim manjši. Zmanjšamo ga lahko z uporabo internih standardov, ki so izotopsko označeni, redčenjem vzorca pred ekstrakcijo in samimi ekstrakcijskimi pogoji (42).

Nastali ioni se nato na masnem analizatorju ločijo glede na razmerje med maso in nabojem (m/z). Poznamo več vrst masnih analizatorjev, kot so enojni in trojni kvadrupolni masni analizator, analizator časa preleta (TOF) in analizator z ionsko pastjo (IT). V praksi je za kvantifikacijo največkrat uporabljen trojni kvadrupolni masni analizator (QQQ), saj

omogoča določevanje analitov, ki se nahajajo v vzorcih pri koncentracijah, ki so lahko nižje tudi od 1 ng/L. Bistvena prednost trojnega kvadrupolnega analizatorja pred enojnim je dodatna fragmentacija ionov, kar pomeni boljšo in nedvoumno določitev ionov. QQQ sestavljajo kovinske palice v obliki kvadrata, ki se nahajajo pod napetostjo (izmenična in enosmerna). Pri snemanju masnega spektra se ohranja razmerje med izmenično in enosmerno napetostjo, pri čemer povečujemo enosmerno napetost. Vzdolž kovinskih palic, ki predstavljajo gradnike QQQ, potujejo ioni do detektorja, ki zabeleži signale in posledično dobimo masni spekter (43).

2. Namen dela

Uporaba zdravilnih učinkovin v medicini in veterini narašča iz leta v leto. Zdravilne učinkovine se po zaužitju in procesu metabolizma izločijo in tako predstavljajo snovi, ki so prisotne v okolju. Še nekaj desetletij nazaj se človek ni zavedal, kakšen negativni vpliv ima lahko izpostavljenost učinkovinam, ki so v relativno nizkih koncentracijah prisotne bodisi v vodi, zraku, tleh oz. okolju, v katerem bivamo.

Cilj magistrske naloge je uporabiti predhodno razvito in ovrednoteno metodo sorptivne tehnike za ekstrakcijo ostankov zdravilnih učinkovin na realnih vzorcih odpadnih voda iz čistilnih naprav. Z omenjeno metodo bomo vzorčili vtoke in iztoke odpadnih vod iz več čistilnih naprav, ki se nahajajo v Sloveniji, predvidoma spomladi leta 2016. Preverili bomo še, kako vpliva različna velikost mešalnih paličic, ki jih uporabljamo za izvedbo sorptivne tehnike ekstrakcije na stopnjo vezave učinkovin. Z vzorčenjem vtoka in iztoka iz čistilnih naprav bomo spremljali odstranjevanje posamezne učinkovine in tako opredelili, katere izmed učinkovin se najboljše oz. najslabše odstranjujejo.

V naslednji fazi magistrske naloge bomo izkoristke, ki jih bomo dobili z uporabo sorptivne tehnike ekstrakcije primerjali z izkoristki dobljenimi s predhodno razvito in delno avtomatizirano tehniko SPE-DEX, ki deluje na principu ekstrakcije na trdnem nosilcu.

Preverili bomo tudi, kako posamezen tip čistilne naprave (tehnologija čiščenja, ki poteka v njej), vpliva na učinkovitost odstranjevanje zdravilnih učinkovin iz odpadne vode. Vključili bomo tudi demografske podatke, v kolikšni meri se prisotnost različnih zdravstvenih ustanov in industrije odraža na prisotnosti nekaterih učinkovin, ki so bile zaznane na čistilnih napravah.

Dobljene koncentracije posameznih učinkovin, ki se nahajajo v čistilnih napravah v Sloveniji, bomo primerjali s tistimi, ki so jih zaznali v Evropi.

Analize ekstraktov, ki jih bomo dobili s pomočjo sorptivne tehnike ekstrakcije in ekstrakcije na trdnem nosilcu, bomo analizirali z LC-MS/MS.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Standardi

- amitriptilinijev klorid, $C_{20}H_{23}N \times HCl$, $M = 313,9$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- atenolol, $C_{14}H_{22}N_2O_3$, $M = 266,3$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- azitromicin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, $M = 749,0$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- bezafibrat, $C_{19}H_{20}ClNO_4$, $M = 361,8$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- bromazepam, $C_{14}H_{10}BrN_3O$, $M = 316,2$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- desipraminijev klorid, $C_{18}H_{22}N_2 \times HCl$, $M = 302,8$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- diazepam, $C_{16}H_{13}ClN_2O$, $M = 284,7$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- diklofenak natrijeva sol, $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2 \times Na$, $M = 318,1$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- donepezilijev klorid monohidrat, $C_{24}H_{29}NO_3 \times HCl \times H_2O$, $M = 434,0$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- escitalopram oksalatna sol, $C_{20}H_{21}FN_2O \times C_2H_2O_4$, $M = 414,4$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- feksofenadinijev klorid, $C_{32}H_{39}NO_4 \times HCl$, $M = 538,1$ g/mol (Sequoia Research products, Pangbourne, Velika Britanija)
- fluoksetinijev klorid, $C_{17}H_{18}F_3NO \times HCl$, $M = 345,8$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- glibenklamid, $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$, $M = 494,0$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- haloperidol, $C_{21}H_{23}ClFNO_2$, $M = 375,9$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- imatinib mesilat, $C_{29}H_{31}N_7O \times CH_4O_3S$, $M = 589,7$ g/mol (Sequoia Research products, Velika Britanija)
- irbesartan, $C_{25}H_{28}N_6O$, $M = 428,5$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

- kalcijev atorvastatinat ($C_{33}H_{34}FN_2O_5$)₂ × Ca, M = 1155,3 g/mol (Sequoia Research products, Pangbourne, Velika Britanija)
- kalcijev rosuvastatinat, ($C_{22}H_{27}FN_3O_6S$)₂ × Ca, M = 1001,1 g/mol (Sequoia Research products, Pangbourne, Velika Britanija)
- karbamazepin, $C_{15}H_{12}N_2O$, M = 236,3 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- klomipraminijev klorid, $C_{19}H_{23}ClN_2$ × HCl, M = 351,3 g/mol (Sigma-Aldrich Nemčija)
- klonazepam, $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$, M = 315,7 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- loperamidijev klorid, $C_{29}H_{33}ClN_2O_2$ × HCl, M = 513,5 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- loratadin, $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, M = 382,9 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- metoprololijev tartrat, $C_{30}H_{50}N_2O_6$ × $C_4H_6O_6$, M = 684,8 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- oksazepam, $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$, M = 286,7 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, M = 252,3 g/mol (Sequoia Research products, Pangbourne, Velika Britanija)
- paracetamol, $C_8H_9NO_2$, M = 151,2 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- prometazinijev klorid, $C_{17}H_{20}N_2S$ × HCl, M = 320,9 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- propranololijev klorid, $C_{16}H_{21}NO_2$ × HCl, M = 295,8 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- raloksifenijev klorid, $C_{28}H_{27}NO_4S$ × HCl, M = 510,0 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- risperidon, $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, M = 410,5 g/mol (Sequoia Research products, Pangbourne, Velika Britanija)
- selegiliniijev klorid, $C_{13}H_{17}N$ × HCl, M = 223,7 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- sertraliniijev klorid, $C_{17}H_{17}Cl_2N$ × HCl, M = 342,7 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- tramadolijev klorid, $C_{16}H_{25}NO_2$ × HCl, M = 299,8 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- triklosan, $C_{12}H_7Cl_3O_2$, M = 289,5 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

- trimetoprim, $C_{14}H_{18}N_4O_3$, $M = 290,3$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- valsartan, $C_{24}H_{29}N_5O_3$, $M = 435,5$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- venlafaksinijev klorid, $C_{17}H_{27}NO_2 \times HCl$, $M = 313,9$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- verapamilijev klorid, $C_{27}H_{38}N_2O_4 \times HCl$, $M = 491,1$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- ziprasidonijev klorid monohidrat, $C_{21}H_{21}ClN_4OS \times HCl \times H_2O$, $M = 467,4$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

Preostali standardi, ki so bili uporabljeni pri metodi SPE-DEX:

- acetazolamid, acetilsalicilna kislina, alprazolam, amantadinijev klorid, amiloridijev klorid, amoksisilin, ampicilin, antipirin, bisoprolol fumarat, bumetanid, cimetidin, enalapril maleat, enalaprilat, fenitoin, fenoterolijev bromid, finasterid, formoterol fumarat, furosemid, gabapentin, gemfibrozil, glipizid, griseofulvin, hidroklorotiazid, indapamid, kaptopril, karvedilol, ketokonazol, ketoprofen, klofibrinska kislina, klonidin, klorheksidin, klorotiazid, kofein, kumarin, kvetiapin hemifumarat, lansoprazol, levamisolijev klorid, lorazepam, metforminijev klorid, metoklopramidijev klorid, nalidiksna kislina, naproksen, nifedipin, norfloksacin, ofloksacin, olanzapin, omeprazol, pantoprazol natrijeva sol, pravastatin natrijeva sol, pirimidon, probenacid, propifenazon, ranitidinijev klorid, rifampicin, salbutamol hemisulfat, salicilna kislina, salmeterol ksinofoat, simvastatin, tamoksifen citrat, teofilin, topiromat, toremifen citrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), amlodipin maleat, etopozid, lakozamid, lamotrigin, levetiracetam, likarbazepin, lizinopril, ramipiril, sildenafil citrat, sumatriptan sukcinat (Sequoia Research products, Pangbourne, Velika Britanija), ciprofloksacin (AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemčija)

3.1.2. Interni standard

- fluoksetinijev-d₅ klorid, $C_{17}D_5H_{13}F_3NO \times HCl$, $M = 350,82$ g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)

3.1.3. Reagenti in topila

- 2–propanol ((CH₃)₂CHOH), M = 60,10 g/mol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- aceton (C₃H₆O), M = 58,08 g/mol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- acetonitril (CH₃CN), M = 41,05 g/mol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- destilirana voda
- diklorometan (CH₂Cl₂), M = 84,93 g/mol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- etanol (C₂H₅OH), 96 %, M = 46,07 g/mol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- kalijev dihidrogen fosfat (KH₂PO₄), ≥ 99,5 %, M = 74,55 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- klorovodikova kislina (HCl), M = 36,46 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- metanol (CH₃OH), ≥ 99,9 %, M = 32,04 g/mol (Sigma Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- mravljična kislina (HCOOH), 98 – 100 %, M = 46,03 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- natrijev hidroksid (NaOH 1 M), M = 40,00 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- ultračista voda Milli-Q, pridelana z Milli-Q Advantage A10 (Millipore Corporation, Billerica, ZDA)

3.1.4. Vzorci odpadne vode

Za potrebe spremljanja koncentracij učinkovin v odpadnih vodah je bilo uporabljenih 17 vzorcev iz čistilnih naprav, ki so bili zajeti spomladi leta 2016. 5 vzorcev je predstavljalo vtok v čistilne naprave, ostalih 12 pa je bilo vzorcev, odvzetih na iztoku iz čistilne naprave. Vsi vzorci z izjemo dveh vzorcev čistilne naprave B (trenutni zajem) so bili časovno proporcionalni kompozitne vzorci, kar pomeni, da predstavljajo 24-urni zajem.

3.1.5. Naprave in pribor

- analitska tehnica Excellence[®] plus (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)

- avtomatske pipete 2-2 μL , 20–200 μL , 100–100 μL , 1-10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Nemčija)
- centrifugirke TPP (TPP, Techno Plastic, Products AG, Trasadingen, Švica)
- epice – plastične 2-mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- filter \varnothing 70 mm, 5891 (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Nemčija)
- hladilnik z zamrzovalnikom (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Škoflja Loka, Slovenija)
- LC-MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)
- magnetno mešalo – plošča z možnostjo segrevanja RT 10 power (Ika Werke, Staufen im Breisgau, Nemčija)
- nastavki za pipete (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- pH lističi 0–14 (Merck KGaA, Darmstadt, Nemčija)
- pH meter MA 5750 (Iskra, Ljubljana, Slovenija)
- polavtomatske pipete: 2–20 μL , 20–200 μL , 100–1000 μL , 1–10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- sistem za filtriranje (Sartorius, Göttingen, Nemčija)
- sistem za pripravo MilliQ vode Advantage® A10 (Millipore Corporation, Billerica, ZDA)
- steklovina: namenske vialne za Twister® magnetne paličice, merilne bučke, zamaški, polnilne pipete, čaše, merilni valji, čolnički za tehtanje, steklene palčke, vialne, vložki za vialne
- stresalnik Vibromix® 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- TurboVap LV® (Caliper, Hopkinton, ZDA)
- Twister® mešalne paličice s polimerom polidimetilsiloksan 10mm \times 1mm (Gerstel GmbH & Co. KG, Nemčija)
- tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)
- ultrazvočna kadička Sonis® 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- ostalo: spatule, plastične pipete, vzmeti za steklene vložke, zamaški za vialne, magneti, škarje, parafilm, magnetna palčka, pinceta, zaščitne rokavice

Sistem za Horizon Technology SPE-DEX®:

- programska oprema Envision™ platform Controller software
- oljna vakuumska črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
- industrijski plin N₂
- diski (Atlantic® HLB SPE Disk, Horizon Technology inc., New Hampshire, ZDA)
- filtri (Atlantic® Fast Flow Sediment Pre-Filters, 1 µm in 5 µm, Horizon Technology inc., New Hampshire, ZDA)
- stekleni vsebnik 1000 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)
- viala za eluat 20 mL (Thermo Fisher Scientific, Waltham, ZDA)
- posode za odpad

3.1.6. Priprava standardnih raztopin

3.1.6.1. Primarne osnovne raztopine analitov

Osnovno raztopino za posamezen analit s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili z raztapljanjem 5 mg standarda posamezne učinkovine v metanolu. Raztopine smo shranjevali pri temperaturi -20 °C.

3.1.6.2. Sekundarne osnovne raztopine

Sekundarno osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/L smo pripravili tako, da smo 1000-krat redčili primarne osnovne raztopine analitov s koncentracijo 1 mg/mL.

Za posamezno tehniko ekstrakcije smo pripravili dve osnovni raztopini:

- Sekundarna osnovna raztopina 1 (SR 1): Iz osnovnih raztopin posameznega analita smo odpipetirali določen volumen in pripravili osnovno raztopino v metanolu, kjer je prisotnih vseh 40 analitov s končno koncentracijo 1 mg/L. Dobljeno raztopino smo prav tako shranjevali pri temperaturi -20 °C (SBSE metoda).
- Sekundarna osnovna raztopina 2 (SR 2): Iz osnovnih raztopin posameznega analita smo odpipetirali določen volumen in pripravili osnovno raztopino v metanolu, kjer je prisotnih vseh 111 analitov s končno koncentracijo 1 mg/l. Raztopino smo shranjevali pri temperaturi -20 °C (SPE-DEX metoda).

3.1.6.3. Priprava delovne raztopine

Pripravili smo dve delovni raztopini:

- Delovna raztopina 1 (DR 1): Sekundarno osnovno raztopino 1 (SR 1) s koncentracijo 1 mg/L v metanolu, ki je vsebovala vseh 40 analitov smo 10-krat redčili z Milli-Q vodo in dobili delovno raztopino 1 (DR 1) s koncentracijo 100 µg/L. Zaradi mogoče nestabilnosti analitov smo delovno raztopino morali pripraviti vsak dan ponovno (SBSE metoda).
- Delovna raztopina 2 (DR 2): Delovno raztopino 2 (DR 2) s koncentracijo 500 µg/L smo pripravili tako, da smo odpipetirali 5 mL SOR 2, jo prenesli v 10 mL merilno bučko in dopolnili do oznake z Milli-Q vodo (SPE-DEX metoda).

3.1.6.4. Priprava raztopine internega standarda

Raztopino internega standarda smo pripravili tako, da smo v 5-mililitrsko bučko natehtali 5 mg devteriranega fluoksetinijevega klorida in ga raztopili v metanolu. Dobljeno raztopino (koncentracija raztopine 1 mg/mL) smo redčili z MeOH tako, da smo dobili raztopino internega standarda s koncentracijo 100 µg/L.

3.1.7. Priprava 50 mM fosfatnega pufra: pH 7 in pH 9

1000 mL 50 mM pufra smo pripravili tako, da smo zatehtali 6,80 g KH_2PO_4 . Natehto smo prenesli v merilno bučko, dolili približno 900 mL Milli-Q vode in dali na ultrazvočno kadičko. S tem smo zagotovili, da se je ves KH_2PO_4 raztopil. S predhodno umerjenim pH metrom smo pomerili pH raztopine in ga naravnali z dodatkom 1 M NaOH ali na vrednost 7 ali 9. Na koncu smo z Milli-Q vodo dopolnili manjkajoči volumen do oznake.

3.1.8. Priprava topil

- ACN:MeOH (50/50, v/v): z merilnim valjem smo odmerili 50 mL ACN in 50 mL MeOH in ju premešali v 100-mililitrski bučki

- 2-odstotno mravljično kislino (HCOOH) v ACN:MeOH (50/50, v/v) smo pripravili tako, da smo 0,5 mL mravljične kisline prenesli v 25-mililitrsko bučko in dopolnili do oznake z ACN:MeOH (50/50, v/v)
- 2-odstotno mravljično kislino (HCOOH) v DCM:MeOH (50/50, v/v) smo pripravili tako, da smo 0,5 mL mravljične kisline prenesli v 25-mililitrsko bučko in dopolnili do oznake z DCM:MeOH (50/50, v/v)
- ACN:MeOH:2-PrOH (50/25/25, v/v/v) smo pripravili tako, da smo z merilnim valjem odmerili ustrezen volumen vsakega izmed topil ter ga prenesli v 1000-mililitrsko bučko
- ACN:MeOH:H₂O (45:45:10, v/v/v) smo pripravili tako, da smo z merilnim valjem odmerili ustrezen volumen vsakega izmed topil ter ga prenesli v 1000-mililitrsko bučko
- 0,1 M NaOH smo pripravili tako, da smo 1 mL 1 M NaOH odpipetirali v 10-mililitrsko bučko in dopolnili do oznake.

3.2. Metode

3.2.1. Uporaba metod na realnih vzorcih

3.2.1.1. Metoda SBSE

Predhodno razvito sorptivno tehniko za ekstrakcijo ostankov zdravilnih učinkovin smo uporabili za določitev koncentracij učinkovin v odpadnih vodah in za spremljanje učinkovitosti njihovega odstranjevanja v čistilnih napravah (44).

Vzorci, ki smo jih odvzeli v čistilnih napravah, smo shranjevali v plastičnih vsebnikih. Plastične vsebnike smo pred samim odvzemom sprali z etanolom, destilirano vodo in ob zajetju z odpadno vodo iz čistilne naprave. Vsebnike z vzorci smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C. Analizo posameznega vzorca smo izvedli najkasneje v 24 urah po odvzemu vzorca v čistilni napravi. Posamezen vzorec smo pred pričetkom ekstrakcije zaradi prisotnih nečistoč prefiltrirali skozi celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45 µm. Sledila je uravnavanje pH-ja na vrednost 9 s pomočjo 0,1 M NaOH. Uravnava pH-ja smo spremljali s pH lističi. Nato smo si pripravili po 50 mL vzorca za dve ponovitvi in dodali standardni dodatek. Iz pripravljenega vzorca smo odpipetirali za posamezno ponovitev po 20 mL vzorca in v vsak stekleni vsebnik dodali po 100 µL internega standarda (priprava je opisana v poglavju

3.1.6.4.). Še pred tem smo s t.i. fazo prekondicioniranja (2 mL MeOH v posameznem steklenem vsebniku, vrtenje 990 rpm, 30 minut) Twister® mešalne paličice pripravili na nadaljnjo predpripravo vzorcev. V vsakega od desetih steklenih vsebnikov z vzorci smo dodali Twister® mešalne paličice. Zatem smo vzorce dali na magnetno mešalo – ploščo in segreto na 50 °C in pustili vrteti na 990 rpm za 150 minut. Po pretečenem času smo steklene vsebnike vzeli iz magnetnega mešala – plošče ter odstranili mešalne paličice in jih osušili na suhem in čistem papirju (Preglednica 1).

Preglednica 1: Dodatki internega standarda in standardnega dodatka.

<i>Vzorec</i>	<i>Interni standard (μL)</i>	<i>Standardni dodatek (ng/L)</i>
1 in 2	100	0
3 in 4	100	20
5 in 6	100	50
7 in 8	100	100
9 in 10	100	200

Sledila je faza desorpcije. Zopet smo si pripravili deset steklenih vsebnikov, v katere smo dali desorpcijsko topilo (ACN:MeOH 50/50, v/v). V vsebnike smo dali tudi Twister® mešalne paličice. Desorpcijo smo izvajali 15 minut pri temperaturi 50 °C in hitrosti vrtenja 990 rpm. Omenjeni parametri so se v času optimizacije metode izkazali za najoptimalnejše. Po 15 minutah smo steklene vsebnike vzeli z magnetnega mešala – plošče in odstranili mešalne paličice.

Po končani fazi desorpcije je sledila t.i. faza vzorčenja. 100 μL vzorca iz posameznega steklenega vsebnika smo prenesli v vialo z inserti, pripravljene za analizo z masnim spektrometrom. 1700 μL vzorca iz posameznega vsebnika pa smo prenesli v epruveto, ki smo jih dali v sušilnik TurboVap LV® (Caliper, Hopkinton, ZDA) in posušili do suhega preostanka. Nato smo v vsako od omenjenih epruvet dodali 170 μL 2-odstotne mravljične kisline (HCOOH) v ACN:MeOH (50/50, v/v) (10x koncentriranje). Epruvete smo nato 2 minuti mešali z vrtnčenjem. S tem smo zagotovili, da se je suhi preostanek prav gotovo raztopil. Iz posamezne epruvete smo zatem odpipetirali po 100 μL vzorca v vialo in jih dali na analizo na LC-MS/MS.

3.2.1.2. Metoda SPE-DEX

Ves čas dela smo uporabljali predhodno optimizirano metodo, razvito na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. SPE-DEX

metoda predstavlja delno avtomatiziran proces, saj pri večini faz operater sodeluje zgolj posredno. Avtomatizirane faze so aktivacija diska za SPE, nanos, sušenje in izpiranje vzorca. Vzorcju odpadne vode (250 mL) smo dodali 250 mL 50 mM fosfatnega puфра s pH 7 in premešali. Proces smo izvajali v treh paralelnih ponovitvah. Vzorca so bili ekstrahirani z delno avtomatiziranim sistemom SPE-DEX (Horizon Technology ZDA). Sistem uporablja programsko opremo Envision™ platform Controller software, ki zaobsega več ciklov, katerim je izpostavljen vzorec ob ekstrakciji (preglednica 2).

Preglednica 2: Metoda ekstrakcije s tehnologijo SPE-DEX.

	topilo	čas namakanja (s)	čas sušenja (s)
predpriprava diska za SPE	MeOH	15	0
	MeOH	15	15
	Milli-Q voda	15	15
	Milli-Q voda	10	10
nanos vzorca			
sušenje		210	
spiranje	ACN:MeOH:2-PrOH (50:25:25, v/v/v)	180	60

Eluat smo po končanem procesu SPE-DEX prenesli v 25-mililitrsko merilno bučko in do oznake dopolnili z elucijskim topilom (ACN:MeOH:2-PrOH 50/25/25, v/v). 2 mL eluata smo v treh paralelkah prenesli v epruvete in jih dali sušit v TurboVap LV® (Caliper, ZDA). Po končanem sušenju smo suhi preostanek rekonstituirali z 200 µL 2-odstotne mravljične kisline (HCOOH) v ACN:MeOH (50/50, v/v). Naslednji fazi sta obsegali mešanje z vrtinčenjem (2 minuti za posamezno epruveto) in raztapljanje suhega preostanka s pomočjo ultrazvoka (15 min). Ko smo zagotovili, da se nam je trdni preostanek po sušenju v celoti raztopil, smo vzorce prenesli v vialo in jih dali na analizo na LC-MS/MS. Pri računanju koncentracij posameznih vzorcev smo si pomagali z uporabo metode standardnega dodatka. V ta namen smo pripravili vzorce standardne raztopine s koncentracijami 2, 5, 10 in 20 µg/L.

3.2.1.3. Metoda internega standarda

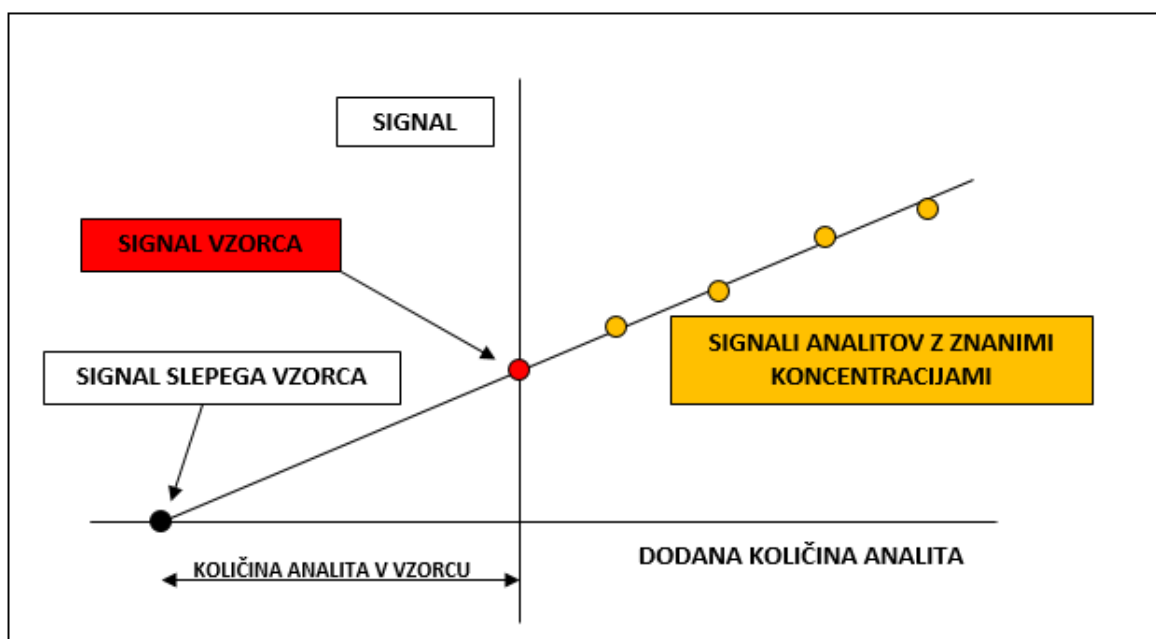
Interni standard predstavlja substanco, ki mora imeti podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot analiti, ni prisoten v prvotnem vzorcju, ne reagira z ostalimi substancami, ki so prisotne v vzorcju in ima različen retencijski čas kot iskani analiti. Pomembno je tudi, da se nahaja v

koncentracijah, ki se gibljejo v območju med 30 % in 50 % maksimalne koncentracije analita v vzorcu. Vsi omenjeni parametri vplivajo na uspešnost analize (45, 46).

Ob predpostavki, da smo izbrali ustrezen interni standard, lahko zanemarimo morebitne manjše nenamerne izgube, ki so nastale med samo pripravo vzorca. Te so običajno povezane z opremo, ki smo jo uporabljali v predpripravi vzorca. Z dodatkom internega standarda zmanjšamo tudi vpliv drugih prisotnih snovi, ki jih ne želimo analizirati in bi lahko motile našo analizo (47). V naših analizah smo kot interni standard uporabili devteriran fluoksetinijev klorid. Pri metodi SBSE smo ga k posameznemu vzorcu dodali 100 μL , medtem pa smo pri metodi SPE-DEX za posamezen vzorec porabili 30 μL internega standarda.

3.2.1.4. Metoda standardnega dodatka

V kakšnih koncentracijah se nahaja posamezna zdravilna učinkovina v vzorcu smo izračunali z metodo standardnega dodatka.



Slika 4: Metoda standardnega dodatka.

Pri omenjeni metodi se vzorci razlikujejo le v količini dodanega standardnega dodatka. Z uporabo analizne metode smo pomerili odzive analitov v raztopinah in jih grafično prikazali. Enačbo umeritvene premice lahko zapišemo kot $y = kx + n$. Vrednosti na osi x predstavljajo

koncentracijo posameznega analita v vzorcu, točke na osi y predstavljajo odziv analita, ki ga daje analizna metoda, n predstavlja presečišče z osjo y in k naklon premice (48). Premico smo ekstrapolirali do točke kjer le-ta seka os x, se pravi y na tej točki zavzema vrednost 0.

$$x \text{ (koncentracija)} = - \frac{n \text{ (presečišče z osjo Y)}}{k \text{ (naklon premice)}} \quad (\text{Enačba 3})$$

Metoda SBSE: Pri tej metodi smo si pripravili 10 vzorcev (5 različnih, saj smo delali v dveh paralelkah). Vsi vzorci so bili istih volumnov (glej preglednico 1), a so vsebovali različne volumne in posledično koncentracije standardnega dodatka. Razen vzorca 1 in 2 se je v vseh nahajal določen volumen standardnega dodatka, tako da smo po opravljenih meritvah z analizno metodo prišli z izračunom do dejanske koncentracije analita, ki se nahaja v preiskovanem vzorcu.

Metoda SPE-DEX: Ponovno smo delali z enakimi volumni preiskovanega vzorca. Delovno raztopino 2 (DR 2, glej poglavje 3.1.6.3.) ali standardno osnovno raztopino 2 (SR 2) znanih volumnov smo dodali k vzorcem, tako da smo po opravljeni analizi lahko izračunali dejanske koncentracije analitov, ki so bile prisotne v našem vzorcu.

3.2.2. Analiza vzorcev z masnim spektrometrom

Vzorci, ki so bili pripravljene z metodama SBSE in SPE-DEX so bili analizirani z visokoločljivostno tekočinsko kromatografijo (1290 Infinity LC, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA), sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom vrste trojni kvadrupol (Agilent 6460 QQQ, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA). Reverzno fazna kolona Poroshell EC-C18 (100 × 3,0 mm, 2,7 μm, Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA) je bila termostatorirana na temperaturo 50 °C. Na reverzno fazno kolono smo injicirali 1 μL vzorca. Posamezni vzorec je bil analiziran 8,2 minute. Igla uporabljena za injiciranje je po posameznem injiciranju vzorca bila sprana z MeOH:H₂O (80:20, v/v). Uporabljali smo gradientno elucijo, pri kateri je bila mobilna faza sestavljena iz topila A (0,1 % HCOOH v vodi) in topila B (ACN). Spreminjanje pretoka in sestava mobilne faze v različnih časovnih točkah je prikazano v preglednici 3.

Preglednica 3: Spreminjanje pretoka in deleža topila med gradientno elucijo.

čas (min)	uporabljen pretok (mL/min)	topilo A (%)
0,5	0,50	85
1,0	0,65	85
2,0	0,65	67
3,0	0,65	65
4,8	0,65	60
5,1	0,65	50
5,3	0,65	30
6,5	0,65	5
6,7	0,65	5
6,9	0,65	92
8,2	0,50	92

Kot ionski izvor je bil uporabljen Agilent Jet Stream® ESI, v katerem poteka ionizacija analitov (preglednica 4). Po končani ionizaciji, nastali ioni potujejo do kvadrupolnega masnega analizatorja, kjer poteka ločevanje.

Preglednica 4: Nastavitve ionskega izvora.

temperatura sušilnega plina	275 °C
pretok plina	5 L/min
nebulizator	45 psi (3,1 bar)
temperatura plašča	320 °C
pretok plina v plašču	11 L/min
napetost na kapilari	4000 V
napetost na šobi	1000 V

Kot metoda za kvantifikacijo je bila uporabljena multirezidualna analiza (MRM). Masni prehod, kolizijska energija, napetost fragmentorja, polariteta in retencijski čas posameznega analita uporabljenega pri metodi SBSE so podani v preglednici 5.

Preglednica 5: MRM prehodi, kolizijske energije, napetosti fragmentorja, polariteta in retencijski časi analitov uporabljenih pri metodi SBSE.

analit	MRM (m/z)	kolizijska energija (eV)	napetost fragmentorja (V)	polariteta	retencijski čas (min)
amitriptilin	278,2–91,0	24	103	+	4,43
atenolol	267,2–145,0	24	96	+	1,35
atorvastatin	559,3–440,2	17	180	+	6,32
azitromicin	749,5–83,0	69	200	+	2,63
bezafibrat	362,1–138,9	25	121	+	6,00
bromazepam	316,0–182,0	40	160	+	3,56
desipramin	267,2–72,1	12	98	+	4,02
diazepam	285,1–193,0	32	159	+	6,14
diklofenak	296,0–214,0	15	55	+	6,38
donepezil	380,2–65,0	97	86	+	3,11
escitalopram	325,2–109,0	29	81	+	3,40
feksofenadin	502,3–466,2	28	195	+	4,35
fluoksetin	310,1–148,1	1	100	+	4,76
glibenklamid	494,2–169,0	36	116	+	6,37
haloperidol	376,2–165,0	21	126	+	3,66
imatinib	494,3–395,2	25	200	+	2,80
irbesartan	429,2–207,1	21	121	+	5,29
karbamazepin	237,1–193,9	12	103	+	4,13
klomipramin	315,2–86,1	16	106	+	5,15
klonazepam	316,1–270,1	21	121	+	4,81
loperamid	477,2–266,1	24	159	+	5,84
loratadin	383,2–337,1	21	121	+	5,96
metoprolol	268,2–116,0	12	96	+	2,58
oksazepam	287,1–241,0	20	126	+	4,56
okskarbazepin	253,1–180,1	17	78	+	3,38
paracetamol	152,1–110,0	12	88	+	1,53
prometazin	285,1–86,1	12	55	+	3,74
propranolol	260,2–56,1	25	126	+	3,11
raloksifen	474,2–112,0	32	200	+	3,28
risperidon	411,2–191,1	28	159	+	2,88
rosuvastatin	482,2–258,5	35	184	+	5,68
selegilin	188,1–91,0	21	81	+	2,43
sertralin	306,1–158,9	24	60	+	4,89
tramadol	264,2–58,1	17	81	+	2,58
triklosan	286,9–35,1	4	60	+	6,80
trimetoprim	219,2–230,0	20	164	+	2,09
valsartan	436,2–207,1	25	81	+	6,12
venlafaksin	278,2–58,1	17	81	+	2,91
verapamil	455,3–150,1	41	184	+	4,39
ziprasidon	413,1–194,0	25	161	+	3,15

3.2.3. Učinkovitost odstranjevanja analitov

Zanimalo nas je, v kolikšni meri se je koncentracija posameznega analita zmanjšala ob prehodu odpadne vode skozi čistilno napravo. Z učinkovitostjo odstranjevanja (t.i. ang. *removal efficiency*) analitov podamo oceno, kako uspešna je posamezna čistilna naprava v procesu čiščenja odpadne vode (49). Učinkovitost odstranjevanja analitov smo primerjali na petih različnih čistilnih napravah, ki se nahajajo v Sloveniji. Kako uspešna je določena naprava, smo izračunali z enačbo 6.

$$\text{učinkovitost odstranjevanja (\%)} = \frac{C(\text{vtok}) - C(\text{iztok})}{C(\text{vtok})} * 100 \quad (\text{Enačba 6})$$

c (vtok) predstavlja koncentracijo analita na vtoku v čistilno napravo, medtem ko c (iztok) predstavlja koncentracijo analita po prehodu odpadne vode skozi čistilno napravo, se pravi na iztoku iz čistilne naprave.

3.2.4. Vpliv različnih dimenzij Twister[®] mešalnih paličic na delež vezave posameznega analita

Preverjali smo vpliv velikosti Twister[®] mešalne paličice in debeline njene obloge na delež vezave. Kot referenco smo uporabili Twister[®] mešalno paličico velikosti 10 mm in z debelino obloge PDMS 1 mm. Omenjena dimenzija mešalne paličice je bila vedno uporabljena za proces ekstrakcije med izdelavo magistrske naloge. Želeli smo preveriti ali je omenjena dimenzija res najprimernejša za izvedbo ekstrakcije ali pa bi bilo smiselno uporabiti mešalne paličice drugih dimenzij. V preglednici 6 se nahajajo informacije o zasnovi eksperimenta.

Preglednica 6: Priprava vzorcev za ugotavljanje vpliva različnih dimenzij Twister[®] mešalnih paličic na delež vezave analita.

vzorec	dimenzije mešalne paličice	volumen vzorca (mL)	standardni dodatek (ng/L)	interni standard (μL)
1 in 2	10 mm × 1 mm	20	70	100
3 in 4	10 mm × 0,5 mm	20	70	100
5 in 6	20 mm × 1 mm	20	70	100
7 in 8	20 mm × 0,5 mm	20	70	100

3.2.5. Vrednotenje SBSE

3.2.5.1. Izkoristek metode

Izkoristek metode je bil izračunan na podlagi enačbe 5. Odzive analitov, ki so prisotni v vzorcu, smo primerjali glede na standardno raztopino pri koncentracijah 70 ng/L in 140 ng/L. Izkoristek predstavlja razmerje med deležem analita v topilu za desorpcijo glede na delež analita, ki je prisoten v raztopini standarda. Deleže pri računanju opredelimo z odzivi, ki jih daje analizna metoda.

$$\text{izkoristek (\%)} = \frac{\text{odziv analita v vzorcu}}{\text{odziv analita v raztopini standarda}} * 100 \quad (\text{Enačba 5})$$

3.2.5.2. Ponovljivost metode

Na vzorcih, ki smo jih ekstrahirali, smo proučevali ponovljivost pri dveh različnih koncentracijah. Pripravili smo si pet ponovitev (koncentracija standardnega dodatka je znašala 70 ng/L in 140 ng/L), kjer smo določali RSD-vrednosti pri posameznem analitu. Uporabljena je bila metoda, opisana v poglavju 3.2.1.1. Preko izračuna relativne standardne deviacije smo ugotavljali, kako dobro je uporabljena metoda ponovljiva. Relativno standardno deviacijo smo izračunali po enačbi 4.

$$\text{relativna standardna deviacija (\%)} = \frac{\text{standardna deviacija}}{\text{povprečna vrednost}} * 100 \quad (\text{Enačba 4})$$

4. Rezultati in razprava

Poglavitni cilj magistrske naloge je bil preveriti uporabnost novo razvite metode priprave vzorcev s tehnologijo SBSE na realnih vzorcih odpadnih vod. V skladu s tem je bila večina dela opravljenega z metodo SBSE. Metodo SPE-DEX smo uporabili zgolj kot referenčno metodo za primerjavo rezultatov (44).

4.1. Izbrani analiti

Na podlagi ugotovitev, do katerih so prišli, ko so razvijali tehniko SBSE, smo se osredotočili na 24 analitov, ki so se izkazali za ustrezne. Omenjene spojine so: amitriptilin, azitromicin, dezipramin, diazepam, donepezil, escitalopram, fluoksetin, haloperidol, imatinib, klomipramin, loperamid, loratadin, metoprolol, prometazin, propranolol, raloksifen, risperidon, selegilin, sertralin, tramadol, triklosan, venlafaksin, verapamil in ziprasidon (44).

4.2. Vrednotenje SBSE

4.2.1. Izkoristek metode

Izkoristki metode so bili izračunani na podlagi enačbe 5. Z izkoristkom vrednotimo uspešnost ekstrakcije določenega analita iz vzorca. Ker smo delali z realnimi vzorci, ki so v večji meri bili precej onesnaženi, smo pričakovali, da bodo izkoristki nižji kot bi jih dobili v primeru čistega vzorca. Izkoristki so skupaj z log P in ponovljivostjo podani v preglednici 7. Prav tako so v preglednici podani teoretični izkoristki analitov, ki smo jih izračunali s pomočjo enačbe 7.

Kot lahko opazimo, se vrednost teoretičnega izkoristka veča z naraščajočim log P. Spojine z nizko vrednostjo log P imajo bistveno nižje vrednosti teoretičnih izkoristkov. Teoretični izkoristek nam sicer služi zgolj kot približek, saj so vrednosti, ki jih dobimo z eksperimentalnim delom odvisne tudi od drugih dejavnikov. Mednje sodijo pogoji, pri katerih izvajamo eksperiment (pH, dodatek soli, temperatura), stabilnost analitov in čistost vzorca.

Iz preglednice 7 lahko razberemo, da se eksperimentalni izkoristki učinkovin primernih za našo metodo gibljejo v intervalu od 3,30 % do 98,36 %. Učinkovine z nizko vrednostjo log P imajo nizke izkoristke zaradi svojih hidrofilnih lastnosti in nezmožnosti sorpcije v stacionarno fazo, katero predstavlja PDMS, ki izraža hidrofobne lastnosti. Pri učinkovinah z visokimi vrednostmi log P lahko komentiramo nižje vrednosti eksperimentalnih izkoristkov od teoretičnih predvsem zaradi morebitne adsorpcije teh učinkovin na steno steklenih vsebnikov, v katerih izvajamo ekstrakcijo ali pa močne vezave na stacionarno fazo. Izkoristke, ki smo jih dobili pri delu z realnimi vzorci, smo primerjali tudi z izkoristki, ki so bili dobljeni pri delu s čistimi vzorci vode. Iz preglednice 7 je jasno razvidno, da so bili izkoristki pri delu s čistimi vzorci vode bistveno višji kot pri uporabi realnih vzorcev. Realni vzorci predstavljajo kompleksnejši sistem, v katerem so prisotne razne nečistote, ki lahko vplivajo na tako velike razlike med dobljenimi izkoristki.

4.2.2. Ponovljivost metode

Kot ponovljivost opredeljujemo natančnost dobljenih rezultatov z določeno metodo. Pri tem moramo upoštevati, da določeno meritev izvaja isti analitik pod enakimi pogoji (vzorec, laboratorij, laboratorijska oprema, kratko časovno obdobje) (50, 51).

Ponovljivost metode smo preverili pri dveh različnih koncentracijah, in sicer pri 70 ng/L in 140 ng/L. Izračunali smo jo na podlagi enačbe 4 in vrednosti podali kot RSD (%). Kot kriterij za dobro ponovljivost nam je služila predpostavka, da mora biti vrednost RSD posameznega analita nižja od 15 %. Rezultati so predstavljeni v preglednici 7.

Preglednica 7: Validacijski parametri.

učinkovina	log P	RSD (%)	izkoristek (%)	izkoristek* (%)	teoretični izkoristek (%)
amitriptilin	4,81	6,94	64,55	113	99,4
azitromicin	2,44	11,96	13,10	24	40,8
desipramin	3,90	9,71	39,71	101	95,2
diazepam	3,08	8,91	7,69	< 5	75,0
donepezil	4,21	5,78	/	92	97,6
escitalopram	3,76	6,56	78,83	81	93,5
fluoksetin	4,17	8,69	48,59	122	97,5
haloperidol	3,66	8,18	53,84	83	92,0
imatinib	4,38	47,61	3,30	< 5	98,4
klomipramin	4,88	6,51	48,87	116	99,5
loperamid	4,77	6,14	56,43	65	99,3
loratidin	4,55	4,68	63,48	100	98,9

metoprolol	1,76	10,99	13,63	7	12,6
prometazin	4,29	9,97	39,02	108	98,0
propranolol	2,58	10,23	64,33	55	48,7
raloksifen	5,69	12,37	7,88	8	99,9
risperidon	2,63	13,37	8,59	14	51,6
selegilin	2,85	10,24	48,15	90	63,9
sertralin	5,15	11,51	98,36	130	99,7
tramadol	2,45	10,32	79,31	49	41,3
triklosan	4,98	8,84	13,39	45	99,6
venlafaksin	2,74	10,88	63,70	60	57,9
verapamil	5,04	5,78	71,65	81	99,6
ziprasidon	3,75	10,35	17,89	18	93,4

Opomba: stolpec izkoristek* predstavlja izkoristki, ki so jih dobili, ko so optimizirali metodo (povzeto po: (44)).

Iz preglednice 7 vidimo, da so vrednosti RSD pri vseh analitih z izjemo imatiniba nižje od 15 %, iz česar lahko sklepamo, da je ponovljivost metode ustrezna. Večina analitov je imela vrednost RSD manjšo od 10 %. V obzir moramo vzeti, da delamo z realnimi vzorci in zato lahko pričakujemo nekoliko višje vrednosti RSD, predvsem pri hidrofilnih učinkovinah, kot so jih dobili, ko so vrednotili optimizirano metodo, saj so v tem primeru delali s čistimi vzorci (44).

4.3. Primerjava izkoristkov med SBSE in SPE-DEX metodo

Del magistrske naloge je obsegal tudi primerjavo izkoristkov med metodama SBSE in SPE-DEX, ki sta bili uporabljeni za ekstrakcijo vzorcev iz odpadnih voda. V preglednici 8 se nahajajo eksperimentalni izkoristki, ki smo jih dobili pri izvedbi obeh tipov ekstrakcij.

Preglednica 8: Primerjava izkoristkov med SBSE in SPE-DEX.

učinkovina	log P	izkoristek SBSE (%)	izkoristek SPE-DEX (%)
amitriptilin	4,81	64,55	38,50
azitromicin	2,44	13,10	51,50
desipramin	3,90	39,71	97,50
diazepam	3,08	7,69	53,50
donepezil	4,21	-	51,30
escitalopram	3,76	78,83	56,80
fluoksetin	4,17	48,59	92,80
haloperidol	3,66	53,84	56,20
imatinib	4,38	3,30	71,20
klomipramin	4,88	48,87	21,10
loperamid	4,77	56,43	43,70
loratidin	4,55	63,48	61,90
metoprolol	1,76	13,63	66,70
prometazin	4,29	39,02	21,70

propranolol	2,58	64,33	42,00
raloksifen	5,69	7,88	63,70
risperidon	2,63	8,59	60,20
selegilin	2,85	48,15	96,40
sertralin	5,15	98,36	103,10
tramadol	2,45	79,31	93,70
triklosan	4,98	13,39	-
venlafaksin	2,74	63,70	70,80
verapamil	5,04	71,65	51,60
ziprasidon	3,75	17,89	48,20

14 izmed 24 analitov izbranih analitov je izkazovalo višje izkoristke pri ekstrakciji SPE-DEX kot pri SBSE. Nižje izkoristke lahko z veliko verjetnostjo pripišemo filtraciji, ki jo pri SBSE izvajamo pred samo izvedbo ekstrakcije, pri SPE-DEX pa filtracija poteka v sklopu metode. Pri SPE-DEX namreč analite, ki se zadržijo na filtru, speremo z elucijskim topilom, pri SBSE pa pri fazi filtracije ne uporabimo elucijskega topila in posledično lahko pride do izgub analitov na filtrirnem papirju. 8 učinkovin je imelo boljše izkoristke z metodo ekstrakcije SBSE napram SPE-DEX metodi. Pri donepezilu izračun eksperimentalnega izkoristka ni bil možen zaradi težav pri eksperimentu. Primerjava izkoristka za triklosan ni bila možna, saj pri procesu SPE-DEX ta učinkovina ni bila vključena v analizo.

4.4. Relativni izkoristki različnih dimenzij Twister[®] mešalnih paličic

Preverjali smo relativne izkoristke pri različnih dimenzijah Twister[®] mešalnih paličic glede na mešalno paličico (referenčna) dimenzij 10 mm x 1 mm, ki je bila uporabljena za ekstrakcijo vseh vzorcev odpadnih voda. Relativne izkoristke smo izračunali s pomočjo enačbe 8.

$$\text{relativni izkoristek (\%)} = \frac{\text{odziv pri mešalni paličici dimenzij } X}{\text{odziv pri referenčni mešalni paličici}} * 100 \quad (\text{Enačba 8})$$

Za ta namen smo vzorčili odpadno vodo iz dveh različnih čistilnih naprav. V preglednici 9 so podani dobljeni rezultati.

Preglednica 9: Relativni izkoristki analitov pri različnih dimenzijah mešalnih paličic.

	dimenzija Twister® mešalne paličice			
	10 mm x 1 mm	10 mm x 0,5 mm	20 mm x 0,5 mm	20 mm x 1 mm
analit	relativni izkoristek (%)	relativni izkoristek (%)	relativni izkoristek (%)	relativni izkoristek (%)
selegilin	100,0	118,6	125,7	86,3
metoprolol	100,0	85,1	95,6	60,8
tramadol	100,0	94,3	76,0	68,0
azitromicin	100,0	76,5	79,3	38,7
imatinib	100,0	126,8	285,8	192,4
risperidon	100,0	79,8	97,6	59,0
venlafaksin	100,0	96,6	69,0	65,4
propranolol	100,0	98,6	87,5	63,3
donepezil	100,0	98,4	62,7	52,0
ziprasidon	100,0	94,3	109,8	70,0
raloksifen	100,0	89,8	129,3	85,6
escitalopram	100,0	95,4	56,1	54,4
haloperidol	100,0	93,2	71,2	55,4
prometazin	100,0	99,7	47,7	56,0
desipramin	100,0	210,4	85,9	79,0
verapamil	100,0	98,1	62,1	51,1
amitriptilin	100,0	138,1	84,6	66,1
fluoksetin	100,0	151,9	59,6	64,7
sertralin	100,0	126,2	96,9	58,5
klomipramin	100,0	134,3	118,3	65,0
loperamid	100,0	87,9	52,5	45,5
loratidin	100,0	101,5	67,8	52,8
diazepam	100,0	94,7	94,9	70,0
triklosan	100,0	76,1	88,3	60,6

Kot je opazno iz preglednice 9 je za večino izbranih analitov najustreznejša mešalna paličica dimenzij 10 mm x 1 mm, ki smo jo uporabljali med izdelavo magistrske naloge. Natančneje, 14 analitov je imelo najvišji delež vezave ravno pri naši referenčni mešalni paličici. Smiselna razlaga visokih vrednosti odstotka vezave predvsem pri imatinibu bi lahko bila ta, da se je učinkovina na mešalnih palicah zadržala od prejšnjih ekstrakcij in se v večji meri desorbirala prav pri našem eksperimentu. Pričakovali bi, da se bo z naraščajočo dimenzijo Twister® mešalne paličice višal tudi relativni izkoristek vezanega analita. Iz preglednice 9 lahko opazimo, da ni tako. Bistven problem pri mešalnih paličicah velikosti 20 mm x 1 mm in 20 mm x 0,5 mm predstavlja sama izvedba eksperimenta, saj smo ob izvedbi eksperimentalnega dela naleteli na kar nekaj problemov, kot so neenakomerno vrtenje mešalne paličice

(udarjanje mešalne paličice ob steno steklenega vsebnika) in izbira ustrezne steklovine. Referenčne mešalne paličice imajo namreč zasnovane posebne steklene vsebnike z ravnim dnom, ki ustrezajo mešalnim paličicam velikosti 10 mm. V teh vsebnikih ob izvedbi eksperimentalnega dela ni bilo zaznati problemov z neenakomernim vrtenjem mešalne paličice. Kot alternativo naši referenčni mešalni paličici bi lahko uporabljali Twister® mešalno paličico dimenzij 10 mm x 0,5 mm, ki je pri določenih analitih dajala celo boljše rezultate kot referenca.

4.5. Prisotnost in koncentracije analitov na vtokih in iztokih čistilnih naprav

Analizirali smo 17 različnih vzorcev iz čistilnih naprav. Kot metodo za ekstrakcijo smo uporabili tehniko SBSE. V preglednici 10 so podane koncentracije posameznih analitov, ki smo jih zaznali na določeni čistilni napravi. Koncentracije, ki so bile nižje od meje določitve smo označili z < LOQ. Določeni analiti niso dajali odziva, sklepamo lahko, da v vzorcu niso prisotni. Omenjene analite smo v preglednici označili z »Ni odziva«. Vsi vzorci razen dveh vzorcev vtoka in iztoka čistilne naprave B so temeljili na 24-urnem zajemu, se pravi, da je bil določen volumen vzorca odvzet vsako uro, v obdobju 24 ur. Vzorca vtoka in iztoka čistilne naprave B sta temeljila na trenutnem zajemu. S trenutnim zajemom opisujemo odvzem vzorca zgolj v eni časovni točki. Sklepamo lahko, da nam 24-urni vzorci dajejo bolj relevantne rezultate, saj v trenutnem zajemu lahko prihaja do izrazitega nihanja koncentracij nekaterih učinkovin. Določene učinkovine so lahko prisotne v visokih koncentracijah, spet druge so lahko prisotne zgolj v zelo nizkih in nam tako ne podajajo realnega stanja koncentracij analitov.

Preglednica 10: Koncentracije analitov na posameznih čistilnih napravah.

	čís. nap. A vtok	čís. nap. A iztok	čís. nap. B vtok	čís. nap. B iztok	čís. nap. C vtok	čís. nap. C iztok	čís. nap. D vtok	čís. nap. D iztok	čís. nap. E vtok	čís. nap. E iztok 1	čís. nap. E iztok 2	čís. nap. F iztok	čís. nap. G iztok	čís. nap. H iztok	čís. nap. I iztok	čís. nap. J iztok	čís. nap. K iztok	
učinkovina	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	konc. (ng/L)	
amitriptilin	17,9	8,7	6,3	5,6	17,3	15,4	18,0	5,4	6,9	7,6	7,8	22,0	7,8	13,2	9,8	29,0	17,5	
azitromicin	302,9	103,9	434,8	276,8	146,3	Ni odziva	156,0	137,6	171,0	153,4	209,5	482,2	188,1	113,6	508,3	322,1	320,2	
desipramin	1,6	3,8	3,2	< LOQ	< LOQ	Ni odziva	4,9	4,3	3,0	2,3	3,5	5,4	5,5	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	
diazepam	8,2	2,7	20,3	17,3	53,4	12,9	25,1	16,0	22,1	22,3	3,3	12,2	24,0	4,1	Ni odziva	Ni odziva	37,8	
donepezil	10,9	7,1	18,3	11,5	10,7	8,9	16,9	14,7	11,1	10,1	7,3	17,5	20,0	2,6	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	
escitalopram	64,3	44,1	148,1	143,5	110,7	96,7	71,6	61,4	71,0	69,1	47,1	92,7	89,2	84,3	72,4	54,1	186,5	
fluoksetin	7,6	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	14,5	8,1	Ni odziva	Ni odziva	17,6	Ni odziva	15,8	Ni odziva	21,8	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	46,7	
haloperidol	19,4	Ni odziva	57,5	4,6	13,5	8,1	5,9	4,5	11,5	6,7	Ni odziva	4,2	10,1	< LOQ	5,0	1,3	11,1	
imatinib	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva
klomipramin	< LOQ	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	< LOQ	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	< LOQ	1,7	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	< LOQ	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	
loperamid	< LOQ	Ni odziva	< LOQ	< LOQ	11,0	< LOQ	3,6	1,4	< LOQ	2,1	< LOQ	3,6	4,4	< LOQ	Ni odziva	Ni odziva	4,7	
loratidin	3,2	2,2	9,7	7,5	2,6	3,3	10,2	8,4	6,3	6,5	1,8	8,6	10,6	4,3	6,1	7,2	21,7	
metoprolol	85,3	23,2	45,4	25,2	80,7	62,5	24,5	13,0	48,3	44,6	25,1	31,3	27,1	34,9	80,8	50,8	68,2	
prometazin	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	12,6	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	52,2	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	
propranolol	42,6	11,0	40,3	39,3	64,2	47,1	45,5	19,8	45,5	42,3	35,5	13,9	18,9	33,8	32,8	55,7	62,8	
raloksifen	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	< LOQ	Ni odziva	
risperidon	3,5	Ni odziva	5,1	< LOQ	2,7	2,6	2,7	< LOQ	6,7	Ni odziva	< LOQ	3,3	1,8	< LOQ	Ni odziva	1,3	2,1	
selegilin	3,0	< LOQ	Ni odziva	Ni odziva	5,6	4,7	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	2,4	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	6,2	
sertralin	2,5	1,7	4,1	5,8	509	160	4,6	1,9	2,9	2,5	3,3	6,3	1,7	< LOQ	2,7	6,1	2,9	
tramadol	6599,6	15938,4	18737,2	43860,2	9488,8	13910,4	10846,2	6359,9	3230,9	8618,1	13189,2	8605,5	6123,2	25670,0	10560,2	26106,8	25964,0	
triklosan	106,8	38,8	47,1	11,7	325,3	61,9	283,5	45,0	137,7	133,8	23,3	58,9	71,1	14,7	39,1	53,1	126,8	
venlafaksin	254,3	144,8	274,3	550,6	345,2	354,0	232,0	202,3	85,0	109,0	107,1	186,5	157,8	353,9	169,7	111,2	324,5	
verapamil	13,7	1,6	64,1	49,1	29,4	26,3	12,2	12,0	21,3	20,9	21,5	23,8	13,4	17,4	12,2	15,8	29,5	
ziprasidon	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	Ni odziva	

Kot je razvidno iz preglednice 10, je bilo v vzorcih, ki smo jih analizirali, prisotnih večina učinkovin, ki so izkazovale primerne lastnosti za našo tehniko ekstrakcije. V vsaj enem od vzorcev, ki smo jih odvzeli na vtokih čistilnih naprav, je bila prisotna ena izmed 24 učinkovin primernih za našo metodo z izjemo imatiniba in ziprasidona. V vzorcih iztokov iz čistilnih naprav lahko ugotovimo podobno.

Preglednica 11: Koncentracijska območja določitve učinkovin in delež prisotnosti v čistilnih napravah.

učinkovina	interval koncentracij (min – max) (ng/L)	prisotnost v čistilni napravi (%) N=17
amitriptilin	5,4 – 29,0	100,0
azitromicin	113,6 – 482,2	100,0
desipramin	< LOQ – 5,5	70,6
diazepam	2,7 – 53,4	88,2
donepezil	2,6 – 20,0	82,4
escitalopram	44,1 – 186,5	100,0
fluoksetin	7,6 – 46,7	41,2
haloperidol	1,3 – 57,5	88,2
imatinib	/	0
klomipramin	< LOQ – 1,7	29,4
loperamid	< LOQ – 11,0	82,4
loratidin	1,8 – 21,7	100,0
metoprolol	13,0 – 85,3	100,0
prometazin	12,6 – 52,2	5,9
propranolol	11,0 – 64,2	100,0
raloksifen	< LOQ	70,6
risperidon	< LOQ – 6,7	82,4
selegilin	2,4 – 6,2	35,3
sertralin	< LOQ – 509,0	100,0
tramadol	3230,9 – 43860,2	100,0
triklosan	11,7 – 325,3	100,0
venlafaksin	85,0 – 550,6	100,0
verapamil	1,6 – 64,1	100,0
ziprasidon	/	0

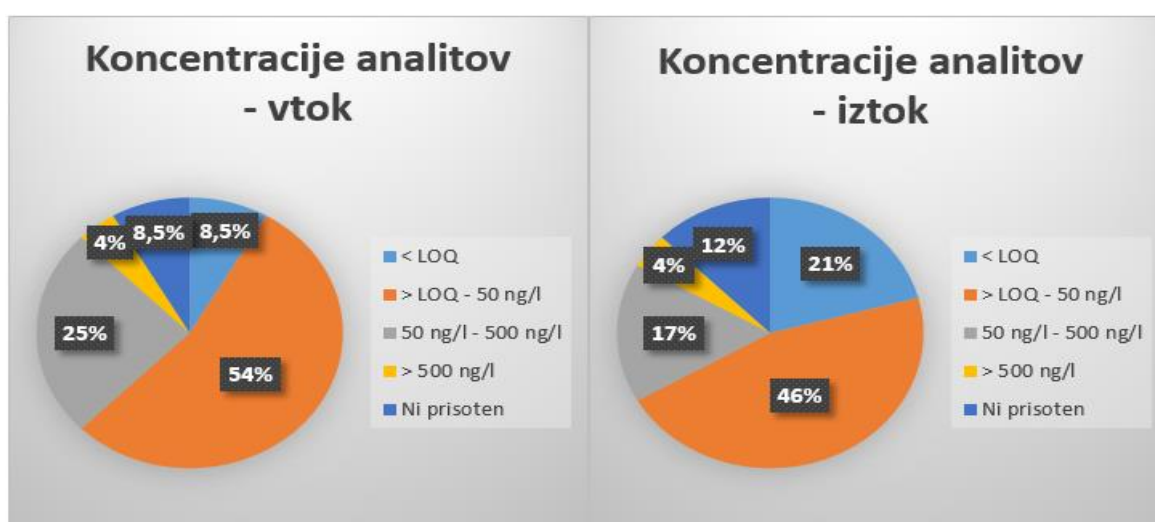
* pri označenih analitih so bile nekatere koncentracije pod mejo določitve.

V preglednici 11 imamo podano za vsako učinkovino posebej, v kakšnem koncentracijskem območju smo jo določili in v kolikih čistilnih napravah je bila določena (izraženo z deležem). Ugotovimo lahko, da so prav v vsakem vzorcu, ne glede na vtok oz. iztok bili prisotni amitriptilin, azitromicin, escitalopram, loratidin, metoprolol, propranolol, sertralin, tramadol, triklosan, venlafaksin in verapamil. Imatiniba in ziprasidona nismo uspeli določiti v nobenem od analiziranih vzorcev. Minimalne koncentracije desipramina, klomipramina, loperamida, risperidona in sertralina se nahajajo pod vrednostjo LOQ. Iz preglednice lahko

razberemo, da se izmed zgornjih učinkovin tramadol v odpadnih vodah nahaja v najvišji koncentraciji. Za razliko od tramadola, najnižje koncentracije beležimo pri klomipraminu, ki ima zgolj eno določeno koncentracijo nad vrednostjo LOQ. Kot je bilo omenjeno, so bili vzorci odvzeti spomladi leta 2016. Čas vzorčenja predstavlja pomemben podatek, saj se nivo koncentracij, v katerih so določeni vzorci, lahko močno razlikuje od meseca do meseca. Za primer lahko vzamemo relativno visoke vrednosti koncentracij učinkovine loratadin, ki so bile izmerjene. Loratadin se uporablja za lajšanje alergijskih bolezni, ki so najbolj prisotne ravno konec zime in v začetku pomladi, ko smo izvajali analize vzorcev. Z gotovostjo lahko trdimo, da imajo nekatere učinkovine višek porabe le v določenih mesecih oz. letnih časih. Tudi v drugih študijah so ugotovili, da so koncentracije nekaterih učinkovin zelo variirale glede na čas odvzema vzorcev (52).

4.5.1. Primerjava koncentracij analitov na vtoku in iztoku čistilnih naprav

Za primerjavo smo uporabili koncentracije petih čistilnih naprav, za katere imamo na voljo podatke o vtoku in iztoku. Posamezne deleže koncentracij analitov smo razdelili v pet območij, in sicer delež, ki ga zavzemajo analiti, ki jih nismo zaznali, analiti, katerih koncentracije so pod mejo LOQ, analiti, ki zavzemajo območje koncentracij med LOQ in 50 ng/L, analiti, katerih koncentracije se nahajajo med 50 ng/L in 500 ng/L in analiti, katerih koncentracije so presegle 500 ng/L. Na sliki 5 so prikazani deleži, ki jih zavzemajo določena koncentracijska območja.



Slika 5: Koncentracije analitov na vtoku in iztoku čistilnih naprav.

Iz slike 5 je razvidno, da se je na iztoku čistilnih naprav izrazito povečal delež učinkovin, ki se nahajajo v koncentracijskem območju pod LOQ. Prav tako beležimo večji delež učinkovin, ki jih nismo uspeli zaznati. Delež obojih se je zvišal na račun analitov, ki se nahajajo na vtoku v koncentracijskem območju med LOQ in 50 ng/L ter 50 ng/L in 500 ng/L. Sprememba omenjenih deležev je pričakovana, saj predvidevamo, da je čistilna naprava zmožna odstraniti določen delež posamezne učinkovine ne glede na tehnologijo čiščenja, ki poteka v njej. Edina učinkovina, ki se je nahajala nad mejo 500 ng/L je tramadol, pri katerem je bila povprečna koncentracija na vtokih in iztokih iz čistilnih naprav višja od 500 ng/L.

4.5.2. Učinkovitost odstranjevanja analitov

Učinkovitost odstranjevanja analitov smo spremljali na petih različnih čistilnih napravah v Sloveniji. V vsaki čistilni napravi smo zajeli vzorec odpadne vode pred vstopom v čistilno napravo in vzorec odpadne vode po opravljenem postopku čiščenja. V preglednici 12 so zbrane izračunane vrednosti učinkovitosti odstranjevanja iz vseh čistilnih naprav, v katerih smo vzorčili vtočno in iztočno odpadno vodo. Učinkovitost odstranjevanja smo izračunali s pomočjo enačbe 6.

Preglednica 12: Učinkovitost odstranjevanja analitov.

	čistilna naprava A	čistilna naprava B	čistilna naprava C	čistilna naprava D	čistilna naprava E	Povprečna učinkovitost odstranjevanja (%)
ANALIT	učinkovitost odstranjevanja (%)	učinkovitost odstranjevanja (%)	učinkovitost odstranjevanja (%)	učinkovitost odstranjevanja (%)	učinkovitost odstranjevanja (%)	
amitriptilin	51,6	11,5	10,6	70,1	-10,1	26,7
azitromicin	65,7	36,3	100,0	11,8	10,3	44,8
desipramin	-137,5	71,9*	100,0	12,4	20,6	13,5
diazepam	67,1	-42,5	75,8	36,1	-1,0	27,1
donepezil	34,9	37,1	17,0	13,2	8,4	22,1
escitalopram	31,4	-4,0	12,6	14,2	2,6	11,4
fluoksetin	100,0	/	44,0	/	100,0	81,3
haloperidol	100,0	92,0	40,3	23,3	41,2	59,4
loperamid	100,0	40,4*	99,1*	61,1	-133,3*	33,5
loratidin	31,3	-4,6	-23,5	17,2	-2,3	3,6
metoprolol	72,8	44,5	22,6	46,8	7,7	38,9

propranolol	74,2	2,4	26,6	56,4	6,9	33,3
risperidon	100,0	100,0*	3,7	85,2*	100,0	77,8
selegilin	76,7*	/	17,5	/	/	47,1
sertralin	32,0	96,6	68,6	58,1	15,4	54,1
tramadol	-141,5	-134,1	-46,6	44,2	-166,7	-88,9
triklosan	63,7	75,2	81,0	98,7	2,8	64,3
venlafaksin	43,1	-100,7	-2,5	12,8	-28,3	-15,1
verapamil	88,3	23,4	10,5	1,9	1,7	25,0

* ocenjene vrednosti (odzivi iztokov so bili nižji od LOQ)
/ nismo dobili odzivov na vtoku in iztoku

V preglednici 12 smo podali izračunane učinkovitosti odstranjevanja analitov v posamezni čistilni napravi. V preglednico nismo zajeli imatiniba, klomipramina, prometazina, raloksifena in ziprasidona, saj je računanje izkoristkov brez pravega pomena, ker jih na večini vtokov in iztokov iz čistilnih naprav bodisi ne zaznamo, bodisi so dobljene vrednosti pod LOQ. Nekatere učinkovitosti odstranjevanja (označeno v preglednici 12) so zgolj ocenjene, saj se koncentracije na iztoku ali na vtoku nahajajo pod LOQ. Kot je razvidno iz preglednice 12, na določenih čistilnih napravah nismo mogli izračunati učinkovitosti očiščenja, saj analiti niso bili prisotni na vseh čistilnih napravah (fluoksetin in selegilin). Posebno obravnavo si zasluži interpretacija učinkovitosti očiščenja v čistilni napravi B, saj sta vzorca temeljila na trenutnem odvzemu in posledično nimamo iste sestave vzorca. Bistveno boljši pregled nam dajejo ostale štiri čistilne naprave, v katerih je vzorčenje potekalo na principu 24-urnega zajema. 24-urni vzorci so primernejši, saj je v njih dokaj dobro zajet čas zadrževanja odpadne vode v čistilni napravi. Čeprav 24-urni vzorci dajejo dober približek realnemu stanju, bi bilo smiselno vzorčenje prilagoditi tako, da bi isti volumen odpadne vode bil analiziran tako na vtoku kot tudi na iztoku iz čistilne naprave.

Iz preglednice lahko ugotovimo, da je risperidon tista učinkovina, ki se z izjemo v čistilni napravi C odstranjuje najbolje. Tudi fluoksetin je izkazoval zelo dobro učinkovitost odstranjevanja, a imamo izračune zgolj za 3 čistilne naprave. Poleg omenjenih, se dokaj dobro odstranjujejo tudi haloperidol, triklosan in sertralin. Najslabši delež odstranjevanja beležimo pri tramadolu. Na učinkovitost očiščenja ima vpliv tudi tip čistilne naprave, se pravi kakšni procesi čiščenja potekajo v njej (primarno, sekundarno in terciarno čiščenje). Razprava o omenjenih parametrih sledi v nadaljevanju magistrske naloge.

4.5.3. Vpliv tehnologije čiščenja v čistilni napravi na učinkovitost odstranjevanja analitov

Ugotavljali smo ali na učinkovitost odstranjevanja analitov vpliva tip čistilne naprave. Ločimo primarno, sekundarno in terciarno čiščenje odplak. S primarnim čiščenjem opisujemo mehansko stopnjo čiščenja, kjer v bazenu poteka usedanje trdnih snovi, medtem ko lažji delci (maščobe) splavajo na površje. Trdna usedlina in plavajoči delci se nato odstranijo. S sekundarnim čiščenjem odstranjujemo biološko razgradljive snovi. Cilj te stopnje je zmanjšati količino vseh organskih snovi, ki so prisotne v odpadni vodi. Terciarna tehnologija čiščenja pa obsega najvišjo stopnjo čiščenja z namenom zagotovitve karseda najvišje kakovosti odplak pred ponovnim vstopom v ekosistem (53). Omenjena tehnologija čiščenja ni nujno prisotna v vseh čistilnih napravah. Prav tako velja, da se terciarna tehnologija čiščenja od čistilne naprave do čistilne naprave lahko močno razlikuje, glede na to, kakšen tip nečistote želimo odstraniti iz odpadne vode (54). Učinkovitost odstranjevanja učinkovin na petih čistilnih napravah je predstavljena v preglednici 13. Ugotavljali smo ali se učinkovitost odstranjevanja od čistilne naprave do čistilne naprave razlikuje in v kolikšni meri na ta dejavnik vpliva posamezna tehnologija čiščenja, ki poteka v čistilnih napravah. Podatke o tehnologiji čiščenja, ki poteka v čistilni napravi smo v primeru čistilnih naprav A, C in E dobili neposredno od osebja, ki je zaposleno v čistilni napravi, medtem ko smo od čistilnih naprav B in D dobili podatke o tehnologiji čiščenja iz informacij dostopnih na spletu.

Preglednica 13: Tehnologija čiščenja, ki poteka v čistilni napravi.

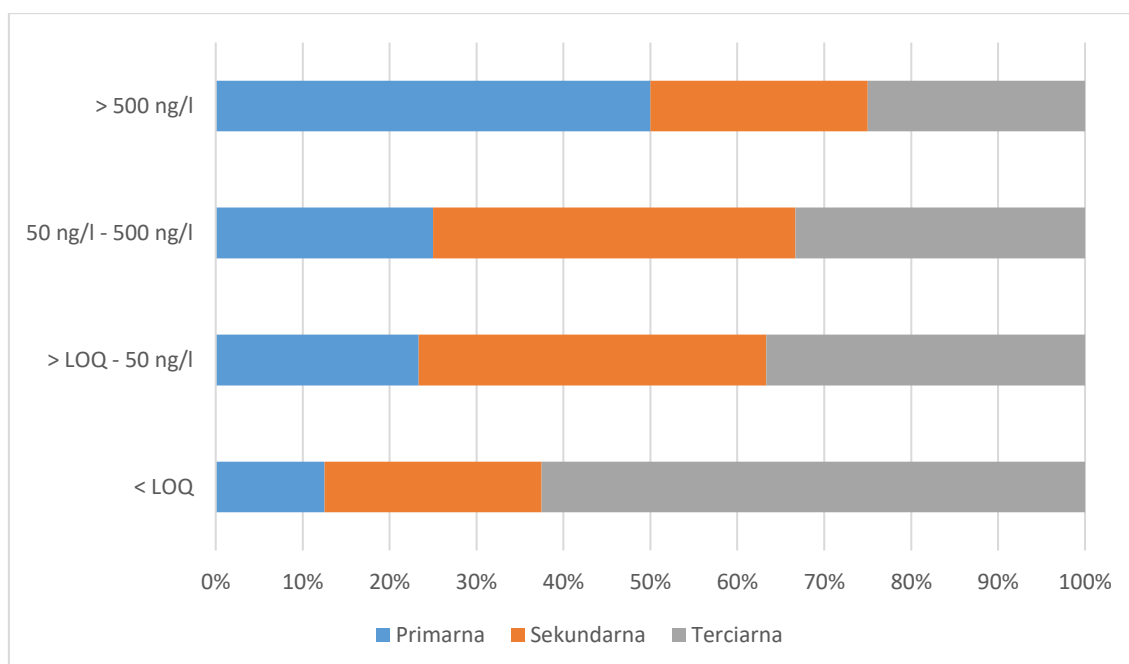
čistilna naprava	tehnologija čiščenja
čistilna naprava A	terciarna
čistilna naprava B	sekundarna
čistilna naprava C	terciarna
čistilna naprava D	terciarna
čistilna naprava E	terciarna

Iz podatkov o izračunanih učinkovitostih odstranjevanja težko sklepamo, da tehnologija čiščenja, ki poteka v določeni napravi, bistveno vpliva na učinkovitost odstranjevanja analitov. Pričakovali smo sicer, da bodo učinkovitosti odstranjevanja analitov v čistilnih napravah s terciarno tehnologijo bistveno višje kot pri čistilni napravi, kjer se izvaja sekundarna tehnologija čiščenja. Če primerjamo samo učinkovitost odstranjevanja med čistilnima napravama A in B, z gotovostjo lahko trdimo, da se analiti v čistilni napravi A,

kjer se izvaja terciarno čiščenje, bolje odstranjujejo kot analiti iz čistilne naprave B, kjer je prisotno sekundarno čiščenje. Če pa vzamemo v obzir vse štiri čistilne naprave, v katerih se izvaja terciarna tehnologija čiščenja, zgornja trditev ne velja vedno. Problem pri proučevanju omenjenega vpliva je predvsem v tem, da so bile nekatere učinkovine prisotne v zelo različnih in tudi nizkih koncentracijah, kar lahko vpliva na izračun učinkovitosti odstranjevanja analitov. To predstavlja tudi enega izmed dejavnikov, zaradi katerih je direktna primerjava učinkovitosti odstranjevanja analitov med čistilnimi napravami, nemogoča. Za optimalno izvedbo zgornjega poizkusa bi morali procesu čiščenja izpostaviti vzorce z istimi koncentracijami analitov. Tako bi zagotovili, da so na vtoku prisotne identične koncentracije učinkovin, na iztoku pa bi dobili določene koncentracije učinkovin, s pomočjo katerih bi izračunali dejanski vpliv tehnologije čiščenja na učinkovitost odstranjevanja analitov. Kot je bilo že omenjeno, problem predstavlja tudi različen zajem vzorca in posledično časovna fluktuacija koncentracij. V čistilnih napravah A, C, D in E smo vzorčili 24 ur, medtem ko vzorec iz čistilne naprave B predstavlja trenutni odvzem. Omeniti velja tudi to, da v terciarno tehnologijo čiščenja niso nujno zajeti postopki, s katerimi bi zagotovili nične oz. minimalne koncentracije učinkovin na iztoku iz čistilne naprave. Vsaka čistilna naprava ima terciarno tehnologijo čiščenja zasnovano drugače. Nekatere čistilne naprave v tej stopnji odstranjujejo fosfor in dušik, spet druge ostanek organskih snovi in tretje toksične snovi, ki bi lahko bile prisotne v odpadni vodi (54).

4.5.4. Vpliv tehnologije čiščenja na delež analitov v posameznem koncentracijskem območju

Na iztokih enajstih različnih čistilnih naprav (iztok čistilne naprave E je bil analiziran 2-krat) smo preverili v kolikšni meri vpliva tehnologija čiščenja (primarna, sekundarna in terciarna), ki poteka v določeni čistilni napravi na povprečne vrednosti koncentracij analitov. Na sliki 6 imamo predstavljen delež, ki so ga zavzemale koncentracije analitov glede na različne tehnologije čiščenja.



Slika 6: Delež koncentracijskih območij analitov glede na tehnologijo čiščenja.

Od enajstih čistilnih naprav je bila zgolj ena čistilna naprava, v kateri je prisotna samo primarna tehnologija čiščenja. Sekundarna tehnologija čiščenja se izvaja v treh čistilnih napravah, terciarna pa v sedmih. Za boljši vpogled v dejansko stanje bi lahko vzorčili še kakšen vzorec iz čistilnih naprav, v katerih se izvaja samo primarna tehnologija in tudi tistih, v katerih se izvaja sekundarna tehnologija čiščenja.

Iz slike 6 lahko razberemo, da tehnologija čiščenja, ki poteka v določeni čistilni napravi, vpliva na povprečne vrednosti koncentracij, v katerih se analiti nahajajo na iztoku iz čistilnih naprav. Dobro je razvidno, da je delež analitov, ki so izpostavljeni terciarni tehnologiji čiščenja, najvišji v koncentracijskem območju, ki se nahaja pod LOQ. Ugotovitev je pričakovana, saj predvidevamo, da z višanjem nivoja čiščenja dvigujemo tudi kakovost iztočne vode. Iz slike 6 opazimo tudi, da je pri primarni tehnologiji čiščenja delež analitov, ki se gibljejo v koncentracijskem območju > 500 ng/L najvišji. V grobem je bistvena ugotovitev ta, da se odpadna voda, ki je izpostavljena terciarni tehnologiji čiščenja boljše očisti analitov, kot pa voda, ki je izpostavljena sekundarni oz. primarni tehnologiji čiščenja. Z vzorčenjem večjega števila vzorcev iz primarnih in sekundarnih čistilnih naprav bi lahko zgornjo ugotovitev dodatno preverili.

4.5.5. Vpliv demografskih značilnosti na prisotnost učinkovin v čistilnih napravah

Zdravstvene ustanove in določen tip industrije, ki se nahajajo v omrežju, ki je priklopljeno na čistilno napravo lahko močno vplivajo na koncentracije učinkovin, ki jih določimo na čistilnih napravah. V preglednici 14 so prikazane značilnosti, ki opisujejo določeno omrežje čistilne naprave. Za čistilni napravi B in D nismo dobili povratnih informacij, iz podatkov, ki jih najdemo na spletu, pa ne moremo biti prepričani, katere zdravstvene ustanove in tip industrije so priključeni na omrežje čistilne naprave, saj je v določenih krajih prisotnih več čistilnih naprav.

Preglednica 14: Količina prečiščene vode in prisotnost zdravstvenih ustanov in industrije v čistilni napravi.

čistilna naprava	količina prečiščene vode (1000 m ³ /leto)	zdravstvene ustanove	industrija
čistilna naprava A	1790	1 bolnišnica, 1 dom za ostarele	avtomobilska
čistilna naprava B	585	/*	/*
čistilna naprava C	237	1 psihiatrična bolnišnica, 1 dom za ostarele	avtomobilska
čistilna naprava D	7093	/*	/*
čistilna naprava E	4702	2 domova za ostarele	mlečna

/ podatkov nismo uspeli pridobiti neposredno od upravitelja čistilne naprave*

Za ustrezno interpretacijo podatkov se moramo osredotočiti na preglednico 7, v kateri imamo podane koncentracije zdravilnih učinkovin na vtokih in iztokih čistilnih naprav. Na osnovi izbranih parametrov lahko primerjamo zgolj čistilne naprave A, C in E, saj za preostali dve čistilni napravi nimamo na voljo podatkov.

Iz vrednosti koncentracij učinkovin lahko ugotovimo, da v primeru čistilne naprave C beležimo povišane vrednosti koncentracij učinkovin diazepam (anksiolitik), escitalopram (antidepresiv), sertralin (antidepresiv) in venlafaksin (antidepresiv) napram čistilnim napravam A in E. Razlog je v tem, da se v kanalizacijskem omrežju čistilne naprave C nahaja psihiatrična bolnišnica, v kateri se v bistveno večji meri predpisujejo omenjene zdravilne učinkovine. Najbolj izražen porast koncentracij je opažen pri sertralinu, saj se na čistilni napravi C nahaja v koncentracijskem območju 509 ng/L (vtok) – 160 ng/L (iztok), medtem pa ga na ostalih dveh zasledimo v koncentracijskem območju 4,6 ng/L (vtok) – 1,7 ng/L (iztok). Koncentracijska območja ostalih učinkovin po posameznih čistilnih napravah so podobna, se pravi ne beležimo velikih odstopanj od čistilne naprave do čistilne naprave. Vpliv prisotne industrije na koncentracije učinkovin je v našem primeru zanemarljiv, saj

avtomobilska in mlečna industrija s svojimi odplakami ne prineseta k dvigu koncentracij učinkovin v odpadni vodi.

Proučevanje demografskih značilnosti kraja na koncentracije prisotnih učinkovin nam služi kot dober pokazatelj, kako lahko določena zdravstvena ustanova vpliva na zvišanje koncentracij določenih učinkovin v odpadni vodi. Zanimivo bi bilo izvesti tudi študijo, v kateri bi imeli na voljo podatke o čistilnih napravah, v katere se stekajo odpadne vode iz farmacevtske oz. kemične industrije. Tako bi lahko primerjali, v kakšni meri vpliva prisotnost take industrije na onesnaženost odpadnih vod v primerjavi s kraji, kjer nimamo prisotnega podobnega tipa industrije.

4.5.6. Pogled v koncentracije farmacevtikov na vtokih in iztokih čistilnih naprav določenih širom Evrope

Koncentracije analitov, ki smo jih določili na vtokih in iztokih čistilnih naprav smo primerjali s podatki evropskih držav najdenih v razpoložljivi literaturi. Primerjava od države do države je zahtevna, saj že v državah znotraj Evrope prihaja do viška predpisovanja določenih učinkovin, spet druge v posameznih državah niso med tistimi, ki dosegajo velik delež predpisanih zdravil. Smiselno je omeniti tudi vpliv števila populacijskih enot, ki jih zaobjame čistilna naprava, tako da koncentracije farmacevtikov lahko močno variirajo. Težko je namreč primerjati čistilno napravo, v katero se steka odpadna voda iz čistilne naprave, ki obsega 1000 populacijskih enot s čistilno napravo, ki obsega 100000 populacijskih enot. Največ podatkov o koncentracijah učinkovin na vtokih smo uspeli pridobiti v državah, ki so zbrane v preglednici 15. Švedska, Španija in Portugalska hkrati predstavljajo tudi države, v katerih se spremljanje koncentracij zdravilnih učinkovin izvaja najpogosteje. Iz preglednice 15 lahko opazimo, da koncentracijska območja pri nekaterih učinkovinah od države do države precej nihajo, spet za druge učinkovine so dokaj podobna. Med učinkovine, pri katerih so se koncentracije, ki so bile določene, najbolj razlikovale med Slovenijo in ostalimi državami, sodijo metoprolol, sertralin in tramadol. Na močno odstopanje sertralina določenega v Sloveniji vpliva prisotnost psihiatrične bolnišnice, ki se nahaja v kanalizacijskem območju ene izmed čistilnih naprav. Koncentracije metoprolola v Sloveniji so bile bistveno nižje od ostalih držav (izjema Portugalska), kar lahko z veliko verjetnostjo pripišemo večjemu predpisovanju metoprolola v tujini kot pri nas.

Preglednica 15: Koncentracije učinkovin v nekaterih evropskih državah.

ATC skupina	učinkovina	države (koncentracija (ng/L))											
		naše vrednosti		Švedska		Portugalska		Italija		Grčija		Španija	
		vtok	iztok	vtok	iztok	vtok	iztok	vtok	iztok	vtok	iztok	vtok	iztok
A (zdravila za bolezni prebavil in presnove)	Loperamid	< LOQ – 3,6	n.d. – 4,7	3 – 30	2 – 30								
C (zdravila za bolezni srca in ožilja)	Metoprolol	24,5 – 85,3	13,0 – 80,8	311 – 1539	900 – 1000	< LOQ – 15	6 – 18	220 – 290	130 – 210	96 – 474	< LOQ – 780	< LOD – 265	< LOD – 118
	Propranolol	40,3 – 64,2	11,0 – 62,8			3 – 24	4 – 11	14 – 45	13 – 26	< LOQ – 64	< LOQ – 90	< LOD – 111	< LOD – 130
	Verapamil	13,7 – 64,1	1,6 – 49,1	20 – 80	10 – 40	3 – 5	1 – 3						
D (zdravila za bolezni kože in podkožnega tkiva)	Prometazin	n.d. – 12,6	n.d. – 52,2	40 – 100	15 – 70								
J (zdravila za sistemsko zdravljenje infekcij)	Azitromicin	146,3 – 434,8	n.d. – 508,3	8 – 30	7 – 30	80 – 295	94 – 297	10 – 330	70 – 180			n.d. – 595	< LOQ – 145
N (zdravila z delovanjem na živčevje)	Amitriptilin	6,3 – 18,0	5,4 – 29,0	8 – 40	20 – 40							65 – 214	65 – 122
	Diazepam	8,2 – 53,4	n.d. – 37,8			< LOQ – 8	7 – 9	2 – 10	n.d.			n.d.	n.d.
	Donepezil	10,7 – 18,3	n.d. – 20,0	5 – 50	2 – 30								
	Fluoksetin	n.d. – 17,6	n.d. – 46,7	9 – 150	9 – 90			55 – 190	10 – 63			69 – 177	85 – 127
	Haloperidol	5,9 – 57,5	n.d. – 11,1	20 – 50	2 – 30	10 – 28	7 – 16						
	Klomipramin	n.d. - < LOQ	n.d. – 1,7	9 – 70	3 – 30								
	Risperidon	2,7 – 6,7	n.d. – 3,3	6 – 200	3 – 200					n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Sertralin	2,5 – 509	< LOQ – 160	90 – 110	30 – 40	< LOQ	< LOQ			< LOQ – 21	< LOQ		
	Tramadol	3230,9 – 18737,2	6359,9 – 43860,2	1000 – 4000	1000 – 4000								
	Venlafaksin	85,0 – 345,2	107,1 – 550,6	300 – 1500	300 – 800	68 – 268	184 – 322			< LOQ – 70	42 – 125	n.d.	n.d.
R (zdravila za bolezni dihal)	Loratadin	2,6 – 9,7	1,8 – 21,7			n.d.	n.d.	n.d. – 20	n.d. – 50			n.d.	n.d.
vir				(55)		(56)		(57)		(58)		(59)	

Tramadol smo v čistilnih naprav v Sloveniji zaznali v bistveno višjih koncentracijah, kot so ga uspeli zaznati v državah, ki so bile vključene v obravnavo (Švedska). Na splošno je bila omenjena učinkovina bila prisotna v zelo visokih koncentracijah napram ostalim učinkovinam, ki smo jih določili v odpadnih vodah v Sloveniji. Podatke za risperidon imamo sicer samo za Švedsko, kjer pa so bile maksimalne koncentracije bistveno višje kot v Sloveniji. Tudi pri azitromicinu, fluoksetinu in venlafaksinu lahko opazimo precejšnje nihanje koncentracij učinkovin, ki so bile določene med različnimi državami.

Primerjava koncentracij učinkovin, ki so bile določene je zgolj okvirna, saj vplivajo na prisotnost le-teh v odpadni vodi različni dejavniki, kot so obseg predpisovanja učinkovine, tehnologija čiščenja, ki poteka v čistilni napravi in število gospodinjstev priključenih na čistilno napravo.

5. Sklep

Magistrska naloga je bila namenjena predvsem spremljanju koncentracij določenih zdravilnih učinkovin v odpadnih vodah v Sloveniji. Analizirani so bili vtoki in iztoki različnih čistilnih naprav. Iztoki čistilnih naprav so predstavljali večino vzorcev, ki so bili zajeti. Velika večina vzorcev je predstavljala celodnevni zajem, s katerim lahko jamčimo reprezentativnost rezultatov. Za ekstrakcijo smo uporabljali metodo SBSE, ki temelji na sorptivnem mehanizmu. Poleg omenjene metode je bila uporabljena tudi metoda SPE-DEX, zgolj za primerjavo izkoristkov med obema metodama.

V analizo je bilo zajetih 24 različnih učinkovin, ki so se v procesu optimizacije metode izkazale kot primerni za SBSE. Na nobeni izmed čistilnih naprav nismo uspeli zaznati imatiniba in ziprasidona, medtem ko se je raloksifen v čistilnih napravah, v katerih je bil prisoten, nahajal pod mejo kvantifikacije. Prav na vsakem vtoku in iztoku iz čistilne naprave smo uspeli zaznati amitriptilin, azitromicin, escitalopram, loratidin, metoprolol, propranolol, sertralin, tramadol, triklosan, venlafaksin in verapamil. Desipramin, diazepam, donepezil, haloperidol, loperamid in risperidon so bili prisotni v več kot 50 % analiziranih vzorcev. Za razliko od omenjenih zdravilnih učinkovin je bila prisotnost fluoksetina, prometazina in selegilina manjša od 50 %. Velika večina zaznanih analitov (62,5 %) je bila prisotna v koncentracijskem območju nižjem od 100 ng/L. Višje koncentracije (do 550 ng/L) prisotnih učinkovin smo zabeležili pri petih učinkovinah, in sicer pri azitromicinu, escitalopramu, sertralinu, triklosanu in venlafaksinu. Posebno obravnavo si zasluži sertralin, saj je omenjena učinkovina bila prisotna v tako visoki koncentraciji zgolj na čistilni napravi, v katero se steka odpadna voda iz psihiatrične bolnišnice. Najvišje izmerjene koncentracije smo zabeležili pri tramadolu (3230,9 ng/L – 43860,2 ng/L). Z izračunom učinkovitosti odstranjevanja smo ugotavljali, v kolikšni meri se zniža koncentracija posameznega analita. Na podlagi dobljenih rezultatov lahko rečemo, da so najvišjo učinkovitost odstranjevanja izkazovali risperidon, haloperidol, sertralin in triklosan. Najslabši izkoristek očiščenja je bil zabeležen pri tramadolu. Ugotovili smo tudi, da z naraščajočo tehnologijo čiščenja, ki poteka v čistilni napravi narašča tudi delež učinkovin, ki imajo koncentracije na iztokih zelo nizke oz. se nahajajo pod LOQ. Omenjena ugotovitev je bila pričakovana, saj z uporabo naprednejše tehnologije čiščenja v čistilni napravi dvigujemo tudi standard kakovosti čiščenja.

Preverili smo tudi ponovljivost metode. Vsi analiti razen imatiniba so izkazovali vrednost RSD nižjo od 15 %, zato lahko sklepamo, da je metoda dobro ponovljiva. Izkoristki metode

so se gibali v območju od 3,30 % do 98,60 %. S primerjavo izračunov izkoristkov med SBSE in SPE-DEX smo ugotovili, da ima večina analitov boljše izkoristke pri metodi SPE-DEX. Omenjena ugotovitev je bila pričakovana, saj pri metodi SBSE izvajamo filtracijo posebej, s tem pa lahko pride do izgube v tej fazi predpriprave vzorca. Pri SPE-DEX se filtracija izvaja v sklopu metode, kar pomeni, da se vsi delci sperejo z elucijskim topilom in tako nimamo zaostanka analitov. Del naloge smo namenili tudi proučevanju vpliva velikosti mešalne paličice na potek ekstrakcije. Ugotovili smo, da je izbrana mešalna paličica najprimernejša za izvedbo ekstrakcije pri večini analitov primernih za našo metodo. 14 od 24 analitov je namreč pri velikosti mešalne paličice 10 mm x 1 mm izkazovalo najboljši izkoristek glede na ostale mešalne paličice, ki smo jih imeli na voljo.

6. Literatura

1. <https://www.drugbank.ca/stats> (dostop: 2.8.2017)
2. Bu Q, Shi X, Yu G, Huang J, Wang B, Wang J. Pay attention to non-wastewater emission pathways of pharmaceuticals into environments. *Chemosphere*, 2016; 165: 515-518.
3. Klatte S, Schaefer HC, Hempel M. Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sus Chem Pharm*, 2017; 5: 61-66.
4. Boxall AB a. The environmental side effects of medication. *EMBO reports*, 2004; 5: 1110-1116.
5. Fernández C, Beltrán EM TJ. Pharmaceuticals Effects in the Environment. *Encyclopedia of Toxicology*, 2014; 3: 844-848.
6. Gaw S, Thomas K V, Hutchinson TH. Sources, impacts and trends of pharmaceuticals in the marine and coastal environment. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biol sci*, 2014; 369: 20130572.
7. <http://www.cistilnenaprave.si/bioloske-greznice/> (dostop: 12.11.2017)
8. Cecinato A, Romagnoli P, Perilli M BC. Pharmaceutical substances in ambient particulates: A preliminary assessment. *Chemosphere*, 2017; 183: 62-68.
9. Vazquez-Roig P, Andreu V, Blasco C, Picó Y. Risk assessment on the presence of pharmaceuticals in sediments, soils and waters of the Pego-Oliva Marshlands (Valencia, eastern Spain). *Sci Total Environ*, 2012; 440: 24-32.
10. Shore RF, Taggart MA, Smits J, Mateo R, Richards NL, Fryday S. Detection and drivers of exposure and effects of pharmaceuticals in higher vertebrates. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biol sci*, 2014; 369: 20130570.
11. Cuthbert RJ, Taggart M a, Prakash V, Chakraborty SS, Deori P, et al. Avian scavengers and the threat from veterinary pharmaceuticals. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biol sci*, 2014; 369: 287-304.
12. Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH, Palace VP, Evans RE, et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *PNAS*, 2007; 104: 8897-8901.
13. Harris CA, Hamilton PB, Runnalls TJ, Vinciotti V, Henshaw A, et al. The consequences of feminization in Breeding groups of wild fish. *Environ Health Perspect*, 2011; 119: 306-311.

14. http://www.ema.europa.eu/docs_en_GB/document_library_Scientific_guideline/2009/10/WC500003978.pdf (dostop 9.8.2016)
15. https://kemija.net/e-gradiva/nevarne_snovi/1_1_Strupene_snovi/strupene_snovi.html (dostop 4.10.2017)
16. <https://www.uradni-list.si/glasilo-uradni-list-rs/vsebina?urlid=199936&stevilka=1752> (dostop 21.7.2017)
17. Carvalho RN, Ceriani L, Ippolito A, Lettieri T. Development of the first Watch List under the Environmental Quality Standards Directive. *JRC Science Hub*, 2015; 168.
18. Milmo S. Regulating the Environmental Impact of Pharmaceuticals. *Pharm Technol*, 2014; 38: 18-63.
19. Cacciola F., Maimone M., Dugo P., Mondello L., Green sample-preparation techniques in comprehensive two-dimensional chromatography. *Compr anal chem*, 2017; 76: 601-623.
20. http://www.academia.edu/3641270/Liquid-Liquid_Extraction_Basic_Principles (dostop: 18.7.2017)
21. Müller E, Berger R, Blass E, Sluyts D, Pfennig A. Liquid-Liquid Extraction. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, 2008: 250-300.
22. <https://www.envirotech-online.com/article/environmental-laboratory/7/college-of-science/solid-phase-extraction-and-its-application-in-preconcentration-of-trace-environmental-pollutant-from-wastewater/1937> (dostop 17.7.2017)
23. Andrade-Eiroa A, Canle M, Leroy-Cancellieri V, Cerda V. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review (Part I). *TrAC*, 2016; 80: 641-654.
24. Prieto A, Basauri O, Rodil R, Usobiaga A, Fernández LA, et al. Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *J Chromatogr A*, 2010; 1217: 2642-2666.
25. http://www.anatune.co.uk/wp-content/uploads/2015/07/welsh_water_presentation_02122013.pdf (dostop 12.6.2017)
26. Tramšek S. Primerjava analiznih metod za določanje policikličnih aromatskih ogljikovodikov v vodah, Diplomsko delo. VŠVO, Velenje, 2016.
27. Sarafraz-Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *TrAC*, 2010; 29: 1-14.
28. Rutkowska M, Dubalska K, Konieczka P, Namieśnik J. Microextraction techniques used in the procedures for determining organomercury and organotin compounds in environmental samples. *Molecules*, 2014; 19: 7581-7609.

29. Rasmussen KE, Pedersen-Bjergaard S. Developments in hollow fibre-based, liquid-phase microextraction. *TrAC*, 2004; 23: 1-10.
30. David F, Sandra P. Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *J Chromatogr A*, 2007; 1152: 54-69.
31. Baltussen E, Sandra P, David F, Cramers C. Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: Theory and principles. *J Mic Sep*, 1999; 11: 737-747.
32. http://www.sbsetechnicalmeeting.com/2013/SBSE2013_Training_Frank_David.pdf (dostop 6.6.2017)
33. He M, Chen B, Hu B. Recent developments in stir bar sorptive extraction. *Anal Bioanal Chem*, 2016: 1-26.
34. Lancas FM, Queiroz MEC, Grossi P, Olivares IRB. Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. *J Sep Sci*, 2009; 32: 813-824.
35. Magulova K, Priceputu A. Global monitoring plan for persistent organic pollutants (POPs) under the Stockholm Convention: Triggering, streamlining and catalyzing global POPs monitoring. *Environ Pollut*, 2016; 217: 82-84.
36. Kawaguchi M, Takatsu A, Ito R, Nakazawa H. Applications of stir-bar sorptive extraction to food analysis. *TrAC*, 2013; 45: 280-293.
37. Camino-Sánchez FJ, Rodríguez-Gómez R, Zafra-Gómez A, Santos-Fandila A, Vilchez JL. Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends. *Talanta*, 2014; 130: 388-399.
38. Rykowska I, Wasiak W. Advances in stir bar sorptive extraction coating: A review. *Acta Chromatogr*, 2013; 25: 27-46.
39. Gilart N, Marcé RM, Borrull F, Fontanals N. New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *TrAC*, 2014; 54: 11-23.
40. Quintana J.B., Ramil M., Rodil R., Cela R., New sample preparation strategies for analytical determinations. *Encyclopedia of analytical chemistry*, 2014: 1-98.
41. Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR. *Principles of Instrumental Analysis Sixth Edition*. Thompson Brooks/Cole, 1998.
42. Arbeláez P, Borrull F, Maria Marcé R, Pocurull E. Simultaneous determination of drugs of abuse and their main metabolites using pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Talanta*, 2014; 125: 65-71.
43. Petrovic M, Gros M, Barcelo D. Multi-residue analysis of pharmaceuticals in

- wastewater by ultra-performance liquid chromatography-quadrupole-time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2006; 1124: 68-81.
44. Zakotnik M. Razvoj novega pristopa za ekstrakcijo izbranih zdravilnih učinkovin iz vodnih vzorcev na osnovi sorptivnega mehanizma, Magistrska naloga. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2016.
 45. Haefelfinger P. Limits of the internal standard technique in chromatography. *J Chromatogr A*, 1981; 218: 73-81.
 46. Vanhaecke F, Vanhoe H, Dams R, Vandecasteele C. The use of internal standards in ICP-MS. *Talanta*, 1992; 39: 737-742.
 47. Wieling J. LC-MS-MS experiences with internal standards. *Chromatographia*, 2002; 55: S107-S113.
 48. Andersen JET. The standard addition method revisited. *TrAC*, 2017; 89: 21-33.
 49. Wang J, Wang S. Removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: A review. *JEM*, 2016; 182: 620-640.
 50. Bland JM, Altman DG. Statistical Methods for Assessing Agreement Between Two Methods of Clinical Measurement. *Lancet*, 1986;327: 307-310.
 51. <https://www.labmate-online.com/news/news-and-views/5/breaking-news/what-is-the-difference-between-repeatability-and-reproducibility/30638> (dostop: 21.8.2017)
 52. Thiebault T, Boussafir M, Le Milbeau C. Occurrence and removal efficiency of pharmaceuticals in an urban wastewater treatment plant: Mass balance, fate and consumption assessment. *JECE*, 2017; 5: 2894-2902.
 53. Šuster B. Razvoj stroškovnega modela obratovanja čistilne naprave za komunalne odpadne vode, Magistrska naloga. Ekonomsko-poslovna fakulteta, Univerza v Mariboru, 2016: 11-23.
 54. <http://www.brighthub.com/environment/science-environmental/articles/68537.aspx> (dostop: 27.8.2017)
 55. Beijer K, Björnlén B, Shaik S, Lindberg RH, Brunström B, Brandt I. Removal of pharmaceuticals and unspecified contaminants in sewage treatment effluents by activated carbon filtration and ozonation: Evaluation using biomarker responses and chemical analysis. *Chemosphere*, 2017; 176: 342-351.
 56. Santos LHMLM, Gros M, Rodriguez-Mozaz S, Delerue-Matos C, Pena A, et al. Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals. *Sci Total Environ*, 2013; 461-

- 462: 302-316.
57. Verlicchi P, Al Aukidy M, Galletti A, Petrovic M, Barceló D. Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci Total Environ*, 2012; 430: 109-118.
 58. Papageorgiou M, Kosma C, Lambropoulou D. Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci Total Environ*, 2016; 543: 547-569.
 59. Unceta N, Sampedro MC, Bakar NKA, Gómez-Caballero A, Goicolea MA, Barrio RJ. Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in wastewaters by dual solid-phase microextraction coupled to liquid chromatography electrospray ionization ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 2010; 1217: 3392-3399.