

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA UMNİK

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JANJA UMNİK

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE ZA MERJENJE  
KONCENTRACIJ IZBRANIH UČINKOVIN V POVRŠINSKIH VODAH S  
TEKOČINSKO KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO Z MASNO  
SPEKTROMETRIJO**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN ANALYTICAL METHOD FOR  
QUANTIFICATION OF SELECTED PHARMACEUTICALS IN SURFACE  
WATER SAMPLES BY LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS  
SPECTROMETRY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvomizr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

### **ZAHVALA**

*Najlepše se zahvaljujemizr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., za mentorstvo, strokovno pomoč, potrpežljivost in vse nasvete pri izdelavi magistrske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi asist. Aniti Klančar, mag. farm., za vso pomoč in vodenje skozi laboratorijsko delo.*

*Za prijetno delovno okolje se zahvaljujem tudi vsem ostalim kolegom in zaposlenim na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi magistrske naloge.*

*Velika zahvala gre moji družini in vsem bližnjim, ki so mi študij omogočili in mi ves čas nudili podporo.*

### **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvomizr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Janja Umnik

### **Komisija za zagovor:**

Predsednik:izr. prof. dr. Matjaž Jeras, mag. farm.

Mentor:izr. prof. dr. Robert Roškar, mag. farm.

Član:izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO PREGLEDNIC.....	IV
KAZALO SLIK.....	V
POVZETEK .....	VI
ABSTRACT .....	VII
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VIII
1 UVOD .....	1
1.1 Vnos učinkovin v okolje .....	3
1.2 Pojavnost učinkovin v površinskih vodah .....	4
1.2.1 Nesteroidni antirevmatiki (NSAIR) in analgetiki.....	4
1.2.2 Protimikrobne zdravilne učinkovine .....	4
1.2.3 Antagonisti adrenergičnih receptorjev beta.....	5
1.2.4 Učinkovine za zniževanje maščob in holesterola v krvi.....	5
1.2.5 Antiepileptiki .....	6
1.2.6 Antidepresivi .....	6
1.3 Ekotoksičnost učinkovin v okolju.....	10
1.4 Ekstrakcijske metode za pripravo vzorcev .....	11
1.4.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE).....	11
1.4.2 Tehnologija SPE-DEX .....	13
1.5 Primeri priprave in analize vzorcev površinskih voda.....	13
1.6 Masna spektrometrija.....	15
2 NAMEN DELA.....	17
3 MATERIALI IN METODE .....	18
3.1 MATERIALI .....	18
3.1.1 Standardi.....	18
3.1.2 Interni standardi.....	19

3.1.3	Topila in reagenti.....	19
3.1.4	Vzorci odpadne vode.....	20
3.1.5	Naprave in laboratorijski inventar.....	20
3.2	METODE.....	22
3.2.1	Priprava standardnih raztopin.....	22
3.2.1.1	Primarne osnovne raztopine posameznih učinkovin.....	22
3.2.1.2	Sekundarna osnovna raztopina.....	22
3.2.1.3	Delovna raztopina.....	23
3.2.2	Priprava fosfatnih pufrov.....	23
3.2.2.1	Priprava 25 mM in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pufra s pH 3, pH 4, pH 5, pH 7 in pH 9	23
3.2.3	Priprava topil.....	24
3.2.3.1	Priprava elucijskih topil.....	24
3.2.3.2	Priprava topila za raztapljanje suhega zaostanka.....	24
3.2.4	Ekstrakcija učinkovin iz odpadne vode.....	24
3.2.4.1	Metoda SPE-DEX.....	24
3.2.4.2	Metoda standardnega dodatka.....	26
3.2.5	Optimizacija metode SPE za površinske vode.....	27
3.2.5.1	Priprava vzorca, uporabljenega za razvoj metode.....	27
3.2.5.2	Začetna metoda SPE.....	27
3.2.5.3	Priprava standardne raztopine za izračun izkoristka ekstrakcije z metodo SPE	27
3.2.5.4	Izbor elucijskega topila.....	28
3.2.5.5	Vpliv pH medija na izkoristek ekstrakcije.....	28
3.2.5.6	Izbor trdnega nosilca za ekstrakcijo.....	28
3.2.5.7	Volumen topila za raztapljanje suhega zaostanka.....	29
3.2.5.8	Volumen vzorca za nanos na SPE.....	29

3.2.5.9	Vpliv koncentracije na izkoristek ekstrakcije .....	29
3.2.6	Končna metoda SPE za površinske vode .....	30
3.2.6.1	Metoda SPE.....	30
3.2.6.2	Analiza vzorcev s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo .....	30
3.2.7	Vrednotenje analizne metode za analizo površinskih voda.....	33
3.2.8	Analiza vzorcev površinskih voda.....	36
3.2.8.1	Izračun vsebnosti učinkovin v realnih vzorcih.....	37
3.2.9	Čiščenje .....	37
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	38
4.1	Ekstrakcija učinkovin iz odpadne vode .....	38
4.2	Razvoj metode za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda.....	39
4.2.1	Optimizacija metode za ekstrakcijo učinkovin.....	39
4.2.1.1	Razvoj postopka elucije .....	39
4.2.1.2	Izgube učinkovin pri uporabi novega postopka elucije.....	40
4.2.1.3	Izbor topila za elucijo .....	42
4.2.1.4	Vpliv vrednosti pH vzorca na izkoristek ekstrakcije učinkovin .....	42
4.2.1.5	Ožji izbor vrednosti pH vzorca .....	43
4.2.1.6	Izbor nosilca za ekstrakcijo .....	45
4.2.1.7	Izbira volumna topila za raztapljanje suhega zaostanka .....	45
4.2.1.8	Volumen nanosa vzorca .....	46
4.2.1.9	Vpliv koncentracije učinkovin .....	47
4.2.1.10	Volumen injiciranja vzorca na masnem spektrometru.....	48
4.3	Vrednotenje razvite metode za analizo površinskih voda.....	49
4.4	Prisotnost učinkovin v vzorcih slovenskih površinskih voda.....	55
5	ZAKLJUČEK.....	59
	LITERATURA.....	61

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Pregled izmerjenih koncentracij (ng/L) izbranih učinkovin v površinskih vodah. ....	7
Preglednica II: Priprava nekaterih vzorcev površinske vode. ....	14
Preglednica III: Povzetek glavnih značilnosti nosilcev za ekstrakcijo. ....	21
Preglednica IV: Faktorji prilagoditve koncentracij pri pripravi sekundarnih osnovnih raztopin za SPE. ....	22
Preglednica V: Priprava elucijskih topil. ....	24
Preglednica VI: Postopek priprave vzorcev vode iz ČN. ....	25
Preglednica VII: Koraki metode ekstrakcije na SPE-DEX. ....	25
Preglednica VIII: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze v odvisnosti od časa. ....	31
Preglednica IX: Nastavitve ionskega izvora. ....	31
Preglednica X: Retencijski časi, prehodi MRM, napetosti fragmentorja, kolizijske energije in polaritete (P) izbranih učinkovin. ....	32
Preglednica XI: Podatki o vzorcih, uporabljenih za vrednotenje linearnosti metode. ....	34
Preglednica XII: Podatki o vzorcih, uporabljenih za vrednotenje ponovljivosti metode. ....	35
Preglednica XIII: Začetne vrednosti pH ter kraji in datumi zajema vzorcev površinskih voda. ....	36
Preglednica XIV: Primerjava ponovljivosti postopka ekstrakcije in zaostanki učinkovin v kartušah po eluciji. ....	40
Preglednica XV: Povprečni relativni izkoristki in ponovljivosti (RSD, n = 3) pri različnih pH vrednostih pufra (n = 39). ....	43
Preglednica XVI: Linearnost injiciranja različnih volumnov vzorcev: 1 $\mu$ L, 1,5 $\mu$ L, 2 $\mu$ L in 2,5 $\mu$ L na LC-MS/MS. ....	48
Preglednica XVII: Validacijski parametri analizne metode za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda. ....	52
Preglednica XVIII: Rezultati analize vzorcev površinskih voda. ....	55

## KAZALO SLIK

Slika 1: Trend porabe zdravil v posameznih ATC-skupinah glede na število DDD v letih 2009 do 2016 (1). .....	1
Slika 2: Usoda učinkovin v okolju; povzeto po (9). .....	3
Slika 3: Shematski prikaz postopka SPE (kondicioniranje, nanos vzorca, spiranje, elucija). Rdeči trikotniki predstavljajo iskani analit, kvadrati, zvezdice in krogi pa nečistote; povzeto po (54). .....	12
Slika 4: Shema trojnega kvadрупolnega masnega spektrometra; povzeto po (45). .....	15
Slika 5: Metoda standardnega dodatka; prirejeno po (47). .....	26
Slika 6: Sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu. ....	30
Slika 7: Koncentracijska območja učinkovin, najdenih v odpadnih vodah. ....	38
Slika 8: Povprečni relativni izkoristki in povprečne ponovljivosti (RSD, n = 3) pri uporabi različnih elucijskih topil (n = 39). ....	42
Slika 9: Povprečni relativni izkoristki in ponovljivosti (RSD, n = 3) pri različnih vrednostih pH (n = 39). ....	43
Slika 10: Povprečni relativni izkoristki in ponovljivosti (n = 3) učinkovin ekstrahiranih na različnih trdnih nosilcih (n = 39). ....	45
Slika 11: Relativni povprečni izkoristki in ponovljivosti (n = 6) pri različnih volumnih topila za raztapljanje suhega zaostanka (n = 39). ....	46
Slika 12: Vpliv volumnov nanosa vzorca na izkoristke učinkovin (n = 39). ....	47
Slika 13: Vplivi koncentracij učinkovin na relativni izkoristek in vrednost RSD (n = 39). ....	48
Slika 14: Grafični prikaz pogostosti prisotnosti učinkovin v vzorcih izbranih slovenskih površinskih voda. ....	57



## POVZETEK

Poraba zdravil se iz leta v leto konstantno povečuje in s tem tudi njihov vnos in pojavnost v okolju, v katerem lahko delujejo potencialno škodljivo. V magistrski nalogi smo najprej ugotavljali prisotnost 111 učinkovin v vzorcih odpadne vode iz iztokov štirih čistilnih naprav. Vzorce smo analizirali z delno avtomatizirano metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE-DEX), sledila ji je analiza s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno z masnim spektrometrom (LC-MS/MS).

S pomočjo rezultatov analize vzorcev odpadnih voda smo izbrali 44 učinkovin, za katere smo razvili postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE) iz površinskih voda. Glavni cilj magistrske naloge je bil razviti in ovrednotiti metodo za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda. Izbirali smo med štirimi elucijskimi topili, ki so bila mešanica metanola, acetonitrila, dodali pa smo še mravljinčno kislino in izopropanol. Preizkusili smo tri različne sorbente. Pripravili smo vzorce z različnimi pH-vrednostmi ter izbirali med različnimi volumni nanosa (100–1.000 mL). Preverili smo še različne volumne topila za raztopitev suhega zaostanka. Najustreznejše pogoje smo izbrali na podlagi izračunanih izkoristkov in ponovljivosti postopka. Najvišje izkoristke in najboljšo ponovljivost smo dobili, če smo 200 mL vzorca uravnali na pH 4, eluirali s topilom metanol : acetonitril = 3 : 1 in suh zaostanek raztopili v 150  $\mu$ L topila. Instrumentalno analizo vzorcev tekom razvoja in ovrednotenja smo izvedli z LC-MS/MS. Novi metodi smo vrednotili linearnost v območju 8–1.600 ng/L (gledano za faktor prilagoditve koncentracije 1), ki je bila za večino učinkovin nad 0,996 in ponovljivost <7 %. Kriterija točnosti ni doseglo 7 učinkovin, metoda pa je 100-odstotno točna za tramadol. Meje določitve so bile v nizkem ng/L koncentracijskem območju, za polovico pod 1 ng/L in le za nekatere nad 40 ng/L.

Metodo smo uporabili na petih vzorcih rek in enem vzorcu iz jezera. Zaznali smo 43 učinkovin, od tega kar 24 v vsaj štirih vzorcih. Osemnajst učinkovin smo kvantitativno ovrednotili, irbesartan, kofein in valsartan pa smo izmerili v vseh šestih vzorcih. Najnižje izmerjene koncentracije je imel vzorec iz jezera, kjer smo izmerili tudi absolutno najnižjo koncentracijo 0,08 ng/L za venlafaksin. Najvišje izmerjene koncentracije so znašale 47,23, 44,57 in 18,56 ng/L za valsartan, gabapentin in tramadol.

**Ključne besede:** zdravilne učinkovine, površinske vode, ekstrakcija na trdnem nosilcu, LC-MS/MS.

## ABSTRACT

Consumption of pharmaceuticals increases year by year and, as a consequence, their introduction to and occurrence in the environment in which they can cause potential negative effects increases as well. In this master's thesis, we first performed a screening of 111 pharmaceuticals in samples of wastewater from the outflows of four treatment plants. We analyzed the samples using a semi-automated solid extraction method (SPE-DEX), followed by liquid chromatography coupled with mass spectrometer analysis (LC-MS/MS).

Using the results of the wastewater sample analysis, we selected 44 pharmaceuticals for which a solid-phase extraction method was developed. The main goal of this master's thesis was to develop and validate the method for the extraction of pharmaceuticals from surface waters. We chose between 4 elution solvents consisting of a mixture of methanol, acetonitrile, and formic acid or isopropanol. We tested three different cartridges, prepared samples with different pH values and selected various application volumes ranging from 100–1.000 mL. We also tested different volumes of the reconstitution solvent. The most optimal conditions were selected based on the calculated recovery. The highest recovery and the best repeatability were obtained when a 200 mL water sample was adjusted to pH 4, eluted with MeOH : ACN = 3 : 1 and 150  $\mu$ L of a reconstitution solvent was added. The instrumental analysis of the samples during the development and validation was performed by LC-MS/MS. The new method was validated and linearity range was established in the range of 8–1.600 ng/L (for the concentration adjustment factor of 1), and for most pharmaceuticals it was above 0.996 with the reproducibility < 7%. Seven pharmaceuticals did not pass the accuracy criterion, but the method is 100% accurate for tramadol. The limit of quantification was in a low ng/L concentration range, for one half of the pharmaceuticals below 1 ng/L and only for some above 40 ng/L.

We applied the method to five samples from the rivers and to one sample from the lake. We detected 43 pharmaceuticals, 24 of which in at least four samples. The concentration in the samples was measured for 18 pharmaceuticals; irbesartan, caffeine and valsartan were measured in all six samples. The lowest measured concentrations had the sample from the lake, where the absolute minimum concentration of 0.08 ng/L for venlafaxine was measured. The highest measured concentrations were 47.23, 44.57 and 18.56 ng/L for valsartan, gabapentin, and tramadol, respectively.

**Keywords:** pharmaceuticals, surface water, solid phase extraction, LC-MS/MS

## SEZNAM OKRAJŠAV

**ACN** – acetonitril

**ATC** – anatomsko-terapevtsko-kemična klasifikacija zdravil

**ČN** – čistilna naprava

**DDD** – definiran dnevni odmerek (angl. *defined daily dose*)

**EC<sub>50</sub>** – koncentracija snovi, pri kateri pride ob izpostavljenosti do učinka na 50 % izpostavljenih organizmov

**ESI** – elektrorazprševalna ionizacija (angl. *electrospray ionization*)

**FDA** – Agencija za hrano in zdravila (angl. *Food and Drug Administration*)

**FPK** – faktor prilagoditve koncentracije

**GS-MS** – plinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (angl. *gas chromatography – mass spectrometry*)

**GS-MS/MS** – plinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (angl. *gas chromatography coupled with tandem mass spectrometry*)

**iPrOH** – 2-propanol

**IS** – interni standard

**LC-MS** – tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (angl. *liquid chromatography – mass spectrometry*)

**LC-MS/MS** – tekočinska kromatografija, sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (angl. *liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry*)

**LOD** – meja zaznave (angl. *limit of detection*)

**LOQ** – meja določitve (angl. *limit of quantitation*)

**ME** – učinek matrice (angl. *matrix effect*)

**MeOH** – metanol

**MRM** – multirezidualna metoda

**MS** – masni spektrometer, masna spektrometrija

**nd** – učinkovina ni zaznana

**NSAIR** – nesteroidni antirevmatiki

**QQQ** – trojni kvadrupol (angl. *triple quadrupole*)

**R<sup>2</sup>** – determinacijski koeficient

**RSD** – relativni standardni odklon

**SOR I, SOR II** – sekundarna osnovna raztopina

**SPE** – ekstrakcija na trdnem nosilcu (angl. *solid-phase extraction*)

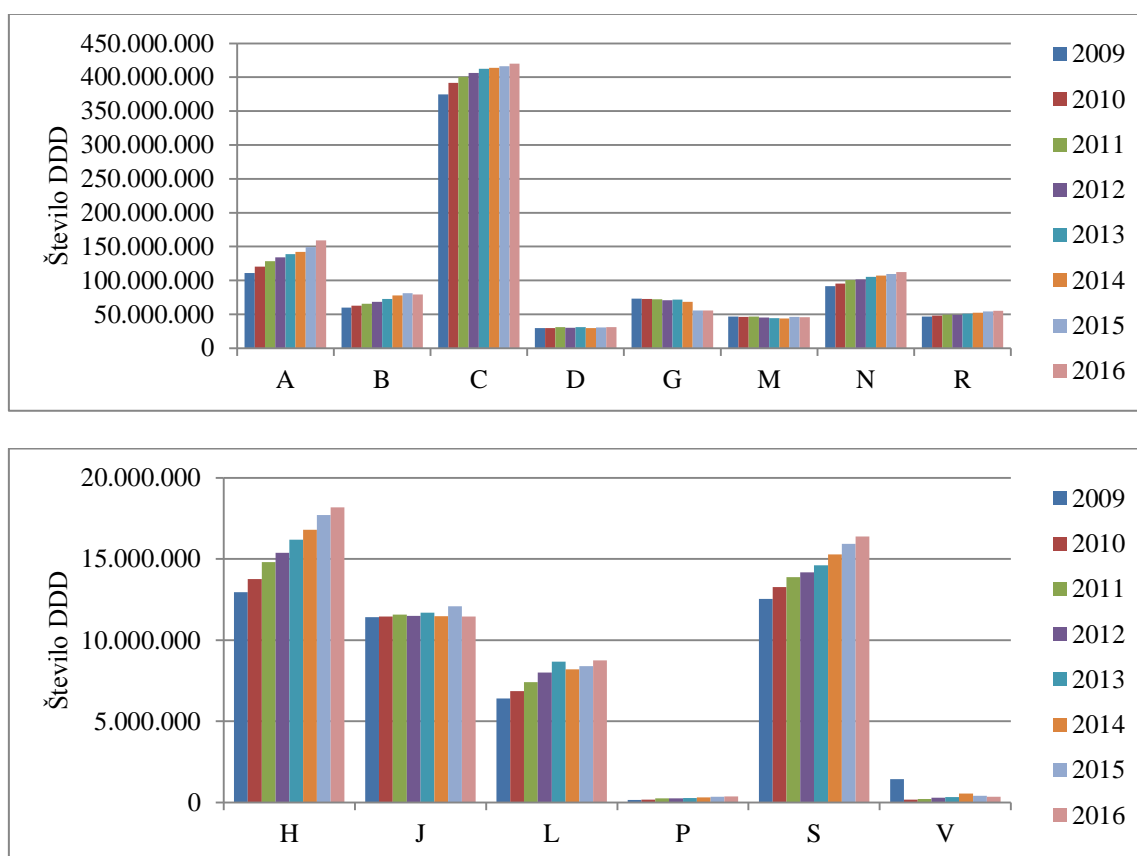
**SPE-DEX** – polavtomatski SPE-sistem SPE-DEX<sup>®</sup> 4790, Horizon Technology

**VB** – Velika Britanija

**ZDA** – Združene države Amerike

## 1 UVOD

Porabo zdravil v Sloveniji spremlja Nacionalni inštitut za javno zdravje. Po priporočilih Svetovne zdravstvene organizacije (angl. *World Health Organisation (WHO)*) te podatke prikazujejo po ATC/DDD-metodologiji (1). Anatomsko-terapevtsko-kemična oz. ATC-klasifikacija razvršča zdravilne učinkovine v skupine glede na organ ali sistem, na katerega delujejo, in njihove terapevtske, farmakološke in kemične lastnosti (2). Definiran dnevni odmerek (DDD) pa je povprečni vzdrževalni odmerek zdravila, ki ga odrasel bolnik prejme v enem dnevu za zdravljenje glavne indikacije z zdravilom. Podatki, predstavljeni v obliki DDD, se uporabljajo za primerjavo porabe zdravil, ne prikazujejo pa dejanske uporabe zdravila (3). V publikaciji *Poraba zdravil v Sloveniji v letu 2016* so zbrani podatki porabe zdravil od leta 2009 do 2016.



**Slika 1: Trend porabe zdravil v posameznih ATC-skupinah glede na število DDD v letih 2009 do 2016 (1).**

Porast števila DDD je konstantno prisoten v skoraj vseh skupinah zdravil, kar vidimo na sliki 1. V skupini J (zdravila za sistemska zdravljenje infekcij) in skupini V (razna zdravila) je število DDD v zadnjem letu padlo, večletni padajoči trend pa ima skupina G

(zdravila za bolezni sečil in spolovil ter spolni hormoni) (1). Povečano uporabo zdravil lahko pripišemo visokemu življenjskemu standardu, daljšanju življenjske dobe in posledično povečanemu deležu starostnikov.

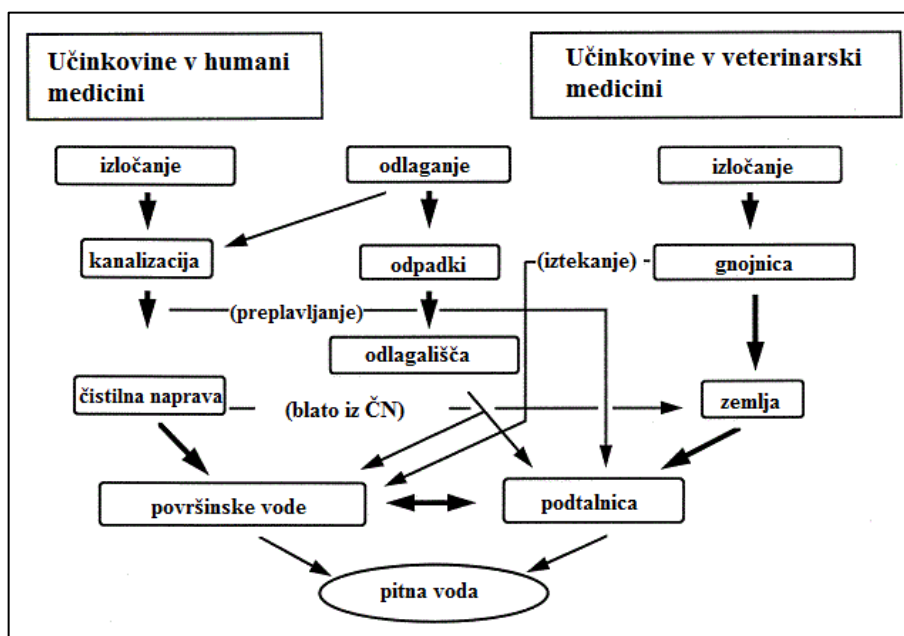
Poraba zdravil se ne veča samo v Sloveniji, ampak po celi Evropi. Leta 2015 je Evropska komisija sprejela izvedbeni sklep 2015/495 o določitvi nadzornega seznama snovi za spremljanje na ravni Unije na področju vodne politike v skladu z Direktivo 2008/105/ES Evropskega parlamenta in Sveta. Na seznam so vključili snovi, ki bi lahko pomenile znatno tveganje za vodno okolje. Poleg herbicidov, insekticidov, pesticidov in snovi, ki se uporabljajo v kozmetični industriji, so na seznam uvrstili še 7 farmacevtikov: diklofenak, tri steroidne hormone (17-alfa-etinilestradiol, 17-beta-estradiol, estron) in tri makrolidne antibiotike (eritromicin, klaritromicin, azitromicin) (4).

Izraz »farmacevtiki« (angl. *pharmaceuticals*) se že dolgo uporablja v tuji, predvsem angleški literaturi. Zadnje čase njegova uporaba v slovenskem jeziku narašča, zato bo tudi uporabljen skozi celotno magistrsko nalogo. Izraz se največkrat uporablja v povezavi z okoljskimi problemi. S tem poimenovanjem poudarimo, da so to učinkovine, ki imajo farmakološki učinek, obenem pa lahko škodujejo netarčnim organizmom. Med farmacevtike spadajo učinkovine, ki se uporabljajo v humani medicini, in učinkovine, ki se uporabljajo v veterinarski medicini (5). Uvrščamo jih v razred novih okoljskih onesnažil (angl. *emerging environmental contaminants*), katerim v zadnjih dveh desetletjih namenimo veliko pozornosti (6). Farmacevtiki se v okolje konstantno vnašajo in so prisotni v nizkih koncentracijah, ki lahko vplivajo na ekosistem, kakovost vode ter posledično humano in živalsko zdravje. Razvoj novih analiznih metod (tekočinska kromatografija, sklopljena z masno spektrometrijo (LC-MS), tandemska masna spektrometrija (LC-MS/MS)) je omogočil njihovo zaznavo v zelo nizkih koncentracijah. Ovrednotimo lahko analite v koncentracijah ng/L v različnih kompleksnih vzorcih, ki so lahko v trdnem (sediment) ali tekočem stanju (odpadne vode, površinske vode, podtalnica) (7).

## 1.1 Vnos učinkovin v okolje

Poti vnosa učinkovin v okolje za učinkovine za humano uporabo in učinkovine, ki se uporabljajo v veterini, se razlikujeta (8). Prikazani sta na sliki 2.

Učinkovine, ki jih zaužijejo ljudje, se z urinom in/ali fecesom izločijo v nespremenjeni obliki ali kot metabolit. Izločajo se v odpadno vodo, ki vstopa v komunalne čistilne naprave (ČN). Tam se učinkovine le redko v celoti odstranijo in posledično iztekajo v reke, jezera, redkeje v podtalnico ali pitno vodo (8, 10). Skozi ČN se v okolje iztekajo tudi pretečena in neuporabljen zdravila, odpadne vode iz bolnišnic in odpadne vode proizvajalcev zdravil (8, 11). Vir onesnaženja okolja so lahko tudi same ČN, saj se blato iz ČN pogosto uporablja za gnojenje polj (10).



Slika 2: Usoda učinkovin v okolju; povzeto po (9).

Učinkovine, ki se uporabljajo v veterinarske in živalorejske namene, se prav tako izločajo z urinom in/ali fecesom (8). Dobljena gnojnica, ki se uporablja za gnojenje polj, se lahko izteka v površinske vode ali pa pronica v podtalnico (10). Neposredno pa vodne sisteme onesnažujejo ribogojnice (akvakultura), saj se učinkovine ribam dajejo neposredno v vodo (8).

Neposredno odlaganje zdravil v okolje z gospodinjskimi odpadki predstavlja tretjo pot vnosa. Študentje programa Tehniško varstvo okolja so proučevali ravnanje in gospodarjenje z odpadki v gospodinjstvih. Anketirali so 190 ljudi in le 33 % anketirancev odpadna zdravila vrne v lekarno, pelje v zbirni center ali premično zbiralnico (12).

Zdravila, odvržena med gospodinjske odpadke, odpeljejo na odlagališča, od koder se lahko izlivajo v površinske vode ali pronicajo v podtalnico.

## **1.2 Pojavnost učinkovin v površinskih vodah**

Farmacevtiki so nova okoljska onesnažila, katerih poraba se konstantno večja. Skoraj tri desetletja nazaj so se raziskovalci začeli bolj zanimati za farmacevtike v okolju. Leta 2010 so v primerjavi z letom 2000 objavili kar petkrat več člankov na to temo (13). Zaznali so jih v nizkih koncentracijah v različnih okoljskih vzorcih, npr. odpadnih vodah, podtalnici, morski vodi in v površinskih vodah (14).

Najpogosteje uporabljene terapevtske skupine učinkovin za humano uporabo so nesteroidni antirevmatiki (NSAIR), analgetiki, antibiotiki, antagonisti adrenergičnih receptorjev beta, učinkovine za zniževanje vsebnosti maščob in holesterola v krvi, steroidni hormoni, antiepileptiki, antidepresivi, pomirjevala, antineoplastiki in diuretiki (14). V preglednici I so zbrani rezultati nekaterih meritev učinkovin v površinskih vodah.

### **1.2.1 Nesteroidni antirevmatiki (NSAIR) in analgetiki**

Nesteroidni antirevmatiki se uporabljajo za lajšanje bolečin, zdravljenje vnetja in zniževanje vročine (15). Reverzibilno ali ireverzibilno zavirajo encim ciklooksigenazo (COX-1 ali COX-2 izoformo), ki sodeluje pri sintezi prostaglandinov iz arahidonske kisline (16). Ibuprofen, naproksen, acetilsalicilno kislino in paracetamol so zaznali v odpadnih vodah, morski vodi in v površinskih vodah (10).

V Južni Afriki so v reki izmerili paracetamol v koncentraciji 0,99–1,74 µg/L in ibuprofen 4,7–84,6 µg/L (18). V Veliki Britaniji (VB) so v dveh rekah merili 10 učinkovin. Najvišje izmerjene koncentracije učinkovin so bile paracetamol 2.382 ng/L, ibuprofen 100 ng/L, diklofenak 261 ng/L, naproksen 146 ng/L, acetilsalicilna kislina 32 ng/L, salicilna kislina 302 ng/L in tramadol 7.731 ng/L (19).

### **1.2.2 Protimikrobne zdravilne učinkovine**

V širšem pomenu so antibiotiki kemoterapevtska sredstva, ki zavirajo ali uničijo rast mikroorganizmov (bakterije, glive, protozoje). So raznolika skupina učinkovin, registriranih jih je približno 250. Razlikujejo se po strukturi in mehanizmu delovanja.



Poznamo  $\beta$ -laktame, kinolone, tetracikline, makrolide, sulfonamide in ostale. Poleg uporabe v humani medicini se obsežno uporabljajo tudi v veterini in agrokulturi (17).

Iz odpadne vode se protimikrobne zdravilne učinkovine v čistilnih napravah le delno očistijo. Zaznali so jih v sedimentu, blatu čistilnih naprav, odpadni vodi in v površinskih vodah, v pitni vodi zelo redko (17).

V Avstraliji so iskali tri protimikrobne zdravilne učinkovine, in sicer ciprofloksacin, norfloksacin in cefaleksin. Izmerili so jih v naslednjih koncentracijah: (nd – učinkovina ni bila zaznana) nd-41,5 ng/L, nd-80,0 ng/L in 15,4-26,8 ng/L (20). V Južni Afriki so v petih vzorcih izmed petih merjenih protimikrobnih zdravilnih učinkovin zaznali štiri. Trimetoprim s koncentracijo nd-0,29  $\mu\text{g/L}$ , sulfametoksazol nd-5,32  $\mu\text{g/L}$ , eritromicin nd-0,26  $\mu\text{g/L}$  in sulfametazin nd-1,09  $\mu\text{g/L}$ . Metronidazola niso zaznali (18). V Veliki Britaniji so zaznali 6 različnih protimikrobnih zdravilnih učinkovin. Najvišje koncentracije so bile za trimetoprim 183 ng/L, sulfametoksazol 4 ng/L, amoksicilin 622 ng/L, kloramfenikol 40 ng/L, eritromicin 351 ng/L in metronidazol 24 ng/L (19).

### 1.2.3 Antagonisti adrenergičnih receptorjev beta

Antagonisti adrenergičnih receptorjev beta oz. beta blokatorji kompetitivno zavirajo  $\beta$ -adrenergične receptorje. Najpogosteje uporabljeni beta blokatorji so atenolol, metoprolol (delujeta na  $\beta_1$  receptorje) in propranolol, ki je neselektiven in deluje na receptorje  $\beta_1$  in  $\beta_2$  (16). Uporabljajo se za zdravljenje kardiovaskularnih bolezni (visok krvni tlak, angina pectoris, aritmije) (15).

V okolju so prisotni v odpadni in površinski vodi ter v podtalnici (10). V površinski vodi so v Veliki Britaniji izmerili propranolol, metoprolol in atenolol. Najvišje koncentracije so bile za atenolol 560 ng/L, propranolol 91 ng/L in metoprolol 12 ng/L (19).

### 1.2.4 Učinkovine za zniževanje maščob in holesterola v krvi

Zdravila za zmanjšanje kroženja holesterola in trigliceridov v krvi so ena izmed najpogosteje predpisanih zdravil (16). Po mehanizmu delovanja jih ločimo na statine in fibrate. Statini zmanjšujejo sintezo holesterola z reverzibilnim kompetitivnim zaviranjem 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktaze, fibrati pa se povežejo in aktivirajo receptor PPAR $\alpha$ , kar vodi v  $\beta$ -oksidacijo maščobnih kislin in povečano sintezo lipoprotein lipaze (15).

Klofibrično kislino, ki je aktivni metabolit klofibrata, so v koncentraciji 14–164 ng/L izmerili v dveh rekah v VB. Izmerili so še benzafibrat (<10–66 ng/L) in zaznali simvastatin in pravastatin (19).

### **1.2.5 Antiepileptiki**

Antiepileptiki preprečujejo epileptične napade z zniževanjem nevronske aktivnosti v centralnem živčnem sistemu. Delujejo po treh različnih mehanizmih. Karbamazepin, ki se ga zaradi manj neželenih učinkov pogosto predpisuje, zavira napetostno odvisne natrijeve kanalčke v nevronu (15).

V reki v Južni Afriki so izmerili 0,13–3,24 µg/L karbamazepina (18), v VB pa 9–356 ng/L. Izmerili pa so še gabapentin, v koncentraciji 27–1.887 ng/L (19).

### **1.2.6 Antidepresivi**

Serotonin je živčni prenašalec, ki regulira imunski sistem, apetit, spanje, čustva in razpoloženje. Selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina so najpogosteje predpisana zdravila za zdravljenje depresije (10).

Na Portugalskem so izmerili paroksetin v koncentraciji nd-25,6 ng/L, venlafaksin v koncentraciji nd-159 ng/L, sertralin pa je bil pod mejo določitve. Sertralin so izmerili tudi v jezeru na Kitajskem, najvišja izmerjena vrednost je znašala 10 ng/L.

**Preglednica I: Pregled izmerjenih koncentracij (ng/L) izbranih učinkovin v površinskih vodah.**

Država	Južna Afrika	Velika Britanija	Poljska	Francija	Portugal ska	Kitajska	Portugal ska	ZDA	Avstralija	vseevropska
Vzorec	1 reka	2 reki	1 reka	1 reka	1 reka	Jezero	1 reka	Jezero	Reka	Več 100 rek
Učinkovina	L-H	L-H	L-H	L-H	L-H	L-H	L-H	L-H	L-H	Povp.
<b>atenolol</b>		<1-560	<0,2-22							
<b>azitromicin</b>					32,15-35,66		nd-29,6	<LOD-22		
<b>ciprofloksacin</b>				6,4-6,6	nd	2,9-43	nd-88,7	<LOD	nd-41,5	
<b>diazepam</b>							nd			
<b>diklofenak</b>		<0,5-261			25,13-51,24	nd-26	nd-38			17
<b>furosemid</b>		<6-630								
<b>gabapentin</b>		<0,6-1.887	42-75							
<b>gemfibrozil</b>				155,2-166,5	6,69-10,34	nd		<LOD-43		29
<b>karbamazepin</b>	130-3.240	<0,5-684	311-794	16,5-17,2	<LOQ	1-6,6	24,9-214	<LOD-38		248

<b>klaritromicin</b>					24,80– 39,10		nd-26,8	<LOD		
<b>kofein</b>	nd- 33.200							18–230		963
<b>metformin</b>								110– 9.200		
<b>metoprolol</b>		<0,5–12	51–155							
<b>naproksen</b>		<0,3–146			nd	nd-22	nd-260	<LOD-19		38
<b>norfloksacin</b>				7,1–7,7		5,2–45		<LOD	nd-80,0	
<b>paracetamol</b>	990- 1.740	<1,5– 2.382	11–58		<LOQ- 69,15		nd-527	<LOD-73		
<b>paroksetin</b>							nd-25,6			
<b>propranolol</b>		<0,5–91	<LOQ			nd-31				
<b>ranitidin</b>		<3–73	<LOQ					<LOD-27		
<b>sertralin</b>					23,30– 23,30	nd-10	nd-<LOQ			
<b>sulfametoksazol</b>	nd-5.320	<0,5–4	26–60	11,1– 11,7		7,6–91	nd-43	<LOD-77		76
<b>tramadol</b>		<30– 7.731	425– 2.108							

<b>trimetoprim</b>	nd-290	<1,5–183	<0,5–27	21,9– 22,7			nd	<LOD-52		
<b>valsartan</b>		<0,5–144	20–133							
<b>venlafaksin</b>							nd-159			
Vir	(18)	(19)	(21)	(22)	(23)	(24)	(25)	(26)	(20)	(27)
<p><b>Legenda:</b> nd (ni zaznan), &lt;LOD (pod mejo zaznave), &lt;LOQ (pod mejo določitve), L-H (najnižja-najvišja izmerjena vrednost), Povp. (povprečna izmerjena vrednost)</p>										

### 1.3 Ekotoksičnost učinkovin v okolju

Farmacevtiki se v okolje konstantno sproščajo in so stalno prisotni v nizkih koncentracijah. Večina farmacevtikov je razvitih z namenom, da delujejo specifično na določeno metabolno ali molekularno pot v ljudeh in živalih (10). Organizmi, ki se nahajajo v okolju in vsebujejo podobne presnovne poti, receptorje ali biomolekule, so nenamerno izpostavljeni aktivnim substancam in njihovim učinkom, ki so lahko tudi negativni (16).

Ekotoksičnost farmacevtikov največkrat določajo v laboratorijih s standardiziranimi testi akutne toksičnosti, ki temeljijo na smernicah OECD (28, 29). Izvajajo se na različnih trofičnih nivojih organizmov, kot so alge, zooplankton, nevretenčarji in ribe (28).

Testiranje vodne ekotoksičnosti po navadi poteka v kontroliranih laboratorijskih pogojih za posamezno spojino na določeni indikatorski vrsti. Določi se akutna toksičnost in vrednost  $EC_{50}$  (koncentracija snovi, pri kateri pride ob izpostavljenosti do učinka na 50 % izpostavljenih organizmov). Najpogosteje meritve izvajajo na vodnih bolhah (*Daphnia magna*). Na podlagi vrednosti  $EC_{50}$  je Evropska komisija klasificirala spojine v tri razrede: 10–100 mg/L škodljive, 1–10 mg/L toksične in <1 mg/L zelo toksične za vodne organizme. V razred škodljivih učinkovin spadajo NSAIR (diklofenak, ibuprofen in naproksen), analgetik paracetamol, regulator lipidov benzafibrat, klofibrična kislina, karbamazepin in trimetoprim. Antibiotiki ofloksacin, sulfametoksazol, oksitetraciklin in eritromicin pa so klasificirani kot toksične učinkovine za vodne organizme (30, 31).

Trenutno v študijah največkrat določajo akutno toksičnost, podatkov o bioakumulaciji in kronični toksičnosti pa je zelo malo. Učinkovine, ki so največkrat zajete v določanje ekotoksičnosti, so NSAIR, regulatorji lipidov, antibiotiki in spolni hormoni (16).

Potočno postrv (*Salmo trutta* f. *fario*) so izpostavili diklofenaku, ki je ena izmed najpogosteje najdenih učinkovin v površinskih vodah. Po 7 in 14 dneh je prišlo do znižanja hematokrita, po 21 dneh pa do povečane infiltracije monocitov v jetra, razširitve kapilar v škrgah in manjše tubularne nekroze v ledvicah. Izmerili so tudi povišane vrednosti granulocitov v škrgah in ledvicah (32).

Na ribi rdečeoki (*Rutilus rutilus*) so v rekah v Veliki Britaniji dokazali vpliv hormonskih motilcev. Ujetim ribam so odvzeli kri, odstranili spolne žleze in jih izmerili ter stehali. Ugotovili so, da je bilo veliko število ujetih rib interspolnih (hkratna prisotnost moških in ženskih spolnih žlez). Izmerili so tudi visoke plazemske koncentracije vitelogenina (33).

Atorvastatin, paracetamol, kofein, sulfametoksazol, karbamazepin, levofloksacin, sertralin in trimetoprim so Brian in sodelavci uporabili v študiji fitotoksičnosti na dveh rastlinah, sibirskem rmancu (*Myriophyllum sibiricum*) in grbasti vodni leči (*Lemna gibba*). Za 35 dni so ju izpostavili mešanici učinkovin in ugotovili koncentracijsko odvisno fitotoksičnost. Pri izpostavitvi posameznim učinkovinam so se sulfametoksazol, levofloksacin in atorvastatin izkazali za najbolj toksične (34).

## 1.4 Ekstrakcijske metode za pripravo vzorcev

Proces priprave vzorca je eden izmed najpomembnejših korakov v analizi organskih spojin v okoljskih vodnih vzorcih. Lahko ima zelo velik vpliv na analizne rezultate, saj lahko z neustrezno pripravo vzorca med samim postopkom izgubimo iskane spojine, vzorec kontaminiramo ali pa se ne znebimo nečistot, ki lahko vplivajo na analizne instrumente (36).

Površinske vode poleg preiskovanih učinkovin vsebujejo še druge naravne komponente (trde delce, sluzi, maščobe, mikroorganizme itd.), ki tvorijo ozadje oz. matriks. Ozadje lahko pomembno vpliva na ionizacijo preiskovanih analitov tekom masne spektrometrije. Odziv analita se lahko zaradi vpliva ozadja poveča oz. zmanjša, lahko pride do slabe ponovljivosti, linearnosti in napak pri kvantifikaciji (37).

Analizni proces je navadno sestavljen iz petih korakov: vzorčenja, priprave vzorcev, ločitve analitov, njihove detekcije in analize podatkov. Za vzorčenje in pripravo vzorcev porabimo največ časa (38).

Obstaja več ekstrakcijskih metod za pripravo vzorcev. Pogosto se uporabljajo: ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE), ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE), mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME), sorpcijska ekstrakcija z mešalno paličico (SBSE), ekstrakcija na osnovi membrane (MBE), mikroekstrakcija s tekočo fazo (LPME), superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE), ekstrakcija pod povišanim tlakom (PLE), disperzivna ekstrakcija na trdnem nosilcu (DSPE), ekstrakcija z ultrazvokom (USE), ekstrakcija z mikrovalovi (MASE) (39).

### 1.4.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE)

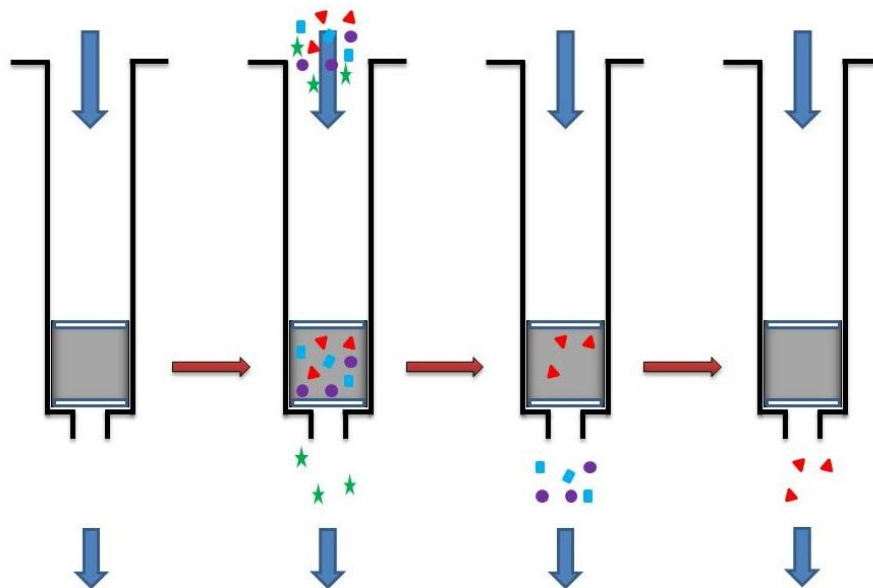
Klasično ekstrakcijo tekoče-tekoče je v zadnjem času zamenjala ekstrakcija na trdnem nosilcu. V primerjavi z LLE ima višje izkoristke, izboljšano selektivnost, specifičnost in

ponovljivost, manjšo porabo organskih topil, krajši čas priprave vzorca, lažja je za izvedbo ter možnost avtomatizacije (sistemi SPE-DEX in on-line) (39).

SPE temelji na porazdelitvi analitov med tekočo fazo (vzorec) in trdno fazo. Snovi morajo imeti pri nanosu večjo afiniteto do trdne faze kot pa do komponent v vzorcu, zato je izbira ustreznega sorbenta zelo pomembna (39).

Postopek SPE, ki je prikazan na sliki 3, sestavljajo:

- ❖ aktivacija stacionarne faze (kondicioniranje), ki omogoči vezavo spojin;
- ❖ nanos vzorca, ki ga pred tem filtriramo (če je potrebno);
- ❖ spiranje sorbenta, da odstranimo neželene spojine;
- ❖ sušenje;
- ❖ elucija analitov s sorbenta;
- ❖ odhlapevanje elucijskega topila;
- ❖ raztapljanje posušenega zaostanka v topilu, ki je primerno za analizo (39).



**Slika 3: Shematski prikaz postopka SPE (kondicioniranje, nanos vzorca, spiranje, elucija). Rdeči trikotniki predstavljajo iskani analit, kvadrati, zvezdice in krogi pa nečistote; povzeto po (54).**

Izbira ustreznega sorbenta je zelo pomembna, saj vpliva na selektivnost, afiniteto in kapaciteto vezave. Katerega bomo izbrali, je odvisno od spojin, ki jih želimo analizirati, ter od interakcij med sorbentom in funkcionalnimi skupinami spojin (39). Poznamo tri glavne skupine sorbentov: anorganski oksidi (silicijev dioksid, aluminijevi in magnezijevi



silikati), nizko-specifični sorbenti (porozni polimerni materiali, npr. polistiren-divinilbenzen) in specifični sorbenti (za specifično spojino ali skupino spojin; npr. nanomateriali na ogljikovi osnovi – fuleren, grafen) (40).

Na trgu obstaja več oblik kartuš za metodo SPE. Tradicionalno jo izvajamo s propilenskimi ali steklenimi kartušami različnih velikosti, v katerih je sorbent. Obstajajo pa še ekstrakcijski diski (delci stacionarne faze so vgrajeni v membrano), nastavki za pipete s stacionarno fazo in plošče z večjim številom kartuš (96, 384 in 1.536 kartuš na plošči) (40). Najpogosteje uporabljene kartuše za analizo vodnih vzorcev so C18, Lichrolut ENV+, Oasis<sup>®</sup> HLB in Strata-X.

#### **1.4.2 Tehnologija SPE-DEX**

SPE-DEX<sup>®</sup> 4790 (Horizon Technology) je delno avtomatiziran sistem SPE. Uporablja se za ekstrakcijo spojin iz vodnih vzorcev (odpadna voda, površinska voda, podtalnica, pitna voda). Deluje na principu metode SPE, le da so nekateri koraki pri pripravi vzorca avtomatizirani: dodajanje topil, prekondicioniranje sorbenta v disku, nanašanje vzorca, sušenje diska in elucija analitov z diska. Omogoča neposreden nanos vzorca iz posode, v kateri smo ga vzorčili, brez predhodne filtracije. V primerjavi z ekstrakcijo LLE je poraba topil do 90 % nižja, kar posledično zniža stroške nakupa in odpada topil. Glavne prednosti pred neavtomatiziranimi metodami pa so krajši čas ekstrakcije, možnost priprave večjih volumnov vzorca (do 4 L) in dobra ponovljivost (41, 42).

### **1.5 Primeri priprave in analize vzorcev površinskih voda**

Učinkovine so v površinskih vodah prisotne v zelo nizkih koncentracijah, zato je treba pred analizo vzorec koncentrirati. S postopki, navedenimi v preglednici II, vzorce skoncentriramo od 100- pa vse do 3.333,3-krat.

V že razvitih protokolih za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda se vzorci pred nanosom na kartušo SPE pogosto filtrirajo, saj lahko vsebujejo večje delce nečistot. Kot trdi nosilec se med navedenimi primeri najpogosteje uporabljajo reverzno-fazne kartuše Oasis<sup>®</sup> HLB. Kondicioniranje sorbenta se v večini primerov izvaja z MeOH, ekvilibracija pa z ultračisto vodo, ki je lahko tudi nakisana. Volumni nanosenega vzorca se gibljejo od 100 mL pa vse do 1 L, pretok pa je navadno 4 mL/min. Vzorce površinskih voda so v vseh primerih tudi nakisali do kislega pH (2–4).

Elucijsko topilo vsebuje MeOH, volumen pa je od 1 do 10 mL. Po sušenju eluata zaostanek raztopijo v različnih topilih, največkrat je končni volumen 1 mL.

Najpogosteje uporabljena analizna tehnika je LC-MS/MS, vsem pa so skupne kromatografske kolone C<sub>18</sub> in ionski izvor ESI.

**Preglednica II: Priprava nekaterih vzorcev površinske vode.**

Kartuša	Oasis <sup>®</sup> HLB	LiChrolut <sup>®</sup> EN	Oasis <sup>®</sup> HLB	Oasis <sup>®</sup> HLB	Oasis <sup>®</sup> MCX
<b>Predfiltriranje</b>	125 mm	0,7 µm	0,45 µm	0,45 µm	/
<b>Kondicioniranje</b>	5 mL MeOH	6 mL heksan, 6 mL aceton	5 mL MeOH	5 mL MeOH	2 mL MeOH
<b>Ekvilibracija</b>	5 mL H <sub>2</sub> O pH 4,2	6 mL H <sub>2</sub> O pH 2	2 mL H <sub>2</sub> O	5 mL H <sub>2</sub> O	2 mL H <sub>2</sub> O pH 2,1
<b>Volumen vzorca</b>	300 mL	1.000 mL	500 mL	100 mL	1.000 mL
<b>pH vzorca</b>	4,2	2,0	3,0	3,0	2,5
<b>Pretok vzorca (mL/min)</b>	4	10	10-15	5	4
<b>Elucija</b>	10 mL MeOH, 5 mL aceton	1 mL aceton, 2 mL MeOH, 2 mL aceton	6 mL MeOH	5 mL MeOH	1 mL MeOH, 2 mL 5% NH <sub>4</sub> OH v MeOH
<b>Raztopitev suhega zaostanka</b>	1 mL MeOH	300 µL MeOH	1 mL MeOH: H <sub>2</sub> O = 50/50 (v/v)	1 mL 95 % H <sub>2</sub> O, 5 % ACN, 0,1 % HCOOH	500 µL H <sub>2</sub> O, kisel pH
<b>Faktor koncentriranja</b>	300	3.333,3	500	100	2.000
<b>Analizna tehnika</b>	LC- MS/MS	LC-MS	LC-MS	LC-MS/MS	UPLC- MS/MS
<b>LC kolona</b>	Zorbax	LiChrospher	Kromasil	YMC	Acquity

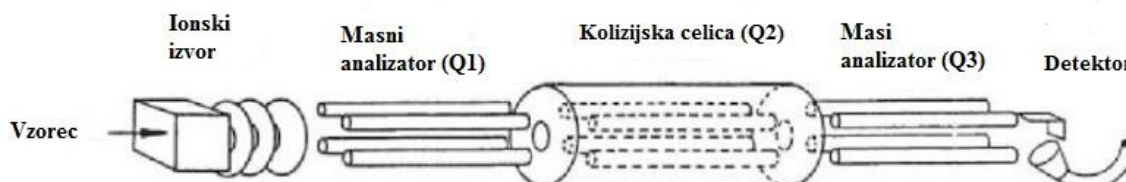
	C <sub>18</sub>	100 RP-18	100 C <sub>18</sub>	Hydrosphere C <sub>18</sub>	UPLC BEH C <sub>18</sub>
<b>Ionski izvor</b>	ESI	ESI	ESI	ESI	ESI
<b>Vir</b>	(18)	(22)	(35)	(23)	(24)

## 1.6 Masna spektrometrija

Masna spektrometrija je zelo občutljiva in specifična analizna tehnika, s katero lahko analite kvalitativno in kvantitativno določimo tudi od nano ( $10^{-9}$ ) do atomolarne ( $10^{-18}$ ) vrednosti (43). Za analizo okoljskih vzorcev je najpogosteje sklopljena s plinsko ali tekočinsko kromatografijo.

Masni spektrometer je sestavljen iz štirih osnovnih delov: ionski izvor, masni analizator, detektor in naprave za obdelovanje podatkov (43). V ionskem izvoru se analizirane molekule spremenijo v ionizirano obliko s pozitivnim ali negativnim nabojem. Nekateri molekularni ioni so nestabilni in razpadejo na manjše fragmente. Ioni in fragmenti nato pospešeno zapuščajo ionski izvor in prehajajo v masni analizator. Tam se v magnetnem ali elektrostatskem polju ločijo glede na razmerje med maso ( $m$ ) in nabojem ( $z$ ). V detektorju je fotopomnoževalka, ki šteje število ionov. Rezultat dobimo v obliki masnega spektra, ki v obliki histograma prikazuje intenziteto ionov v odvisnosti od razmerja  $m/z$  (44).

Poznamo več vrst ionizacije molekul. Elektronska ionizacija (EI) in kemijska ionizacija (CI) se pretežno uporabljata pri GC-MS. V obeh primerih elektroni v analizirano molekulo trčijo v vakuumu, le da pri CI v ionski izvor dodajo še reagenčni plin (metan), ki elektronom zniža energijo. Pri LC-MS pa se najpogosteje uporablja elektrorazprševalna ionizacija (ESI), ki poteka pri atmosferskem pritisku. Manj pogosto pa se uporabljata kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (APCI) in fotoionizacija pri atmosferskem pritisku (APPI) (44).



**Slika 4: Shema trojnega kvadrupolnega masnega spektrometra; povzeto po (45).**

Danes največ uporabljajo trojni kvadrupolni masni analizatorji (QQQ, shematski prikaz na sliki 4), ker so razmeroma poceni in robustni ter omogočajo kvantifikacijo učinkovin tudi v kompleksnih okoljskih vzorcih. Kvadrupolni masni analizator (Q) je sestavljen iz štirih paralelnih palic, ki so pod napetostjo. Električno polje med palicami dovoljuje prehod do detektorja le ionom z ustreznim razmerjem  $m/z$ . Ostali ioni trčijo v palice in detektor jih ne zazna, kar omogoča analizo širokega območja  $m/z$  v kratkem času. Pri trojnem kvadrupolnem MS so zaporedno vezani trije Q. Prvi in tretji delujeta kot masni analizator in prepuščata le ione z določenim razmerjem  $m/z$ , Q2 pa deluje kot kolizijska celica, ki ione fragmentira (44). Pri našem eksperimentalnem delu smo s QQQ uporabili multirezidualno analizo (MRM), pri kateri smo za posamezen analit izbrali optimalno vrednost  $m/z$  na Q1 (starševski ion) in Q3 (hčerinski ion), v Q2 pa optimalno energijo kolizije za nastanek hčerinskega iona. Tako smo izboljšali selektivnost in občutljivost metode (46).

## 2 NAMEN DELA

Poraba zdravil se v Republiki Sloveniji in drugod po svetu zvišuje. S tem prihaja v okolje vedno več farmacevtikov in njihova prisotnost v njem ima lahko negativen vpliv na izpostavljene organizme, med katerimi smo tudi ljudje.

Naš cilj bo razviti in ovrednotiti postopek ekstrakcije, ki ga bo mogoče uporabiti na vzorcih različnih površinskih voda (reke, jezera). Najprej bomo preverili prisotnost in koncentracijo izbranih učinkovin (>100) v kompozitnih vzorcih odpadnih voda iz štirih čistilnih naprav. Na podlagi teh rezultatov bomo izbrali učinkovine, ki se v odpadnih vodah pojavljajo v najvišjih koncentracijah in jih lahko pričakujemo tudi v površinskih vodah.

Razvili in optimizirali bomo postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu za večje število izbranih učinkovin, s katerim bomo vzorce očistili in skoncentrirali pred analizo z instrumentom LC-MS/MS. Sistematično bomo spreminjali parametre, ki lahko vplivajo na izkoristek ekstrakcije: elucijsko topilo, pH in volumen vzorca, vrsto trdnega nosilca, volumen topila za raztapljanje suhega zaostanka, vpliv koncentracije učinkovin. Postopek bomo razvijali na laboratorijsko pripravljenih vzorcih. Sestavljeni bodo iz pufra in ultračiste vode, ki jima bomo dodali znane volumne standardnih raztopin izbranih učinkovin. Vzorce bomo tekom razvoja analizirali s predhodno razvito metodo LC-MS/MS in dodatno preverili vplive različnih volumnov injiciranja vzorcev. Nato bomo metodo ovrednotili z validacijskimi parametri: linearnost, ponovljivost, točnost, izkoristek, meja določitve in vpliv ozadja.

Optimizirano metodo bomo uporabili za analizo vzorcev površinskih voda iz rek Kokre, Pake, Savinje in Ledave ter iz Zbiljskega jezera. Ugotavljali bomo prisotnost izbranih učinkovin in rezultate primerjali z objavljenimi rezultati iz tujine.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Standardi

Uporabili smo naslednje standarde: acetazolamid, acetilsalicilna kislina, alprazolam, amantadinijev klorid\*, amiloridijev klorid, amitriptilinijev klorid, amoksicilin, ampicilin, antipirin\*, atenolol\*, azitromicin\*, benzafibrat, bisoprolol fumarat\*, bromazepam, bumetanid, cimetidin, despiraminijev klorid, diazepam\*, diklofenak natrijeva sol\*, donepezilijev klorid monohidrat, enalapril maleat, enalaprilat, escitalopram oksalat\*, fenitoin, fenoterolijev bromid, finasterid, fluoksetinijev klorid, formoterol fumarat, furosemid\*, gabapentin\*, gemfibrozil\*, glibenklamid, glipizid, griseofulvin, haloperidol, hidrokortiazid, indapamid, irbesartan\*, katopril, karbamazepin\*, karvedilol, ketokonazol, ketoprofen, klofibrinska kislina, klomipraminijev klorid, klonazepam, klonidin, klorheksidin, klorotiazid, klaritromicin\*, kofein\*, kumarin, kvetiapin hemifumarat, lansoprazol, levamisolijev klorid, loperamidijev klorid, loratidin, lorazepam, metforminijev klorid\*, metoklopramidijev klorid, metoprolol tartat\*, nalidiksna kislina, naproksen\*, nifedipin\*, norfloksacin\*, ofloksacin, oksazepam\*, olanzapin, omeprazol, pantoprazol natrijeva sol\*, paracetamol\*, paroksetin\*, pravastatin natrijeva sol, pirimidon\*, probenicid, prometazinijev klorid, propifenazon\*, propranololijev klorid\*, raloksifenijev klorid, ranitidinijev klorid\*, rifampicin, salbutamol hemisulfat, salicilna kislina, salmeterol ksinofat, selegilinijev klorid, sertralinijev klorid\*, simvastatin, sulfametoksazol\*, tamoksifen citrat, teofilin\*, topiromat, toremifen citrat, tramadolijev klorid\*, triklosan, trimetoprim\*, valsartan\*, venlafaksinijev klorid\*, verapamilijev klorid, ziprasidonijev klorid monohidrat (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija), amlodipin maleat, atorvastatin kalcijeva sol\*, etopozid, feksofenadinijev klorid\*, imatinib mezilat, lakozamid\*, lamotrigin\*, levetiracetam\*, likarbazepin\*, lizinopril, okskarbazepin\*, ramipril, risperidon, rosuvastatin kalcijeva sol\*, sildenafil citrat, sumatriptan sukcinat (Sequoia Researcher Products, Pangbourne, Velika Britanija), ciprofloksacin\* (AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemčija).

Čistost vseh standardov je bila >97 %. Pri razvoju metode za površinske vode smo uporabili standarde, označene z \*.

### 3.1.2 Interni standardi

Uporabili smo izotopsko označene spojine: atorvastatin-d<sub>5</sub> kalcijeva sol, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]- diklofenak, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-sertralinijev klorid (AlsaChim, Illkirch-Graffenstaden, Francija), ciprofloksacin-d<sub>8</sub> klorid hidrat, diazepam-d<sub>5</sub>, karbamazepin-d<sub>6</sub>, metoprolol-(isopropil-d<sub>7</sub>)(+)-tartrat (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija).

### 3.1.3 Topila in reagenti

Uporabljena topila in reagenti:

- **2-propanol** ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH), M = 60,10 g/mol, ≥99,5 % (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija);
- **acetonitril** (CH<sub>3</sub>CN), M = 41,05 g/mol, ≥99,9 %, HPLC grade (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija);
- **acetonitril** (CH<sub>3</sub>CN), M = 41,05 g/mol, ≥99,9 %, LC-MS grade (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija);
- **diklorometan** (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), M = 84,93 g/mol, 99,9 % (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija);
- **etanol** (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), M = 46,07 g/mol, 96 % (Kefo, d. o. o., Ljubljana, Slovenija);
- **kalijev dihidrogenfosfat** (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ≥99,5 %, M = 136,08 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija);
- **klorovodikova kislina** (HCl 1M), M = 36,46 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija);
- **metanol** (CH<sub>3</sub>OH), M = 32,04 g/mol, ≥99,9 % HPLC grade (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija);
- **mravljinčna kislina** (HCOOH), 98–100 %, M = 46,03 g/mol, Suprapur<sup>®</sup> (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija);
- **natrijev hidroksid** (NaOH 1M), M = 40 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija);
- **stisnjen dušik** (N<sub>2</sub>), M = 28,03 g/mol (Messer Slovenija, d. o. o, Ruše, Slovenija);
- **ultračista voda**, pridobljena z Mili-Q – Advantage A 10 Water Purification System (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA).

### 3.1.4 Vzorci odpadne vode

Vzorčili smo iztoke štirih čistilnih naprav (A, B, C in D). Vzorci so bili sestavljeni oz. kompozitni, odvzeti v obdobju 24 ur.

### 3.1.5 Naprave in laboratorijski inventar

Uporabljene naprave in laboratorijski inventar:

- centrifugirke TPP (TPP, Techno Plastic, Products AG, Trasadingen, Švica);
- elektromagnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Woonsocket, Rhode Island, ZDA);
- hladilnik 2–8 °C z zamrzovalnikom –20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija);
- pH-indikatorski trakovi pH 0–14 MColorpHast™ (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija);
- ostalo: nastavki za pipete, vzmeti za steklene vložke, zamaški za vialo, parafilm M, kapalke, kovinske spatule, magneti, pinceta, štoparica, škarje, zaščitne rokavice, papirnate brisačke;
- pH-meter PA 220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica);
- indikatorski lističi pH 3,8–5,5 Pheanon® (Macherey – Nagel, Düren, Nemčija);
- plastične mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija);
- polavtomatske pipete: 2–20 µL, 20–200 µL, 200–1.000 µL, 1–10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija);
- pufrne raztopine: pH 4, pH 7, pH 10 (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija);
- specialni indikatorski papir pH 3,8–5,8 (Macherey – Nagel, Düren, Nemčija);
- steklovina: čaše, merilne bučke, merilni valj, epruvete, vialo, stekleni vložki, steklena palčka;
- stresalnik Vibromix 10 (Domel, Železniki, Slovenija);
- tehtnica AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica);
- tehtnica Exacta 300EB (Domel, Železniki, Slovenija);
- sušilnik TurboVap LV (Caliper, Hopkinton, Massachusetts, ZDA);
- ultrazvočni čistilnik Sonis 4 (Iskra pio, d. o. o., Šentjernej, Slovenija).

#### Sistem SPE:

- kadička Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA);



- oljna vakuumska črpalka DOA-P504-BN (Gast Manufacturing In., Harbob, Michigan, ZDA);
- plastične brizge 60 mL BD Plastipak (BD Biosciences, New Jersey, ZDA);
- adapterski nastavki za brizge (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA);
- cevke za enkratno uporabo (Supelco, Bellefonte, ZDA);
- kartuše Strata-X 33  $\mu\text{m}$  Polymeric Reversed Phase, 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA);
- kartuše Strata C18-E 55  $\mu\text{m}$ , 500 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA);
- kartuše Oasis<sup>®</sup> HLB 60 mg (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, ZDA).

**Preglednica III: Povzetek glavnih značilnosti nosilcev za ekstrakcijo.**

Nosilec	Strata-X	Strata C18-E	Oasis <sup>®</sup> HLB
Velikost delcev ( $\mu\text{m}$ )	33	55	30
Masa sorbenta (mg)	60	500	60
Volumen kolone (mL)	3	3	3
Specifična površina ( $\text{m}^2/\text{g}$ )	800	500	450
Povprečni premer por ( $\text{Å}$ )	85	70	80
pH-območje	1-14	N.P.	0–14
Vir	(50)	(51)	(49)
<b>Legenda:</b> N. P. (ni podatka)			

Sistem SPE-DEX:

- ekstraktor SPE-DEX<sup>®</sup> 4790 (Horizon Technology Inc., New Hampshire, ZDA);
- diski Atlantic<sup>®</sup> HLB SPE Disk (Horizon Technology Inc., New Hampshire, ZDA);
- filtri (Atlantic<sup>®</sup> Fast Flow Sediment Pre-Filters; 1  $\mu\text{m}$ , 5  $\mu\text{m}$ );
- industrijski plin  $\text{N}_2$ ,  $M = 28,01 \text{ g/mol}$ ,  $\geq 99.9 \%$  (Messer, Ruše, Slovenija);
- oljna vakuumska črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA);
- programska oprema Envision<sup>™</sup> platform Controller software (Horizon Technology Inc., New Hampshire, ZDA);
- stekleni vsebniki 1.000 mL (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, ZDA);
- viala za eluat 20 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA);
- posode za odpad.

Analitski sistem LC-MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, Kalifornija, ZDA):

- Agilent 1290 Infinity LC;
- Agilent 6460 Triple Quadripole Jetstream LC-MS z ionskim izvorom Jetstream<sup>®</sup> ESI;
- kromatografska kolona Poroshell EC-C18 100 × 3,0 mm, 2,7 μm;
- programska oprema MassHunter Workstation.

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava standardnih raztopin

#### 3.2.1.1 Primarne osnovne raztopine posameznih učinkovin

Iz naštetih učinkovin v poglavju 3.1.1 smo pripravili referenčne raztopine s koncentracijo 1 mg/mL. Na tehtič smo zatehtali 5 mg učinkovine in jo raztopili v 5 mL MeOH.

#### 3.2.1.2 Sekundarna osnovna raztopina

Sekundarno osnovno raztopino s koncentracijo 2,5 mg/L smo pripravili tako, da smo prilagojen volumen glede na faktor prilagoditve koncentracije (FPK) odpipetirali v 25-mililitrsko bučko in do oznake dopolnili z MeOH.

Pripravili smo dve raztopini:

- I. *sekundarna osnovna raztopina I (SOR I)*: raztopino smo pripravili iz 111 primarnih osnovnih raztopin za delo z odpadnimi vodami (SPE-DEX);
- II. *sekundarna osnovna raztopina II (SOR II)*: raztopino smo pripravili iz 44 primarnih osnovnih raztopin za razvoj metode za analizo učinkovin v površinskih vodah (SPE). Faktorji prilagoditve koncentracije in dejanske koncentracije učinkovin v raztopini *SOR II* so navedeni v preglednici IV.

**Preglednica IV: Faktorji prilagoditve koncentracij pri pripravi sekundarnih osnovnih raztopin za SPE.**

Učinkovina	FPK	c (mg/L)
amantadin	0,049	0,123
antipirin	0,040	0,1
atenolol	1,000	2,5
atorvastatin	0,250	0,625

azitromicin	0,125	0,313
bisoprolol	0,020	0,05
ciprofloksacin	0,100	0,25
diazepam	0,050	0,125
diklofenak	0,200	0,5
escitalopram	0,010	0,025

<b>feksofenadin</b>	0,020	0,05
<b>furosemid</b>	1,000	2,5
<b>gabapentin</b>	5,000	12,5
<b>gemfibrozil</b>	0,500	1,25
<b>irbesartan</b>	0,004	0,01
<b>karbamazepin</b>	0,020	0,05
<b>klaritromicin</b>	0,002	0,005
<b>kofein</b>	0,040	0,1
<b>lakoamid</b>	0,500	1,25
<b>lamotrigin</b>	0,200	0,5
<b>levetiracetam</b>	4,000	10
<b>likarbazepin</b>	0,050	0,125
<b>metformin</b>	2,000	5
<b>metoprolol</b>	0,050	0,125
<b>naproksen</b>	2,000	5
<b>nifedipin</b>	0,250	0,625
<b>norfloksacin</b>	0,100	0,25

<b>oksazepam</b>	0,200	0,05
<b>okskarbazepin</b>	0,050	0,125
<b>pantoprazol</b>	2,000	5
<b>paracetamol</b>	0,080	0,2
<b>paroksetin</b>	0,008	0,02
<b>primidon</b>	0,400	1
<b>propifenazon</b>	0,028	0,007
<b>propranolol</b>	0,010	0,025
<b>ranitidin</b>	1,072	2,68
<b>rosuvastatin</b>	0,207	0,52
<b>sertralin</b>	0,010	0,025
<b>sulfametoksazol</b>	0,200	0,5
<b>teofilin</b>	0,400	1
<b>tramadol</b>	0,023	0,058
<b>trimetoprim</b>	0,050	0,125
<b>valsartan</b>	0,100	0,25
<b>venlafaksin</b>	0,010	0,025

### 3.2.1.3 Delovna raztopina

Pripravili smo dve delovni raztopini:

- I. *delovna raztopina I* za delo s SPE-DEX: v 5-mililitrsko bučko smo odpipetirali 1 ml raztopine SOR I in do oznake dopolnili z MeOH. Dobili smo raztopino z nominalno koncentracijo 0,5 mg/mL;
- II. *delovna raztopina II* za delo s SPE: v 10-mililitrsko bučko smo odpipetirali 5 mL SOR II in do oznake dopolnili z MeOH. Dobili smo raztopino z nominalno koncentracijo 1,25 mg/L.

## 3.2.2 Priprava fosfatnih pufrov

### 3.2.2.1 Priprava 25 mM in 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pufra s pH 3, pH 4, pH 5, pH 7 in pH 9

Za pripravo 1 L pufra smo predhodno izračunali količino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ki jo moramo raztopiti, da dobimo 25 mM ali 50 mM raztopino. Na tehtnici smo zatehtali 3,40 g ali 6,80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ga kvantitativno prenesli v enolitrsko merilno bučko, z ultračisto vodo dopolnili do oznake in ga premešali. Pripravljenim raztopinam smo za pH 3 in pH 4 postopno

dodajali 1 M HCl in spremembo pH spremljali s pH-metrom. Pufre s pH 5, pH 7 in pH 9 pa smo dobili s postopnim dodajanjem 1 M NaOH. Za vse vrednosti je bilo na pH-metru sprejemljivo odstopanje za  $\pm 0,05$  enote.

### 3.2.3 Priprava topil

#### 3.2.3.1 Priprava elucijskih topil

Za delo na sistemu SPE-DEX in razvoj metode SPE smo pripravili več elucijskih topil. S polnilno pipeto smo odmerili ustrezen volumen topila in ga prenesli v 50-mililitrsko centrifugirko ali večjo bučko. Pripravili smo elucijska topila, navedena v preglednici V.

#### Preglednica V: Priprava elucijskih topil.

Št.	Elucijsko topilo
1.	ACN : MeOH (50/50, v/v)
2.	ACN : MeOH (75/25, v/v)
3.	ACN : MeOH : H <sub>2</sub> O : HCOOH (44/44/8/2, v/v/v/v)
4.	ACN : MeOH : iPrOH (50/25/25, v/v/v)

Elucijsko topilo ACN : MeOH : iPrOH (50/25/25, v/v/v) smo uporabili pri metodi SPE-DEX, opisani v poglavju 3.2.4.1.

#### 3.2.3.2 Priprava topila za raztapljanje suhega zaostanka

Za raztapljanje suhega zaostanka smo uporabili mešanico topil ACN : MeOH : H<sub>2</sub>O : HCOOH (44/44/8/2, v/v/v/v). Pripravili smo jo po enakem postopku kot elucijsko topilo iste sestave, ki je naveden v poglavju 3.2.3.1.

### 3.2.4 Ekstrakcija učinkovin iz odpadne vode

#### 3.2.4.1 Metoda SPE-DEX

Odpadne vode smo vzorčili na iztoku štirih različnih čistilnih napravah. Postopek priprave vzorcev je bil enak za vse štiri vzorce in je podan v preglednici VI.

**Preglednica VI: Postopek priprave vzorcev vode iz ČN.**

Vzorec	Volumen odpadne vode (ml)	Volumen pufra (mL)	Volumen ultračiste vode (mL)	Volumen delovne raztopine I, $c = 0,5$ mg/L ( $\mu$ L)	Koncentracija dodanih analitov v vzorcu pred SPE-DEX (ng/L)
Slepi vzorec	/	/	500	/	/
Odpadna voda	250	250	/	/	0
VZ <sub>STD I</sub>	250	250	/	10	10
VZ <sub>STD II</sub>	250	250	/	25	25
VZ <sub>STD III</sub>	250	250	/	50	50
VZ <sub>STD IV</sub>	250	250	/	100	100

Vzorci so bili rahlo motni in so vsebovali nekaj vidnih delcev, zato smo jih pred nanosom razredčili s 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufrom s  $\text{pH} = 7$ . S tem korakom smo se izognili morebitnemu mašenju diskov in zmanjšali vpliv matrice. Pripravljen vzorec smo ekstrahirali s predhodno optimizirano metodo, ki so jo razvili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo. Koraki metode so navedeni v preglednici VII. Eluat smo iz zbiralne vialne prenesli v 25-mililitrsko bučko in do oznake dopolnili z elucijskim topilom. Dva mL eluata smo prenesli v epruveto, posušili pod Turbo Vapom, ga raztopili v 200  $\mu$ L topila (postopek priprave je opisan v poglavju 3.2.3.2), 1 minuto stresali na Vibromixu in postavili v ultrazvočno kadičko za 15 minut. Vzorce smo nato prenesli v steklene inserte, vstavljene v vialne, in jih analizirali na LC-MS/MS. Koncentracijo učinkovin v odpadni vodi smo izračunali z metodo standardnega dodatka (poglavje 3.2.4.2).

**Preglednica VII: Koraki metode ekstrakcije na SPE-DEX.**

	Topilo	Čas namakanja (s)	Čas sušenja (s)
Predpriprava diska SPE	MeOH	15	0
	MeOH	15	15
	Ultračista voda	15	15
	Ultračista voda	10	10
Nanos vzorca			

Sušenje	210		
Spiranje	Elucijsko topilo	180	60

### 3.2.4.2 Metoda standardnega dodatka

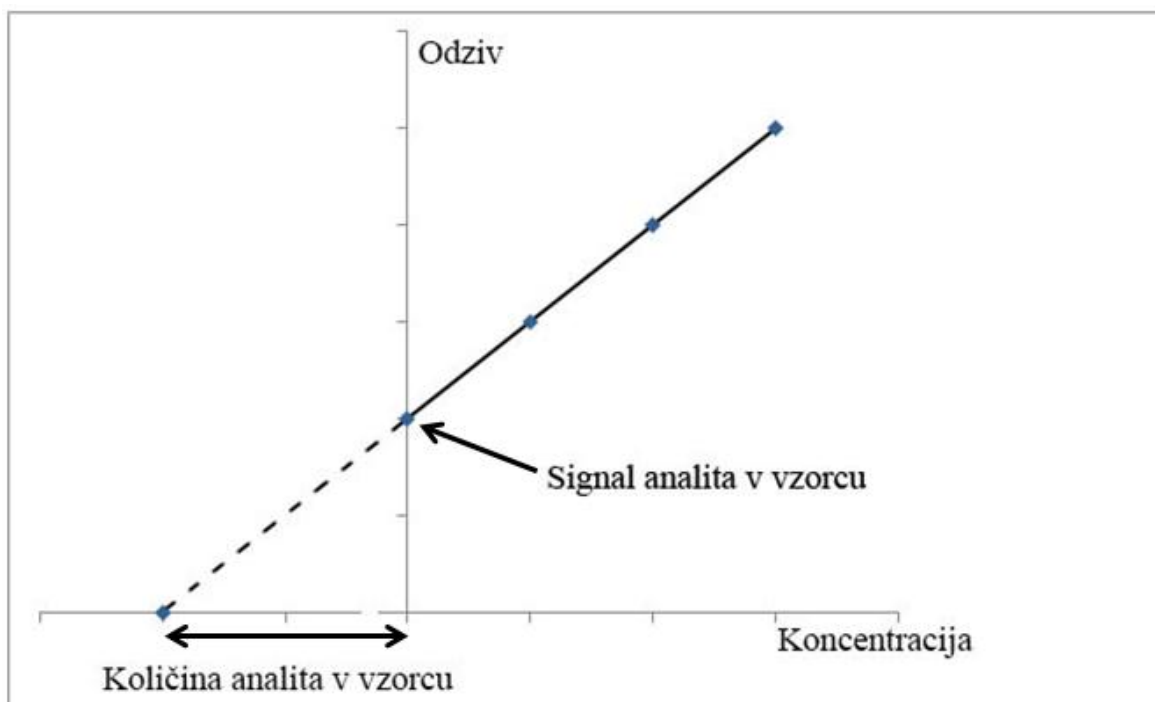
Koncentracijo učinkovin v odpadni vodi smo izračunali z metodo standardnega dodatka. Za izvedbo metode potrebujemo vzorce enakih volumnov, a z različnim dodatkom standardne raztopine. Pripravili smo pet vzorcev v dveh paralelkah; štirim smo dodali delovno raztopino I ( $V_{zSTD}$  I-IV), enemu ničesar (preglednica VI). Vzorce smo z metodo SPE-DEX ekstrahirali, izmerili odziv analitov na sistemu LC-MS/MS in jih grafično prikazali. Os x predstavlja koncentracijo, os y pa odziv analita v vzorcu. S pomočjo programa Microsoft Office Excel smo izračunali parametre umeritvenih premic (enačba 1), kjer  $k$  poda naklon in  $n$  presečišče premice z y-osjo. Skozi točke smo nato ekstrapolirali premico do osi x, kjer velja  $y = 0$ . Vrednost, v kateri premica seka os x, predstavlja dejansko koncentracijo analita v vzorcu (slika 5) (47). Izračunamo jo z enačbo 2.

$$y = kx + n$$

**Enačba 1**

$$\text{koncentracija} = - \frac{n (\text{presečišče z osjo } y)}{k (\text{naklon premice})}$$

**Enačba 2**



Slika 5: Metoda standardnega dodatka; prirejeno po (47).

### 3.2.5 Optimizacija metode SPE za površinske vode

#### 3.2.5.1 Priprava vzorca, uporabljenega za razvoj metode

Za razvoj metode smo pripravili vzorec z znanimi koncentracijami učinkovin. V merilni bučki smo v volumskem razmerju 1 : 1 združili ultračisto vodo in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  z ustrežno vrednostjo pH. Dodali smo še 32  $\mu\text{L}$  *delovne raztopine II* na 100 mL, tako da smo dobili vzorec z nominalno koncentracijo 400 ng/L.

#### 3.2.5.2 Začetna metoda SPE

Izhajali smo iz metode SPE, ki je bila predhodno razvita za določanje nekaterih antidepressivov v odpadnih vodah (48). Začetne poskuse smo opravljali v šestih paralelkah na kartušah Strata-X. Najprej smo stacionarno fazo v kartušah aktivirali z nanosom 10 mL MeOH in ekvilibrirali s 3 mL 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufru s  $\text{pH} = 7$ . Pretok smo za oba koraka naravnali na 1 mL/min. Nato smo nanесли 100 mL vzorca (priprava opisana v poglavju 3.2.5.1), s pretokom 8 mL/min; uravnali smo ga z vakuumsko črpalko. Sledilo je 10 minut vakuumskega sušenja, nato pa smo s 4 mL elucijskega topila ACN : MeOH : iPrOH (50/25/25, v/v/v) sprali kartušo in eluirali analite. Dva mL eluata smo z merilno pipeto odpipetirali v epruveto ter do suhega posušili v TurboVapu. Eluat se je sušil približno pol ure v vodni kopeli pri 50 °C v toku dušika. Suhi zaostanek v epruveti smo raztopili z 200  $\mu\text{L}$  topila za raztapljanje suhega zaostanka, ga stresali 1 minuto na Vibromixu in postavili v ultrazvočno kadičko za 15 minut. Vsebino epruvete smo nato z merilno pipeto odpipetirali v steklen insert, vstavljen v vialo, ter analizirali z LC-MS/MS.

Kmalu po začetku optimizacije smo spremenili postopek elucije. Eluirali smo le 2 mL ( $4 \times 500 \mu\text{L}$ ) in ga v isti epruveti sušili do suhega. Postopek raztapljanja suhega zaostanka pa je ostal enak.

#### 3.2.5.3 Priprava standardne raztopine za izračun izkoristka ekstrakcije z metodo SPE

Izkoristek ekstrakcije je bil glavni parameter, s katerim smo spremljali uspešnost ekstrakcijske metode. Nanašali smo vzorec s koncentracijo 400 ng/L, končna koncentracija po postopku SPE s spremenjenim postopkom elucije (ob predpostavki, da je izkoristek 100 %) je bila 200  $\mu\text{g/L}$ . Za izračun izkoristka smo uporabili enačbo 3 in delili odziv vzorca z odzivom standardne raztopine.

Standardno raztopino z nominalno koncentracijo 200 µg/L smo pripravili tako, da smo v 5-mililitrsko merilno bučko odpipetirali 800 µL *delovne raztopine II* in jo do oznake dopolnili z MeOH.

$$\text{Izkoristek (\%)} = \frac{\text{odziv v vzorcu}}{\text{odziv v raztopini standarda}} * 100$$

### Enačba 3

Izračunane izkoristke smo zaradi boljše preglednosti podali v obliki relativnega izkoristka. Pri vsaki učinkovini smo znotraj enega poskusa dobili najmanj tri različne izkoristke za različne pogoje. Izkoristke smo nato delili z maksimalnim izkoristkom iste učinkovine (enačba 4). S tem korakom smo dosegli to, da so imele učinkovine pri najboljših pogojih 100 % relativni izkoristek.

$$\text{Relativni izkoristek (\%)} = \frac{\text{izkoristek}}{\text{maksimalni izkoristek učinkovine}} * 100$$

### Enačba 4

#### 3.2.5.4 *Izbor elucijskega topila*

Preverili smo štiri različna elucijska topila, ki so navedena v preglednici V. Postopek njihove priprave smo opisali v poglavju 3.2.3.1, postopek priprave vzorca v poglavju 3.2.5.1, postopek SPE pa v poglavju 3.2.5.2.

#### 3.2.5.5 *Vpliv pH medija na izkoristek ekstrakcije*

Večjo količino 50 mM fosfatnega puфра smo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.2.1. Vpliv pH medija smo najprej preverjali pri pH vrednostih 3, 5, 7 in 9, in sicer v treh paralelkah po postopku SPE (poglavje 3.2.5.2). Po pregledu rezultatov smo pH območje zožili in poskus ponovili pri pH 3, 4 in 5.

#### 3.2.5.6 *Izbor trdnega nosilca za ekstrakcijo*

Za ekstrakcijo vzorcev smo izbirali med tremi reverzno-faznimi trdnimi nosilci. Imeli smo dva s polimernim sorbentom, Strata-X in Oasis<sup>®</sup> HLB ter enega na silikatni osnovi, Strata C18-E. Z vsako vrsto kartuše smo ekstrahirali tri paralelke vzorca, ki smo ga pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.5.1 in analizirali z začetno metodo SPE (poglavje 3.2.5.2).



### **3.2.5.7 Volumen topila za raztapljanje suhega zaostanka**

Za izbiro volumna topila za raztapljanje suhega zaostanka smo z redčenjem *delovne raztopine II* pripravili 50 mL raztopine standarda s koncentracijo 200 ng/L. Po 2 mL pripravljene raztopine smo z merilno pipeto odpipetirali v 24 epruвет in jih posušili v TurboVapu. Raztopili smo jih po postopku iz poglavja 3.2.5.2, le da smo spreminjali volumen dodanega topila. Šestim paralelkam smo dodali 100  $\mu$ L, 150  $\mu$ L, 200  $\mu$ L oz. 250  $\mu$ L. Pripravili smo še štiri standardne raztopine ustreznih koncentracij za izračun izkoristkov in vse skupaj analizirali na LC-MS/MS.

### **3.2.5.8 Volumen vzorca za nanos na SPE**

Pripravili smo večjo količino vzorca iz poglavja 3.2.5.1. Sledili smo postopku, opisanemu v poglavju 3.2.5.2, le da smo spreminjali volumen nanesenega vzorca in število paralelk. Učinkovine smo ekstrahirali v šestih paralelkah iz 100 mL in 200 mL ter v štirih paralelkah iz 500 mL in 1.000 mL vzorca.

### **3.2.5.9 Vpliv koncentracije na izkoristek ekstrakcije**

Poleg vzorca s koncentracijo učinkovin 400 ng/L smo pripravili še vzorca s koncentracijama 40 ng/L in 8 ng/L. Za pripravo prvega smo uporabili dvakrat razredčeno *delovno raztopino II*, za drugega pa 20-krat razredčeno. Postopek SPE, ki smo se ga držali, je opisan v poglavju 3.2.5.2, vzorca pa smo ekstrahirali v šestih paralelkah.

### 3.2.6 Končna metoda SPE za površinske vode

#### 3.2.6.1 Metoda SPE

Vzorcu površinske vode smo izmerili pH in ga z 1 M HCl uravnali na pH = 4. Za ekstrakcijo smo uporabili kartuše Strata-X, ki smo jih aktivirali z nanosom 10 mL MeOH in 10 mL 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s pH = 4. Z merilno bučko smo odmerili 200 mL vzorca, ga nanесли in 10 minut sušili. Eluirali smo 2 mL ( $4 \times 500 \mu\text{L}$ ) z elucijskim topilom ACN : MeOH = 75 : 25, v/v. Epruvete z eluatom smo nato do suhega sušili v TurboVapu v vodni kopeli pri 50 °C z zvrtnim tokom dušika. Suh zaostanek smo raztopili v 150  $\mu\text{L}$  topila ACN : MeOH :  $\text{H}_2\text{O}$  : HCOOH (44/44/8/2, v/v/v/v), ga stresali 1 minuto na Vibromixu in še 15 minut v ultrazvočni kadički. Vsebino epruvete smo nato prenesli v vialo s steklenim vložkom in analizirali z LC-MS/MS.

Slika 6 prikazuje uporabljeni sistem SPE.



**Slika 6: Sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu.**

#### 3.2.6.2 Analiza vzorcev s tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo

Vzorci, ki smo jih pripravili z metodo SPE, smo analizirali z instrumentom LC-MS/MS. Dva  $\mu\text{L}$  vzorca smo injicirali na reverzno fazno kolono Poroshell EC-C18 ( $100 \times 3 \text{ mm}$ ,  $2,7 \mu\text{m}$ ) pri temperaturi 50 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz topila A (0,05 % HCOOH v vodi) in topila B (100 % ACN). Uporabili smo gradientno elucijo; spremembe deleža topila A in pretoka skozi čas so navedene v preglednici VIII. Čas analize posameznega vzorca je bil 8,2 minute.

**Preglednica VIII: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze v odvisnosti od časa.**

Čas (min)	Pretok (mL/min)	Delež topila A (%)
0	0,50	92
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

Kromatografski ločbi je sledila ionizacija analitov v elektronskem razprševalniku Agilent Jet Stream ESI. V preglednici IX so navedene nastavitve ionskega izvora.

**Preglednica IX: Nastavitve ionskega izvora.**

Temperatura sušilnega plina	275 °C
Pretok plina	10 L/min
Nebulizator	45 psi (3,1 bara)
Temperatura plašča	350 °C
Pretok plina v plašču	11 L/min
Napetost na kapilari	4.000 V
Napetost na šobi	1.000 V

Izbrane analite smo merili z uporabo multirezidualne analize (MRM). Preglednica X prikazuje retencijske čase, prehode MRM, napetosti fragmentorja, kolizijske energije in polaritete za vsako od analiziranih spojin.

**Preglednica X: Retencijski časi, prehodi MRM, napetosti fragmentorja, kolizijske energije in polaritete (P) izbranih učinkovin.**

Učinkovina	Retencijski čas (min)	Prehod MRM (m/z)			Napetost fragmentorja (V)	Kolizijska energija (eV)	P
amantadin	2,18	152,1	→	135,0	88	16	+
antipirin	2,55	189,1	→	56,0	131	32	+
atenolol	1,35	267,2	→	145,0	96	24	+
atorvastatin	6,32	559,3	→	440,2	180	17	+
azitromicin	2,63	749,5	→	83,0	200	69	+
bisoprolol	2,99	326,2	→	116,1	150	13	+
ciprofloksacin	2,21	332,1	→	314,1	134	16	+
diazepam	6,14	285,1	→	193,0	159	32	+
diklofenak	6,38	296,0	→	214,0	55	15	+
escitalopram	3,40	325,2	→	109,0	81	29	+
feksofenadin	4,35	502,3	→	466,2	195	28	+
furosemid	3,90	329,0	→	284,8	83	4	-
gabapentin	1,64	172,1	→	95,0	81	25	+
gemfibrozil	6,67	249,2	→	121,0	81	9	-
irbesartan	5,29	429,2	→	207,1	121	21	+
karbamazepin	4,13	237,1	→	193,9	103	12	+
klaritromicin	4,27	748,5	→	158,1	162	25	+
kofein	1,91	195,1	→	138,0	101	16	+
lakoamid	2,69	251,2	→	108,1	60	18	+
lamotrigin	2,47	256,0	→	211,0	170	25	+
levetiracetam	1,61	171,1	→	126,1	112	15	+
likarbazepin	2,91	255,1	→	194,1	78	17	+
metformin	0,85	130,1	→	60,1	83	8	+
metoprolol	2,58	268,2	→	116,0	96	12	+
naproksen	5,93	229,1	→	168,9	70	26	-
nifedipin	5,97	347,1	→	315,1	81	1	+

<b>norfloksacin</b>	2,12	320,1	→	302,1	134	16	+
<b>oksakarbazepin</b>	4,56	287,1	→	241,0	126	20	+
<b>oksazepam</b>	3,38	253,1	→	180,1	78	17	+
<b>pantoprazol</b>	3,35	384,1	→	138,2	81	20	+
<b>paracetamol</b>	1,53	152,1	→	110,0	88	12	+
<b>paroksetin</b>	3,83	390,2	→	70,1	81	29	+
<b>primidon</b>	2,57	219,2	→	162,5	100	12	+
<b>propifenazon</b>	3,11	260,2	→	56,1	126	25	+
<b>propranolol</b>	4,63	231,1	→	189,0	121	21	+
<b>ranitidin</b>	1,39	315,2	→	175,9	83	12	+
<b>rosuvastatin</b>	5,68	482,2	→	258,5	184	35	+
<b>sertralin</b>	4,89	306,1	→	158,9	60	24	+
<b>sulfametoksazol</b>	2,95	254,1	→	156,0	86	13	+
<b>teofilin</b>	1,54	181,1	→	124,0	88	16	+
<b>tramadol</b>	2,58	264,2	→	58,1	81	17	+
<b>trimetoprim</b>	2,09	291,2	→	230,0	164	20	+
<b>valsartan</b>	6,12	436,2	→	207,1	81	25	+
<b>venlafaksin</b>	2,91	278,2	→	58,1	81	17	+
<b>[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]- karbamazepin</b>	4,06	243,1	→	199,9	103	12	+
<b>[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-diklofenak</b>	6,38	300,1	→	220,0	100	15	+
<b>[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-sertralin</b>	4,89	312,1	→	159,0	100	25	+
<b>atorvastatin-d<sub>5</sub></b>	6,32	564,3	→	440,2	180	17	+
<b>ciprofloksacin-d<sub>8</sub></b>	2,21	340,1	→	322,1	134	16	+
<b>diazepam-d<sub>5</sub></b>	6,14	290,1	→	198,1	140	32	+
<b>metoprolol-d<sub>7</sub></b>	2,58	275,2	→	123,0	100	12	+

### 3.2.7 Vrednotenje analizne metode za analizo površinskih voda

Analizno metodo smo vrednotili v skladu s smernicami FDA za validacijo bioanaliznih metod (52). Vrednotili smo linearnost, ponovljivost, točnost, območje metode in mejo določitve. Dodatno pa smo preverili tudi izkoristek ekstrakcije (poglavje 3.2.5.3) in učinek matrice (poglavje 3.2.6).

### ❖ Linearnost

Za vrednotenje linearnosti smo pripravili 8 vzorcev v koncentracijskem območju 8–1.600 ng/L (gledano za FPK 1, npr. atenolol) ter en vzorec s koncentracijo 0, tj. slepi vzorec. Prvih 5 vzorcev smo pripravili z dodatkom *delovne raztopine II*, za zadnje 3 pa smo jo 5-krat redčili. Koncentracije vzorcev in volumni dodatka standarda so zbrani v preglednici XI. Vsak vzorec smo analizirali v 3 paralelkah in uporabili pogoje končne metode (poglavje 3.2.6). Izmerjene odzive smo statistično obdelali in z metodo linearne regresije dobili umeritveno premico za posamezen analit (enačba 1). Determinacijski koeficient ( $R^2$ ) smo izračunali iz korelacije med koncentracijo v vzorcu (spremenljivka x) in odzivom vzorca (spremenljivka y). Izračunali smo še RSD, izkoristek, točnost, območje metode in mejo določitve (LOQ). Za določitev ustrezne linearnosti smo postavili mejo  $R^2 \geq 0,99$ .

Parametre regresijskih premic smo uporabili za vrednotenje prisotnosti in koncentracije učinkovin v vzorcih površinskih voda.

**Preglednica XI: Podatki o vzorcih, uporabljenih za vrednotenje linearnosti metode.**

Koncentracija vzorca pri FPK 1 (ng/L)	Koncentracija raztopine standardov za pripravo vzorca ( $\mu\text{L/L}$ )	Volumen dodane raztopine standardov ( $\mu\text{L}$ )	Medij
1600	1.250	1.280	Ultračista voda : pufer 50 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pH 4 = 1 : 1, 1.000 mL
800	1.250	640	
400	1.250	320	
80	1.250	64	
40	1.250	32	
20	250	80	
12	250	48	
8	250	32	
0	0	0	

### ❖ Ponovljivost

Ponovljivost metode smo preverili na treh vzorcih različnih koncentracij. Njihova priprava je bila enaka kot pri tistih, ki smo jih uporabili za ugotavljanje linearnosti, le koncentracije vzorcev in volumni dodatka so drugačni (preglednica XII). Za vsak vzorec smo analizirali tri paralelke po postopku končne metode, navedenem v poglavju 3.2.6. Vzorce smo pripravili in analizirali v treh zaporednih dneh. Z uporabo enačbe 5 smo izračunali relativni standardni odklon, s čimer smo ovrednotili ponovljivost.

$$\text{Relativni standardni odklon (RSD) (\%)} = \frac{\text{standardni odklon}}{\text{povprečna vrednost}} * 100$$

### Enačba 5

**Preglednica XII: Podatki o vzorcih, uporabljenih za vrednotenje ponovljivosti metode.**

Koncentracija vzorca pri FPK 1 (ng/L)	Koncentracija raztopine standardov za pripravo vzorca (μL/L)	Volumen dodane raztopine standardov (μL)	Medij
1200	1.250	960	Ultračista voda : pufer 50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 4 = 1 : 1, 1.000 mL
160	1.250	128	
16	250	64	

### ❖ Točnost

S pomočjo regresijske premice smo za vsako učinkovino izračunali njeno koncentracijo. To smo nato primerjali z dejansko koncentracijo in izračunali odstotek odstopanja z enačbo 6. Sprejemljivo mejo odstopanja oz. točnosti smo določili na ±25 %.

$$\text{Točnost (\%)} = \frac{\text{izračunana konc.} - \text{dejanska konc.}}{\text{dejanska konc.}} * 100$$

### Enačba 6

### ❖ Meja določitve in delovno območje metode

S pomočjo podatkov za točnost metode smo postavili še mejo določitve. Za LOQ smo določili koncentracijo, pri kateri je bil odstotek napake manjši od ±25 % in ponovljivost

<20 %. Pri učinkovinah, kjer je bila prisotna kontaminacija v slepem vzorcu, smo za LOQ določili tisto vrednost, pri kateri je bilo razmerje med odzivom vzorca in odzivom slepega vzorca manjše od 25 %.

LOQ je tudi spodnja meja območja linearnosti analizne metode, za zgornjo pa smo vzeli koncentracijo, pri kateri je bila vrednost  $R^2$  še vedno ustrezna.

#### ❖ Vpliv ozadja

Vpliv ozadja smo preverjali na realnem vzorcu iz reke Ledave. Držali smo se razvitega postopka SPE (poglavje 3.2.6.1). Vzorce smo pripravili v šestih paralelkah, drugačno je bilo le raztapljanje suhega zaostanka pri treh vzorcih. Raztopili smo jih namreč v standardnih raztopinah učinkovin z nominalnimi koncentracijami 53,3 µg/L, 533,3 µg/L in 1.066,6 µg/L, ki smo jih pripravili iz raztopine *SOR II*. V treh steklenih vialah smo nato v enakih koncentracijah pripravili še standardne raztopine iz raztopine *SOR II* in jih analizirali na LC-MS/MS. Vpliv matrice smo izračunali z enačbo 7.

$$ME (\%) = \left( \frac{A - B}{C} \right) * 100$$

#### Enačba 7

A... odziv vzorca, raztopljenega v topilu za raztapljanje suhega zaostanka, z znano koncentracijo učinkovin x

B... odziv vzorca

C... odziv standarda s koncentracijo učinkovin x

#### Enačba 8

### 3.2.8 Analiza vzorcev površinskih voda

Razvito metodo (poglavje 3.2.6) smo uporabili na 6 vzorcih površinskih voda. Pet jih je bilo odvzetih iz reke, eden pa iz jezera. Začetne vrednosti pH ter kraj in datum zajema so navedeni v preglednici XIII. Vzorčeni so bili ročno kot naključni vzorci, v plastični vsebnik, in sicer na globini 1–2 m. Vzorce smo analizirali v roku 24 ur po odvzemu, do priprave pa smo jih shranili v hladilniku na 4 °C.

**Preglednica XIII: Začetne vrednosti pH ter kraji in datumi zajema vzorcev površinskih voda.**

Vzorec	Začetni pH	Kraj zajema	Datum zajema
--------	------------	-------------	--------------



<b>Kokra</b>	6	Reka Kokra, Kranj	12. 7. 2016
<b>Paka</b>	6	Reka Paka, Velenje	23. 8. 2016
<b>Savinja 1</b>	6	Reka Savinja – obrežje, Kasaze	23. 8. 2016
<b>Savinja 2</b>	6	Reka Savinja – z mostu, Kasaze	23. 8. 2016
<b>Ledava</b>	6	Reka Ledava, Murska Sobota	23. 8. 2016
<b>Zbiljsko jezero</b>	5	Zbiljsko jezero, Zbilje	25. 8. 2016

### 3.2.8.1 Izračun vsebnosti učinkovin v realnih vzorcih

Vsebnost učinkovin v vzorcih smo izračunali s pomočjo regresijske premice ( $n$  – presečišče,  $k$  – naklon) in faktorja prilagoditve koncentracije (preglednica XVII), z uporabo enačbe 9.

$$\text{vsebnost učinkovine v realnem vzorcu} = \frac{\text{odziv vzorca} - n}{k} * FPC$$

**Enačba 9**

### 3.2.9 Čiščenje

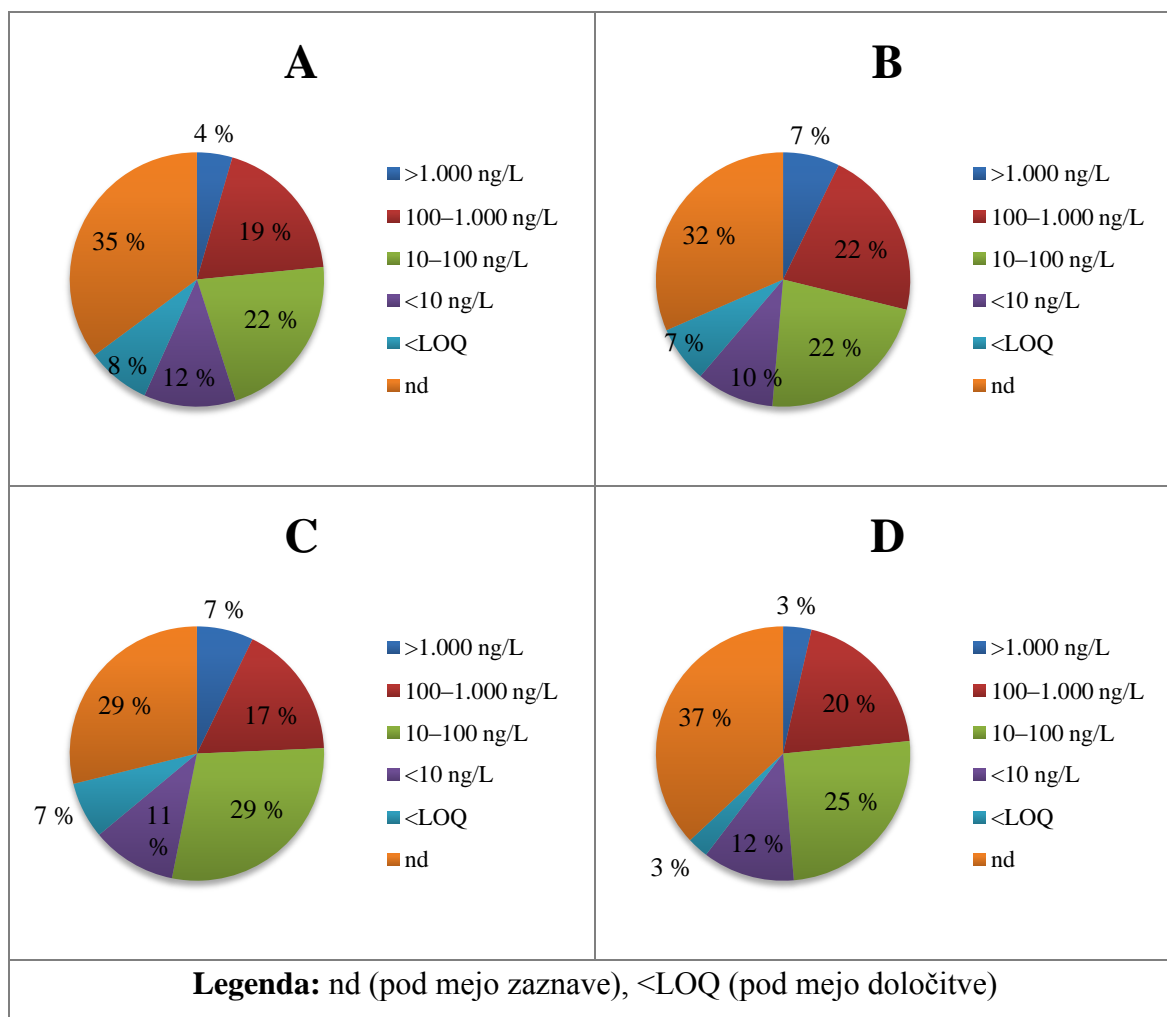
Tekom razvoja in vrednotenja metode smo poskuse izvajali z nizkimi koncentracijami analitov. Možnost kontaminacije v laboratoriju z višjimi koncentracijami učinkovin je bila visoka, zato smo med delom vso steklovino in dele sistema SPE dobro čistili. Vsak ponedeljek smo se držali standardnega operativnega postopka, pripravljenega prav za ta namen. Prav tako smo ga upoštevali pred analizo vzorcev za vrednotenje metode in pred analizo realnih vzorcev. Ko smo steklovino in sistem SPE očistili, smo pripravili 100 mL ultračiste vode in jo analizirali po postopku iz poglavja 3.2.5.2, kasneje pa po postopku iz poglavja 3.2.6.1. Od prvega slepega vzorca pa vse do zaključka eksperimentalnega dela smo imeli sistem SPE konstantno kontaminiran z metforminom in propifenazonom. Občasno so se pojavili še visoki odzivi v slepem vzorcu za antipirin, azitromicin, ciprofloksacin, diklofenak, klaritromicin, kofein, nifedipin, paracetamol in propranolol.

Za analize smo uporabljali lastno steklovino, ki smo jo shranjevali ločeno. Ves potrošni material (steklene vial, zamaški za vial, steklene epruvete itd.) smo po enkratni uporabi zavrgli. Sistem SPE smo sicer tekom eksperimentalnega dela uporabljali le za ta namen, vendar pa je bil postavljen v laboratoriju, kjer se sočasno izvajajo še druga raziskovalna dela. V istem laboratoriju se tudi tehtajo standardi učinkovin, ki se lahko prenesejo po laboratoriju in kontaminirajo površine.

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 Ekstrakcija učinkovin iz odpadne vode

S predhodno razvito in optimizirano metodo SPE-DEX smo analizirali vzorce štirih iztokov iz čistilnih naprav (A–D). Vzorčili smo jih v spomladanskem času. Ugotavljali smo prisotnost 111 učinkovin in na podlagi dobljenih rezultatov izbrali tiste, za katere smo razvili metodo SPE za pripravo vzorcev površinskih voda.



**Slika 7: Koncentracijska območja učinkovin, najdenih v odpadnih vodah.**

Na sliki 7 so grafično prikazana koncentracijska območja učinkovin v odpadni vodi. Izmed 111, ki smo jih analizirali, je bila približno tretjina (29–37 %) pod mejo zaznave (nd). Tiste, ki smo jih izmerili, smo razdelili v štiri koncentracijska območja. Iz grafov je razvidno, da so območja pri vseh vzorcih podobno razporejena. Največ učinkovin je bilo prisotnih v koncentraciji 10–100 ng/L. Za nadaljnje delo smo izbrali učinkovine s koncentracijami nad 100 ng/L, izmerjenimi v vsaj enem vzorcu, dodali pa smo še nekaj

učinkovin, ki smo jih pogosto zasledili v člankih med pregledom literature. Tako smo izbrali naslednje učinkovine: amantadin, antipirin, atenolol, atorvastatin, azitromicin, bisoprolol, ciprofloksacin, diazepam, diklofenak, escitalopram, feksofenadin, furosemid, gabapentin, gemfibrozil, irbesartan, karbamazepin, klaritromicin, kofein, lakozamid, lamotrigin, levetiracetam, likarbazepin, metformin, metoprolol, naproksen, nifedipin, norfloksacin, okskarbazepin, oksazepam, pantoprazol, paracetamol, paroksetin, pirimidon, propifenazon, propranolol, ranitidin, rosuvastatin, sertralin, sulfametoksazol, teofilin, tramadol, trimetoprim, valsartan in venlafaksin.

## **4.2 Razvoj metode za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda**

Rezultati vzorčenja odpadnih voda iz štirih čistilnih naprav so nam pomagali pri izbiri učinkovin za spremljanje njihove prisotnosti v površinskih vodah. Večina razvitih metod se osredotoča na eno specifično terapevtsko skupino, saj so si učinkovine znotraj nje navadno zelo podobne (53). Naš izbor pa je zajemal številne učinkovine, ki so si zelo različne po terapevtskih skupinah in po fizikalno-kemijskih lastnostih. Med razvojem analizne metode je bilo zato pri izbiri eksperimentalnih pogojev pogosto treba sklepati kompromise, ki niso bili vedno idealni za vse učinkovine.

### **4.2.1 Optimizacija metode za ekstrakcijo učinkovin**

Tekom optimizacije metode SPE smo razvili nov postopek elucije in določili elucijsko topilo, pH vrednost pufru za ekvibracijo, pH vrednost in volumen vzorca, vrsto nosilca za ekstrakcijo, volumen topila za raztapljanje suhega zaostanka in volumen injiciranja na LC-MS/MS. Pri poskusih smo uporabljali *delovno raztopino II*, opisano v poglavju 1.1.1.1. Rezultati razvoja vsebujejo podatke za 39 učinkovin; klaritromicin, paroksetin in sulfametoksazol smo vključili malo pred ovrednotenjem metode, azitromicin in nifedipin pa smo zaradi nestabilnosti pripravljali dnevno, pri čemer smo se zaradi možne kontaminacije v laboratoriju tekom razvoja metode izogibali njuni pripravi.

#### **4.2.1.1 Razvoj postopka elucije**

Na začetku razvoja metode SPE smo delali s po šestimi paralelkami in se držali protokola, opisanega v poglavju 3.2.5.2. Pri prvih poskusih smo dobili zelo visoke vrednosti RSD, zato smo pred odvzemom 2 mL iz epruvete, vzorec stresali še 10 s na Vibromixu. S to spremembo smo uspeli le malenkostno izboljšati RSD, kar je prikazano v preglednici XIV.

Zaradi visokih vrednosti RSD (>75 %) smo postopek elucije popolnoma spremenili. Namesto s 4 mL ( $4 \times 1$  mL) smo elucijo izvedli z 2 mL elucijskega topila, in sicer štirikrat s 500  $\mu$ L. S to spremembo smo dosegli, da je vrednost RSD pri kar 85 % učinkovin padla pod 10 %, najvišja pa je bila za propifenazon, in sicer 19,2 %.

#### 4.2.1.2 Izgube učinkovin pri uporabi novega postopka elucije

Ker smo elucijski volumen tekom razvoja zmanjšali za polovico, nas je zanimalo, kolikšen je zaostanek učinkovin na trdnih nosilcih. Izvedli smo poskus, ki je opisan v poglavju 3.2.5.2, in sicer v šestih paralelkah. Po eluciji 2 mL smo ločeno eluirali še dvakrat po 1 mL v steklene epruvete. Zaostanek smo izračunali tako, da smo odziv vzorcev 1 mL eluata delili z odzivom vzorca na isti kartuši in pomnožili s 100. Rezultati so podani v preglednici XIV. Dobili smo zanemarljive količine, saj je bil zaostanek pri skoraj vseh učinkovinah manjši od 0,5 %, najvišji pa je bil pri metforminu, 6,4 %.

**Preglednica XIV: Primerjava ponovljivosti postopka ekstrakcije in zaostanki učinkovin v kartušah po eluciji.**

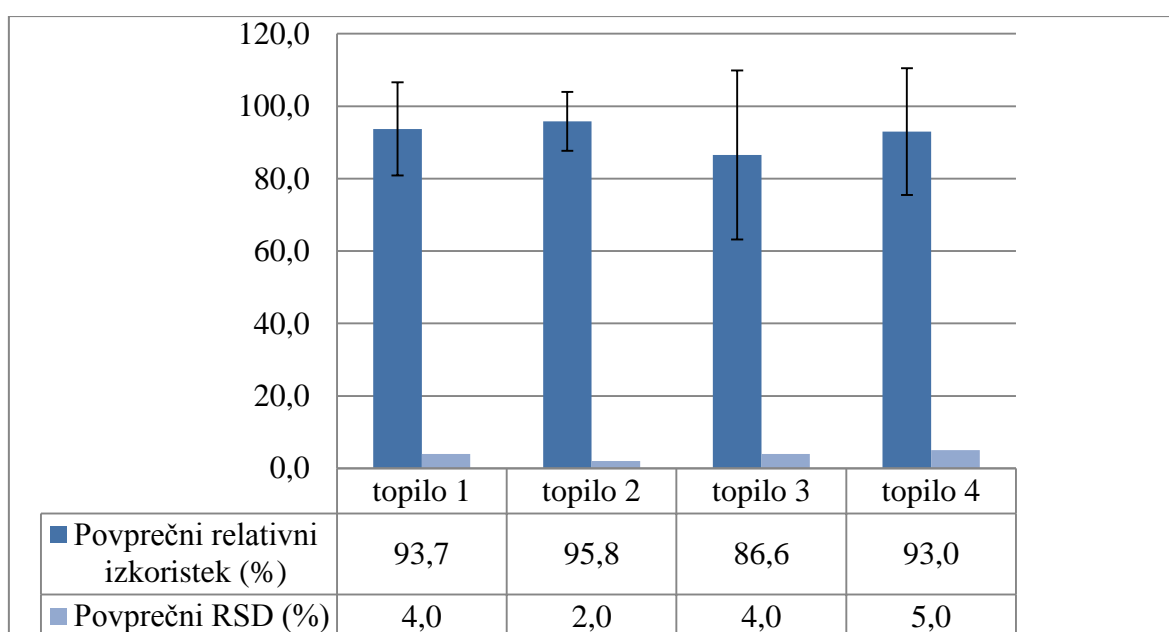
Učinkovina	Povprečna vrednost RSD (%)			Zaostanek po novem postopku elucije (%)	
	Izhodiščni postopek	Izhodiščni postopek z dodatnim mešanjem eluata	Nov postopek elucije	1 mL prvič	1 mL drugič
amantadin	80,7	100,3	11,4	2,1	1,1
antipirin	75,5	75,7	12,5	0,1	0,1
atenolol	84,5	71,0	1,1	0,1	0,0
atorvastatin	96,0	85,5	6,0	0,0	0,0
bisoprolol	88,2	78,3	1,7	0,2	0,1
ciprofloksacin	90,9	80,2	2,9	0,2	0,1
diazepam	82,4	75,5	3,0	0,3	0,1
diklofenak	87,7	75,4	2,3	0,2	0,1
escitalopram	84,3	75,5	5,7	0,3	0,1

<b>feksofenadin</b>	91,7	79,8	1,1	0,1	0,1
<b>furosemid</b>	91,9	78,8	2,0	0,0	0,0
<b>gabapentin</b>	81,0	73,2	7,0	0,3	0,3
<b>gemfibrozil</b>	92,8	80,1	3,6	0,1	0,1
<b>irbesartan</b>	90,0	78,4	0,6	0,1	0,1
<b>karbamazepin</b>	88,6	77,8	1,9	0,2	0,1
<b>kofein</b>	75,3	74,9	15,1	0,2	0,1
<b>lakoamid</b>	86,1	76,3	2,0	0,2	0,2
<b>lamotrigin</b>	85,6	69,7	1,3	0,3	0,1
<b>levetiracetam</b>	69,0	65,2	10,6	0,2	0,1
<b>likarbazepin</b>	90,8	76,8	2,7	0,1	0,0
<b>metformin</b>	71,7	67,4	5,8	6,4	5,6
<b>metoprolol</b>	84,4	71,4	4,4	0,2	0,0
<b>naproksen</b>	95,2	84,5	1,4	0,0	0,0
<b>norfloksacin</b>	88,9	79,2	3,8	0,3	0,1
<b>oksazepam</b>	88,2	76,8	1,5	0,2	0,0
<b>okskarbazepin</b>	114,9	94,3	9,7	0,1	0,1
<b>pantoprazol</b>	99,6	79,6	9,1	0,0	0,0
<b>paracetamol</b>	77,3	62,2	1,6	0,1	0,0
<b>primidon</b>	91,3	75,6	2,2	0,3	0,2
<b>propifenazon</b>	76,5	84,6	19,2	1,0	1,0
<b>propranolol</b>	82,2	74,9	3,7	0,5	0,2
<b>ranitidin</b>	93,2	77,7	5,7	0,0	0,0
<b>rosuvastatin</b>	90,8	79,9	1,7	0,0	0,0
<b>sertralin</b>	69,9	75,9	8,2	1,4	0,5
<b>teofilin</b>	82,8	70,3	1,2	0,3	0,1
<b>tramadol</b>	73,9	79,8	18,7	0,5	0,2
<b>trimetoprim</b>	89,5	76,5	2,3	0,1	0,0
<b>valsartan</b>	89,5	76,6	1,2	0,1	0,0
<b>venlafaksin</b>	75,5	75,6	9,6	0,5	0,2

#### 4.2.1.3 Izbor topila za elucijo

Pri izboru topila za elucijo moramo paziti, da nobena od komponent ne reagira z analiziranimi učinkovinami. Vseeno pa mora organsko topilo prekiniti vezi med analitom in sorbentom, da se le-ta lahko eluira. Najpogosteje uporabljeni topili za elucijo sta ACN in MeOH. Izbirali smo med štirimi elucijskimi topili, ki so navedena v preglednici V, postopek njihove priprave pa smo opisali v poglavju 3.2.3.1. Poskus smo izvedli v treh paralelkah, in sicer po metodi iz poglavja 3.2.5.4.

Izbrali smo topilo 2, ACN : MeOH (75/25, v/v), saj je imelo najvišji povprečni relativni izkoristek pri najboljši ponovljivosti (slika 8).



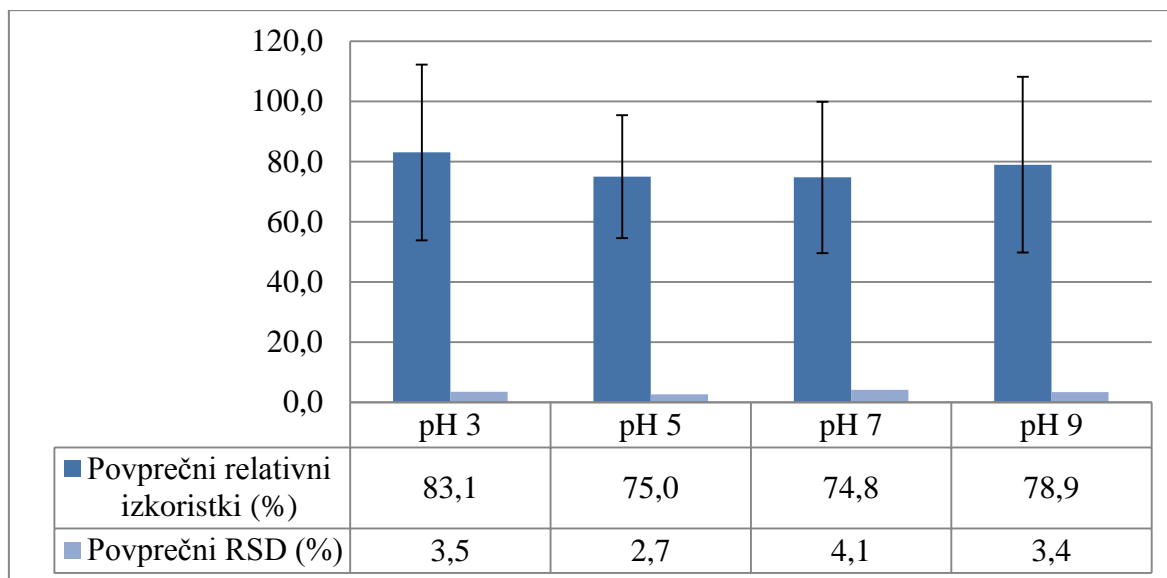
**Slika 8: Povprečni relativni izkoristki<sup>1</sup> in povprečne ponovljivosti (RSD, n = 3)<sup>2</sup> pri uporabi različnih elucijskih topil (n = 39).**

#### 4.2.1.4 Vpliv vrednosti pH vzorca na izkoristek ekstrakcije učinkovin

Na izkoristek ekstrakcije učinkovin poleg vrste trdnega nosilca vpliva tudi vrednost pH vzorca. Tako smo v prvi fazi preizkusili štiri različne vrednosti pH, od kislega pH 3 pa vse do bazičnega pH 9. Poskus smo opisali v poglavju 3.2.5.5. Dobljene izkoristke smo s pomočjo enačbe 3 preračunali v relativne izkoristke in dobili rezultate, predstavljene na sliki 9. Najvišji povprečni relativni izkoristki so bili v kislem mediju, zato smo v nadaljevanju poleg pH 3, na enak način preskusili še pH 4 in pH 5.

<sup>1</sup> Povprečje relativnih izkoristkov vseh učinkovin pri enem pogoju.

<sup>2</sup> Povprečje RSD vseh učinkovin pri enem pogoju.



**Slika 9: Povprečni relativni izkoristki in ponovljivosti (RSD, n = 3) pri različnih vrednostih pH (n = 39).**

#### 4.2.1.5 Ožji izbor vrednosti pH vzorca

V ožjem izboru smo uporabili pufer s pH vrednostmi 3, 4 in 5. Vzorce smo po postopku, opisanem v poglavju 3.2.5.5, analizirali v treh paralelkah. Iz rezultatov, navedenih v preglednici XV vidimo, da je imelo kar 56 % učinkovin najvišji relativni izkoristek pri pH 4. Slednjo vrednost smo izbrali zato, ker so imele z izjemo atorvastatina, pantoprazola in ranitidina tudi ostale učinkovine visok izkoristek z dobro ponovljivostjo.

**Preglednica XV: Povprečni relativni izkoristki in ponovljivosti (RSD, n = 3) pri različnih pH vrednostih pufru (n = 39).**

Učinkovine	Relativni izkoristki (%) (RSD (%))		
	pH 3	pH 4	pH 5
amantadin	100,0 (1,6)	98,1 (11,6)	32,3 (1,8)
antipirin	96,6 (1,7)	100,0 (3,0)	87,1 (8,5)
atenolol	88,9 (1,2)	100,0 (1,1)	91,9 (3,8)
atorvastatin	16,4 (10,5)	42,5 (14,1)	100,0 (9,9)
bisoprolol	85,7 (1,8)	100,0 (0,9)	93,8 (2,3)
ciprofloksacin	99,0 (0,2)	100,0 (12,2)	72,4 (7,2)
diazepam	93,0 (1,8)	100,0 (2,9)	97,3 (1,9)

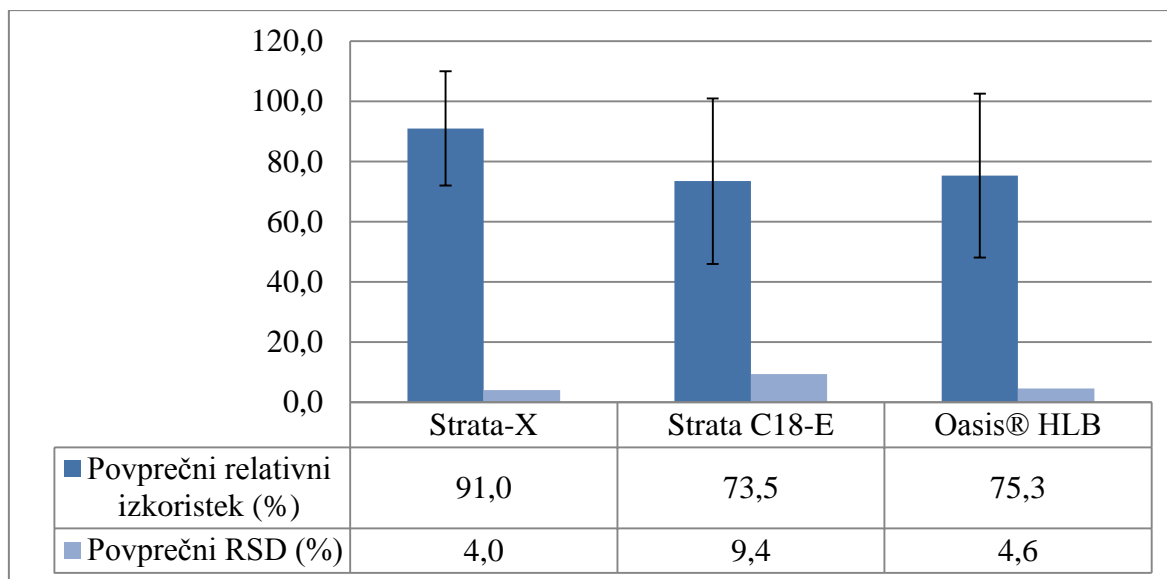
<b>diklofenak</b>	89,6 (2,3)	100,0 (2,6)	98,8 (1,4)
<b>escitalopram</b>	94,9 (1,2)	100,0 (1,8)	85,5 (9,6)
<b>feksofenadin</b>	90,9 (0,4)	100,0 (2,0)	92,6 (4,7)
<b>furosemid</b>	80,9 (4,4)	100,0 (2,4)	99,8 (0,5)
<b>gabapentin</b>	100,0 (1,9)	55,4 (19,3)	16,1 (2,5)
<b>gemfibrozil</b>	53,5 (8,2)	87,8 (21,5)	100,0 (2,5)
<b>irbesartan</b>	73,6 (3,2)	91,8 (3,2)	100,0 (2,5)
<b>karbamazepin</b>	86,1 (2,7)	100,0 (3,2)	98,8 (3,0)
<b>kofein</b>	100,0 (1,7)	89,1 (6,2)	73,0 (11,3)
<b>lakoamid</b>	95,0 (4,9)	100,0 (0,5)	95,7 (2,5)
<b>lamotrigin</b>	95,8 (0,8)	100,0 (2,7)	94,6 (2,3)
<b>levetiracetam</b>	100,0 (2,5)	91,3 (7,0)	54,3 (10,7)
<b>likarbazepin</b>	84,7 (2,5)	99,0 (3,7)	100,0 (1,0)
<b>metformin</b>	37,8 (5,0)	55,3 (3,7)	100,0 (6,6)
<b>metoprolol</b>	93,6 (0,3)	100,0 (1,4)	98,9 (1,1)
<b>naproksen</b>	83,1 (2,2)	98,6 (2,1)	100,0 (1,8)
<b>norfloksacin</b>	98,0 (0,5)	100,0 (11,6)	72,7 (6,2)
<b>oksazepam</b>	88,0 (1,8)	98,6 (3,4)	100,0 (0,1)
<b>okskarbazepin</b>	86,6 (5,6)	96,0 (11,7)	100,0 (1,8)
<b>pantoprazol</b>	0,1 (11,6)	3,4 (5,0)	100,0 (1,5)
<b>paracetamol</b>	92,9 (1,7)	100,0 (3,5)	73,3 (8,5)
<b>primidon</b>	91,2 (3,8)	100,0 (1,8)	98,4 (1,9)
<b>propifenazon</b>	100,0 (0,9)	76,2 (10,9)	59,6 (14,2)
<b>propranolol</b>	90,6 (2,9)	100,0 (1,3)	91,7 (3,4)
<b>ranitidin</b>	67,4 (0,6)	26,0 (1,9)	100,0 (5,5)
<b>rosuvastatin</b>	37,6 (2,0)	85,5 (14,6)	100,0 (0,6)
<b>sertralin</b>	94,9 (2,1)	100,0 (1,7)	45,6 (12,1)
<b>teofilin</b>	97,4 (0,4)	100,0 (4,2)	81,5 (0,6)
<b>tramadol</b>	95,5 (0,7)	100,0 (3,8)	69,6 (13,0)
<b>trimetoprim</b>	89,8 (2,2)	100,0 (1,4)	94,9 (0,8)
<b>valsartan</b>	68,3 (3,2)	90,7 (2,6)	100,0 (4,7)



<b>venlafaksin</b>	92,4 (0,5)	100,0 (1,2)	82,9 (8,4)
--------------------	------------	-------------	------------

#### 4.2.1.6 Izbor nosilca za ekstrakcijo

Izbirali smo med nosilci Strata-X, Strata C18-E in Oasis<sup>®</sup> HLB. Njihove lastnosti so prikazane v preglednici III, opis samega postopka pa je naveden v poglavju 3.2.5.6. S primerjavo odzivov ekstrahiranih vzorcev in vzorcev standardov smo dobili rezultate, prikazane na sliki 10.



**Slika 10: Povprečni relativni izkoristki in ponovljivosti (n = 3) učinkovin ekstrahiranih na različnih trdnih nosilcih (n = 39).**

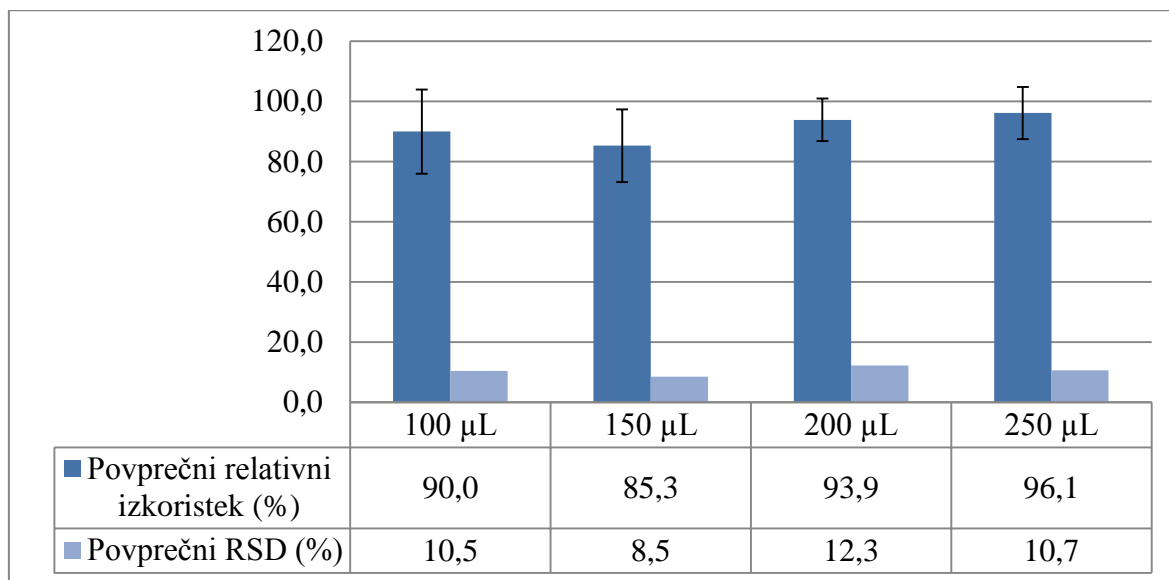
Nosilca Strata-X in Oasis<sup>®</sup> HLB sta si po lastnostih zelo podobna, a smo z Oasis<sup>®</sup> HLB dobili nižje izkoristke kot s Strata-X. Nosilec Strata C18-E, ki vsebuje sorbent na silikatni osnovi, pa je imel najnižje relativne izkoristke in slabšo ponovljivost. Ker je imelo kar 74 % učinkovin najvišji izkoristek ekstrakcije pri uporabi Strata-X, smo ta nosilec izbrali za uporabo v naši novo razviti metodi.

#### 4.2.1.7 Izbira volumna topila za raztapljanje suhega zaostanka

Poleg samega volumna vzorca lahko na faktor koncentriranja pomembno vplivamo tudi z volumnom topila, v katerem raztopimo suhi zaostanek. Postopek poskusa je opisan v poglavju 3.2.5.7. Rezultati na sliki 11 prikazujejo, da imajo učinkovine najvišji povprečni relativni izkoristek pri najvišjem volumnu. V tem primeru bi bil faktor koncentriranja metode 800-kraten. Ker pa je bil naš cilj čim višji faktor koncentriranja, smo za našo metodo izbrali manjši volumen, in sicer 150  $\mu$ L topila. S tem smo faktor koncentriranja

zvišali kar za 1,7-krat, na 1.333,3-kratno koncentriranje. Poleg faktorja koncentriranja je na izbiro pomembno vplivala tudi ponovljivost, ki je bila pri izbranem volumnu najnižja.

Čeprav so imele učinkovine pri 100  $\mu\text{L}$  topila boljše relativne izkoristke, pa tega volumna nismo izbrali. Pri nižjih volumnih namreč ostane nad usedlino v steklenem insertu manj tekočine, kar lahko poveča možnost zapletov pri analizi na LC-MS/MS.



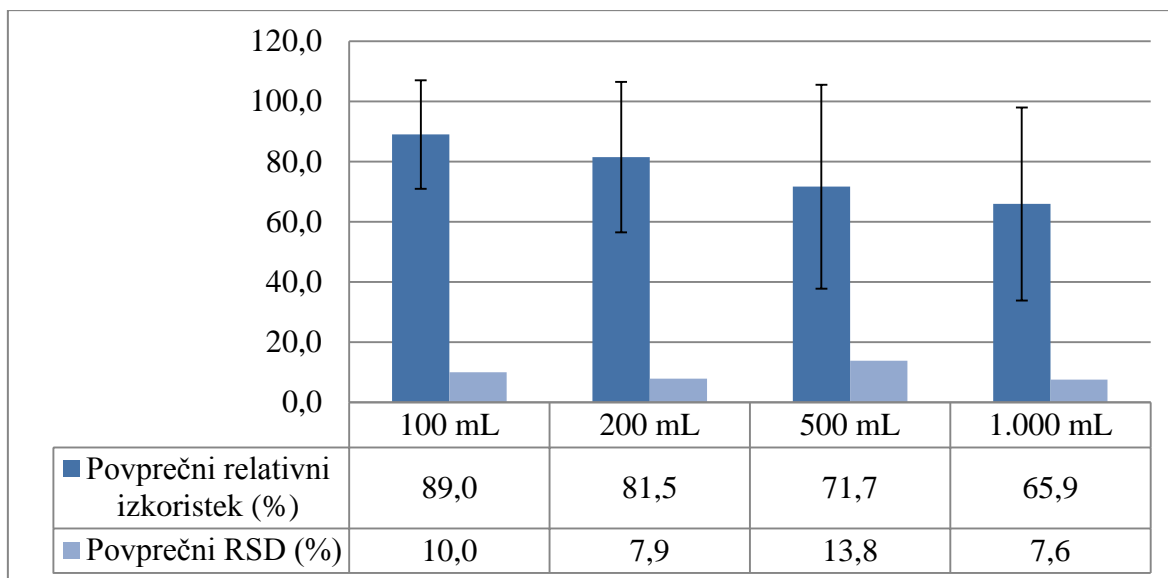
**Slika 11: Relativni povprečni izkoristki in ponovljivosti (n = 6) pri različnih volumnih topila za raztapljanje suhega zaostanka (n = 39).**

#### 4.2.1.8 Volumen nanosa vzorca

Metoda, iz katere smo izhajali, je v protokolu predpisovala volumen nanosa vzorca 100 mL. Ker s tem volumnom dobimo manjši faktor koncentriranja, smo preizkusili še višje volumne, 200 mL, 500 mL in 1.000 mL. Postopek dela je opisan v poglavju 3.2.5.8, rezultati pa so predstavljeni na sliki 12.

Pri izboru volumna vzorca moramo upoštevati tudi čas, ki ga potrebuje vzorec, da preide skozi kartušo. Pri pretoku 8 mL/min potrebujemo za 100 mL približno 13 minut, za 200 mL 25 minut, za 500 mL 63 minut in za 1.000 mL kar 125 minut. Večji volumen vzorca pa vsebuje tudi več nečistot, ki lahko hitro zamašijo kartuše in ustavijo pretok, pa tudi čas nanosa se lahko pri višjih volumnih bistveno podaljša.

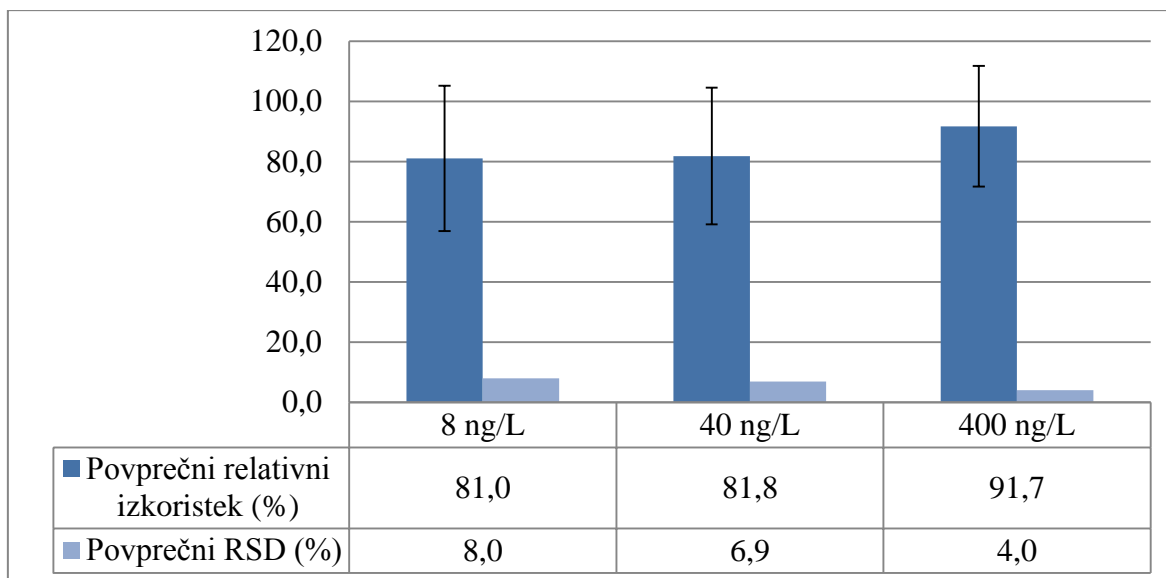
Na koncu smo za volumen vzorca izbrali 200 mL, saj je imelo pri tem volumnu največ učinkovin (41 %) najvišji izkoristek, pa tudi ponovljivost je boljša kot pri nanosu 100 in 500 mL vzorca.



**Slika 12: Vpliv volumnov nanosa vzorca na izkoristke učinkovin (n = 39).**

#### **4.2.1.9 Vpliv koncentracije učinkovin**

Preverili smo še izkoristke 10- in 50-krat nižjih koncentracij učinkovin v vzorcu (poglavje 3.2.5.9). Ugotovili smo, da pri nižjih koncentracijah povprečni relativni izkoristek sicer malo pade, vendar se bistveno ne spremeni, ponovljivost pa se malo zniža, a je še vedno ustrezna. Kot pričakovano, so imele učinkovine pri najvišjih koncentracijah tudi najvišje izkoristke in najboljše ponovljivosti, kar je prikazano na sliki 13. Z izvedbo poizkusa smo torej dokazali, da je metoda primerna za vrednotenje širokega razpona koncentracij učinkovin v vzorcu.



Slika 13: Vplivi koncentracij učinkovin na relativni izkoristek in vrednost RSD (n = 39).

#### 4.2.1.10 Volumen injiciranja vzorca na masnem spektrometru

Preverili smo tudi različne volumne injiciranja vzorca na LC-MS/MS. Vzorec smo pripravili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.5.1, in ga enkrat ekstrahirali skladno z razvitim postopkom SPE (poglavje 3.2.6). Isti vzorec smo analizirali s štirimi različnimi volumni injiciranja: 1  $\mu\text{L}$ , 1,5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  in 2,5  $\mu\text{L}$ . Iz odzivov smo izračunali determinacijski koeficient, ki je bil za 88 % učinkovin višji od 0,99 (preglednica XVI). Višina odziva vzorca je z volumnom injiciranja pričakovano linearno rastla. Pri injiciranem volumnu 2,5  $\mu\text{L}$  pa so se kromatografski vrhovi polarnih učinkovin, ki se prve eluirajo, popačili. Vzrok za to je zelo različna začetna sestava mobilne faze in topila, v katerem je bil vzorec raztopljen. Za optimalen volumen injiciranja vzorca smo tako izbrali 2  $\mu\text{L}$ , saj smo z njim zagotovili visok odziv in lepe kromatografske vrhove.

Preglednica XVI: Linearnost injiciranja različnih volumnov vzorcev: 1  $\mu\text{L}$ , 1,5  $\mu\text{L}$ , 2  $\mu\text{L}$  in 2,5  $\mu\text{L}$  na LC-MS/MS.

Učinkovine	$R^2$
amantadin	0,9741
antipirin	0,9999
atenolol	0,9319
atorvastatin	0,9984

bisoprolol	0,9922
ciprofloksacin	0,9999
diazepam	0,9947
diklofenak	0,9998
escitalopram	0,9992

feksofenadin	0,9969
furosemid	0,9998
gabapentin	0,9875
gemfibrozil	0,9956
irbesartan	0,9989
karbamazepin	0,9984
klaritromicin	0,9930
kofein	0,9900
lakoamid	0,9996
lamotrigin	0,9932
levetiracetam	0,9972
likarbazepin	0,9983
metformin	0,9268
metoprolol	0,9924
naproksen	0,9970
norfloksacin	0,9726
oksazepam	0,9994

okskarbazepin	0,9970
pantoprazol	0,9951
paracetamol	0,9947
paroksetin	0,9997
primidon	0,9997
propifenazon	0,9999
propranolol	0,9997
ranitidin	0,9920
rosuvastatin	0,9998
sertralin	0,9957
sulfametoksazol	0,9924
teofilin	0,9981
tramadol	0,9983
trimetoprim	0,9988
valsartan	0,9967
venlafaksin	0,9997

### 4.3 Vrednotenje razvite metode za analizo površinskih voda

Cilj vrednotenja analizne metode je prikazati njeno primernost za načrtovane poskuse. To je proces, s katerim dokažemo, da so pridobljeni rezultati z novo razvito metodo točni in ponovljivi. Ovrednotili smo ponovljivost nove metode ter njeno točnost, linearnost, mejo določitve, območje in izkoristek (52). Rezultati so predstavljeni v preglednici XVII, opis postopka vrednotenja pa smo opisali v poglavju 3.2.7.

#### ❖ Delovno območje metode, njena linearnost in meja določitve

Koncentracijsko območje, znotraj katerega je metoda natančna, točna in linearna, imenujemo delovno območje metode. Spodnja meja delovnega območja metode je LOQ. To je najnižja koncentracija, pri kateri lahko analit še kvantitativno opredelimo. Za izbrane učinkovine smo LOQ določili skladno s postopkom, opisanem v poglavju 3.2.7. Delovna območja metode so se zaradi velikega nabora različnih učinkovin med seboj zelo razlikovale. Večina je imela vrednosti LOQ v nizkem koncentracijskem območju (ng/L);

48 % učinkovin je imelo vrednost LOQ < 1 ng/L, 23 % 1–5 ng/L, 29 % pa 5–100 ng/L (preglednica XVII). Najvišje vrednosti LOQ so imeli, zaradi slabe ponovljivosti pri nižjih koncentracijah, atorvastatin in nifedipin (100 ng/L) ter metformin in pantoprazol (160 ng/L).

Linearnost je sposobnost analizne metode, da v določenem koncentracijskem območju daje rezultate, ki so premo sorazmerni koncentraciji merjenega analita v vzorcu. Linearnost razvite metode smo vrednotili za vse učinkovine v enako širokem koncentracijskem območju, ki smo ga prilagodili glede na njihove odzive na aparatu LC-MS/MS. Za učinkovine s FPK 1 je bilo to območje 8–1.600 ng/L. Linearnost smo opredelili z determinacijskim koeficientom  $R^2$ , ki smo ga izračunali za delovno območje. Mejo smo postavili na  $R^2 \geq 0,99$ . Metoda za merjenje koncentracij učinkovin v površinskih vodah je bila linearna za kar 40 učinkovin, le vrednosti  $R^2$  azitromicina, atorvastatina, nifedipina in propifenazona niso zadoščale kriteriju za linearnost (preglednica XVII).

#### ❖ Ponovljivost

Ponovljivost je definirana kot natančnost analizne metode, ki jo v krajšem časovnem intervalu večkrat izvedemo pod istimi analiznimi pogoji. Preverjali smo znotrajdnevno in meddnevno stopnjo ujemanja rezultatov vzorca z najvišjo koncentracijo, ki smo ga pripravili trikrat v treh paralelkah. Ponovljivost smo podali v obliki RSD, ki smo jih izračunali iz rezultatov, pri čemer smo kot mejni kriterij postavili vrednost RSD <15 %. Rezultati so predstavljeni v preglednici XVII. Kar 40 učinkovin je imelo vrednosti meddnevni RSD manjše od 7 %, 3 učinkovine <13 %, nifedipin vrednost 15,9 %. Znotrajdnevne vrednosti RSD so bile pri 43 učinkovinah <9 %, najvišjo pa smo zabeležili v primeru pantoprazola, in sicer 17,8 %. Ker sta imeli samo dve učinkovini previsoko vrednost RSD, sklepamo, da je ponovljivost metode zelo dobra.

#### ❖ Točnost

Točnost metode podajamo kot stopnjo ujemanja izračunane in dejanske koncentracije analita v merjenem vzorcu. Za izračun smo uporabili vzorce s koncentracijo 1.200 ng/L, ki smo jih pripravili po postopku, predstavljenem v preglednici XII (poglavje 3.2.7). Za izračune smo uporabili enačbo 6 in postavili kriterij za točnost na  $\pm 25$  %. Rezultati v preglednici XVII kažejo, da smo pri kar 84 % učinkovinah dobili ustrezno točnost. Največje odstopanje smo opazili pri azitromicinu, klaritromicinu in atorvastatinu. Našemu

kriteriju pa niso ustrezali še propifenazon, ranitidin, rosuvastatin in sulfametoksazol. 100-odstotno točnost pa je izkazal tramadol.

#### ❖ Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek ekstrakcije smo izračunali z enačbo 3. Uporabili smo vzorec s koncentracijo 1.200 ng/L, ki smo ga pripravili za vrednotenje ponovljivosti. Izkoristek predstavlja delež spojine, ki smo jo uspeli ekstrahirati. Uspelo nam je ekstrahirati 43 spojin, z izjemo metformina, ki je imel izkoristek 0,3 %. Nizek izkoristek (<20 %) so imele polarne učinkovine amantadin, atenolol, atorvastatin, gabapentin, levetiracetam in ranitidin. Pri 28 učinkovinah pa so bili izkoristki med 80 in 120 % (preglednica XVII). Najvišji izkoristek je izkazal propifenazon, in sicer zaradi kontaminacije sistema s to učinkovino.

#### ❖ Vpliv ozadja

Okoljski vzorci vsebujejo poleg iskanih učinkovin še veliko število komponent, ki lahko vplivajo na ionizacijo analitov ter tako ojačijo ali oslabijo signal. Ko je vrednost ME višja od 100 %, pride do povišanega odziva na LC-MS/MS, in obratno, odziv je nižji pri vrednostih  $ME < 100$  %. Vpliv ozadja smo vrednotili tako, kot je opisano v poglavju 3.2.7 na vzorcu iz reke Ledave. Rezultate, ki so navedeni v preglednici XVII, smo izračunali s pomočjo enačbe 7. Vrednosti ME so bile za različne učinkovine zelo različne. V območju  $100 \pm 20$  % so jih izkazovale učinkovine atenolol, azitromicin, gabapentin, oksazepam, propifenazon, rosuvastatin in tramadol. Največji vpliv je imelo ozadje na karbamazepin. Pri večini učinkovin je ozadje signal zmanjšalo, ta pa se je povečal le pri irbesartanu in metforminu. Z upoštevanjem izotopsko označenih internih standardov se je vpliv ozadja bistveno zmanjšal. Znotraj območja je bilo tako kar 57 % učinkovin. Upoštevanje omenjenih standardov je najmanj zmanjšalo vpliv ozadja v primeru pantoprazola, paracetamola in lamotrigina.

**Preglednica XVII: Validacijski parametri analizne metode za ekstrakcijo učinkovin iz površinskih voda.**

Učinkovina	Izkoristek pri $c = 1,2$ $\mu\text{g/L}$ (%)	Ponovljivost		Točnost (%)	LOQ (ng/L)	Območje linearnosti (ng/L)	$R^2$	Regresijska premica	FPK	ME (%)	
		RSD (%)								–	$z$ IS
		ZD	MD								
amantadin	18,1	8,8	7,0	106,3	0,59	0,59–79	0,9999	$y = 2.743,3x + 3.627,0$	0,049	52,5	68,3
antipirin	96,8	3,5	1,6	96,3	0,32	0,32–64	0,9998	$y = 2.786,4x + 988,06$	0,040	61,9	72,3
atenolol	9,4	6,5	6,6	110,5	80	80–1.600	0,9997	$y = 5.620,8x + 3.631,6$	1,000	90,3	92,4
atorvastatin	14,4	0,6	4,1	65,9	100	100–400	0,9607	$y = 8.384,7x - 2.870,0$	0,250	29,8	96,3
azitromicin	115,0	1,2	3,3	44,3	50	50–200	0,9339	$y = 1.118,6x + 115.569$	0,125	105,8	102,6
bisoprolol	109,9	0,1	1,7	83,5	0,16	0,16–32	0,9999	$y = 5.487,7x + 224,80$	0,020	67,7	95,5
ciprofloksacin	127,0	1,6	1,1	97,0	0,80	0,80–160	0,9998	$y = 8.824,6x - 1.712,1$	0,100	24,4	80,1
diazepam	108,5	4,9	2,3	100,7	0,40	0,40–80	0,9997	$y = 5.803,2x + 2.585,9$	0,050	36,3	101,4
diklofenak	115,6	2,3	0,8	101,0	1,6	1,60–320	0,9995	$y = 4.483,2x + 18.623$	0,200	42,2	98,3
escitalopram	101,2	0,3	1,7	101,2	0,08	0,08–16	0,9997	$y = 4.822,2x - 1.243,4$	0,010	52,5	74,1
feksofenadin	104,6	1,5	2,5	92,3	0,16	0,16–32	0,9996	$y = 5.626,0x + 223,96$	0,020	76,5	80,6
furosemid	95,0	0,3	1,8	82,2	8,0	8,0–1.600	0,9999	$y = 6.871,5x + 135,01$	1,000	61,7	66,1
gabapentin	2,6	4,6	2,5	109,6	40	40–8.000	0,9998	$y = 4.518,0x + 412,14$	5,000	81,6	84,2
gemfibrozil	119,2	2,1	3,5	99,4	4,0	4,0–800	0,9986	$y = 10.176x - 1.265,2$	0,500	60,6	75,2
irbesartan	93,3	2,7	2,8	82,2	0,03	0,03–6,4	0,9994	$y = 2.204,3x - 26,173$	0,004	121,0	115,1



<b>karbamazepin</b>	107,5	0,9	0,3	99,8	0,16	0,16–32	0,9997	$y = 4.315,0x + 1.559,0$	0,020	20,5	99,1
<b>klaritromicin</b>	137,9	2,0	3,5	65,5	0,16	0,16–3,2	0,9992	$y = 1.014,2x + 1.639,6$	0,002	63,2	84,2
<b>kofein</b>	105,2	1,8	4,7	107,7	0,48	0,48–64	0,9998	$y = 3.975,3x + 10.059$	0,040	32,2	77,2
<b>lakoamid</b>	106,6	1,0	4,0	112,8	40	40–800	0,9964	$y = 8.691,7x + 24.722$	0,500	47,8	75,9
<b>lamotrigin</b>	97,2	0,1	2,0	109,0	1,60	1,60–320	0,9980	$y = 4.140,7x + 1.817,2$	0,200	35,2	55,1
<b>levetiracetam</b>	6,7	7,0	6,0	115,9	32	32–6.400	0,9999	$y = 3.622,2x + 904,89$	4,000	44,8	74,9
<b>likarbazepin</b>	113,5	4,5	6,6	101,5	4,0	4,0–80	0,9980	$y = 5.369,5x + 5.475,6$	0,050	73,9	84,1
<b>metformin</b>	0,3	0,2	5,2	97,8	160	160–3.200	0,9999	$y = 706,47x + 10.907$	2,000	125,9	117,8
<b>metoprolol</b>	105,0	0,2	0,5	102,4	0,40	0,40–80	0,9999	$y = 5.107,5x - 131,00$	0,050	51,3	96,1
<b>naproksen</b>	112,1	3,0	3,1	93,3	16	16–3.200	0,9970	$y = 4.238,6x - 1318,3$	2,000	68,0	83,2
<b>nifedipin</b>	115,3	3,2	15,9	88,2	100	100–400	0,9545	$y = 3.214,3x + 5.975,4$	0,250	53,3	62,4
<b>norfloksacin</b>	137,0	1,2	2,9	101,6	0,80	0,80–160	0,9992	$y = 9.477,2x + 2.769,8$	0,100	33,1	93,4
<b>oksakarbazepin</b>	89,1	0,7	8,7	96,7	1,60	1,60–320	0,9995	$y = 4.770,9x - 628,85$	0,200	68,2	93,2
<b>oksazepam</b>	112,6	3,3	0,9	99,7	0,40	0,40–80	0,9998	$y = 3.886,3x + 404,81$	0,050	86,8	95,1
<b>pantoprazol</b>	35,2	17,8	12,4	81,1	160	160–3.200	1,0000	$y = 6.068,8x + 6334,0$	2,000	22,7	61,0
<b>paracetamol</b>	23,8	6,4	4,6	109,8	6,4	6,4–128	1,0000	$y = 2.901,2x + 5.411,1$	0,080	22,2	56,1
<b>paroksetin</b>	75,3	2,8	1,6	83,6	0,64	0,64–13	0,9994	$y = 577,73x + 742,91$	0,008	43,4	68,8
<b>primidon</b>	107,1	0,2	1,2	101,4	3,2	3,2–640	0,9997	$y = 5.062,8x + 977,33$	0,400	38,7	66,2
<b>propifenazon*</b>	165,6	0,6	3,3	109,3	4	4–16	0,9543	$y = -2.374,0x + 23.1209$	0,028	104,1	101,7
<b>propranolol</b>	108,7	1,3	3,5	96,2	0,22	0,22–45	0,9976	$y = 1.875,7x + 23.531$	0,010	57,7	79,2

<b>ranitidin</b>	3,0	7,8	8,5	126,4	21	21–1.715	0,9994	$y = 7.690,5x - 12.959$	1,072	73,3	86,3
<b>rosuvastatin</b>	108,3	2,4	3,1	72,4	1,6	1,6–331	0,9995	$y = 5.012,5x + 206,93$	0,207	109,3	102,9
<b>sertralin</b>	103,9	0,9	1,9	98,8	0,08	0,08–16	0,9994	$y = 2.421,4x + 702,06$	0,010	68,2	89,1
<b>sulfametoksazol</b>	42,6	7,1	4,8	70,9	4,0	4,0–320	0,9998	$y = 733,08x + 1.069,8$	0,200	40,4	64,5
<b>teofilin</b>	63,6	1,7	3,9	109,8	3,2	3,2–640	0,9999	$y = 2.811,6x + 2.340,8$	0,400	47,6	69,7
<b>tramadol</b>	104,4	0,4	1,3	100,0	0,18	0,18–36	0,9997	$y = 5.646,9x - 174,84$	0,023	92,4	95,6
<b>trimetoprim</b>	96,6	1,4	2,0	98,2	0,40	0,40–80	0,9998	$y = 5.132,5x + 220,65$	0,050	59,2	87,8
<b>valsartan</b>	81,7	0,7	3,2	83,9	0,80	0,80–160	0,9999	$y = 6.995,0x - 2.255,0$	0,100	43,0	69,8
<b>venlafaksin</b>	110,1	1,1	2,1	103,2	0,08	0,08–16	0,9999	$y = 6.122,2x + 860,70$	0,010	22,1	65,1

**Legenda:** \* (zaradi visokega odziva ozadja na LC-MS/MS izračunana vrednost ni relevantna.), **ZD** (znotrajdnevna ponovljivost), **MD** (meddnevna ponovljivost), **FPK** (faktor prilagoditve koncentracije)

#### 4.4 Prisotnost učinkovin v vzorcih slovenskih površinskih voda

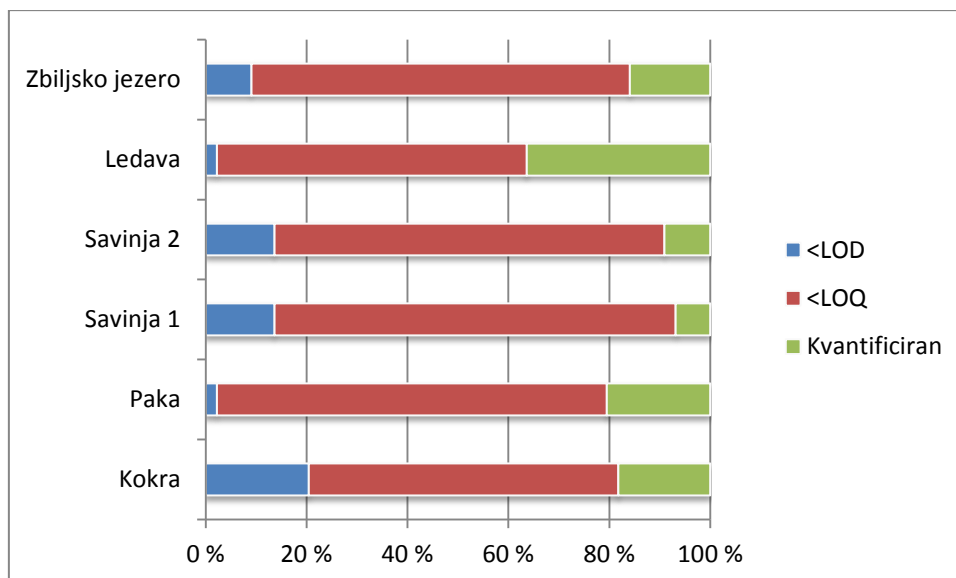
Poleg razvoja in vrednotenja metode je eden izmed glavnih ciljev tudi njena uporaba za analizo realnih vzorcev. Vzorce površinskih voda, ki so naštetih v preglednici XIII, smo pripravili po optimiziranem postopku (poglavje 3.2.6), izmerjene koncentracije pa so smo izračunali z enačbo 9.

Rezultati analize realnih vzorcev so zbrani v preglednici XVIII.

**Preglednica XVIII: Rezultati analize vzorcev površinskih voda.**

<b>Vzorec</b> <b>Učinkovina</b>	<b>Kokra</b> (ng/L)	<b>Paka</b> (ng/L)	<b>Savinja</b> <b>1</b> (ng/L)	<b>Savinja</b> <b>2</b> (ng/L)	<b>Ledava</b> (ng/L)	<b>Zbiljsko</b> <b>jezero</b> (ng/L)
<b>amantadin</b>	+	+	+	+	<b>0,92</b>	+
<b>antipirin</b>	/	+	/	/	+	/
<b>atenolol</b>	+	+	+	+	+	+
<b>atorvastatin</b>	+	+	+	+	+	+
<b>azitromicin</b>	+	+	+	+	+	+
<b>bisoprolol</b>	+	<b>1,29</b>	+	+	<b>0,61</b>	+
<b>ciprofloksacin</b>	/	+	+	+	+	+
<b>diazepam</b>	+	+	+	+	+	+
<b>diklofenak</b>	+	+	+	+	+	+
<b>escitalopram</b>	+	+	+	+	<b>0,42</b>	+
<b>feksofenadin</b>	<b>0,59</b>	+	+	+	<b>0,60</b>	+
<b>furosemid</b>	+	+	+	+	+	+
<b>gabapentin</b>	/	<b>44,57</b>	+	+	+	/
<b>gemfibrozil</b>	/	+	+	+	+	+
<b>irbesartan</b>	<b>0,27</b>	<b>4,64</b>	<b>0,81</b>	<b>0,62</b>	<b>9,33</b>	<b>0,15</b>
<b>karbamazepin</b>	<b>0,45</b>	+	/	+	<b>8,54</b>	<b>0,17</b>
<b>klaritromicin</b>	+	+	+	+	+	+
<b>kofein</b>	<b>1,37</b>	<b>1,66</b>	<b>2,75</b>	<b>3,06</b>	<b>2,10</b>	<b>1,06</b>
<b>lakoamid</b>	/	/	/	/	/	/
<b>lamotrigin</b>	+	+	+	+	<b>3,04</b>	+

levetiracetam	+	+	/	/	+	+
likarbazepin	+	+	+	+	+	+
metformin	+	+	+	+	+	+
metoprolol	+	+	+	+	+	+
naproksen	+	+	+	+	+	+
nifedipin	/	+	+	+	+	+
norfloksacin	+	+	+	+	+	+
oksazepam	+	+	+	+	<b>0,43</b>	+
okskarbazepin	/	<b>3,46</b>	+	+	<b>6,21</b>	+
pantoprazol	+	+	+	+	+	+
paracetamol	/	+	+	+	+	+
paroksetin	+	+	+	+	+	+
primidon	/	+	+	+	+	+
propifenazon	+	+	+	/	+	+
propranolol	+	+	/	/	+	+
ranitidin	+	+	+	+	+	/
rosuvastatin	+	<b>2,81</b>	+	+	+	+
sertralin	+	+	+	+	<b>0,24</b>	+
sulfametoksazol	<b>6,25</b>	+	/	/	<b>11,80</b>	<b>1,12</b>
teofilin	<b>4,12</b>	+	+	+	<b>4,06</b>	+
tramadol	<b>0,45</b>	<b>2,04</b>	+	+	<b>18,56</b>	<b>0,23</b>
trimetoprim	+	+	+	+	+	+
valsartan	<b>2,56</b>	<b>47,23</b>	<b>3,76</b>	<b>5,01</b>	<b>8,39</b>	<b>0,78</b>
venlafaksin	+	<b>1,02</b>	+	<b>0,09</b>	<b>3,01</b>	<b>0,08</b>
<b>Legenda:</b> / (pod LOD), + (prisoten, a pod LOQ)						



**Slika 14: Grafični prikaz pogostosti prisotnosti učinkovin v vzorcih izbranih slovenskih površinskih voda.**

Pred vsako analizo vzorca smo po enakem postopku analizirali tudi slepi vzorec. Potrebovali smo ga za dodatno prilagoditev vrednosti LOD zaradi morebitne kontaminacije sistema z analiti. Vrednost LOD smo definirali kot razmerje odzivov med realnim in slepim vzorcem, v našem primeru je bilo to več kot 4 : 1. V vzorcu rek Ledava in Paka so imele vse analizirane učinkovine to razmerje nad postavljeno mejo, v ostalih vzorcih pa je bilo prisotnih nekaj učinkovin z nižjimi razmerji (najpogosteje antipirin, lakozamid in levetiracetam).

Lakozamida nismo zaznali v nobenem vzorcu. Ostale učinkovine smo zaznali v vsaj štirih vzorcih, razen antipirina, ki smo ga zaznali v dveh.

Kvantitativno smo lahko ovrednotili le tiste učinkovine, ki so imele izmerjene vrednosti nad LOQ. Dobljene rezultate smo primerjali z vrednostmi LOQ, ki smo jih pridobili tekom vrednotenja metode. Učinkovine, ki so imele izmerjene vrednosti višje od LOQ, smo uspeli zanesljivo kvantificirati. Izmed 44 smo jih lahko kvantificirali 18.

Razmerja med izmerjenimi, zaznanimi in nezaznanimi učinkovinami so prikazana na sliki 14. Največ učinkovin z vrednostmi nad LOQ smo našli v Ledavi, Paki in Kokri, in sicer 16, 9 in 8. V vseh 6 preiskovanih vzorcih smo kvantificirali irbesartan (najmanj 0,15 ng/L v Zbiljskem jezeru in največ 9,33 ng/L v Ledavi), kofein (najmanj 1,06 ng/L v Zbiljskem

jezeru in največ 3,06 v vzorcu Savinja 2) in valsartan (najmanj 0,78 ng/L v Zbiljskem jezeru in največ 47,23 ng/L v Paki).

V vzorcu iz Zbiljskega jezera smo izmerili zelo nizke vrednosti učinkovin. Najnižja je bila koncentracija venlafaksina (0,08 ng/L), najvišja pa kofeina (1,06 ng/L).

Učinkovini z najvišjima koncentracijama smo izmerili v vzorcu reke Pake, to sta bila gabapentin (44,57 ng/L) in valsartan (47,23 ng/L). Visoke koncentracije učinkovin smo zaznali tudi v vzorcu reke Ledave, v kateri smo jih tudi največ kvantificirali. Največ je bilo tramadola (18,56 ng/L) in sulfametoksazola (11,80 ng/L).

V primerjavi z objavljenimi rezultati v strokovni literaturi je bila pojavnost karbamazepina v odvzetih vzorcih naših površinskih voda nizka. Izmerili so ga v intervalu od 1 do 3.240 ng/L (18, 19, 21–27), medtem ko ga je bilo v naših vzorcih le 0,45 do 8,54 ng/L. Prisotnost paracetamola smo v naših vzorcih samo zaznali (<6,4 ng/L), medtem ko poročajo, da so njegove koncentracije v okolju lahko zelo visoke, do 2.382 ng/L (18, 19, 21, 23, 25, 26). V primerjavi s podatki, navedenimi v preglednici I sta bila kofein in tramadol v naših vzorcih prisotna v veliko nižjih koncentracijah. Njune najvišje izmerjene koncentracije, navedene v literaturi so 33.200 ng/L (kofein) in 7.731 ng/L (tramadol) (18, 19, 21, 26, 27), medtem ko smo v naših vzorcih izmerili največ 3,06 ng/L kofeina in 18,56 ng/L tramadola. Podatkov o irbesartanu, ki smo ga v vseh vzorcih izmerili v koncentracijah od 0,15 do 9,33 ng/L, pa v razpoložljivi literaturi nismo našli. Trimetoprim se pogosto pojavlja v koncentracijah do 290 ng/L (18, 19, 21, 22, 25, 26), v naših vzorcih pa smo ga le zaznali (<0,4 ng/L). Koncentracije azitromicina, ciprofloksacina, gemfibrozila, naproksena in norfloksacina v površinskih vodah lahko, glede na podatke v literaturi, dosežejo tudi do nekaj 100 ng/L (19, 22–27). V vzorcih izbranih slovenskih površinskih voda pa smo jih le zaznali, saj so bile njihove koncentracije pod mejo določitve.

Če torej primerjamo slovenske in površinske vode drugod po svetu, opazimo, da je njihova obremenjenost z različnimi učinkovinami razmeroma nizka. Nobena izmerjena vrednost namreč ni presegla 50 ng/L, zelo veliko analiziranih učinkovin pa je bilo pod mejo zaznave. Ugotovili smo tudi, da so koncentracije učinkovin tako v slovenskih kot v jezerih drugod po svetu nižje od tistih, izmerjenih v rekah.

## 5 ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo se osredotočili na razvoj in optimizacijo postopka ekstrakcije 44 izbranih učinkovin iz vzorcev površinskih voda. Eden izmed glavnih ciljev naloge je bil uporaba nove metode na realnih vzorcih, odvzetih iz izbranih slovenskih rek in jezera.

Najprej smo spremljali pojavnost 111 učinkovin v štirih vzorcih odpadnih voda, odvzetih na iztokih čistilnih naprav. Te vzorce smo ovrednotili z metodo SPE-DEX, predhodno razvito v laboratorijih Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za Farmacijo v Ljubljani. Približno tretjina analiziranih učinkovin v posameznem vzorcu je bila pod mejo zaznave, največ kvantificiranih učinkovin pa je bilo v koncentracijskem razponu od 10 do 100 ng/L. Izbrali smo tiste učinkovine, katerih koncentracija je bila višja od 100 ng/L, saj zanje obstaja večja možnost, da jih bomo našli tudi v površinskih vodah. K 41 na ta način izbranim učinkovinam smo po pregledu strokovne literature dodali še 3. Izbrane učinkovine, za katere smo se odločili razviti novo analizo metodo, spadajo v različne terapevtske skupine in imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti.

Tekom razvoja metode ekstrakcije učinkovin iz površinskih voda smo preverjali različne parametre: elucijska topila, izbor trdnih nosilcev za ekstrakcijo, vplive pH vzorcev in volumnov njihovega nanosa, vplive koncentracij učinkovin v vzorcu, volumne topila za raztapljanje suhega zaostanka in volumne injiciranja vzorca na LC-MS/MS. Optimizirani metodi po ekstrakciji vzorca na trdnem nosilcu je sledila instrumentalna analiza z LC-MS/MS.

Metodo smo natančno ovrednotili in ji določili območje linearnosti v koncentracijskem razponu učinkovin od 8 do 1.600 ng/L (glede na faktor prilagoditve koncentracije 1). Ponovljivost naše metode je bila dobra, saj so imeli rezultati meritev vseh učinkovin, z izjemo nifedipina, relativni standardni odklon <13 %. Izkoristki ekstrakcije so se gibali od 0,3 % pa vse do 137,9 %. Meja določitve je bila za večino učinkovin v nizkem koncentracijskem območju (ng/L) in le za štiri med njimi nad 100 ng/L. Vpliv ozadja je bilo prisotno pri meritvah večine učinkovin in je povzročalo zmanjšanje detekcijskih signalov. Z uporabo izotopsko označenih internih standardov pa smo te negativne vplive v večini primerov uspeli bistveno zmanjšati.

Novo, optimizirano metodo smo nato uporabili za ugotavljanje prisotnosti in koncentracij izbranih učinkovin v vzorcih rek Kokre, Pake, Ledave, Savinje in v vzorcu Zbiljskega jezera. Zaznali smo 43 od 44 iskanih učinkovin in uspešno izmerili koncentracije 18 med njimi (vrednosti nad LOQ). Največ smo jih uspeli kvantitativno ovrednotiti v vzorcu reke Ledave. Irbesartan, kofein in valsartan so bili v vseh vzorcih prisotni nad vrednostmi LOQ. Najnižja izmerjena koncentracija je bila 0,08 ng/L za venlafaksin v vzorcu Zbiljskega jezera, najvišja, 47,23 ng/L za valsartan pa v vzorcu reke Pake.

Razvili in optimizirali smo metodo, s katero lahko v površinskih vodah zaznamo in izmerimo koncentracije 44 učinkovin iz različnih terapevtskih skupin. Poznavanje točnih vrednosti učinkovin v okolju bo vse bolj pomembno za ekotoksikološke študije in spremljanje onesnaženosti okolja. Z našo metodo smo tako sposobni zaznati ne le najpogostejše farmacevtike, temveč tudi tiste, ki so jih do sedaj le redko merili, zato je njihov vpliv na okolje le malo znan. Onesnaženost slovenskih rek je v primerjavi z rekami drugod po svetu še razmeroma nizka, vendar pa se moramo zavedati, da se lahko to stanje zaradi vedno večje uporabe zdravil spremeni.



## LITERATURA

1. Poraba zdravil v Sloveniji v letu 2016, [http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/poraba\\_zdravil\\_2016\\_290617\\_zadnja.pdf](http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/publikacije-datoteke/poraba_zdravil_2016_290617_zadnja.pdf) 29.7.2017
2. [https://www.whocc.no/atc/structure\\_and\\_principles/](https://www.whocc.no/atc/structure_and_principles/) 29.7.2017
3. [https://www.whocc.no/ddd/definition\\_and\\_general\\_considera/](https://www.whocc.no/ddd/definition_and_general_considera/) 29.7.2017
4. Evropska komisija (EU). Izvedbeni sklep komisije (EU) 2015/495. Ur. List Evr. Unije 2015. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015D0495&qid=1502366790729&from=SL> 29.7.2017
5. Ebele AJ, Abdallah MAE, Harrad S. Pharmaceuticals and personal care (PPCPs) in the freshwater aquatic environment. *Emerging Contaminants* 2017; 3:1–16.
6. Petrovic M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 2014; 1:e25–e33.
7. Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MA et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 2013; 93(7):1268–1287.
8. Jorgensen SE, Halling-Sorensen B. Editorial: Drugs in the environment. *Chemosphere* 2000; 40(7):691-699.
9. Ternes TA. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70<sup>th</sup> birthday. *Water Research*. 1998; 32(11):3245-3260.
10. Fent K, Weston AA, Caminada D. Review: Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology*. 2006; 76(2):122-159.
11. Pal A, Gin KYH, Lin AYC, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Science of the Total Environment*. 2010; 408(24):6062-6069.
12. Trček B, Cafuta MR, v sodelovanju s študenti Univerze Maribor, Fakulteta za strojništvo – Tehniško varstvo okolja. Analiza ravnanja z odpadki v gospodinjstvu. 7. Posvet kemijska varnost za vse: Zdravila v odpadkih – nevarne kemikalije v okolju. Zbornik povzetkov. 2015; 12.

13. Fatta-Kassinos D, Meric S, Nikolaou A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011; 399(1):251-275.
14. Nikolaou A, Meric S, Fatta D. Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2007; 387:1225-1234.
15. Dale MM, Haylett DG: *Pharmacology Condensed*, 2nd Edition, Elsevier, 2009: 35, 43, 57, 95.
16. Santos LHMLM, Araújo AN, Fachini A, Pena A et al. Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*. 2010; 175(1-3):45-95.
17. Kummerer K. Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I. *Chemosphere*. 2009; 75(4):417-434.
18. Matongo S, Birungi G, Moodley B, Ndungu P. Pharmaceutical residues in water and sediment of Msunduzi River, KwaZulu-Natal, South Africa. *Chemosphere*. 2015; 134:133-140.
19. Kasprzyk – Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research*. 2008; 42(13):3498-3518.
20. Constanzo SD, Murby J, Bates J. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. *Marine Pollution Bulletin*. 2015; 51:218-223.
21. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2007; 1161(1-2):132-145.
22. Farré M, Ferrer I, Ginebreda A et al. Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*. *Journal of Chromatography A*. 2001; 938(1-2):187-197.
23. Pereira AMPT, Silva JLG et al. Human pharmaceuticals in Portuguese rivers: The impact of water scarcity in the environmental risk. *Science of the Total Environment*. 2017; 609:1182-1191.

24. Xie Z, Lu G, Yan Z, Liu J, Wang P. Bioaccumulation and trophic transfer of pharmaceuticals in food webs from a large freshwater lake. *Environmental Pollution*. 2017; 222:356-366.
25. Pagia P, Santos LHMLM, Ramos S, Jorge S, Silva JG, Delerue-Matos C. Presence of pharmaceuticals in the Lis river (Portugal): Sources, fate and seasonal variation. *Science of the Total Environment*. 2016; 573:164-177.
26. Blair BD, Crago JP, Hedman CJ, Klaper RD. Pharmaceuticals and personal care products found in the Great Lakes above concentrations of environmental concern. *Chemosphere*. 2013; 93(9):2116-2123.
27. Loos R, Gawlik MB, Locoro G, Rimaviciute E, Contini S, Bidoglio G. EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters. *Environmental Pollution*. 2009; 157(9):561-568.
28. Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquatic Toxicology*. 2010; 96(3):167-181.
29. OECD and EU test Guidelines. <http://echa.europa.eu/support/oecd-eu-test-guidelines> 18.8.2017
30. Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Research*. 2015;72(0):3-27.
31. Commission of the European Communities. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances – Part II: Environmental Risk Assessment, 2003.
32. Hoeger B, Köllner B, Dietrich DR, Hitzfeld B. Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (*Salmo trutta f. fario*). *Aquatic Toxicology*. 2005;75(1):53-64.
33. Jobling S, Nolan M, Tyler CR, Brighty G, Sumpter JP. Widespread Sexual Disruption in Wild Fish. *Environmental Science Technology*. 1998;(32):2498-2506.

34. Brian BA, Johnson DJ, Richards SM, Hanson ML et al. Microsom evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemma gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*. 2004;70(1):23-40.
35. Pedrouzo M, Reverté S, Borrull F, Pocurull E, Marcé RM. Pharmaceutical determination in surface and wastewaters using high-performance liquid chromatography-(electrospray)-mass spectrometry. *Journal of Separation Science*. 2007; 30:297-303.
36. Kostopoulou M, Nikolaou A. Analytical problems and the need for sample preparation in the determination of pharmaceuticals and their metabolites in aqueous environmental matrices. *Trends in Analytical Chemistry*. 2008;27(11):1023–1035.
37. Caban M, Migowska N, Stepnowski P et al. Matrix effects and recovery calculations in analyses of pharmaceuticals based on the determination of  $\beta$ -blockers and  $\beta$ -agonists in environmental samples. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1258:117-127.
38. Kataoka H. New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*. 2003; 22(4):232–244.
39. Pavlović DM, Babić S, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007; 26(11):1062–1075.
40. Płotka-Wasyłka J, Szczepanska N, Guardia M, Namiesnik J. Modern trends in solid phase extraction: New sorbent media. *Trends in Analytical Chemistry*. 2016; 77:23–43.
41. Horizon T. Brošura SPE-DEX<sup>®</sup> 4790 Automated Extraction System. [http://www.horizontechinc.com/wp/wp-content/uploads/2015/10/B0051508\\_01\\_SPE-DEX\\_4790\\_brochure.pdf](http://www.horizontechinc.com/wp/wp-content/uploads/2015/10/B0051508_01_SPE-DEX_4790_brochure.pdf)  
14.7.2017
42. Horizon T. Brošura SPE-DEX<sup>®</sup> 4790 Extractor System. <https://www.chromspec.com/pdf/hz03.pdf> 14.7.2017
43. Mellon F A. Mass spectrometry: Principles and instrumentation. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (second edition), 2003;3739–3749.

44. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Introduction to pharmaceutical chemical analysis, John Wiley & Sons, West Sussex, Velika Britanija, 2012: 231–259.
45. <http://what-when-how.com/proteomics/quadrupole-mass-analyzers-theoretical-and-practical-considerations-proteomics/>, 10.11.2017
46. Kim SC, Carlson K. LC-MS<sup>2</sup> for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. Trends in Analytical Chemistry. 2005; 24(7):635-644.
47. Brodnjak Vončina D. Industrijska analiza: Zbrano gradivo. Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo. 2007.
48. Bergoč, T., 2015. Razvoj in validacija metode za ekstrakcijo in kvantifikacijo nekaterih antidepresivov iz odpadnih vod. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo.
49. Oasis<sup>®</sup> HLB 3 cc Vac Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm Particle Size, 100/pk [WAT094226], <http://www.waters.com/1/1/7953-wat094226-oasis-hlb-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30-%CE%BCm-particle-size-100-pk.html>, 23.2.2017
50. Phenomenex Strata-X outperforms Oasis<sup>®</sup> HLB, <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e62d67d8-eef5-42f0-b829-4e188661ab57.pdf>, 23.2.2017
51. Phenomenex, Chromatography, Product Guide 2016-17, <https://flipflashpages.uniflip.com/3/41719/371633/pub/>, stran 71, februar 2017
52. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, maj 2001, <https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm070107.pdf> 14.6.2017
53. Gros M, Petrović M, Barcelo D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. Talanta. 2006;70:678–690.
54. Lucci P, Pacetti D, Núñez O, Frega NG: Chromatography - The Most Versatile Method of Chemical Analysis, Dr. Leonardo Calderon (Ed.), InTech, 2012:129.