

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC ZAKOTNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATIC ZAKOTNIK

***RAZVOJ NOVEGA PRISTOPA ZA EKSTRAKCIJO IZBRANIH
ZDRAVILNIH UČINKOVIN IZ VODNIH VZORCEV NA OSNOVI
SORPTIVNEGA MEHANIZMA***

***DEVELOPMENT OF A NEW STIR-BAR SORPTIVE EXTRACTION
APPROACH FOR EXTRACTION OF PHARMACEUTICAL
COMPOUNDS FROM WATER SAMPLES***

Ljubljana, 2016

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

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju,izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm., za strokovno pomoč, svetovanje in vodenje pri nastajanju magistrske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi asist. Aniti Klančar, mag. farm., za pomoč in vodenje pri laboratorijskem delu.

Posebej se zahvaljujem tudi domačim in vsem bližnjim, ki so me podpirali in mi pomagali v času študija.

IZJAVA:

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja,izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Matic Zakotnik

KAZALO VSEBINE

1	UVOD	1
1.1	UPORABA ZDRAVIL	1
1.2	POJAVLJANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN V OKOLJSKIH VODAH	2
1.2.1	VIRI KONTAMINACIJE OKOLJA Z ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI.	3
1.2.2	NEVARNOST PRISOTNOSTI ZDRAVILNIH UČINKOVIN V OKOLJU... ..	3
1.3	PREGLED PRISOTNOSTI ZDRAVILNIH UČINKOVIN V OKOLJU IN NJIHOVI NEGATIVNI UČINKI	3
1.3.1	NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI	3
1.3.2	HIPOLIPEMIKI	4
1.3.3	ANTIBIOTIKI	4
1.3.4	SPOLNI HORMONI	5
1.3.5	ANTIEPILEPTIKI	5
1.3.6	ZAVIRALCI ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV BETA.....	5
1.3.7	ANTIDEPRESIVI.....	6
1.3.8	ANTINEOPLASTIKI	6
1.3.9	V OKOLJU JE PRISOTNA MEŠANICA UČINKOVIN	7
1.4	PREDPRIPRAVA VZORCEV	7
1.4.1	EKSTRAKCIJA TEKOČE-TEKOČE	7
1.4.2	EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU	8
1.4.2.1	EKSTRAKCIJSKI POL-AVTOMATIZIRAN SISTEM SPE-DEX.....	9
1.4.2.2	MIKROEKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU	10
1.4.3	EKSTRAKCIJA NA OSNOVI SORPTIVNEGA MEHANIZMA S POMOČJO TWISTER®MEŠALNIH PALIČIC.....	11
1.4.3.1	NAČELA METODE	12
1.4.3.2	METODA SBSE – DVOSTOPENJSKI PROCES.....	13
1.4.3.3	STACIONARNA FAZA POLIDIMETILSILOKSAN	13
1.4.3.4	APLIKACIJE METODE	14
1.5	ANALIZA Z MASNO SPEKTROMETRIJO	15

2	NAMEN DELA.....	17
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	MATERIALI	18
3.1.1	STANDARDI.....	18
3.1.2	REAGENTI, RAZTOPINE IN TOPILA	20
3.1.3	NAPRAVE IN PRIBOR	20
3.1.4	PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN	21
3.1.4.1	OSNOVNE RAZTOPINE POSAMEZNIH ANALITOV	21
3.1.4.2	OSNOVNA RAZTOPINA VSEH 40 ANALITOV	21
3.1.4.3	PRIPRAVA DELOVNE RAZTOPINE	22
3.1.4.4	PRIPRAVA RAZTOPINE ZA RAZVOJ EKSTRAKCIJSKE METODE....	22
3.1.4.5	PRIPRAVA RAZTOPINE INTERNEGA STANDARDA.....	22
3.1.5	PRIPRAVA 50 mM FOSFATNEGA PUFRA: pH 3, pH 5, pH 7 in pH 9..	22
3.1.6	PRIPRAVA TOPIL.....	22
3.2	METODE	23
3.2.1	RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA METODE SBSE	23
3.2.1.1	IZBOR SPOJIN	23
3.2.1.2	OSNOVNI POGOJI PRI RAZVOJU IN OPTIMIZACIJI EKSTRAKCIJE.....	23
3.2.1.3	KINETIKA EKSTRAKCIJE.....	24
3.2.1.4	VPLIV pH NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE.....	24
3.2.1.5	VPLIV TEMPERATURE NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE	25
3.2.1.6	PREVERJANJE STABILNOSTI ANALITOV V VZORCU.....	25
3.2.1.7	VPLIV DODATKA METANOLA NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE.....	25
3.2.1.8	VPLIV DODATKA INERTNE SOLI NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE.....	26
3.2.1.9	IZRAČUN IZKORISTKA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA	26
3.2.1.10	OSNOVNI POGOJI PRI RAZVOJU IN OPTIMIZACIJI DESORPCIJE.....	27

3.2.1.11 VPLIV DESORPCIJSKEGA TOPILA NA IZKORISTEK DESORPCIJE.....	27
3.2.1.12 VPLIV TEMPERATURE NA IZKORISTEK DESORPCIJE.....	27
3.2.1.13 KINETIKA DESORPCIJE.....	27
3.2.1.14 VPLIV VEČKRATNE DESORPCIJE NA IZKORISTEK.....	28
3.2.1.15 VPLIV UPORABE ULTRAZVOKA NA IZKORISTEK DESORPCIJE.....	28
3.2.1.16 VPLIV ŠTEVILA ANALITOV NA KONČNI IZKORISTEK METODE... ..	29
3.2.1.17 IZKORISTEK DESORPCIJE	29
3.2.1.18 ANALIZA VZORCEV	30
3.2.2 VREDNOTENJE SBSE.....	30
3.2.2.1 IZKORISTEK METODE	30
3.2.2.2 LINEARNOST	30
3.2.2.3 PONOVLJIVOST METODE	31
3.2.2.4 TOČNOST METODE	31
3.2.3 UPORABA METODE NA REALNEM VZORCU	32
3.2.3.1 METODA INTERNEGA STANDARDA	33
3.2.3.2 METODA STANDARDNEGA DODATKA	33
3.2.4 ANALIZA VZORCEV Z METODO LC/MS-MS	34
4 REZULTATI IN RAZPRAVA	36
4.1 IZBOR ANALITOV.....	36
4.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA SBSE – EKSTRAKCIJA.....	37
4.2.1 KINETIKA EKSTRAKCIJE ANALITOV.....	37
4.2.2 VPLIV pH VREDNOSTI VZORCA NA EKSTRAKCIJO	40
4.2.3 VPLIV TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJO	42
4.2.4 DODATEK METANOLA	42
4.2.5 DODATEK INERTNE SOLI	45
4.3 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA SBSE – DESORPCIJA.....	46
4.3.1 VPLIV DESORPCIJSKEGA TOPILA.....	46
4.3.2 VPLIV TEMPERATURE NA DESORPCIJO	47
4.3.3 KINETIKA DESORPCIJE	47

4.3.4	ŠTIRIKRATNA ZAPOREDNA DESORPCIJA	48
4.3.5	VPLIV ULTRAZVOKA NA IZKORISTEK DESORPCIJE	49
4.4	VPLIV ŠTEVILA ANALITOV NA IZKORISTEK.....	50
4.5	STABILNOST ANALITOV PRI POVIŠANI TEMPERATURI	51
4.6	IZBRANI OPTIMALNI POGOJI.....	52
4.7	VREDNOTENJE SBSE	53
4.7.1	IZKORISTEK	53
4.7.2	LINEARNOST	54
4.7.3	PONOVLJIVOST METODE.....	55
4.7.4	TOČNOST METODE.....	55
4.7.5	IZBOR ANALITOV	55
4.8	APLIKACIJA METODE NA REALNI VZOREC.....	57
5	SKLEP.....	59
6	LITERATURA	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Prikaz povečane porabe zdravil v DDD za leto 2014 glede na leto 2009	2
Slika 2: Prikaz stopenj v postopku ekstrakcije SPE z uporabo kartuš (prekondicioniranje-nanos vzorca-spiranje-elucija).....	9
Slika 3: Prikaz SPME-metode.	10
Slika 4: Prikaz zgradbe Twister® mešalne paličice.	11
Slika 5: Struktura PDMS..	13
Slika 6: Grafični prikaz metode standardnega dodatka	33
Slika 7: Kinetika ekstrakcije pri pH 9, temperaturi 50 °C in času 90 min za 40 spojin.....	38
Slika 8: Kinetika ekstrakcije pri pH 9, 50 °C in podaljšanem času 180 min za 40 spojin ..	39
Slika 9: Primerjava kinetike ekstrakcije pri sobni temperaturi in 50 °C za izbrane spojine	40
Slika 10: Delež ekstrahirane ZU (%) glede na pH vzorčne raztopine za 15 spojin	40
Slika 11: Vpliv temperature na izkoristek ekstrakcije iz vzorčne raztopine na izbranih 15 spojinah	42
Slika 12: Izkoristek ekstrakcije glede na delež MeOH v vzorčni raztopini za izbranih 15 spojin	44
Slika 13: Vpliv dodatka NaCl na izkoristek ekstrakcije za izbranih 15 analitov	45
Slika 14: Izkoristek desorpcije pri sobni in povišani temperaturi za izbranih 15 analitov..	47
Slika 15: Kinetika desorpcije pri 50 °C v ACN:MeOH 50/50 (v/v) za 40 spojin	48
Slika 16: Štirikratna desorpcija v ACN:MeOH 50/50 (v/v), vsakič po 15 min pri 50 °C, za izbranih 15 spojin	48
Slika 17: Primerjava treh načinov desorpcije (desorpcija z ultrazvokom, klasična desorpcija in kombinirana desorpcija) za izbranih 15 spojin	49
Slika 18: Vpliv števila analitov v vzorčni raztopini na končni izkoristek metode za 15 testiranih analitov	51
Slika 19: Delež spojin glede na izkoristek, predstavljeno po posameznih skupinah spojin.	54

KAZALO TABEL

Tabela 1: Sestava vzorcev z različnim odstotkom MeOH	25
Tabela 2: Sestava vzorcev z dodanim NaCl	26
Tabela 3: Prikaz sestave vzorčnih raztopin za preverjanje vpliva števila analitov na izkoristek ekstrakcijske metode	29
Tabela 4: Priprava vzorcev za vrednotenje linearnosti.....	31
Tabela 5: Priprava vzorcev (20 mL) z dodatkom internega standarda in standardnega dodatka	32
Tabela 6: Parametri gradientne elucije	34
Tabela 7: MRM nastavitve in retencijski časi za vse analite.....	35
Tabela 8: Teoretični izkoristki za ZU po skupinah.	37
Tabela 9: pKa vrednosti za izbrane zdravilne učinkovine (53)	41
Tabela 10: Izkoristek ekstrakcije pri različnem deležu (v/v) dodanega MeOH (pH 7)	43
Tabela 11: Izkoristek ekstrakcije pri različnem deležu (v/v) dodanega MeOH (pH 9)	44
Tabela 12: Izkoristki desorpcije (%) pri uporabi različnih topil	46
Tabela 13: Prikaz stabilnostnih podatkov za 40 analitov pri 50 °C in pH 9	51
Tabela 14: Parametri validacije za optimizirano metodo	56
Tabela 15: Prikaz rezultatov uporabe metode SBSE na realnem vzorcu	57

POVZETEK

Poraba zdravil v svetu stalno narašča, s tem pa tudi njihova proizvodnja. Posledica je vse večja prisotnost zdravilnih učinkovin (ZU) in njihovih metabolitov v okolju. Pojavljanje ZU v odpadnih, površinskih in podzemnih vodah lahko ogrozi vire pitne vode in ima lahko negativen vpliv na vodni ekosistem in na človeka.

V sklopu magistrske naloge smo zato nameravali razviti in optimizirati preprosto in hitro metodo za ekstrakcijo ZU iz vodnih vzorcev. Za vrednotenje ZU v okolju je potrebna ustrezna predpriprava z namenom čiščenja in koncentriranja vzorcev, saj se ZU nahajajo v nizkih koncentracijah. Uporabili smo tehniko, ki temelji na osnovi sorptivnega mehanizma. Polimer polidimetilsiloksan predstavlja stacionarno fazo, v katero so prehajale ZU tekom ekstrakcije. V drugi fazi smo ZU desorbirali v topilo in s tem hkrati skoncentrirali vzorec. Za analizo pripravljenih vzorcev smo uporabili tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo. Metodo priprave vzorca smo razvijali s pomočjo vzorčne raztopine, ki je vsebovala 40 ZU. Preverili smo vpliv različnih dejavnikov na ekstrakcijo in kot optimalne pogoje izbrali: volumen vzorca 20 mL, hitrost vrtenja magnetnih paličic (1 mm × 10 mm) 990 rpm, čas vrtenja 150 min pri 50 °C, vzorčna raztopina, uravnana na pH 9. Dodatek metanola oz. natrijevega klorida v vzorčno raztopino nista prispevala k boljšemu izkoristku. Za fazo desorpcije smo izbrali: 2 mL topila acetonitril:metanol (50/50, v/v), čas desorpcije 15 min pri 990 rpm in temperaturi 50 °C. Večkratna desorpcija in uporaba ultrazvoka nista prispevala k povečanju izkoristka desorpcije. Izbira topila za desorpcijo se ni izkazala za pomemben parameter.

Optimizirano metodo smo ovrednotili z osnovnimi validacijskimi parametri: izkoristek, linearnost, ponovljivost, točnost, meja določitve. Za 24 ZU je bil izkoristek zadovoljiv in se je metoda izkazala kot ustrezno ponovljiva ($RSD \leq 20 \%$), točna ($100 \pm 20 \%$) in linearna ($R^2 \geq 0,99$). Meja določitve je za večino ZU 1,25 ng/L.

Metodo smo v nadaljevanju preverili na dveh realnih vzorcih; vtoku in iztoku iz čistilne naprave. Na vtoku smo zaznali 15 ZU, na iztoku pa 13, v koncentracijah od nekaj ng/L do skoraj 190 ng/L. V okviru magistrske naloge smo vpeljali novo, preprosto in hitro metodo za predpripravo vodnih vzorcev, ki je priročna tudi za terensko vzorčenje, saj ne zahteva velike porabe topil, drage opreme in uporabe visokih temperatur.

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

ABSTRACT

Consumption, and therefore production, of medicines is increasing year after year. Consequently, active pharmaceutical ingredients (APIs) occur in the environment and have influence on water ecosystem and also human.

The aim of our experimental work was to develop and optimise a fast and simple method for extraction of APIs from aqueous samples. Pre-concentration and cleaning step are required because APIs are present in low concentrations in the environment. Stir bar sorptive extraction (SBSE) method with polydimethylsiloxane (PDMS) as a stationary phase was used. This method consists of two steps: an extraction step, in which the analytes are extracted from the sample into stationary phase and a desorption step, where the analytes are desorbed and concentrated into desorption solvent. Further analyses were performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. The sample solution consisted of 40 analytes. As optimal conditions for extraction step were recognized: sample volume 20mL, stirring speed 990 rpm (stir bar dimensions: 1 mm × 10 mm), time 150 min, temperature 50°C and sample pH 9. Methanol and sodium chloride addition did not increase the efficiency. As optimal conditions for desorption step were recognized: 2 mL of solvent acetonitrile:methanol (50/50, v/v), time 15 min, stirring speed 990 rpm, temperature 50°C. Multiple desorption steps and sonification treatment did not increase the efficiency. Solvent selection was not recognized as a critical parameter.

The evaluation of method performance was made by determination of the major validation parameters: recovery, linearity, repeatability, accuracy and limit of quantification (LOQ). Method is appropriate for 24 of the tested substances: suitable efficiency, linearity ($R^2 \geq 0,99$), repeatability ($RSD \leq 20\%$), accuracy ($100 \pm 20\%$). LOQ was set as the lowest concentration where deviation from the nominal value is not more than 20% (1,25 ng/L for most of the analytes).

The method was tested on two real samples: influent and effluent of waste water treatment plant. In influent water 15 analytes and in effluent water 13 analytes were detected in concentration range from few ng/L to nearly 190 ng/L. SBSE is a new fast and simple method for pretreatment of water samples, which does not demand enormous solvent consumption, is appropriate for thermolabile substances and is cost effective.

Key words: SBSE extraction, active pharmaceutical ingredients, waste water, LC-MS/MS

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN – acetonitril

ČN – čistilna naprava

DCM – diklorometan

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

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

HCl – klorovodikova kislina

IS – interni standard

LC – tekočinska kromatografija (ang. *liquid chromatography*)

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

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

logP – logaritem porazdelitvenega koeficienta

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

MeOH – metanol

MRM – multirezidualna analiza (ang. *multiple reaction monitoring*)

NaCl – natrijev klorid

NaOH – natrijev hidroksid

ND – NEDOLOČENO

NSAID – nesteroidni antirevmatiki

PDMS – polidimetilsiloksan

R^2 – determinacijski koeficient

RSD – relativni standardni odklon

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

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

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

Twister® – komercialno poimenovanje magnetnih mešalnih paličic s polimerno stacionarno fazo

UV – ultravijoličen

UZ – ultrazvok

v/v – volumsko-volumski odstotek

VB – Velika Britanija

ZDA – Združene države Amerike

ZU – zdravilna učinkovina

1 UVOD

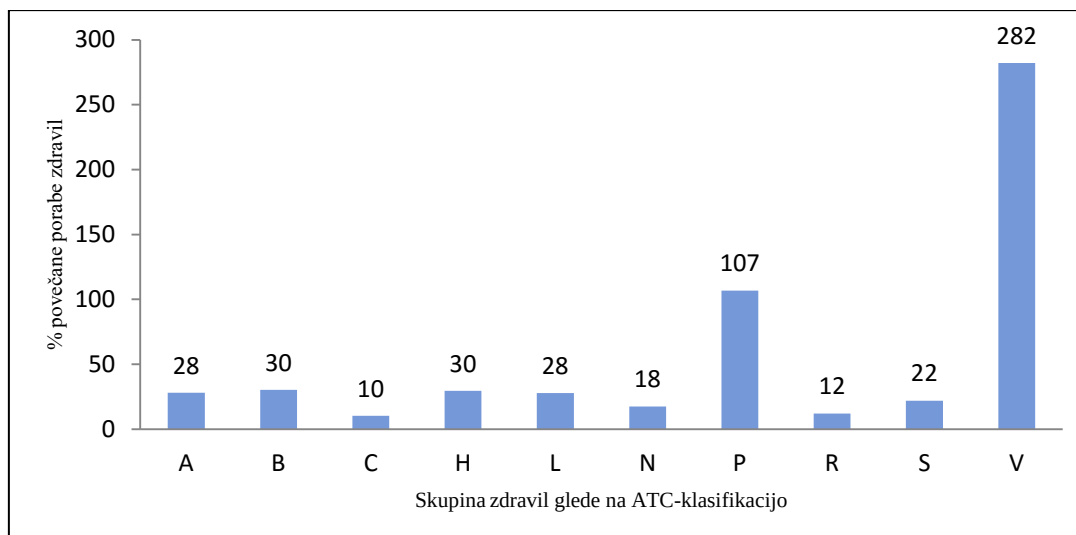
1.1 UPORABA ZDRAVIL

Zakon o zdravilih Republike Slovenije definira zdravilo kot vsako snov ali kombinacijo snovi, ki so predstavljene z lastnostmi za zdravljenje ali preprečevanje bolezni pri ljudeh ali živalih. Za zdravilo velja tudi vsaka snov ali kombinacija snovi, ki jo lahko uporabljamo pri ljudeh ali živalih ali jo dajemo ljudem ali živalim z namenom, da bi ponovno vzpostavili, izboljšali ali spremenili fiziološke funkcije prek farmakološkega, imunološkega ali presnovnega delovanja ali bi se določila diagnoza (1). Zdravilo je sestavljeno iz pomožnih snovi in zdravilne učinkovine (ali več zdravilnih učinkovin), ki je nosilka farmakološkega delovanja.

Farmacevtska industrija je v zadnjih desetletjih doživela velik razvojni napredek. Z razvojem novih zdravilnih učinkovin, farmacevtskih oblik ter načinov uporabe je veliko prispevala k učinkovitejšemu zdravljenju, lažšanju neozdravljivih bolezni in boljši diagnostiki bolezni. To je eden od vzrokov, zakaj se podaljšuje življenjska doba prebivalstva, posledično pa narašča potreba po zdravilih in njihovi uporabi, saj je veliko bolezni povezanih prav s starostjo.

Svetovna zdravstvena organizacija WHO, ang. *World Health Organization*, je za določitev porabe zdravila opredelila statistično enoto: definiran dnevni odmerek DDD, ang. *defined daily dose*, ki je povprečni vzdrževalni odmerek zdravila, ki ga prejme odrasel bolnik v enem dnevu za izvajanje določenega medicinskega ukrepa. DDD predstavlja teoretično vrednost, s katero lahko poenotimo prikaz porabe zdravil. Zavedati pa se moramo, da je dejansko odmerjanje lahko precej drugačno od teoretično določenih DDD-jev (odvisno od številnih dejavnikov: npr. bolezenskega stanja, spola, starosti, mase bolnika, načina in pogostosti uporabe) (2).

Podatki Nacionalnega inštituta za javno zdravje, objavljeni v dokumentu Poraba ambulantno predpisanih zdravil v Sloveniji, kažejo na povečano porabo zdravil skoraj vseh skupin zdravil glede na anatomsko-terapevtsko-kemijsko (ATC) klasifikacijo med letoma 2009 in 2014 (3) (Slika 1).



Slika 1: Prikaz povečane porabe zdravil v DDD za leto 2014 glede na leto 2009

A – zdravila za bolezni prebavil in presnove, B – zdravila za bolezni krvi in krvotvornih organov, C – zdravila za bolezni srca in ožilja, H – hormonska zdravila za sistemsko zdravljenje (razen spolnih hormonov in inzulinov), L – zdravila z delovanjem na novotvorbe in imunomodulatorji, N – zdravila z delovanjem na živčevje, P – antiparazitiki, insekticidi in repelenti, R – zdravila za bolezni dihal, S – zdravila za bolezni čutil, V – razna zdravila (v to skupino spadajo alergijo sprožajoče snovi (alergeni), druga nerazvrščena zdravila za različne bolezni, diagnostiki, osnovna hranila, drugi neterapevtski pripravki, kontrastna sredstva, radiodiagnostiki, radioterapevtski) (3).

S Slike 1 je razvidno, da je v Sloveniji najbolj narasla poraba zdravil skupin: V, P, B, H, A, L, S, N, R in C. Svetovna proizvodnja zdravil sledi trendu povpraševanja na trgu – zaradi večje porabe zdravil je večja tudi proizvodnja.

1.2 POJAVLJANJE ZDRAVILNIH UČINKOVIN V OKOLJSKIH VODAH

V povezavi z vedno večjo proizvodnjo postaja prisotnost učinkovin v okolju vse bolj raziskovano področje. Prvič so problem onesnaženja okolja izpostavili v sedemdesetih letih prejšnjega stoletja v ZDA, v Evropi pa desetletje pozneje (4). Razvoj analitskih tehnik (priprave vzorca in instrumentalne metodologije) je pomembno prispeval k boljšemu znanju o problematiki tovrstnega onesnaženja. Danes smo sposobni kvantitativno določiti veliko število različnih učinkovin že v zelo nizkih koncentracijah (nizko ng/L do µg/L območje), na primer v površinskih sladkih vodah in morjih, podtalnicah, pitni vodi in odplakah (4). Prisotnost učinkovin v okolju ne pomeni samo potencialne grožnje vodnim organizmom, ampak tudi človeku. Učinki se lahko pokažejo šele čez nekaj generacij, saj gre večinoma za subterapevtske koncentracije, ki še ne izzovejo farmakološkega učinka. Ne smemo pa pozabiti, da smo lahko kronično izpostavljeni posamezni učinkovini ali mešanici učinkovin. Izpostavljenost mešanici učinkovin je lahko zaradi aditivnega in/ali

sinergističnega delovanja ter nepredvidljivih učinkov kombinacije večjega števila učinkovin bolj nevarna kot izpostavljenost posamezni učinkovini (4).

1.2.1 VIRI KONTAMINACIJE OKOLJA Z ZDRAVILNIMI UČINKOVINAMI

Pomembna pot vstopanja učinkovin v vodni krog je prek izločanja ljudi in živali. Odpadne vode iz bolnišnic ter domov za ostarele so eden največjih virov onesnaževanja okolja z učinkovinami in njihovimi metaboliti. Dodatno obremenitev okolja predstavljajo tudi zdravila, ki jih ljudje ne potrebujejo več ali pa jim je pretekel rok uporabe, saj pogosto končajo v odtoku umivalnika ali pa v stranišni školjki, namesto da bi jih odnesli na ustrezna zbirna mesta. Pomembna je tudi uporaba zdravil v veterini, zlasti živinoreji, ker živina prav tako izloča učinkovine ali metabolite z urinom in blatom, ki ju lahko uporabljamo kot gnojilo za polja. Učinkovine tako pridejo v zemljo ali pa se z dežjem sperejo v podtalne in površinske vode. S povečano porabo zdravil je povečana tudi njihova proizvodnja in odpadne vode, ki pri tem nastanejo (npr. čiščenje opreme) ter se iztekajo v okolje (4) (5).

1.2.2 NEVARNOST PRISOTNOSTI ZDRAVILNIH UČINKOVIN V OKOLJU

Zdravilne učinkovine načrtujemo tako, da izzovejo določen farmakološki učinek v organizmu. Preko različnih poti se skupaj z njihovimi metaboliti, ki so lahko še vedno biološko aktivni, izločajo v okolje in tako predstavljajo potencialno nevarnost za netarčne organizme in vplivajo na ravnovesje ekosistema (6). Stalna izpostavljenost organizmov, pa čeprav v subterapevtskih koncentracijah, lahko predstavlja nevarnost za njihov razvoj, razmnoževanje, dozorevanje. Zavedati pa se moramo, da je toksični vpliv na organizme pri dolgoročni izpostavljenosti različnim koncentracijam spojin zelo težko ovrednotiti (4). Primere negativnih vplivov pojavljanja učinkovin v okolju za posamezne skupine učinkovin predstavljamo v Poglavju 1.3.

1.3 PREGLED PRISOTNOSTI ZDRAVILNIH UČINKOVIN V OKOLJU IN NJIHOVI NEGATIVNI UČINKI

1.3.1 NESTEROIDNI ANTIREVMATIKI

Učinek nesteroidnih antirevmatikov (NSAID) se kaže preko zaviranja ene ali obeh izoform encima ciklooksigenaze (COX-1 in COX-2), ki je vpletena v sintezo prostaglandinov iz

arahidonske kisline (7). Izoformi COX-2 podoben ciklooksigenazni encim so našli v ribah (8), zato lahko prisotnost NSAID v okoljskih vodah negativno vpliva nanje. Prostaglandini so vpeti tudi v sintezo jajčne lupine pri pticah, njihovo pomanjkanje pa se kaže s tanjšo lupino (9). Največjo akutno toksičnost med NSAID kaže diklofenak. Študije kronične toksičnosti na šarenkah so pokazale citološke spremembe v jetrih, ledvicah in škrgah že pri koncentraciji 1 µg/L. Pri višjih koncentracijah so opazili ledvične lezije, kopičenje učinkovine v jetrih, ledvicah, mišicah in škrgah (10). Visoko koncentracijo diklofenaka na iztoku iz čistilne naprave so zaznali v Švici (2,4 µg/L) (11) ter v Belgiji (1,42 µg/L) (12).

1.3.2 HIPOLIPEMIKI

Hipolipemike, katerih naloga je znižati raven holesterola in trigliceridov v krvi, delimo v dve glavni skupini: statine in fibrate. Statini zavirajo encim 3-hidroksi-3-metilglutaril-koencim A reduktazo, ki je vpleten v sintezo holesterola. Fibrati pa se vežejo na receptorje PPAR α , kar vodi v povečano β -oksidacijo maščobnih kislin (13). Odkrili so, da atorvastatin negativno vpliva na razvoj vodne leče. Prisotnost atorvastatina je povezana z nižjo vsebnostjo pigmenta v tej rastlini (14). Koncentracije statinov, ki so jih odkrili v neobdelani odpadni vodi v Kanadi, se gibljejo med 4 in 117 ng/L, v obdelani odpadni vodi pa med 1 in 59 ng/L (15). Fibrati, ki jih v okolju pogosteje zaznamo, lahko zaustavijo embrionalni razvoj z zaviranjem celične diferenciacije (vezava na receptorje PPAR- γ) (4). Pri analiziranju odpadne vode, odvzete na iztoku iz neke čistilne naprave v Španiji, so našli učinkovino bezafibrat v koncentraciji 40–130 ng/L (16).

1.3.3 ANTIBIOTIKI

Največja skrb, povezana s pojavljanjem antibiotikov v okolju, je razvoj odpornosti pri bakterijah, ki bi lahko ogrozila uspešnost zdravljenja z antibiotiki. So zelo toksični za mikroorganizme in alge. Zavirajo rast alg, kar je problematično, saj alge tvorijo bazo prehranjevalne verige in njihova zmanjšana rast lahko ogrozi ravnovesje vodnega ekosistema (4). β -laktamski antibiotiki (npr. ampicilin, amoksicilin) so se izkazali kot najmanj toksična skupina, saj so za doseganje toksičnih učinkov v primerjavi z antibiotiki drugih skupin potrebne nekajkrat višje koncentracije. β -laktamski obroč v strukturi spojin je kemijsko nestabilen, hitro poteče reakcija hidrolize s pomočjo encima β -laktamaze (17). Sulfonamidne antibiotike so odkrili v odpadnih vodah na vhodu in izhodu iz čistilne

naprave, v površinskih vodah, podzemnih vodah in celo pitni vodi. Koncentracije so se gibale v območju ng/L do nekaj $\mu\text{g/L}$ (4). Fluorokinolonske antibiotike so v visokih koncentracijah (2–11 $\mu\text{g/L}$) odkrili na iztoku iz bolnišnice v Italiji. Zaznali so jih tudi v dveh rekah v Italiji in na Portugalskem v koncentracijskem območju nekaj 10 ng/L. Za analizo vzorcev površinskih voda so v dveh rekah v Italiji zaznali tudi tetraciklinske antibiotike v koncentracijskem območju do 250 ng/L (4).

1.3.4 SPOLNI HORMONI

So biološko aktivne spojine, ki že v zelo nizkih odmerkih sprožijo terapevtski učinek. Zelo pogosto jih predpisujemo kot peroralne kontraceptive in zato njihova koncentracija v okolju narašča (najpogostejši so estrogeni). Z vezavo na specifične receptorje v neciljnih organizmih (nevretenčarji, ribe, plazilci, ptice, sesalci) delujejo kot motilci endokrinega sistema. Prisotnost estrogenov v okolju naj ne bi negativno vplivala na človeka, kopičijo pa se v vodnih organizmih in preko prehranjevalne verige lahko dosežejo tudi človeka. V vzorcih površinskih vod so jih našli v nizkih koncentracijah (17 β -estradiol 0,6–100 ng/L in etinilestradiol 1–73 ng/L) (4). Hormonske motilce, ne le spolne hormone, čedalje pogosteje omenjajo kot možen vzrok za pojav neplodnosti pri moških (18).

1.3.5 ANTIEPILEPTIKI

Najpogosteje zaznan antiepileptik v okolju je karbamazepin, ki deluje kot blokator napetostno odvisnih natrijevih kanalčkov. Za podgane je karcinogena spojina, medtem ko na sesalce nima mutagenega učinka. Na vodne organizme deluje negativno (4). To dokazuje primer vodne bolhe, pri kateri karbamazepin, v sicer visoki koncentraciji 12,7 mg/L, zavira rast (4). Karbamazepin so odkrili v vseh testiranih vzorcih vode iz čistilnih naprav v Kanadi v koncentracijah do 2,3 $\mu\text{g/L}$, v testirani odpadni vodi v Nemčiji pa v koncentracijah do 6,3 $\mu\text{g/L}$ (19).

1.3.6 ZAVIRALCI ADRENERGIČNIH RECEPTORJEV BETA

Med najpogosteje zastopanimi učinkovinami iz te skupine so propranolol, ki je neselektiven in zavira tako receptorje β_1 kot β_2 , ter metoprolol in atenolol, ki sta selektivna in delujeta na receptorje β_1 . Ribe in drugi vretenčarji imajo receptorje β v srcu, jetrih in razmnoževalnem sistemu, zato ima lahko dolgoročna izpostavljenost zaviralcem

receptorjev β škodljive učinke (4). Plazemske koncentracije steroidnih hormonov pri ribah so se spremenile že pri dvotedenski izpostavljenosti koncentraciji $1\mu\text{g/L}$. Že pri pol nižji koncentraciji so opazili zmanjšano število proizvedenih jajčec (20). Analiza vode iztoka iz bolnišnice v Španiji je pokazala visoko koncentracijo propranolola – do $6,5\mu\text{g/L}$. Njegovo prisotnost so preverili tudi z analizo vode na iztoku iz čistilne naprave, kjer so bile dosežene koncentracije $30\text{--}370\text{ ng/L}$. V površinskih vodah je bila njegova koncentracija na nivoju ng/L (4).

1.3.7 ANTIDEPRESIVI

Serotonin je zelo pomemben nevrottransmitter, ki je vpleten v regulacijo razpoloženja, čustev, spanja, apetita. Njegovo pomanjkanje lahko vpliva na vsa našeta področja (13). V terapiji depresije najpogosteje uporabljamo selektivne zaviralce ponovnega privzema serotonina (npr. fluoksetin, sertralin, paroksetin). Zavirajo ponovni prevzem prenašalca iz sinaptične špranje nazaj v presinaptični nevron. Zaradi pogostega predpisovanja teh zdravil je možnost njihove pojavnosti v okolju večja (21). Te učinkovine imajo lahko zelo negativen vpliv na vodne nevretenčarje. Največji vpliv imajo na razmnoževanje, kar se lahko kaže z zmanjšanim številom legel in s tem manjšim številom potomcev. Lahko sprožijo drstenje in porod, kar je problematično, če se zgodi ob nepravem času v letu, ko zaradi pomanjkanja hrane večji del potomcev pogine (22). Selektivne zaviralce ponovnega privzema serotonina (fluoksetin, sertralin, paroksetin, citalopram) pogosto najdemo v vodah, tako odpadnih kot tudi površinskih. Večinoma se nahajajo v koncentracijah nekaj ng/L , ki niso nevarne za netarčne organizme. Problematična je lahko kronična izpostavljenost mešanici učinkovin, ki izkazujejo enake učinke (4).

1.3.8 ANTINEOPLASTIKI

Protitumorne ZU so zasnovane z namenom ubijanja čezmerno delečih se celic, kakršne najdemo pri rakavih boleznih. Podoben učinek lahko pričakujemo pri kateremkoli rastočem evkariontskem organizmu. Podatki o kronični toksičnosti so zelo redki, tovrstne ZU tudi redko zaznajo v vodah, zato je težko napovedati toksičnost za izpostavljene vodne organizme (4).

1.3.9 V OKOLJU JE PRISOTNA MEŠANICA UČINKOVIN

V okolju niso prisotne le posamezne učinkovine, pač pa njihova mešanica, ki ima lahko drugačen vpliv na organizme kot vsaka snov zase. Lahko pride do pojava aditivnega učinka, kjer se učinki posameznih učinkovin med seboj seštevajo; še bolj nevarno pa je potenciranje, kjer je celokupni učinek večji od seštevka posameznih učinkov. V mešanici ZU lahko že nižje koncentracije spojine izkazujejo toksičnost (4). Primer, ki ponazori škodljiv učinek delovanja več ZU hkrati, je študija, ki so jo opravili na vodnih bolhah. Izpostavili so jih mešanici fluoksetina (36 µg/L) in klofibrinske kisline (100 µg/L). Posledice izpostavljenosti tej mešanici so bile malformacije in povečana umrljivost, medtem ko izpostavljenost posamezni spojini v enaki koncentraciji ni izkazovala toksičnih učinkov (23).

1.4 PREDPRIPRAVA VZORCEV

Analitske metode običajno zahtevajo ekstrakcijo analitov iz vzorcev pred analizo. Analite ločimo od kompleksnega ozadja (očistimo) in jih skoncentriramo, s čimer omogočimo njihovo identifikacijo in kvantitativno ovrednotenje (24). Zgodovinsko gledano je bil korak predpriprave vzorca vedno najbolj časovno zahtevna in obremenjujoča stopnja (velika poraba topil). Danes se vse metode za predpripravo vzorca razvijajo v smeri t. i. zelene analize kemije, za katero je značilna minimalna ali celo ničelna poraba organskih topil. Nove metode so preproste za uporabo, minimizirajo čas priprave vzorca, zmanjšajo potrebo po uporabi organskih topil, nekatere omogočajo sklopitev z nadaljnjimi metodami detekcije. Posledično se izboljša občutljivost, zmanjša se možnost izgube analita in količina potrebnega vzorca. Ekstrakcijo tekoče-tekoče, ki zahteva velike količine organskih topil, so zamenjale novejšie metode, kot so npr. ekstrakcija na trdnem nosilcu, mikroekstrakcija na trdnem nosilcu, ekstrakcija na osnovi sorptivnega mehanizma s pomočjo Twister® magnetnih paličic in druge (25,26).

1.4.1 EKSTRAKCIJA TEKOČE-TEKOČE

Pri ekstrakciji tekoče-tekoče (LLE, ang. *liquid-liquid extraction*) gre za ekstrakcijo snovi iz ene tekoče faze v drugo; običajno iz vodne raztopine v organsko topilo, ki se z vodo ne meša. Količina spojine, ki jo najdemo v vodni ali organski fazi, je odvisna od njene

relativne topnosti v teh dveh fazah. Razmerje med koncentracijama spojine v organski in vodni fazi je porazdelitveni koeficient. Organsko topilo se ne sme mešati z vodo, ne sme reagirati z vodo in snovjo, ki jo želimo ekstrahirati, mora imeti čim boljši porazdelitveni koeficient za snov, ki jo ekstrahiramo, mora biti stabilno in imeti čim nižje vrelišče, da ga lažje odstranimo z odparevanjem (27). Ostanek po sušenju raztopimo v topilu, ki je kompatibilno z nadaljnjo analizo. Poleg velike porabe organskih topil pa ima ta tehnika ekstrakcije še nekatere druge slabosti, kot so npr. omejena selektivnost, ker se lahko sočasno ekstrahirajo še druge snovi, ne le želeni analit, težavna avtomatizacija metode in pojav emulzij. Emulzije se tvorijo, ko vzorec vsebuje veliko površinsko aktivnih snovi (npr. fosfolipidov), ki preprečijo ločbo obeh tekočin. Tako je težko kvantitativno zbrati eno ali drugo fazo, analit pa je porazdeljen med obe fazi. Temu se navadno lahko izognemo z dodatkom soli (28).

1.4.2 EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU

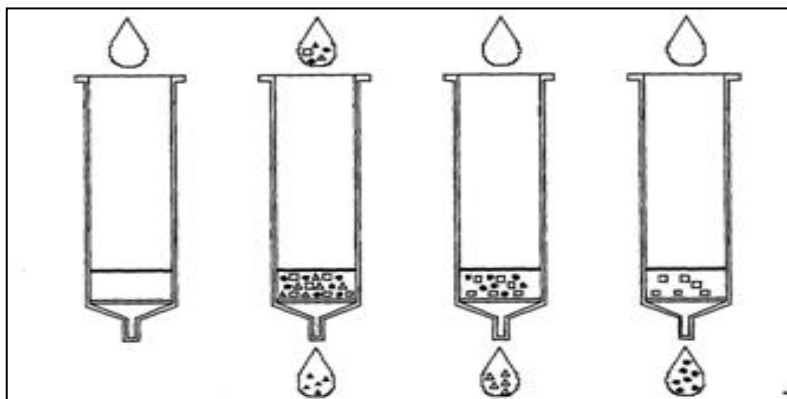
Zahteva po zmanjšanju porabe organskih topil je pripomogla k razvoju in pogostejši uporabi te tehnike. Tudi zahteva za detekcijo večjega števila polarnih analitov, ki so delno topni v vodi in se tako ne ekstrahirajo v celoti z uporabo ekstrakcije tekoče-tekoče, je pokazala potrebo po razvoju alternativne metode (29).

Snovi se porazdeljujejo med tekočo fazo (vzorec) in med trdno fazo (nosilec). Lahko se adsorbirajo na površino ali pa prehajajo v delce nosilca. Vzpostavi se ravnotežno stanje. Porazdelitveni koeficient nam poda razmerje med koncentracijo spojine v trdni fazi in koncentracijo spojine v vzorcu (30). Tradicionalno izvedbo ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE, ang. *solid phase extraction*) predstavljajo polipropilenske ali steklene kartuše različnih velikosti, v katerih je trdni nosilec. Poleg kartuš so na trgu prisotne še druge izvedbe: ekstrakcijski diski (delci nosilca so vgrajeni v membrano), nastavki za pipete s stacionarno fazo in plošče z večjim številom kartuš (različnih dimenzij z različnim številom vgrajenih kartuš s stacionarno fazo). Stacionarne faze v splošnem delimo v več skupin: anorganski oksidi (silicijev dioksid, aluminijevi in magnezijevi silikati), nizko-specifični nosilci (porozni polimerni materiali, npr. polistiren-divinilbenzen), specifični nosilci (za spojino ali skupino spojin; to so npr. nanomateriali na ogljikovi osnovi – fuleren, grafen) (31).

Prednosti, ki jih prinaša uporaba ekstrakcije na trdnem nosilcu:

- *Čiščenje vzorcev*: pogosto so iskane spojine del kompleksnega vzorca oz. ozadja (matriksa). Veliko število komponent, prisotnih poleg iskanih snovi, oteži analizo, ker jih je težko ločiti ter identificirati in kvantificirati iskane snovi. Komponente ozadja lahko oslabijo (dobimo lažno nižje vrednosti) ali pa ojačajo (dobimo lažno višje vrednosti) signal. Govorimo o t. i. vplivu ozadja (ang. *matrix effect*). Z odstranitvijo neželenih komponent povečamo občutljivost na masnem spektrometru (32).
- *Ločevanje iskanih analitov*: to je ugodno, ko imamo več spojin, ki jih želimo analizirati in jih lahko ločimo po frakcijah glede na njihove lastnosti – npr. polarnost (32).
- *Koncentriranje*: ugodno za vrednotenje spojin, ki so v vzorcu v zelo nizkih koncentracijah (32).

Potek ekstrakcije na trdnem nosilcu (prikazuje ga Slika 2): izbira ustrezne trdne faze in opreme → prekondicioniranje trdne faze (spiramo s topilom, odvisno od nosilca: npr. z metanolom in zatem z vodo ali pufrom; včasih pred metanolom spiramo s topilom, ki ga pozneje uporabimo za elucijo, da odstranimo prisotne nečistoče) → nanos vzorca → spiranje (speremo neželene nečistoče, ki bi lahko motile analizo; izberemo ustrezno topilo, da ne eluiramo želene spojine) → elucija analita z ustreznim topilom (33).



Slika 2: Prikaz stopenj v postopku ekstrakcije SPE z uporabo kartuš (prekondicioniranje-nanos vzorca-spiranje-elucija). Povzeto po (57).

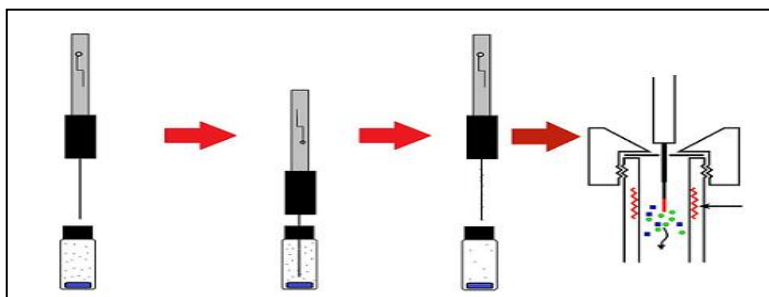
1.4.2.1 EKSTRAKCIJSKI POL-AVTOMATIZIRAN SISTEM SPE-DEX

SPE-DEX (Horizon Technology) je ekstrakcijski sistem za avtomatizacijo ekstrakcije analitov iz vodnih vzorcev vseh vrst: npr. pitna voda, podtalnica, površinske in odpadne vode. Proces ekstrakcije poteka avtomatsko in zajema naslednje korake:

prekondicioniranje diska s stacionarno fazo, nanos vzorca (ni potreben ročni nanos vzorca, ker naprava vzorec črpa iz vsebnika, niti ni potrebna filtracija vzorca), zadrževanje analitov na disku s stacionarno fazo (preostala vodna faza se zbira v za to namenjeni posodi), spiranje vsebnika, v katerem je bil vzorec, spiranje diska, sušenje, elucija. Prednosti metode so v njeni avtomatizaciji, predpriprava vzorca ni potrebna, ker filter v napravi zadrži delce pred stacionarno fazo, zmanjšamo izpostavljenost analita toplom, dobra ponovljivost (34). Za izvedbo ekstrakcije potrebujemo namenski sistem, kar je povezano s stroškovno učinkovitostjo. Poraba topil se zmanjša, a se ne izniči. Omejitev metode je volumen eluata (do 20 mL), kar zahteva dodatno koncentriranje.

1.4.2.2 MIKROEKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU

Mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME, ang. *solid phase microextraction*) je metoda priprave vzorca, ki ne zahteva uporabe topil. Na vlakna kvarčnega stekla je nanešena plast stacionarne faze. V osnovi je dvostopenjski proces (prikazan na Sliki 3). Prva stopnja je porazdeljevanje analita med vzorcem (lahko je tekočina ali para nad vzorcem) in stacionarno fazo. Gre za ravnotežen proces in največji izkoristek dosežemo v točki, ko se vzpostavi ravnotežje. Če je to časovno preveč potratno (slabost metode), lahko proces prekinemo že prej, ko dosežemo sprejemljiv rezultat. Druga slabost je omejena količina stacionarne faze, saj je na nosilec možno nanesti le omejeno količino, ki morda ni zadostna za ves analit v vzorcu. Prisoten je vpliv ozadja, zato je za kvantitativno določitev potrebna metoda standardnega dodatka. Komponente iz ozadja lahko tudi tekmujejo za vezavna mesta na stacionarni fazi. Druga stopnja je desorpcija skoncentriranega analita iz stacionarne faze v instrument, kjer poteka analiza. Na voljo je več različnih stacionarnih faz, različne debeline in polarnosti (35).



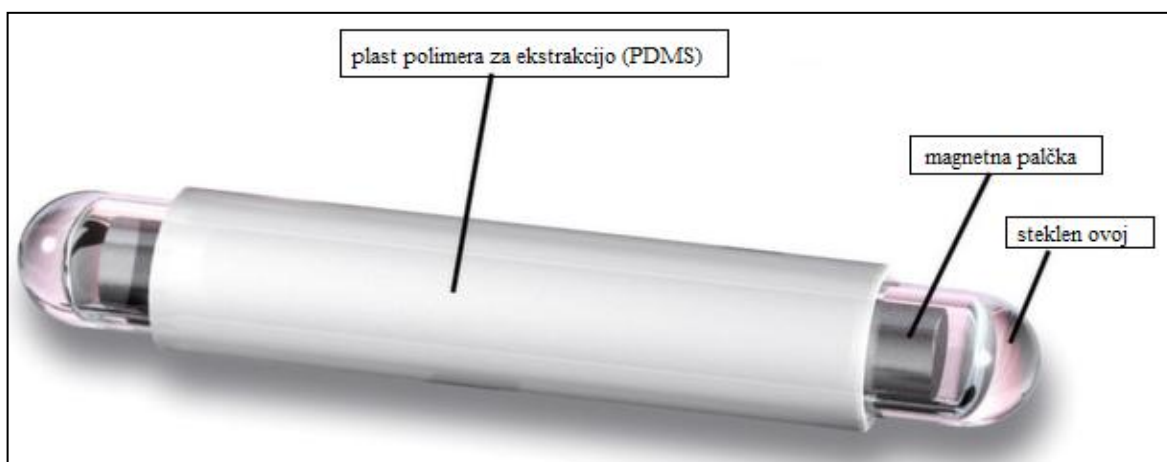
Slika 3: Prikaz SPME-metode. Povzeto po (58).

Glavne prednosti metode so: zmanjšana poraba topil, postopki, združeni v dve stopnji, ter možnost analize vzorcev majhnih volumnov. Metoda ima lahko visoko občutljivost, uporabimo jo lahko za polarne in nepolarne analite, sklopimo jo lahko s plinsko ali tekočinsko kromatografijo (35).

1.4.3 EKSTRAKCIJA NA OSNOVI SORPTIVNEGA MEHANIZMA S POMOČJO TWISTER® MEŠALNIH PALIČIC

Twister® je komercialno poimenovanje izdelka podjetja Gerstel GmbH & Co. KG in ga sestavljajo trije bistveni deli (Slika 4):

- **magnetna palčka** v dolžini enega ali dveh centimetrov, ki služi za prenos rotirajočega gibanja iz mešalne plošče v tekoči vzorec;
- tanek **steklen ovoj** okrog magneta, ki ločuje magnetno palčko in plast polimera ter tako preprečuje razgradnjo polimerne plasti, ki bi jo lahko katalizirale kovine iz magnetne palčke;
- plast **polimera**, npr. polidimetilsiloksan (PDMS), kamor se ekstrahirajo analiti (24).



Slika 4: Prikaz zgradbe Twister® mešalne paličice. Povzeto po (59).

Tehniko priprave vzorca s pomočjo Twister® mešalne paličice so prvič predstavili leta 1999 (36) in se je razvila iz SPME-metode. Mehanizem ekstrakcije je podoben, glavna razlika pa je v volumnu stacionarne faze, ki je pri ekstrakciji na osnovi sorptivnega mehanizma s pomočjo Twister® mešalnih paličic (SBSE, ang. *stir bar sorptive extraction*) tehniki 50- do 250-krat večji. Posledično je kapaciteta polimera za ekstrakcijo pri SBSE veliko večja, zato so večji tudi absolutni izkoristki, ki jih lahko dosežemo. Poleg tega

tehnika ne zahteva velike porabe organskih topil, omogoča koncentriranje analitov ter daje ponovljive rezultate. Tehniko so uspešno uporabili za analizo bioloških vzorcev ter vrednotenje spojin v hrani. Glavne slabosti metode so pomanjkanje več komercialno dostopnih stacionarnih faz, njihova neselektivnost, težave pri sočasni analizi spojin z različnimi lastnostmi (polarnost), tehniko je težko avtomatizirati. Kot sorptivno stacionarno fazo običajno uporabljamo polidimetilsiloksan; komercialno dostopne so tudi mešalne paličice s poliakrilatnimi oblogami (37).

1.4.3.1 NAČELA METODE

SBSE je ravnotežni proces, ki temelji na porazdeljevanju analitov med stacionarno fazo in vzorcem. Vzorec je lahko vodna raztopina ali para nad njo. Spojine prehajajo v stacionarno fazo in se tam zadržijo, vendar ne adsorbirajo in zato ne gre za kompetitiven proces, ki bi bil omejen s številom vezavnih mest. Vsaka spojina ima svoj porazdelitveni koeficient, ki je neodvisen od drugih spojin (37, 38).

Porazdelitveni koeficienti med polidimetilsiloksanom in vodo ($K_{PDMS/V}$) so v sorazmerju oz. jih lahko primerjamo s porazdelitvenimi koeficienti med oktanolom in vodo ($K_{O/V}$). To lahko zapišemo na naslednji način:

$$K_{O/V} \approx K_{PDMS/V} = \frac{C_{PDMS}}{C_V} = \frac{m_{PDMS}}{m_V} \times \frac{V_V}{V_{PDMS}} \quad (\text{Enačba 1})$$

pri čemer predstavlja koncentracijo analita v polimeru c_{PDMS} , v vodni fazi c_V , maso analita v polimeru m_{PDMS} in v vodni fazi m_V ; V_{PDMS} in V_V pa volumna polimera oz. vodne faze. Razmerje med volumnom vode (vzorca) in volumnom polidimetilsiloksana imenujemo fazno razmerje in ga označimo z β ($\beta = \frac{V_V}{V_{PDMS}}$). Enačbo 1 tako napišemo kot:

$$\frac{K_{O/V}}{\beta} = \frac{m_{PDMS}}{m_V} = \frac{m_{PDMS}}{m_0 - m_{PDMS}} \quad (\text{Enačba 2})$$

kjer m_0 predstavlja celokupno količino analita, prisotnega v vodi na začetku. Enačbo 2 lahko preoblikujemo tako, da dobimo enačbo za izračun teoretičnega izkoristka ekstrakcije z uporabo tehnike SBSE:

$$\frac{m_{PDMS}}{m_0} = \frac{\left(\frac{K_{O/V}}{\beta}\right)}{1 + \left(\frac{K_{O/V}}{\beta}\right)} \quad (\text{Enačba 3})$$

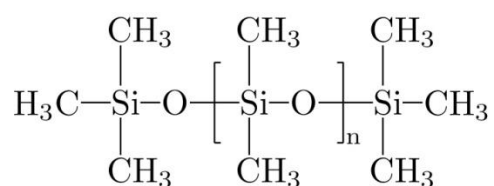
Upoštevajoč Enačbo 3 je edini parameter, ki vpliva na izkoristek ekstrakcije, razmerje med porazdelitvenim koeficientom $K_{O/V}$ in faznim razmerjem β (36). Večja kot je količina polidimetilsiloksana, manjše je fazno razmerje β in večji je izkoristek ekstrakcije (38).

1.4.3.2 METODA SBSE – DVOSTOPENJSKI PROCES

SBSE izvedemo v dveh osnovnih korakih z – ekstrakcijo in desorpcijo. V fazi ekstrakcije je Twister® ali potopljen v vzorec ali pa izpostavljen pari nad vzorcem. Če Twister® potopimo v vzorec, ga moramo pred fazo desorpcije očistiti z vodo, da odstranimo soli, sladkorje, proteine in druge komponente vzorca, ki bi lahko motile analizo. Spiranje z vodo ne povzroči izgube analita, ker so spojine ujete v strukturi polimera. Ekstrakciji sledi desorpcija, ki je lahko termalna ali tekočinska. V večini primerov je zastopana termalna desorpcija, ki ne zahteva uporabe organskih topil. Sklopljena je z analizo s plinsko kromatografijo in omogoča prenos ekstrahiranega analita v kromatografski sistem. Termalna desorpcija poteka v območju med 150 in 300 °C. Slabosti metode sta izpostavljenost analitov visokim temperaturam in draga oprema. Kadar nimamo na voljo ustrezne opreme ali analiziramo termolabilne spojine, lahko kot alternativno metodo uporabimo tekočinsko desorpcijo. Twister® potopimo v topilo ali mešanico topil, zagotoviti moramo njegovo popolno omočenost. Uporabljena topila morajo biti kompatibilna s polimerom. Najpogosteje uporabljamo acetonitril, metanol, njune zmesi, zmesi z vodo ali s pufri. Tekočinska desorpcija je cenejša, manjša je kontaminacija iz polimerne faze, ki jo lahko povzročijo visoke temperature, prav tako omogoča ponovno analizo, saj ni direktno povezana z analizno tehniko kot termalna desorpcija (25).

1.4.3.3 STACIONARNA FAZA POLIDIMETILSILOKSAN

Kot stacionarna faza je na Twister® mešalno paličico nanešen polimer polidimetilsiloksan (Slika 5). Polidimetilsiloksan spada v družino silikonov, ki so v splošnem sestavljeni iz silicija, ogljika, vodika in kisika. Uveljavil se je kot stacionarna faza v plinski kromatografiji, od tam pa se je njegova uporaba razširila tudi na druge metode, kot sta npr. mikroekstrakcija na trdnem nosilcu in SBSE.



Slika 5: Struktura PDMS. Povzeto po (46).

Polidimetilsiloksan je netoksičen, hidrofoben, prosojen polimer, ki se ne kopiči v organizmih. Je nereaktiven z veliko kemikalijami. Kaže tendenco po nabrekanju v hidrofnih topilih (pentan, diisopropilamin, trietilamin, ksilen ...). V hidrofilnih topilih, ki jih večinoma uporabljamo v analizi kemiji, praktično ne nabreka (voda, nitrometan, acetonitril, dimetilsulfoksid, etilen-glikol ...). To omogoča ekstrakcijo analitov iz vodnih vzorcev za kvantitativno analizo. Element -Si-O-Si- v strukturi polidimetilsiloksana je zelo prožen v primerjavi z drugimi »gumijastimi« polimeri, interakcije med posameznimi komponentami pa niso močne. To omogoča gibljivost polimera v večji razdalji že pri nizkih temperaturah, posledica pa je njegova nizka selektivnost za permeabilnost spojin (46).

1.4.3.4 APLIKACIJE METODE

- Analize **okoljskih vzorcev**: metoda SBSE se že leta uporablja za analizo velikega števila spojin, tudi nekaterih, ki so na seznamu Stockholmske konvencije (konvencija glede obstojnih organskih onesnaževalcev POP (ang. *Persistent Organic Pollutant*), ki je veljavna od leta 2004. Je globalna pogodba, katere namen je zaščititi človekovo zdravje in okolje pred negativnimi vplivi obstojnih organskih onesnaževalcev. Cilj je zmanjšati in, kjer je mogoče, odpraviti sproščanje teh snovi v okolje (39): aromatski policiklični ogljikovodiki (PAH, ang. *polycyclic aromatic hydrocarbon*), organoklorovi, organofosforjevi, nitrogenirani pesticidi, ostanki eksploziva, UV-filtri, hormonski motilci (npr. PAH, ftalati, spolni hormoni, alkilfenoli ...). Zdravilne učinkovine so s to metodo določali v urinu in plazmi, za analize okoljskih vod pa zaenkrat ni podatkov(40–44).
- Analize **vzorcev hrane** lahko razdelimo v štiri skupine: analiza osnovnih sestavin (npr. profil maščobnih kislin v olivnem olju), analiza komponent, ki so odgovorne za kakovost hrane oz. pijače (npr. analiza eteričnih olj hmelja v pivu), analiza snovi, ki kažejo na pokvarjenost hrane (npr. določitev 3-kloroanizola v vinu), analiza kontaminantov v hrani (npr. pesticidi, snovi, ki se sproščajo iz embalaže ...) (45).

- Analiza **bioloških vzorcev** je redkeje zastopana kot zgornji dve iz več razlogov: a) Koncentracije analitov so pogosto v območju, ko koncentriranje ni potrebno. b) Biološki vzorci so zelo kompleksni, ozadje ima lahko prevelik vpliv na uspešnost analize, metoda ni visoko selektivna. c) Volumen biološkega vzorca je včasih omejen le na nekaj mililitrov ali mikrolitrov, za uspešno uporabo SBSE pa moramo zagotoviti popolno omočenost stacionarne faze z vzorcem. d) Analiti so pogosto polarne spojine, ki za ekstrakcije, kjer je stacionarna faza polidimetilsiloksan, niso najbolj primerni. e) Tehniko je težko avtomatizirati (40). SBSE lahko uporabljamo za vrednotenje učinkovin in prepovedanih substanc – v urinu ali plazmi npr. lahko spremljamo terapevtske koncentracije učinkovin, farmakokinetiko, biorazpoložljivost. SBSE uporabljamo tudi za namene klinične in forenzične toksikologije. Z uporabo encimske hidrolize (npr. s pomočjo β -glukoronidaz) lahko zmanjšamo polarnost analitov in tako postanejo primernejši za ekstrakcijo. Možna je tudi izvedba *in-situ* derivatizacije spojin, da jih lažje ekstrahiramo (38,41).

1.5 ANALIZA Z MASNO SPEKTROMETRIJO

Masna spektrometrija je izjemno občutljiva in specifična analizna metoda, s katero lahko analite ovrednotimo kvalitativno in kvantitativno. Redko jo uporabljamo kot samostojno tehniko, ker je običajno potrebno želeni analit ločiti od matriksa. Zato je masna spektrometrija kot detektorski sistem sklopljena s tekočinsko oz. plinsko kromatografijo. Masni spektrometer je sestavljen iz štirih osnovnih delov: a) Ionski izvor – tu se molekule ionizirajo in preidejo v plinsko fazo. b) Masni analizator – loči ione glede na njihovo razmerje med maso (m) in nabojem (z) $\rightarrow \frac{m}{z}$. c) Detektor – šteje ione. d) Naprava za obdelavo podatkov – pretvori podatke iz detektorja za nadaljnje procesiranje. Molekule lahko ioniziramo na več načinov: *elektronska ionizacija* – EI (analite uparimo in obstreljujemo z elektroni, dobimo nabite fragmente molekule; naboj »z« je večinoma enak 1, tako da je razmerje m/z enako masi posameznega fragmenta), *kemijska ionizacija* – CI (temelji na reakcijah uparjenega analita in ionih reagenčnega plina, večinoma se analiti protonirajo in so pozitivno nabiti), *elektrozprševalna ionizacija* – ESI (analit raztopimo v ustreznem topilu, ionizacija poteka pri prehodu analita skozi cevko, ki je pod napetostjo; topilo odparimo), *kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku* – APCI (zelo podobno ESI, ionizacija poteka s pomočjo elektrode, ki ionizira molekule topila, te pa naboj prenesejo na

analit s pomočjo kemijske reakcije), *ionizacija v matriksu z lasersko desorpcijo – MALDI* (vzorec je suspendiran v matriksu, ionizacijo izvedemo z laserjem) (47). Danes je najpogostejše uporabljani masni analizator kvadrupolni analizator, ker je preprost za uporabo, je poceni, robusten, zanesljiv, ni tako občutljiv na nečistote in je primeren za vzorce, kjer so analiti v nizkih koncentracijah. Masni spekter dobimo s spremljanjem območja mas, ki nas zanima (48). Kvadrupolni masni analizatorji so sestavljeni iz štirih kovinskih palic, oblikovanih v kvadratno obliko, ki so pod napetostjo. Vzdlž njih potujejo ioni proti detektorju. Kvadrupolni masni analizator deluje kot filter, ki loči ione glede na razmerje m/z . Ko ioni dosežejo ionski detektor, ta generira signal in dobimo masni spekter. Pri tandemski masni spektrometriji uporabljamo dva masna analizatorja znotraj ene naprave (npr. tandemski kvadrupol, ki ga poznamo pod imenom trojni kvadrupol – prvi in tretji delujeta kot masna analizatorja, vmesni pa kot kolizijska celica). Pri našem eksperimentalnem delu smo uporabili multirezidualno analizo (MRM), pri kateri prvi kvadrupol prepušča starševske ione, drugi kvadrupol starševske ione fragmentira, tretji kvadrupol pa filtrira izbrane hčerinske ione. Na ta način izboljšamo selektivnost in občutljivost metode (49, 50).

2 NAMEN DELA

Ozaveščenost o pomenu čistega okolja, v katerem živimo, je čedalje večja. Sem sodi tudi ohranjanje kakovosti okoljskih voda, saj le-te napajajo vire pitne vode, kar lahko ogroža naše zdravje. Spremljanje koncentracij zdravilnih učinkovin ima zato vedno večji pomen.

Zdravilne učinkovine so v okolju prisotne v nizkih koncentracijah, zato je pred analizo vzorce pogosto potrebno skoncentrirati in hkrati tudi očistiti. V ta namen bomo razvili in optimizirali metodo na osnovi sorptivnega mehanizma (SBSE Twister®), ki je nova metoda na področju raziskovanja prisotnosti zdravilnih učinkovin v vodnih vzorcih. Metodologijo bomo razvili s pomočjo 40 izbranih standardov zdravilnih učinkovin. Sistematično bomo proučili parametre, ki vplivajo na izkoristek ekstrakcije: čas ekstrakcije, pH medija, temperatura medija, dodatek inertne soli oz. metanola. Namesto termalne desorpcije, ki zahteva uporabo dragih naprav, bomo razvili alternativno metodo tekočinske desorpcije. Zato bomo proučili tudi parametre, ki vplivajo na izkoristek desorpcije: čas, temperatura, vrsta topila, uporaba ultrazvoka. Med eksperimentalnimi postopki bomo učinkovine izpostavili povišani temperaturi in različnim pH vrednostim, zato bomo preverili tudi stabilnost spojin v skrajnih eksperimentalnih razmerah. Ker bo vzorec vseboval 40 spojin, bomo preverili tudi vpliv različnega števila analitov na izkoristek metode. Uspešnost metodologije oz. ekstrakcije učinkovin iz vzorca z znanimi koncentracijami bomo preverjali s pomočjo predhodno razvite metode LC-MS/MS.

Optimizirano metodo ekstrakcije na osnovi sorptivnega mehanizma bomo ovrednotili z osnovnimi validacijskimi parametri (linearnost, ponovljivost, točnost in izkoristek) in jo preverili na realnem vzorcu. Vzorčili bomo vtok ter iztok iz čistilne naprave. Oba vzorca odpadnih vod bosta trenutno odvzeta vzorca.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 STANDARDI

- amitriptilinijev klorid, $C_{20}H_{23}N \times HCl$, $M = 313,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- atenolol, $C_{14}H_{22}N_2O_3$, $M = 266,3 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- atorvastatin kalcijeva sol $(C_{33}H_{34}FN_2O_5)_2 \times Ca$, $M = 1155,3 \text{ g/mol}$ (Sequoia Research products, VB).
- azitromicin, $C_{38}H_{72}N_2O_{12}$, $M = 749,0 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- bezafibrat, $C_{19}H_{20}ClNO_4$, $M = 361,8 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- bromazepam, $C_{14}H_{10}BrN_3O$, $M = 316,2 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- desipraminijev klorid, $C_{18}H_{22}N_2 \times HCl$, $M = 302,8 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- diazepam, $C_{16}H_{13}ClN_2O$, $M = 284,7 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- diklofenak natrijeva sol, $C_{14}H_{10}Cl_2NO_2 \times Na$, $M = 318,1 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- donepezilijev klorid monohidrat, $C_{24}H_{29}NO_3 \times HCl \times H_2O$, $M = 434,0 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- escitalopram oksalatna sol, $C_{20}H_{21}FN_2O \times C_2H_2O_4$, $M = 414,4 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- feksofenadinijev klorid, $C_{32}H_{39}NO_4 \times HCl$, $M = 538,1 \text{ g/mol}$ (Sequoia Research products, VB)
- fluoksetinijev klorid, $C_{17}H_{18}F_3NO \times HCl$, $M = 345,8 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- fluoksetinijev-d₅ klorid (interni standard), $C_{17}D_5H_{13}F_3NO \times HCl$, $M = 350,82 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- glibenklamid, $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$, $M = 494,0 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- haloperidol, $C_{21}H_{23}ClFNO_2$, $M = 375,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- imatinib mezilatna sol, $C_{29}H_{31}N_7O \times CH_4O_3S$, $M = 589,7 \text{ g/mol}$ (Sequoia Research products, VB)
- irbesartan, $C_{25}H_{28}N_6O$, $M = 428,5 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- karbamazepin, $C_{15}H_{12}N_2O$, $M = 236,3 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)

- klomipraminijev klorid, $C_{19}H_{23}ClN_2 \times HCl$, $M = 351,3 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- klonazepam, $C_{15}H_{10}ClN_3O_3$, $M = 315,7 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- loperamidijski klorid, $C_{29}H_{33}ClN_2O_2 \times HCl$, $M = 513,5 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- loratadin, $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$, $M = 382,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- metoprolol tartratna sol, $C_{30}H_{50}N_2O_6 \times C_4H_6O_6$, $M = 684,8 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- oksazepam, $C_{15}H_{11}ClN_2O_2$, $M = 286,7 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- okskarbazepin, $C_{15}H_{12}N_2O_2$, $M = 252,3 \text{ g/mol}$ (Sequoia Research products, VB)
- paracetamol, $C_8H_9NO_2$, $M = 151,2 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- prometazinijski klorid, $C_{17}H_{20}N_2S \times HCl$, $M = 320,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- propranololijev klorid, $C_{16}H_{21}NO_2 \times HCl$, $M = 295,8 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- raloksifenijev klorid, $C_{28}H_{27}NO_4S \times HCl$, $M = 510,0 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- risperidon, $C_{23}H_{27}FN_4O_2$, $M = 410,5 \text{ g/mol}$ (Sequoia Research products, VB)
- rosvastatin kalcijeva sol, $(C_{22}H_{27}FN_3O_6S)_2 \times Ca$, $M = 1001,1 \text{ g/mol}$ (Sequoia Research products, VB)
- selegilinijski klorid, $C_{13}H_{17}N \times HCl$, $M = 223,7 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- sertralinijski klorid, $C_{17}H_{17}Cl_2N \times HCl$, $M = 342,7 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- tramadolijev klorid, $C_{16}H_{25}NO_2 \times HCl$, $M = 299,8 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- triklosan, $C_{12}H_7Cl_3O_2$, $M = 289,5 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- trimetoprim, $C_{14}H_{18}N_4O_3$, $M = 290,3 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- valsartan, $C_{24}H_{29}N_5O_3$, $M = 435,5 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- venlafaksinijski klorid, $C_{17}H_{27}NO_2 \times HCl$, $M = 313,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)

- verapamilijev klorid, $C_{27}H_{38}N_2O_4 \times HCl$, $M = 491,1 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- ziprasidonijev klorid monohidrat, $C_{21}H_{21}ClN_4OS \times HCl \times H_2O$, $M = 467,4 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)

3.1.2 REAGENTI, RAZTOPINE IN TOPILA

- acetonitril MS grade $\geq 99,9 \%$, CH_3CN , $M = 41,1 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- amonijev formiat $\geq 99,0 \%$, NH_4HCOO , $M = 63,1 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- diklorometan $\geq 99,8 \%$, CH_2Cl_2 , $M = 84,9 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich Nemčija)
- mravljična kislina 98–100 %, $HCOOH$, $M = 46,0 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- kalijev dihidrogen fosfat $\geq 99,5 \%$, KH_2PO_4 , $M = 74,55 \text{ g/mol}$ (Merck KGaA, Nemčija)
- klorovodikova kislina 1M, HCl , $M = 36,4 \text{ g/mol}$ (Merck KGaA, Nemčija)
- metanol $\geq 99,9 \%$, CH_3OH , $M = 32,0 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- natrijev hidroksid 1M, $NaOH$, $M = 40,0 \text{ g/mol}$ (Merck KGaA, Nemčija)
- natrijev klorid, $NaCl$, $M = 58,44 \text{ g/mol}$ (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- pufrne raztopine (Sigma-Aldrich, Nemčija)
- ultračista voda Milli-Q

3.1.3 NAPRAVE IN PRIBOR

- analitska tehtnica Excellence® plus (Mettler Toledo, Švica)
- avtomatske pipete 2–2 μ L, 20–200 μ L, 100–100 μ L (Eppendorf Research, Nemčija)
- celulozno-acetatni filter z velikostjo por 0,45 μ m (Sartorius, Nemčija)
- epice – plastične 2-mL (Eppendorf Research, Nemčija)
- hladilnik z zmrzovalnikom (Gorenje, Slovenija)
- hladilnik (LTH, Slovenija)

- LC-MS/MS (Agilent Technologies, Santa Clara, ZDA)
- magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Portugalska)
- magnetno mešalo – plošča z možnostjo segrevanja RT 10 power (Ika Werke, Nemčija)
- nastavki za pipete (Eppendorf Research, Nemčija)
- pH lističi 0–14 (Merck KGaA, Nemčija)
- pH metra MA 5750 (Iskra, Slovenija) in PA 220 (Mettler Toledo, Švica)
- sistem za filtriranje (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Nemčija)
- sistem za pripravo MilliQ vode Advantage® A10 (Millipore Corporation, ZDA)
- steklovina: namenske vialne za Twister® magnetne paličice, merilne bučke, zamaški, polnilne pipete, čaše, merilni valji, čolnički za tehtanje, steklene palčke, vialne, vložki za vialne
- stresalnik Vibromix® 10 (Tehtnica, Slovenija)
- turboVap LV® (Caliper, ZDA)
- Twister®-mešalne paličice s polimerom polidimetilsiloksan 10mm × 1mm (Gerstel GmbH & Co. KG, Nemčija)
- ultrazvočna kadička Sonis® 4 (Iskra, Slovenija)
- ostalo: spatule, plastične pipete, vzmeti za steklene vložke, zamaški za vialne, magneti, škarje, parafilm, magnetna palčka, pinceta, zaščitne rokavice

3.1.4 PRIPRAVA STANDARDNIH RAZTOPIN

3.1.4.1 OSNOVNE RAZTOPINE POSAMEZNIH ANALITOV

Osnovno raztopino za vsak analit s koncentracijo 1 mg/mL smo pripravili z raztapljanjem 5 mg standarda v metanolu. Te raztopine smo shranjevali pri –20 °C.

3.1.4.2 OSNOVNA RAZTOPINA VSEH 40 ANALITOV

Iz posameznih osnovnih raztopin vsakega analita smo odpipetirali določen volumen in pripravili osnovno raztopino v metanolu z vsemi 40 analiti in končno koncentracijo 1 mg/L. Dobljeno raztopino smo shranjevali pri –20 °C.

3.1.4.3 PRIPRAVA DELOVNE RAZTOPINE

Osnovno raztopino z vsemi 40 analiti in koncentracijo 1 mg/L v metanolu smo 10-krat redčili z vodo MilliQ in dobili delovno raztopino s koncentracijo 100 µg/L. To raztopino smo pripravili vsak dan znova zaradi možne nestabilnosti analitov.

3.1.4.4 PRIPRAVA RAZTOPINE ZA RAZVOJ EKSTRAKCIJSKE METODE

Raztopino smo pripravili iz delovne raztopine z 10-kratnim redčenjem s pufrom ustreznega pH. Koncentracija vzorčne raztopine je bila 10 µg/L. Kot pufer smo uporabili 50 mM raztopino fosfatnega pufra (KH_2PO_4).

3.1.4.5 PRIPRAVA RAZTOPINE INTERNEGA STANDARDA

5 mg standarda smo natehtali v 5-mililitrsko bučko in ga raztopili v MeOH (konc. raztopine 1 mg/mL). To raztopino smo shranjevali pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. V MeOH smo pripravili raztopino internega standarda s koncentracijo 100 µg/L in dodali 100 µL tako pripravljene raztopine v 20 mL vzorca, kar pomeni, da je bila koncentracija v vzorcu 0,5 µg/L.

3.1.5 PRIPRAVA 50 mM FOSFATNEGA PUFRA: pH 3, pH 5, pH 7 in pH 9

Najprej smo preračunali potrebno količino KH_2PO_4 za pripravo želenega volumna pufrne raztopine. Za 200 mL 50 mM pufra smo potrebovali 1360,8 mg KH_2PO_4 . Natehtano substanco smo kvantitativno prenesli v merilno bučko in jo do približno 90 % končnega volumna dopolnili z vodo MilliQ. S pH metrom, ki smo ga predhodno umerili na želeno vrednost pH s pomočjo pufrih raztopin, smo pomerili začetni pH raztopine KH_2PO_4 . Če je bil pH želenega pufra nižji kot pH te raztopine, smo ga naravnali s pomočjo 1 M HCl, če pa je bil višji, pa s pomočjo 1 M NaOH. Manjkajoči volumen v merilni bučki smo dopolnili še z vodo MilliQ.

3.1.6 PRIPRAVA TOPIL

- ACN:MeOH (50/50, v/v): v 100-mililitrski merilni bučki smo zmešali z merilnim valjem odmerjenih 50 mL ACN in 50 mL MeOH.

- 2-odstotna mravljična kislina (HCOOH) v $\text{ACN}:\text{MeOH}$ (50/50, v/v): 0,5 mL mravljične kisline smo prenesli v 25-mililitrsko merilno bučko in do oznake dopolnili z mešanico $\text{ACN}:\text{MeOH}$.
- 2,5 mM amonijev formiat (NH_4HCOO) v $\text{ACN}:\text{MeOH}$ (50/50, v/v): natehtali smo 3,95 mg amonijevega formiata in ga kvantitativno prenesli v 25-mililitrsko merilno bučko. Do oznake na bučki smo dopolnili z mešanico $\text{ACN}:\text{MeOH}$.
- $\text{DCM}:\text{MeOH}$ (50/50 v/v): v merilni bučki smo zmešali z merilnim valjem odmerjenih 50 mL DCM in 50 mL MeOH .
- 2,5 mM amonijev formiat v 50-odstotnem ACN (rekonstitucijsko topilo): za 100 mL topila smo natehtali 15,8 mg amonijevega formiata in dopolnili z raztopino, ki smo jo pripravili iz volumsko enakih delov ACN in MilliQ vode.
- 0,1 M NaOH : pripravili smo ga iz 1 M NaOH z 10-kratnim redčenjem z MilliQ vodo. Za pripravo 50 mL smo odpipetirali 5 mL 1 M NaOH v 50 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z vodo MilliQ.
- $\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (80/20, v/v): v merilni bučki smo zmešali z merilnim valjem odmerjenih 80 mL MeOH in 20 mL vode MilliQ.
- 0,1-odstotna mravljična kislina: 1 mL mravljične kisline smo dali v 999 mL vode MilliQ.

3.2 METODE

3.2.1 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA METODE SBSE

3.2.1.1 IZBOR SPOJIN

Glede na pogostost pojavljanja v okolju in fizikalno-kemijske lastnosti (polarnost) smo izbrali 40 različnih spojin, s pomočjo katerih smo razvili in optimizirali metodo SBSE. 39 spojin je zdravilnih učinkovin, ena spojina (triklosan) pa je sestavina izdelkov za osebno nego. Glede na vrednosti $\log P$ smo spojine razdelili v tri skupine. V prvi skupini so spojine z vrednostjo $\log P$ pod 3, v drugi skupini tiste z vrednostjo $\log P$ med 3 in 5, v tretji skupini pa tiste z vrednostjo $\log P$ nad 5.

3.2.1.2 OSNOVNI POGOJI PRI RAZVOJU IN OPTIMIZACIJI EKSTRAKCIJE

Nov pristop za ekstrakcijo učinkovin iz vodnih vzorcev na osnovi sorptivnega mehanizma smo razvijali v 20 mL raztopine (v 50-mililitrskih steklenih bučkah) s koncentracijo 10

$\mu\text{g/L}$. Twister® paličice dimenzij $10\text{ mm} \times 1\text{ mm}$ smo pred vsako uporabo 30 min vrteli v 3 mL metanola pri 990 rpm na plošči z magnetnim mešalom in sobni temperaturi. Za lažjo optimizacijo posameznega koraka ekstrakcije smo uporabili stalne pogoje za desorpcijo: 2 mL desorpcijskega topila ACN:MeOH (50/50, v/v), temperatura $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, čas 15 min in hitrost vrtenja 990 rpm. Po končani desorpciji smo Twister® paličice očistili še v 2 mL mešanice DCM:MeOH (50/50, v/v), pri sobni temperaturi, hitrosti vrtenja 990 rpm in v času 30 min.

3.2.1.3 KINETIKA EKSTRAKCIJE

Preverili smo vpliv časa na izkoristek ekstrakcije. Pripravili smo 8 ponovitev vzorčnih raztopin po 20 mL s koncentracijo $10\text{ }\mu\text{g/L}$ (2 mL delovne raztopine s koncentracijo $100\text{ }\mu\text{g/L}$ in 18 mL pufra) ter izvedli postopek ekstrakcije. Vzorčne raztopine smo prenesli v 50-mililitrske steklene bučke. Prve štiri ponovitve smo segrevali na $40\text{ }^{\circ}\text{C}$, dve sta bili umerjeni na pH 7, dve pa na pH 9. Druge štiri ponovitve smo segrevali na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ in prav tako dve umerili na pH 7 in dve na pH 9. Uporabili smo 50 mM fosfatni pufer. Postopek ekstrakcije smo izvajali 60 min pri 990 rpm. Vzorčili smo vzorčno raztopino ob času 0 in nato vsakih 15 min po $100\text{ }\mu\text{L}$.

Pred uporabo optimizirane metode na realnem vzorcu smo študijo kinetike ekstrakcije ponovili. Pripravili smo osem paralelek po 20 mL vzorčne raztopine s koncentracijo $10\text{ }\mu\text{g/L}$, 2 mL delovne raztopine s koncentracijo $100\text{ }\mu\text{g/L}$ in 18 mL pufra pH 9, v 50-mililitrskih steklenih bučkah. 4 ponovitve smo segrevali na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$, preostale 4 ponovitve pa smo spremljali pri sobni temperaturi. Vzorčili smo začetne raztopine v času 0 po $100\text{ }\mu\text{L}$ in nato vsakih 30 min še po $100\text{ }\mu\text{L}$, do končnega časa 180 min. Vzorce smo analizirali z LC-MS/MS.

3.2.1.4 VPLIV pH NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Preverili smo vpliv pH vrednosti raztopine vzorca na izkoristek ekstrakcije. Raztopino smo pripravili iz 2 mL delovne raztopine s koncentracijo $100\text{ }\mu\text{g/L}$ in 18 mL fosfatnega pufra, uravnanega na pH vrednost 3,5,7 ali 9. Vzorec smo prenesli v 50-mililitrske steklene bučke ter ga segreli na $50\text{ }^{\circ}\text{C}$. Čas ekstrakcije smo omejili na 1 uro.

3.2.1.5 VPLIV TEMPERATURE NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Preverili smo vpliv temperature na izkoristek ekstrakcije. Raztopino smo pripravili iz 2 mL delovne raztopine s koncentracijo 100 µg/L in 18 mL fosfatnega pufru s pH 9. 20 mL vzorčne raztopine s koncentracijo 10 µg/L smo prenesli v 50-mililitrske steklene bučke. Dve ponovitvi smo ekstrahirali pri sobni temperaturi (25 °C), dve smo segrevali na 40 °C in dve na 50 °C. Čas ekstrakcije smo omejili na 1 uro.

3.2.1.6 PREVERJANJE STABILNOSTI ANALITOV V VZORCU

Preverili smo stabilnost spojin, saj so slednje med razvojem in optimizacijo metode izpostavljene različnim pogojem, ki lahko vplivajo na njihovo obstojnost. Pripravili smo 20 mL vzorčne raztopine s koncentracijo 10 µg/L v pufru s pH 9 v dveh ponovitvah. Vzorce smo izpostavili temperaturi 50 °C (najvišja uporabljena temperatura). Prvi vzorec smo vzeli ob času 0, ostale pa po 15 min, 30 min, 60 min in 90 min (30 min dlje od pričakovanega časa ekstrakcije). Volumen odvzetega vzorca je bil 700 µL. Analizo smo izvedli z metodo LC-MS/MS. Izračunali smo upad koncentracije v % po Enačbi 4:

$$\% \text{ razpada} = \frac{\text{odziv ob } t_0 - \text{odziv v času } t}{\text{odziv ob } t_0} \times 100 \quad (\text{Enačba 4})$$

3.2.1.7 VPLIV DODATKA METANOLA NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Preverili smo vpliv dodatka MeOH na izkoristek ekstrakcije. Vzorčna raztopina je bila sestavljena iz 2 mL delovne raztopine s koncentracijo 100 µg/L in različnih volumnov fosfatnega pufru (Tabela 1); 2 ponovitvi s pH 7 in 2 ponovitvi s pH 9 pri vsaki koncentraciji MeOH.

Tabela 1: Sestava vzorcev z različnim odstotkom MeOH

MeOH (%)	V _{delovne razt.} (mL)	V _{MeOH} (mL)	V _{pufer} (mL)
1	2	0	18
5	2	0,8	17,2
10	2	1,8	16,2
20	2	3,8	14,2
30	2	5,8	12,2

Pri pripravi vzorcev smo zaradi zmanjšanja napake upoštevali količino MeOH, ki je vedno prisotna v vzorcu, saj je osnovna raztopina vseh 40 analitov s koncentracijo 1 mg/L pripravljena v MeOH. Z upoštevanjem faktorja redčenja lahko izračunamo, da je v vsakem vzorcu, pripravljenem po klasičnem postopku (2 mL delovne raztopine in 18 mL pufru), na začetku 200 µL MeOH oz. 1 % MeOH (vzorec v prvi vrstici Tabele 1). Iz pripravljenih vzorčnih raztopin z MeOH smo ob času 0 vzorčili po 150 µL. Ekstrakcijo smo izvajali 1 uro pri 50 °C in hitrosti vrtenja 990 rpm. Vzorčne raztopine smo po končani ekstrakciji vzorčili in analizirali, da bi ugotovili, kolikšen delež analitov zaostane v vzorcu.

3.2.1.8 VPLIV DODATKA INERTNE SOLI NA IZKORISTEK EKSTRAKCIJE

Preverili smo vpliv dodatka inertne soli (NaCl) na izkoristek ekstrakcije. Pripravili smo po dve ponovitvi vzorčne raztopine s koncentracijo 10 µg/L; iz 2 mL delovne raztopine s koncentracijo 100 µg/L in 18 mL fosfatnega pufru pH 7. Vzorcem smo dodali različne količine NaCl, kot prikazuje Tabela 2:

Tabela 2: Sestava vzorcev z dodanim NaCl

m_{NaCl} (mg)	$V_{\text{delovne razt.}}$ (mL)	V_{pufer} (mL)
0	2	18
500	2	18
1000	2	18
2000	2	18

V 50-mililitrsko bučko smo najprej odmerili 15 mL pufru, dodali določeno količino NaCl, ga raztopili, dodali še 3 mL pufru in na koncu 2 mL delovne raztopine. Ekstrakcijo smo izvajali 1 uro pri 50 °C in hitrosti vrtenja 990 rpm. Vzorčno raztopino smo po končani ekstrakciji vzorčili in analizirali, da bi ugotovili, kolikšen delež analitov zaostane v vzorcu.

3.2.1.9 IZRAČUN IZKORISTKA EKSTRAKCIJSKEGA POSTOPKA

Uspešnost postopka ekstrakcije smo preverjali z računanjem izkoristkov za vsako spojino v vzorčni raztopini po Enačbi 5:

$$\text{izkoristek (\%)} = \frac{c(\text{začetna}) - c(\text{zaostanek})}{c(\text{začetna})} \times 100 \quad (\text{Enačba 5})$$

c(začetna) pomeni koncentracijo v vzorčni raztopini, c(zaostanek) pa pomeni koncentracijo v vzorčni raztopini po končani fazi ekstrakcije.

3.2.1.10 OSNOVNI POGOJI PRI RAZVOJU IN OPTIMIZACIJI DESORPCIJE

Končani optimizaciji ekstrakcije je sledila optimizacija desorpcije. Za lažjo optimizacijo posameznega koraka desorpcije smo uporabili stalne pogoje za ekstrakcijo: 20 mL vzorčne raztopine s koncentracijo 10 µg/L (2 mL delovne raztopine s koncentracijo 100 µg/L in 18 mL 50 mM fosfatnega pufra pH 9), temperatura 50 °C, čas 60 min in hitrost vrtenja 990 rpm.

3.2.1.11 VPLIV DESORPCIJSKEGA TOPILA NA IZKORISTEK DESORPCIJE

Preverili smo, kako izbira desorpcijskega topila vpliva na izkoristek desorpcije. Pripravili smo štiri različna topila: 100-odstotni ACN, ACN:MeOH (50/50, v/v), 2-odstotna mravljična kislina v ACN:MeOH (50/50, v/v) in 2,5 mM amonijev formiat v ACN:MeOH (50/50, v/v). Twister® mešalne paličice smo po končani ekstrakciji prenesli v 2 mL desorpcijskega topila (2 ponovitvi za vsako topilo), segretega na 50 °C. Čas desorpcije smo omejili na 15 min, hitrost vrtenja je bila 990 rpm. Po končani fazi desorpcije smo vzorčili po 1 mL vzorca in ga analizirali z metodo LC-MS/MS.

3.2.1.12 VPLIV TEMPERATURE NA IZKORISTEK DESORPCIJE

Preverili smo vpliv temperature na izkoristek desorpcije. Po končani fazi ekstrakcije smo Twister® mešalne paličice prenesli v 2 mL desorpcijskega topila ACN:MeOH (50/50, v/v); 2 ponovitvi pri sobni temperaturi, dve pri 30 °C, dve pri 40 °C in dve pri 50 °C. Čas desorpcije smo omejili na 15 min, hitrost vrtenja je bila 990 rpm. Po končani fazi desorpcije smo vzorčili po 1 mL vzorca in ga analizirali z metodo LC-MS/MS.

3.2.1.13 KINETIKA DESORPCIJE

Preverili smo vpliv časa na izkoristek desorpcije. Po končani fazi ekstrakcije smo Twister® mešalne paličice prenesli v 2 mL desorpcijskega topila ACN:MeOH (50/50 v/v), segretega na 50 °C. Desorpcijo smo podaljšali do 20 min, namesto običajnih 15 min. Poskus smo izvajali v dveh ponovitvah. Z vzorčenjem vsakih 5 min smo spremljali količino

desorbiranega analita. Vzorčili smo čim manjšo količino desorpcijskega topila (100 μ L), da bi čim manj vplivali na gradient med stacionarno fazo (polimerom) in topilom.

3.2.1.14 VPLIV VEČKRATNE DESORPCIJE NA IZKORISTEK

Preverili smo vpliv štirih zaporedno izvedenih korakov desorpcije na končni izkoristek desorpcije. Za vsako od štirih stopenj smo uporabili sveže topilo. Desorpcija je potekala štirikrat po 15 min, v 2 mL ACN:MeOH (50/50 v/v), pri temperaturi 50 °C in hitrosti vrtenja 990 rpm. Poskus smo izvajali v dveh ponovitvah. Po končani vsaki stopnji smo vzorčili po 1 mL vzorca in ga analizirali z metodo LC-MS/MS.

3.2.1.15 VPLIV UPORABE ULTRAZVOKA NA IZKORISTEK DESORPCIJE

Vpliv uporabe ultrazvoka smo preverili na dva različna načina:

➤ Ultrazvok kot samostojna tehnika desorpcije:

- Po končani ekstrakciji osmih vzorcev smo štiri ponovitve uporabili za razvito tekočinsko desorpcijo z mešanjem na magnetnem mešalu 15 min pri hitrosti vrtenja 990 rpm, temperaturi 50 °C in 2 mL desorpcijskega topila. Za dve ponovitvi smo kot desorpcijsko topilo uporabili 100-odstotni ACN, za dve pa ACN:MeOH (50/50, v/v).
- Preostale 4 ponovitve smo uporabili za desorpcijo s pomočjo ultrazvoka. Twister® mešalne paličice smo vstavili v steklene inserte, dodali 250 μ L desorpcijskega topila (za dve paraleli 100 % ACN in za dve ACN:MeOH (50/50, v/v)) in jih dali v UZ-kadičko za 15 min pri temperaturi 50 °C.

➤ Ultrazvok kot dodatek tekočinski desorpciji:

- Po končani ekstrakciji osmih vzorcev smo štiri ponovitve uporabili za razvito tekočinsko desorpcijo z mešanjem na magnetnem mešalu 15 min pri hitrosti vrtenja 990 rpm, temperaturi 50 °C in 2 mL desorpcijskega topila ACN:MeOH (50/50, v/v).
- preostale 4 ponovitve smo uporabili za razvito tekočinsko desorpcijo v 2 mL ACN:MeOH (50/50, v/v), pri temperaturi 50°C in hitrosti vrtenja 990 rpm. Twister® mešalne paličice smo dodatno izpostavili še 15 min ultrazvoka (ne da bi zamenjali topilo) pri sobni temperaturi.

Vseh 16 ponovitev smo na koncu vzorčili v vialo in jih analizirali z metodo LC-MS/MS.

3.2.1.16 VPLIV ŠTEVILA ANALITOV NA KONČNI IZKORISTEK METODE

Po končani optimizaciji predpriprave vzorca smo preverili še vpliv prisotnosti števila analitov na izkoristek ekstrakcije. Vzoredno smo poskus izvedli s standardno vzorčno raztopino z vsemi 40 spojinami (koncentracija 10 µg/L) in tremi vzorčnimi raztopinami s po petimi spojinami – glejte Tabelo 3 (koncentracija 10 µg/L). Te tri raztopine smo pripravili na enak način kot vzorčno raztopino z vsemi analiti. Iz osnovnih raztopin posameznih spojin s koncentracijo 1 mg/mL v MeOH smo pripravili osnovne raztopine petih analitov s koncentracijo 1 mg/L v MeOH. Z redčenjem v vodi MilliQ smo pripravili delovne raztopine s koncentracijo 100 µg/L. Vzorčne raztopine, iz katerih smo ekstrahirali analite, so bile sestavljene iz 2 mL delovne raztopine in 18 mL 50 mM pufru s pH 9. Ekstrakcija je potekala 1 uro pri temperaturi 50 °C in hitrosti vrtenja 990 rpm, desorpcija pa 15 min pri temperaturi 50 °C in hitrosti vrtenja 990 rpm. Za analizo smo vzorčili 1 mL desorpcijskega topila po končani fazi desorpcije.

Tabela 3: Prikaz sestave vzorčnih raztopin za preverjanje vpliva števila analitov na izkoristek ekstrakcijske metode

raztopina I	raztopina II	raztopina III
diazepam	desipramin	amitriptilin
escitalopram	donepezil	klomipramin
haloperidol	fluoksetin	loratadin
loperamid	selegilin	prometazin
venlafaksin	sertralin	verapamil

3.2.1.17 IZKORISTEK DESORPCIJE

Izkoristek metode smo uporabili za oceno izkoristka desorpcije. Izračunamo ga po Enačbi 6:

$$\text{izkoristek metode (\%)} = \frac{c(\text{desorpcija})}{10 \times c(\text{začetna})} \times 100 \quad (\text{Enačba 6})$$

$c(\text{desorpcija})$ pomeni koncentracijo analita v desorpcijskem topilu po končani desorpciji, $c(\text{začetna})$ pa je koncentracija analita v vzorčni raztopini pred začetkom ekstrakcije. Ker desorpcijo izvajamo v 2 mL topila, ekstrakcijo pa v 20 mL vzorčne raztopine, je potrebno upoštevati še faktor 10.

3.2.1.18 ANALIZA VZORCEV

Za analizo vzorcev z metodo LC-MS/MS smo vzorčili po 1 mL vzorčne raztopine oz. desorpcijskega topila. V nekaterih primerih smo odvzeli manj vzorca (npr. pri študiji kinetike ekstrakcije in desorpcije, preverjanju stabilnosti). Preveč odvzetega vzorca lahko vpliva na gradient med stacionarno fazo (polimerom) in raztopino/topilom. Manjše volumne odvzetih vzorcev smo prenesli v inserte, ki smo jih s pomočjo vzmeti namestili v steklene vialke.

3.2.2 VREDNOTENJE SBSE

3.2.2.1 IZKORISTEK METODE

Izkoristek metode smo računali s pomočjo Enačbe 6 (enačbo smo hkrati prevzeli tudi za izračun izkoristka desorpcije). Izkoristek metode predstavlja delež spojine v desorpcijskem topilu napram koncentraciji v začetni raztopini (pred začetkom postopka ekstrakcije).

3.2.2.2 LINEARNOST

Linearnost metode smo ovrednotili na osnovi raztopin analitov v koncentracijskem območju od 1,25 ng/L do 1250 ng/L. Iz osnovne raztopine vseh 40 analitov s koncentracijo 1 mg/L smo s 1000-kratnim redčenjem v MeOH (25 µL raztopine na 25 mL MeOH) pripravili raztopino s koncentracijo 1 µg/L. Dobljeno raztopino smo uporabili za pripravo prve polovice vzorčnih raztopin. Za pripravo ostalih vzorčnih raztopin smo uporabili osnovno raztopino 40 analitov s koncentracijo 50 µg/L (20-kratno redčenje). Vzorce smo pripravili v dveh ponovitvah (Tabela 4).

Tabela 4: Priprava vzorcev za vrednotenje linearnosti

koncentracija vzorčnih raztopin (ng/L)	koncentracija raztopin za pripravo vzorca ($\mu\text{g/L}$)	volumen dodane raztopine (μL)	pufer
1,25	1	25	50 mM KH_2PO_4 pH 9 do 20 mL
5,0	1	100	
25,0	1	500	
50,0	1	1000	
125	50	50	
250	50	100	
500	50	200	
1250	50	500	

Uporabili smo metodo, opisano v Poglavju 4.6. Linearnost smo ovrednotili s pomočjo determinacijskega koeficienta R^2 . Neodvisna spremenljivka x je koncentracija, odvisna spremenljivka y pa predstavlja odziv spojine.

3.2.2.3 PONOVLJIVOST METODE

Za preverjanje ponovljivosti metode smo pripravili šest ponovitev, ki so bile enake raztopini za razvoj ekstrakcijske metode (koncentracija 10 $\mu\text{g/L}$). Uporabili smo metodo, opisano v Poglavju 4.6. Ponovljivost smo opredelili z izračunom relativnega standardnega odklona (RSD) odzivov ekstrahiranih analitov (Enačba 7):

$$RSD (\%) = \frac{\text{standardni odklon}}{\text{povprečna vrednost}} \times 100 \quad (\text{Enačba 7})$$

3.2.2.4 TOČNOST METODE

Iz enačbe premice $y = kx + n$ lahko zapišemo: $x = (y-n)/k$, kjer je x koncentracija, y odziv pri tej koncentraciji, n je začetna vrednost in k naklon premice. S pomočjo izračunane koncentracije in znane koncentracije lahko z Enačbo 8 izračunamo odklon od deklarirane vrednosti, s katerim opredelimo točnost metode. Najnižjo koncentracijo, pri kateri je bila vrednost odklona manjša ali enaka 20 %, smo opredelili kot mejo določitve (LOQ, ang. *limit of quantification*).

$$\text{odklon} (\%) = \frac{\text{izračunan konc.} - \text{deklarirana konc.}}{\text{deklarirana konc.}} \times 100 \quad (\text{Enačba 8})$$

3.2.3 UPORABA METODE NA REALNEM VZORCU

Optimizirano metodo smo testirali tudi na realnem vzorcu odpadne vode, ki smo jo vzorčili na dveh mestih: pred postopkom obdelave v čistilni napravi (vtok) in po obdelavi, na iztoku iz čistilne naprave. Vzorca sta bila trenutno odvzeta v marcu 2016. Plastične vsebnike smo predhodno sprali z etanolom, destilirano vodo in tik pred odvzemom še z odpadno vodo. Vzorce smo shranili pri 4 °C in jih analizirali najpozneje v 24 urah po odvzemu. Zaradi prisotnosti nečistoč v vzorcu smo vzorec pred uporabo prefiltrirali z vakuumsko filtracijo prek celulozno-acetatnega filtra z velikostjo por 0,45 µm. pH vzorca smo uravnali na vrednost 9 s pomočjo 0,1 M NaOH z uporabo pH lističev. Pripravili smo po 50 mL vzorca za dve ponovitvi in dodali standardni dodatek (kot prikazuje Tabela 5). Od 50 mL pripravljenega vzorca smo odpipetirali za vsako od dveh ponovitev po 20 mL in dodali še 100 µL internega standarda (pripravo internega standarda opisujemo v 3.1.4.5) ter vzorce segreli na 50 °C, preostanek smo zavrgli. Dodali smo Twister® mešalne paličice in začeli z ekstrakcijo. Uporabili smo metodo, opisano v Poglavju 4.6. Za ugotavljanje koncentracij smo uporabili metodo standardnega dodatka. Pričakovane končne koncentracije obogatenih vzorcev so v Tabeli 5. Zaradi morebitnih nizkih koncentracij analitov v realnem vzorcu smo analizirali 100 µL vzorca po desorpciji, hkrati pa vzorce še dodatno 10-krat koncentrirali. 1700 µL vzorca smo s pomočjo TurboVap®-a posušili do suhega in raztopili v 170 µL desorpcijskega topila ter analizirali.

Tabela 5: Priprava vzorcev (20 mL) z dodatkom internega standarda in standardnega dodatka

vzorec	interni standard (µL)	standardni dodatek (ng/L)
1 in 2	100	0
3 in 4	100	20
5 in 6	100	50
7 in 8	100	100
9 in 10	100	200

S pomočjo Enačbe 9 smo izračunali tudi učinkovitost odstranjevanja spojin v čistilni napravi:

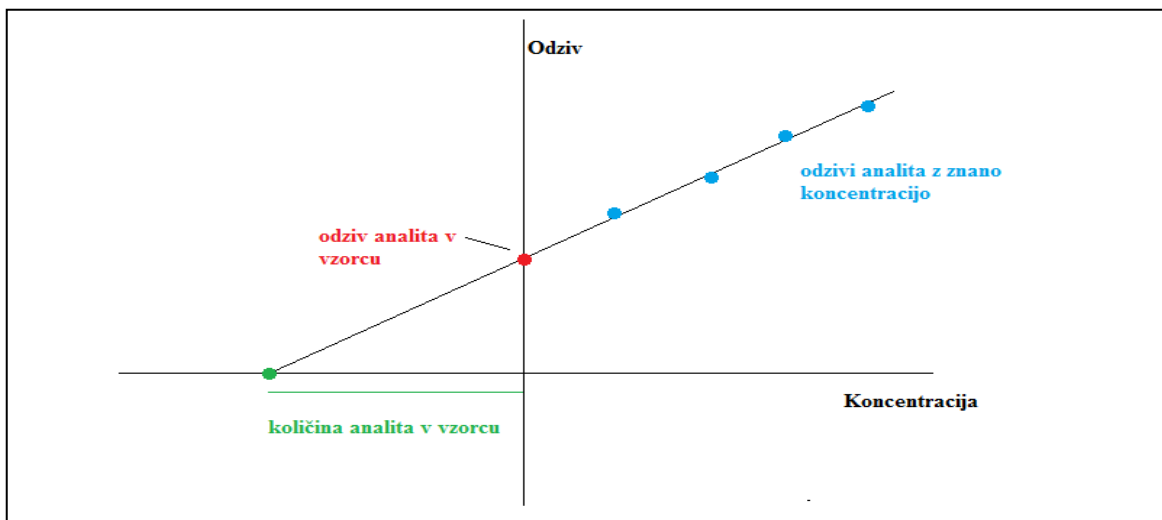
$$\text{učinkovitost odstranjevanja (\%)} = \frac{\text{začetna konc.} - \text{končna konc.}}{\text{začetna konc.}} \times 100 \quad (\text{Enačba 9})$$

3.2.3.1 METODA INTERNEGA STANDARDA

Kot interni standard smo uporabili devteriran fluoksetin-d₅. K vsem vzorcem smo ga dodali enako količino – 100 µL (priprava je opisana v Poglavju 3.1.4.5). Namen dodajanja internega standarda v vzorec je, da zmanjšamo napake, ki se pojavijo v povezavi z instrumentalno opremo (napake pri pipetiranju, različen vzorec vrtenja Twister® paličic v raztopini na magnetnem mešalu, morebitne razlike pri segrevanju na grelni plošči ...) in za zmanjšanje učinka ozadja oz. prisotnih ostalih spojin. Imeti mora podobne fizikalno-kemijske lastnosti kot preiskovane spojine, ne sme pa biti enak preiskovani spojini oz. mora le-ta biti v vzorcu prisotna v nizki koncentraciji, da interni standard ne moti analize (51). Odzive, ki smo jih dobili za posamezne analite z analizo na LC-MS/MS, smo najprej delili z odzivi, ki smo jih dobili za interni standard, in s pomočjo teh vrednosti izračunali količino desorbiranih analitov.

3.2.3.2 METODA STANDARDNEGA DODATKA

Za kvantitativno določitev prisotnih analitov v realnem vzorcu smo uporabili metodo standardnega dodatka. Pripravili smo 5 različnih vzorcev enakih volumnov v dveh ponovitvah, kot prikazuje Tabela 5.



Slika 6: Grafični prikaz metode standardnega dodatka

Vzorci so se razlikovali le v količini standardnega dodatka (dodali smo ga v vse razen v en vzorec). Z uporabo analizne metode smo izmerili odzive analita v raztopinah in jih

grafično prikazali, tako da os x predstavlja koncentracijo analita v vzorcu, os y pa odziv analita. Skozi točke smo izrisali premico in jo ekstrapolirali do osi x (kjer velja $y = 0$). Točka na osi x, ki smo jo dobili z ekstrapolacijo, predstavlja koncentracijo analita v vzorcu (52). Metoda standardnega dodatka je grafično prikazana na Sliki 6.

Enačbo premice zapišemo kot $y = kx + n$. V točki, kjer premica seka os x, je $y = 0$ in zato lahko koncentracijo v vzorcu (x) izračunamo, kot prikazuje Enačba 10.

$$x = - \frac{n \text{ (presečišče z osjo y)}}{k \text{ (naklon premice)}} \quad (\text{Enačba 10})$$

3.2.4 ANALIZA VZORCEV Z METODO LC/MS-MS

Vzorci, ki smo jih dobili s predpripravo z uporabo SBSE, smo analizirali s tekočinsko kromatografijo (1290 Infinity LC, Agilent Technologies, ZDA), sklopljeno s tandemskim masnim spektrometrom vrste trojni kvadrupol (Agilent 6460 QQQ, Agilent Technologies, ZDA). Na kolono Poroshell EC-C18 ($100 \times 3,0$ mm, $2,7 \mu\text{m}$, Agilent Technologies, ZDA) smo injicirali $1 \mu\text{L}$ vzorca. Kolona je bila termostatisirana na 50°C . Uporabili smo gradientno elucijo s topilom A (0,1-odstotna mravljična kislina v vodi) in topilom B (ACN). Uporabljeni pretoki in deleži topila A v posameznih časovnih točkah so predstavljeni v Tabeli 6.

Tabela 6: Parametri gradientne elucije

čas (min)	topilo A (%)	pretok (ml/min)
0,50	85	0,50
1,00	85	0,65
2,00	67	0,65
3,00	65	0,65
4,80	60	0,65
5,10	50	0,65
5,30	30	0,65
6,50	5	0,65
6,70	5	0,65
6,90	92	0,65
8,20	92	0,50

Čas analize posameznega vzorca je bil 8,2 min. Igla za injiciranje se je po vsakem injiciranju sprala s topilom MeOH:H₂O (80:20, v/v). Za ionski izvor smo uporabili Agilent Jet Stream ESI z naslednjimi nastavitvami: temperatura sušilnega plina 275°C , pretok

plina 5 L/min, nebulizator 45 psi (3,1 bar oz. 310 kPa), temperatura plašča 320 °C, pretok plina v plašču 11 L/min, napetost na kapilari 4000 V in napetost na šobi 1000 V.

V Tabeli 7 so za vsako spojino predstavljeni podatki o retencijskih časih, prehodih MRM, kolizijskih energijah (CE), napetostih fragmentorja (frag (V)) in polariteti (P).

Tabela 7: MRM nastavitve in retencijski časi za vse analite.

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

4 REZULTATI IN RAZPRAVA

Na področje priprave vodnih vzorcev za nadaljnje analize smo vpeljali alternativno metodo, ki temelji na sorptivnem mehanizmu z uporabo komercialno dostopnih Twister® mešalnih paličic. Metodo smo razvijali na standardnem vzorcu, ki je vseboval 40 spojin. Optimizacijo metode smo zaradi večje preglednosti predstavili na 15 reprezentativnih spojinah, ki so imele zadovoljiv izkoristek ekstrakcije. Postopek priprave vzorca je potekal v dveh fazah: v *fazi ekstrakcije*, v kateri analite iz vodnih vzorcev ekstrahiramo v stacionarno plast (polimer) mešalne paličice, in *fazi desorpcije*, v kateri analite desorbiramo v topilo in jih hkrati skoncentriramo. Parametre, ki vplivajo na obe fazi, smo sistematično proučili; najprej tiste, ki vplivajo na ekstrakcijo, in nato še tiste, ki vplivajo na desorpcijo. Analiza vzorcev je potekala s pomočjo predhodno razvite metode LC-MS/MS. Optimizirano metodo smo ovrednotili z osnovnimi validacijskimi parametri in njeno uporabnost preverili na dveh trenutno odvzetih realnih vzorcih, vtoku in iztoku iz čistilne naprave.

4.1 IZBOR ANALITOV

Za pripravo vzorca, ki smo ga uporabljali za razvoj in optimizacijo SBSE, smo najprej izbrali 40 spojin glede na pogostost pojavljanja v okolju ter njihove fizikalno-kemijske lastnosti. Nato smo jih razdelili v tri skupine, pri čemer smo upoštevali logaritemsko vrednost porazdelitvenega koeficienta ($\log P$) (Tabela 8):

- Skupina I: spojine, ki imajo vrednost $\log P$ pod 3,
- Skupina II: spojine, ki imajo vrednost $\log P$ med 3 in 5,
- Skupina III: spojine, ki imajo vrednost $\log P$ nad 5.

Polidimetilsiloksan, ki je sestavni del Twister® mešalne paličice, predstavlja stacionarno fazo, v katero se porazdelijo izbrane spojine. Glede na teoretične izkoristke ekstrakcije in naravo polidimetilsiloksana, ki je precej hidrofoben, za spojine z višjo vrednostjo $\log P$ pričakujemo višje izkoristke. Literaturni viri navajajo, da naj bi bili najbolj primerni analiti iz skupine II (24). Spojine iz tretje skupine so precej lipofilne in obstaja večja možnost njihove izgube zaradi adsorpcije na steklo, plastiko ali Twister® (25). Pri spojinah v prvi skupini lahko pričakujemo najnižje izkoristke. Teoretične vrednosti izkoristkov, izračunane s pomočjo Enačbe 3, so predstavljene v Tabeli 8, ločeno za vsako podskupino spojin.

Tabela 8: Teoretični izkoristki za ZU po skupinah.

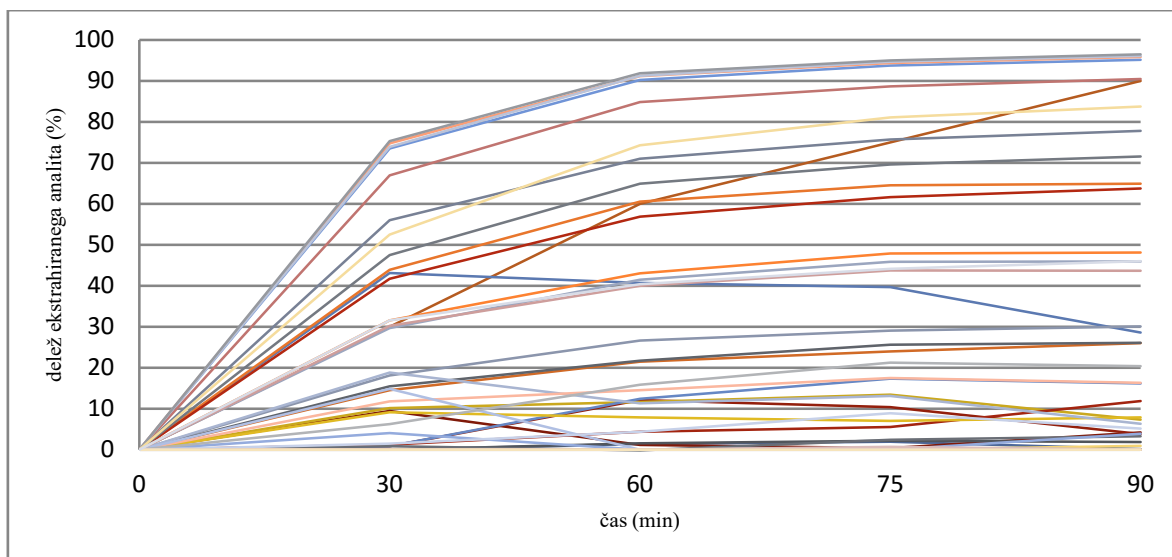
ZU (skupina I)	teoretični izkoristek (%)	ZU (skupina II)	teoretični izkoristek (%)	ZU (skupina III)	teoretični izkoristek (%)
atenolol	0,7	amitriptilin	99,4	atorvastatin	99,8
azitromicin	40,8	bezafibrat	96,1	irbesartan	99,9
bromazepam	46,4	desipramin	95,2	sertralin	99,7
feksofenadin	68,5	diazepam	75,0	verapamil	99,6
karbamazepin	59,5	diklofenak	97,8	raloksifen	99,9
metoprolol	12,6	donepezil	97,6	valsartan	99,8
oksazepam	67,5	escitalopram	93,5	/	/
okskarbazepin	14,2	fluoksetin	97,5	/	/
paracetamol	2,0	glibenklamid	93,9	/	/
propranolol	48,7	haloperidol	92,0	/	/
risperidon	51,6	imatinib	98,4	/	/
rosuvastatin	17,2	klomipramin	99,5	/	/
selegilin	63,9	klonazepam	77,9	/	/
tramadol	41,3	loperamid	99,3	/	/
trimetoprim	4,5	loratadin	98,9	/	/
venlafaksin	57,9	prometazin	98,0	/	/
/	/	triklosan	99,6	/	/
/	/	ziprasidon	93,4	/	/

4.2 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA SBSE – EKSTRAKCIJA

4.2.1 KINETIKA EKSTRAKCIJE ANALITOV

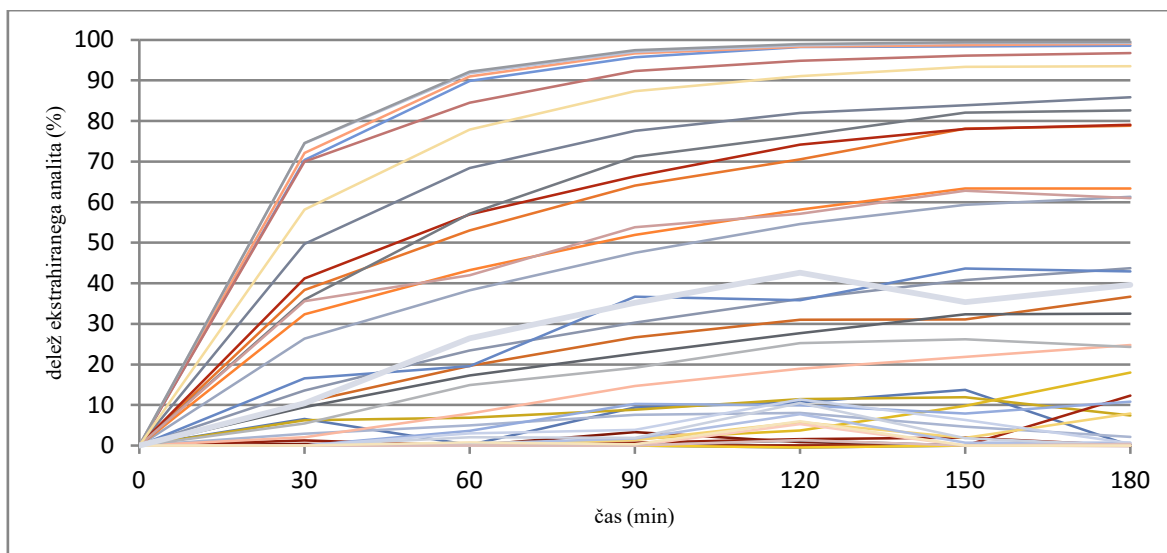
Kinetiko ekstrakcije smo proučevali dvakrat. Prvič na začetku eksperimentalnega dela, za potrebe optimizacije metode in drugič tik pred uporabo optimizirane metode na realnem vzorcu. Na Sliki 7 je prikazana prva študija kinetike ekstrakcije vseh 40 spojin pri pH 9 in temperaturi 50 °C.

Razvidno je, da delež analitov, ki prehajajo v stacionarno fazo Twister® paličice, sčasoma narašča. To smo spremljali z merjenjem odzivov analitov z vzorčenjem v vzorčni raztopini, kjer je njihova koncentracija upadala. Več kot polovica spojin sledi pričakovanemu trendu naraščanja deleža ekstrahiranih analitov, a so tudi izjeme. To so predvsem spojine prve skupine (atenolol, feksofenadin, karbamazepin, metoprolol, oksazepam, paracetamol, risperidon, rosuvastatin, trimetoprim), kar smo zaradi večje polarnosti teh spojin tudi pričakovali. Izjema so tudi nekatere spojine druge skupine (bezafibrat, diklofenak, glibenklamid imatinib, klonazepam) in tretje skupine (atorvastatin, valsartan). Pri slednjih je možen vzrok za odstopanje adsorpcija na steklo oz. plastiko ali ionizirana oblika spojih.



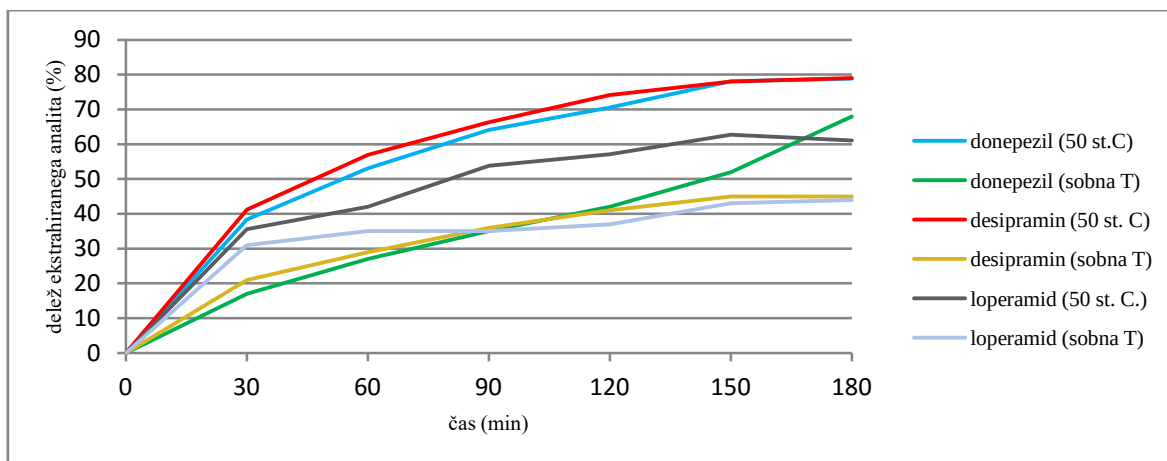
Slika 7: Kinetika ekstrakcije pri pH 9, temperaturi 50 °C in času 90 min za 40 spojin

Porazdeljevanje analitov v stacionarno polimerno fazo je ravnotežen proces in poteka, dokler se ne vzpostavi ravnotežno stanje, kar se na grafu odraža kot plato. Največji delež učinkovin se porazdeli v prvih tridesetih minutah (strm naklon). V naslednjem polurnem intervalu hitrost porazdeljevanja upade. Po šestdeseti minuti pa se približujemo stacionarnemu stanju, saj delež porazdeljenih analitov le počasi raste. Za potrebe optimizacije metode smo se odločili, da poskus prekinemo po eni uri ekstrakcije, kjer dosežemo zadovoljive rezultate in sklenemo kompromis med izkoristkom in časom ekstrakcije. Kot najprimernejše učinkovine za tovrstno metodo predpriprave vzorca so se po pričakovanjih izkazale tiste iz druge in nekatere iz tretje skupine. Spojine iz prve skupine (npr. atenolol, paracetamol, rosuvastatin, trimetoprim) so za porazdelitev v polidimetilsiloksan preveč hidrofilne in jih na ta način ne moremo izolirati. Te spojine so ostale v vzorčni raztopini, saj s časom nismo zaznali upada njihove koncentracije.



Slika 8: Kinetika ekstrakcije pri pH 9, 50 °C in podaljšanem času 180 min za 40 spojin

Slika 8 prikazuje kinetiko ekstrakcije za vseh 40 spojin, ki smo jo še enkrat proučili tik pred validacijo in uporabo na realnem vzorcu. Pogoji poskusa in sestava vzorca so v obeh primerih povsem enaki, razlika je le v podaljšanem času ekstrakcije v drugem poskusu. Z grafa na Sliki 8 je razvidno, da po eni uri ekstrakcije delež ekstrahirane učinkovine s časom lahko še nekoliko povečamo in za nekatere spojine dosežemo 100-odstotno ekstrakcijo iz vzorčne raztopine. Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili, da za uporabo metode na realnem vzorcu čas ekstrakcije iz 60 minut podaljšamo na 150 minut. S tem lahko izboljšamo izkoristek ekstrakcijske metode in posledično izboljšamo tudi zaznavnost ZU, saj so analiti v realnem vzorcu prisotni v nizkih koncentracijah. Na Sliki 8 lahko vidimo, da v zadnjem polurnem intervalu delež ekstrahirane učinkovine praktično ne narašča več in lahko predpostavimo, da se je vzpostavilo ravnotežno stanje. Pri tej študiji kinetike ekstrakcije smo primerjalno preverili še kinetiko pri sobni temperaturi. Za izbrane tri učinkovine so rezultati predstavljeni na Sliki 9.

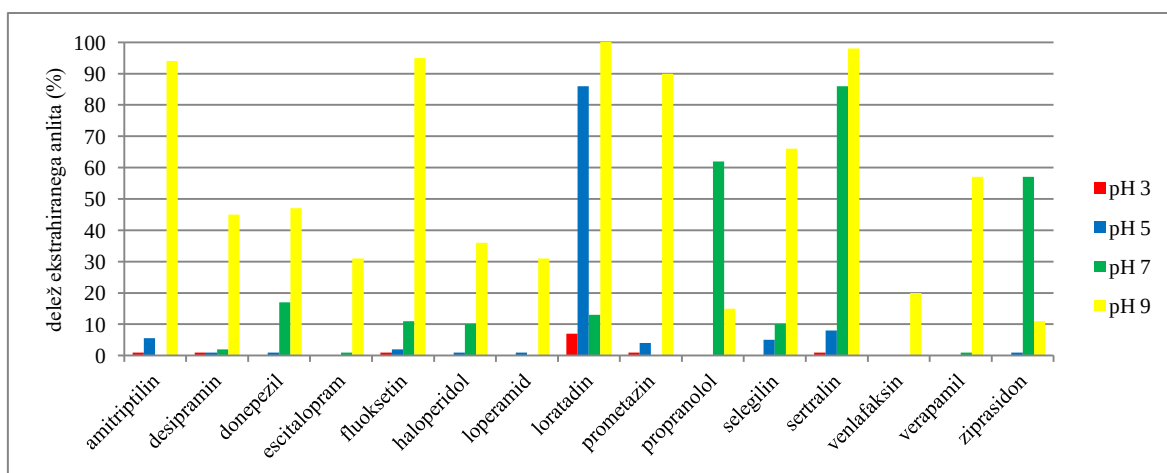


Slika 9: Primerjava kinetike ekstrakcije pri sobni temperaturi in 50 °C za izbrane spojine

Pri vseh treh izbranih učinkovinah kot tudi pri ostalih, ki na sliki niso predstavljene, lahko opazimo, da pri povišani temperaturi dosežemo boljše rezultate. Uporaba sobne temperature za ekstrakcijo tako ni smiselna. S Slike 9 je pri donepezilu razvidno tudi, da pri sobni temperaturi potrebujemo daljši čas, da dosežemo stacionarno stanje, ki se tudi po 180. minuti še vedno ni vzpostavilo.

4.2.2 VPLIV pH VREDNOSTI VZORCA NA EKSTRAKCIJO

Na spodnji Sliki 10 je prikazan izkoristek ekstrakcije za izbrane učinkovine pri štirih različnih pH vrednostih vzorčne raztopine. Izbrali smo si območje med pH 3 in 9. Kisel ali bazičen medij izven tega območja proizvajalec odsvetuje, saj lahko poškoduje stacionarno fazo (polimer) na Twister® magnetni paličici (25). V vseh štirih primerih smo kot pufrno raztopino uporabili 50mM KH_2PO_4 .



Slika 10: Delež ekstrahirane ZU (%) glede na pH vzorčne raztopine za 15 spojin

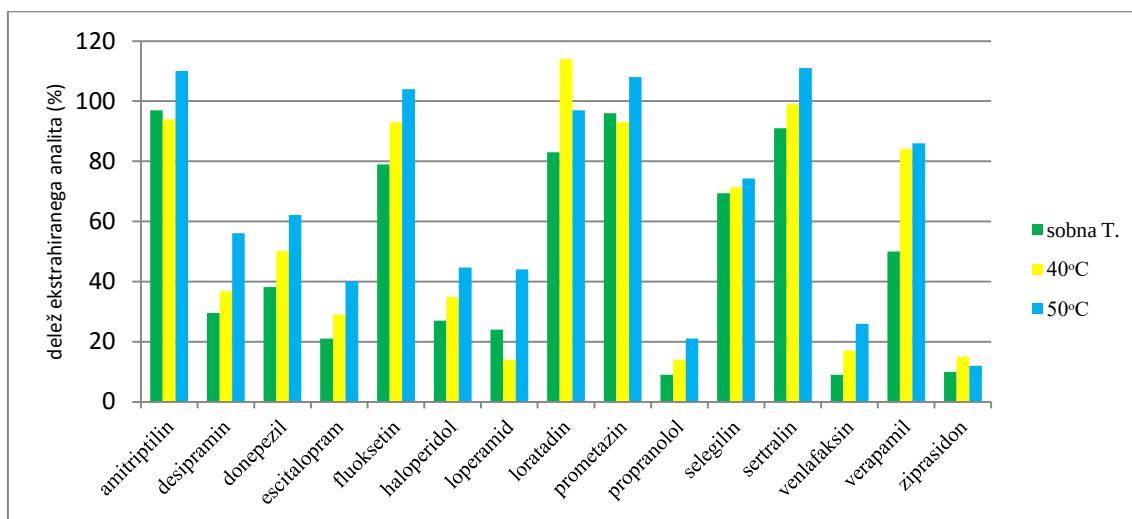
S Slike 10 je razvidno, da iz vzorčnih raztopin s pH 3 in 5 analitov v večini primerov ne ekstrahiramo. Izjema je loratadin, pri katerem smo pri pH 5 vzorčne raztopine dosegli dobre rezultate, kar je posledica nižje pKa vrednosti kot pri ostalih spojinah (Tabela 9), kar poveča delež neionizirane oblike že pri nižjem pH. Ko smo pH vzorčne raztopine uravnali na 7, se je odstotek ekstrahirane učinkovine izrazito povečal pri donepezilu, fluoksetinu, haloperidolu, selegilinu in sertralinu; pri propranololu in ziprasidonu dosežemo pri pH 7 najvišje izkoristke. Ko smo pH vzorčne raztopine uravnali na 9, smo za večino spojin dosegli najboljše rezultate. Enak trend lahko opazimo tudi pri ostalih učinkovinah iz vzorca. Omenjen vpliv pH vrednosti na izkoristek ekstrakcije je posledica dejstva, da se s približevanjem pH vrednosti k pKa vrednosti spojine povečuje delež spojine v neionizirani obliki, ki je predpogoj za uspešno ekstrakcijo spojin v stacionarno fazo. V vzorčnih raztopinah, kjer smo uporabili pufer s pH vrednostjo 3, 5 ali 7, so bile spojine v ionizirani obliki, za porazdeljevanje v polimerno fazo pa morajo biti neionizirane. Iz teh podatkov lahko ugotovimo, da so visoki odstotki ekstrahiranih učinkovin pri pH 9 in za nekatere analite že pri pH 7 posledica porazdeljevanja neionizirane oblike molekule. Izbor optimalnega pH medija za uporabo v SBSE moramo torej prilagoditi lastnostim analitov, ki jih želimo izolirati.

Tabela 9: pKa vrednosti za izbrane zdravilne učinkovine (53)

zdravilna učinkovina	pKa
amitriptilin	9,76
desipramin	10,02
donepezil	8,62
escitalopram	9,78
fluoksetin	9,80
haloperidol	8,05
loperamid	9,41
loratadin	4,33
prometazin	9,05
propranolol	9,67
selegilin	8,67
sertralin	9,85
venlafaksin	8,91
verapamil	9,68
ziprasidon	7,22

4.2.3 VPLIV TEMPERATURE NA EKSTRAKCIJO

Ekstrakcijo analitov iz vzorčne raztopine smo primerjalno preverili pri sobni in povišani temperaturi pri 40 in 50 °C. Na spodnji sliki so prikazani deleži ekstrahiranih izbranih spojin pri različnih temperaturah.



Slika 11: Vpliv temperature na izkoristek ekstrakcije iz vzorčne raztopine na izbranih 15 spojinah

Kot nam prikazuje Slika 11, temperatura pomembno vpliva na delež ekstrahiranih spojin iz vzorčne raztopine. Za večino analitov opazimo pri temperaturi 50 °C najboljši izkoristek ekstrakcije. To je najbolj razvidno pri desipraminu, donepezilu, escitalopramu, fluoksetinu, haloperidolu, loperamidu, venlafaksinu, propranololu, prometazinu. Pri amitriptilinu, selegilinu, sertralinu in verapamilu med 40 in 50 °C ni bistvene razlike. Pri loratadinu in ziprasidonu dosežemo najboljše izkoristke že pri 40 °C.

Vpliv povišane temperature na ekstrakcijo je dvoplasten. Po eni strani pri povišani temperaturi hitreje dosežemo ravnotežno stanje, kar izboljša izkoristek ekstrakcije, po drugi strani pa je pri višji temperaturi lahko topnost spojin v vodi večja, kar se odraža v zmanjšanem obsegu porazdeljevanja med fazama in negativno vpliva na izkoristek ekstrakcije (40, 42)

Ker se je izkazalo, da za večino analitov pri 50 °C dobimo najboljše rezultate, smo se odločili, da bomo ekstrakcijo izvajali pri tej temperaturi.

4.2.4 DODATEK METANOLA

Zaradi možne adsorpcije nepolarnih analitov ($\log K_{OW} > 5$) na uporabljeno steklovino lahko vzorcu za zmanjšanje tega efekta dodamo t. i. organske modifikatorje. V literaturi so

opisali dodatke MeOH ali ACN. Pri količini dodanega modifikatorja moramo biti zelo previdni, saj lahko povečajo topnost spojin v vodni fazi in tako negativno vplivajo na izkoristek ekstrakcije, ker se manjši delež molekul porazdeli v polimerno fazo (25, 40, 42). Kot je opisano v Poglavju 3.2.1.7, smo za izboljšanje izkoristka ekstrakcije v vzorčno raztopino dodali določen delež metanola. Vzorce smo pripravili, kot prikazuje Tabela 1. Vzorčna raztopina je vsebovala od 1 do 30 % metanola (v/v). 1 % MeOH je v vzorčni raztopini vedno prisoten zaradi dodane metanolne raztopine standarda v vodno raztopino. V Tabeli 10 so prikazani izkoristki ekstrakcije za 15 analitov pri različnem odstotku dodanega metanola.

Tabela 10: Izkoristek ekstrakcije pri različnem deležu (v/v) dodanega MeOH (pH 7)

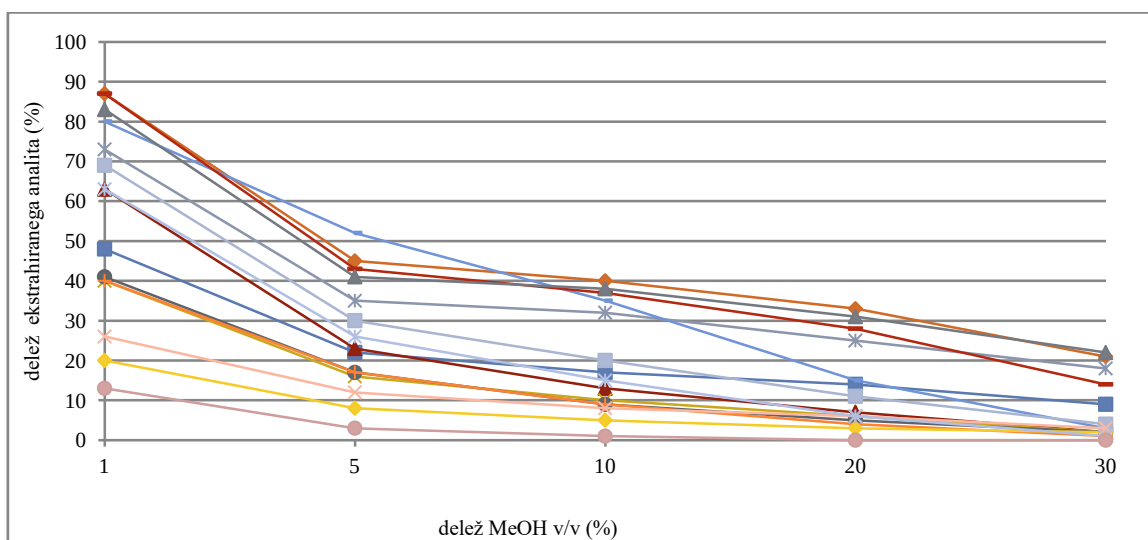
ZU	1 % MeOH	5 % MeOH	10 % MeOH	20 % MeOH	30 % MeOH
amitriptilin	50	51	33	24	16
desipramin	3	4	2	2	1
donepezil	7	6	3	2	1
escitalopram	2	2	1	1	1
fluoksetin	18	20	11	7	5
haloperidol	6	5	4	2	2
loperamid	6	6	4	2	1
loratadin	77	78	51	22	6
prometazin	44	45	29	21	13
propranolol	1	1	1	1	0
selegilin	53	45	30	18	9
sertralin	56	57	40	29	19
venlafaksin	1	1	1	1	1
verapamil	10	11	5	2	1
ziprasidon	10	6	4	2	1

Iz zgornje tabele je razvidno, da med 1 in 5 % dodanega MeOH ni opazne razlike. Pri večini spojin so izkoristki primerljivi med seboj, saj se razlikujejo zgolj za odstotek. Največjo razliko opazimo pri selegilinu in ziprasidonu, kjer je izkoristek pri 1 % MeOH boljši. Z dodatkom večjega volumna modifikatorja pa smo dosegli ravno obraten učinek od želenega. Izkoristki ekstrakcije so z nadaljnjim višanjem deleža MeOH padali, zato je dodajanje večje količine nesmiselno. Na podlagi dobljenih rezultatov smo se odločili, da pri optimizaciji metode organskega modifikatorja ne bomo dodajali v vzorec.

Tabela 11: Izkoristek ekstrakcije pri različnem deležu (v/v) dodanega MeOH (pH 9)

ZU	1 % MeOH	5 % MeOH	10 % MeOH	20 % MeOH	30 % MeOH
amitriptilin	87	45	40	33	21
desipramin	48	22	17	14	9
donepezil	63	23	13	7	2
escitalopram	40	16	10	6	2
fluoksetin	73	35	32	25	18
haloperidol	41	17	9	5	2
loperamid	40	17	9	4	1
loratadin	80	52	35	15	3
prometazin	87	43	37	28	14
propranolol	20	8	5	3	2
selegilin	69	30	20	11	4
sertralin	83	41	38	31	22
venlafaksin	26	12	8	6	3
verapamil	63	26	15	6	1
ziprasidon	13	3	1	0	0

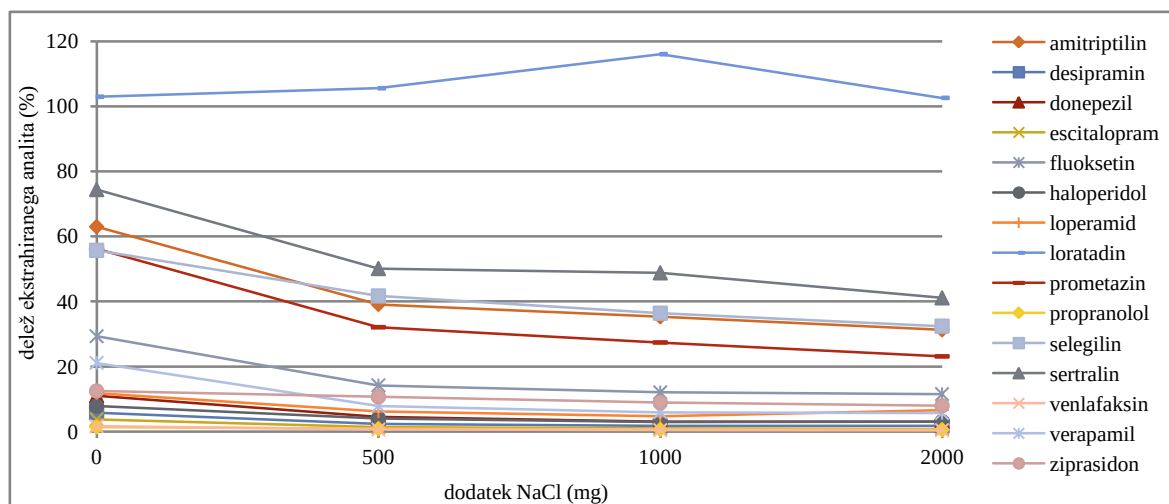
Pred uporabo optimizirane metode na realnem vzorcu smo poskus ponovili. Namesto pufru s pH 7 smo uporabili pufer s pH 9, vsi ostali parametri poskusa so bili enaki. Rezultati, ki smo jih dobili, so predstavljeni v Tabeli 11. Kot je bilo že pokazano, smo z višjo pH vrednostjo izboljšali izkoristek ekstrakcije, hkrati pa dodatno potrdili enak trend nižanja izkoristka z dodajanjem organskega modifikatorja. Vendar je v tem primeru opazno večja razlika že med 1 % in 5 % dodanega MeOH. Za zgornjih 15 spojin (Tabela 11) so rezultati dodatno grafično predstavljeni na Sliki 12, kjer je jasno razviden trend padanja izkoristkov ekstrakcije z večanjem deleža MeOH. MeOH zato nismo dodali niti pri uporabi metode na realnem vzorcu.



Slika 12: Izkoristek ekstrakcije glede na delež MeOH v vzorčni raztopini za izbranih 15 spojin

4.2.5 DODATEK INERTNE SOLI

V literaturnih podatkih pogosto naletimo na dodajanje inertne soli, ponavadi je to NaCl, v vzorčno raztopino z namenom vpliva na ionsko moč. Vzorčnim raztopinam smo dodali različno količino soli, tako kot je prikazano v Tabeli 2 (Poglavje 3.2.1.8). Rezultati, ki smo jih dobili, so predstavljeni na Sliki 13.



Slika 13: Vpliv dodatka NaCl na izkoristek ekstrakcije za izbranih 15 analitov

V splošnem velja, da za bolj hidroforne analite z $\log K_{O/W} > 3,5$ dodatek soli ne izboljša izkoristka ekstrakcije, ampak ga lahko celo zmanjša. Nasprotno pa velja za bolj hidrofilne analite, pri katerih se izkoristek ekstrakcije lahko izboljša. Obstaja nekaj hipotez, ki skušajo utemeljiti nižji izkoristek pri hidrofornih analitih, ko vzorcu dodamo sol: a) Dodana sol povzroči nastanek »efekta olja«, nepolarne spojine se pomaknejo na površino vodnega vzorca in tako niso več v stiku s stacionarno polimerno fazo. b) Povečana viskoznost vzorčne raztopine lahko upočasni kinetiko ekstrakcije spojin. c) Ioni soli lahko zasedejo površino polimera, kar zmanjša površino, ki je na voljo analitom. d) Med ioni soli in analiti se lahko vzpostavljajo interakcije, kar zmanjša gibljivost spojin. Polarnim analitom naj bi dodatek soli zmanjšal topnost v vodi in tako povečal izkoristek ekstrakcije. Zaradi nasprotnih učinkov, ki jih ima dodatek soli na spojine, ki jih želimo ekstrahirati, moramo biti pri izbiri dodane količine NaCl zelo previdni (42).

Za spojine iz skupine I izkoristkov nismo uspeli izboljšati. Nobene učinkovine razen diazepama, pri katerem lahko opazimo povečanje izkoristka za nekaj odstotkov, nismo niti ekstrahirali iz vzorčne raztopine. Za spojine, ki smo jih pri izbranih pogojih ekstrakcije

uspeli ekstrahirati (Slika 13), opazimo, da z dodajanjem soli v vzorčno raztopino izkoristka ne uspemo izboljšati. Večji kot je dodatek soli, slabši je izkoristek. Odstopanje lahko opazimo le pri loratadinu, kjer se izkoristek ne poslabša oz. se celo rahlo izboljša.

Iz dobljenih rezultatov lahko ugotovimo, da dodajanje soli v vzorec ni potrebno, saj se za analite iz skupine I izkoristek ni izboljšal, hkrati pa se je za preostale analite po pričakovanjih zmanjšal.

4.3 RAZVOJ IN OPTIMIZACIJA SBSE – DESORPCIJA

4.3.1 VPLIV DESORPCIJSKEGA TOPILA

Za preverjanje vpliva izbire topila na izkoristek desorpcije smo si pripravili 4 različna topila. V Tabeli 12 so predstavljeni izkoristki desorpcije za 15 analitov za vsako topilo. Postopka ekstrakcije in desorpcije sta bila enaka za vse ponovitve, različno je bilo le desorpcijsko topilo.

Tabela 12: Izkoristki desorpcije (%) pri uporabi različnih topil

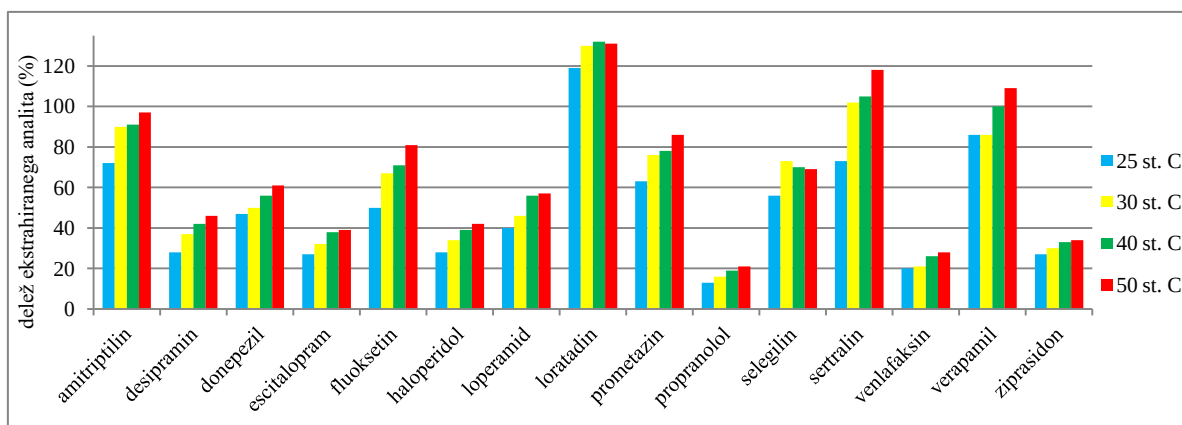
ZU	100 % ACN	ACN:MeOH 50/50	2 % HCOOH*	2,5 mM NH ₄ HCOO*
amitriptilin	73	89	85	82
desipramin	36	41	53	31
donepezil	63	64	57	50
escitalopram	34	34	35	25
fluoksetin	58	68	81	56
haloperidol	38	38	39	28
loperamid	40	33	35	23
loratadin	81	80	80	71
prometazin	75	72	82	79
propranolol	15	18	20	13
selegilin	68	70	67	58
sertralin	78	85	85	68
venlafaksin	22	23	21	15
verapamil	66	63	61	51
ziprasidon	13	12	12	10

*v ACN:MeOH (50/50, v/v)

Iz rezultatov lahko ugotovimo, da izbira desorpcijskega topila nima bistvenega vpliva na končni izkoristek. V večini primerov se ACN, ACN:MeOH (50/50, v/v) in 2-odstotna mravljična kislina v tem topilu izkažejo kot najboljša topila, doseženi izkoristki so primerljivi med seboj. Z uporabo 2,5 mM amonijevega formiata v ACN:MeOH (50/50, v/v) večinoma dosežemo najslabše izkoristke. Odločili smo se, da bomo pri nadaljnjih poskusih uporabljali topilo ACN:MeOH (50/50, v/v).

4.3.2 VPLIV TEMPERATURE NA DESORPCIJO

Z izbranim desorpcijskim topilom smo preverili še vpliv temperature na uspešnost desorpcije. Izbrali smo sobno temperaturo (25 °C), 30 °C, 40 °C in 50 °C, ki je enaka najvišji uporabljeni temperaturi med razvojem in optimizacijo ekstrakcije. Rezultati za 15 izbranih analitov so predstavljeni na Sliki 14.

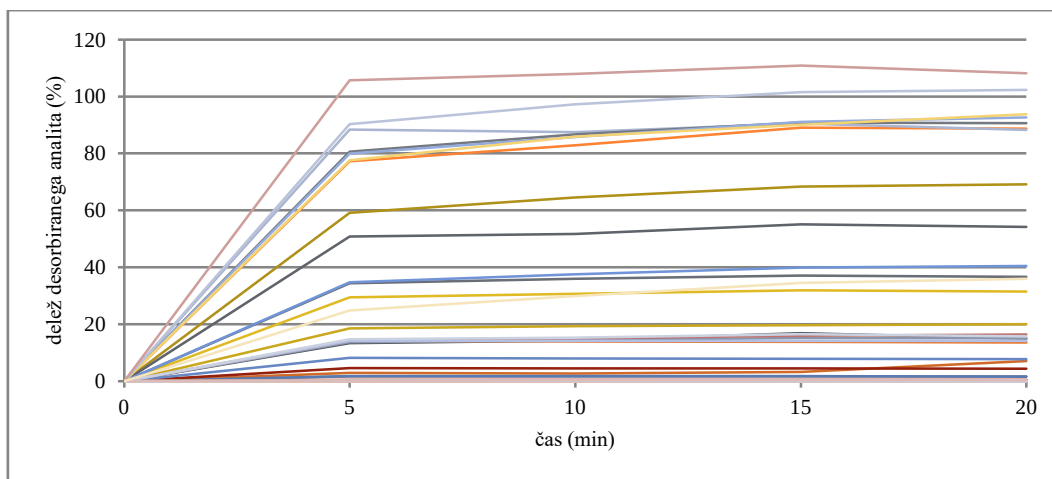


Slika 14: Izkoristek desorpcije pri sobni in povišani temperaturi za izbranih 15 analitov

Kot je razvidno iz zgornjih rezultatov, najboljše izkoristke desorpcije dosežemo pri uporabi povišane temperature. Praviloma se izkoristek povečuje s povišanjem temperature desorpcije. Izjemi sta loratadin, kjer malenkost višji izkoristek dosežemo pri 40 °C, in selegilin, pri katerem se kot najprimernejša temperatura izkaže 30 °C. Na podlagi eksperimentalnih rezultatov smo kot optimalno temperaturo desorpcije izbrali 50 °C.

4.3.3 KINETIKA DESORPCIJE

Poleg kinetike ekstrakcije smo preverili tudi kinetiko desorpcije. Čas desorpcije smo spremljali 20 min. Z vzorčenjem topila vsakih 5 min smo preverjali odstotek desorbiranih analitov. Rezultati za vse spojine so prikazani na Sliki 15.

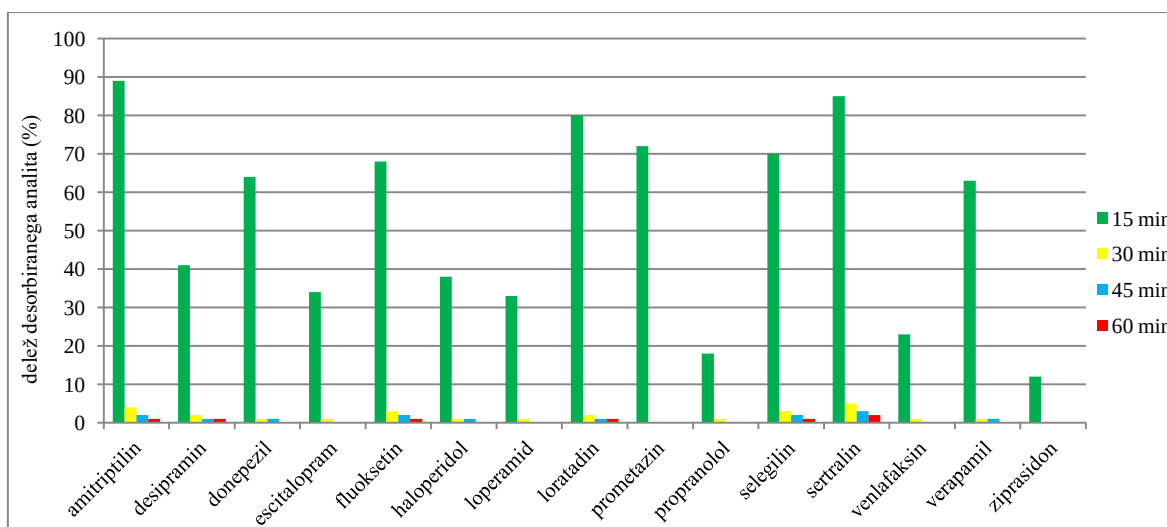


Slika 15: Kinetika desorpcije pri 50 °C v ACN:MeOH 50/50 (v/v) za 40 spojin

Večina predhodno ekstrahiranih spojin na Twister® paličico se desorbira že v prvih petih minutah (strm naklon krivulje na grafu). V nadaljnjih desetih minutah se delež ekstrahiranih analitov le rahlo povečuje. Po 15 min desorpcije pa se ta delež praktično ne spreminja več. Ugotovimo lahko, da je ključnih prvih 5 min desorpcije, v nadaljevanju pa se odstotek desorbirane učinkovine ne poveča več bistveno; pri nekaterih spojinah ostaja konstanten, pri nekaterih pa se le rahlo povečuje. Na podlagi teh ugotovitev smo se odločili, da bomo desorpcijo izvajali 15 min.

4.3.4 ŠTIRIKRATNA ZAPOREDNA DESORPCIJA

Izkoristek desorpcije smo skušali povečati z izvedbo štirih zaporednih desorpcijskih ciklov, pri čemer smo za vsak korak uporabili sveže topilo. Rezultati so prikazani na Sliki 16.

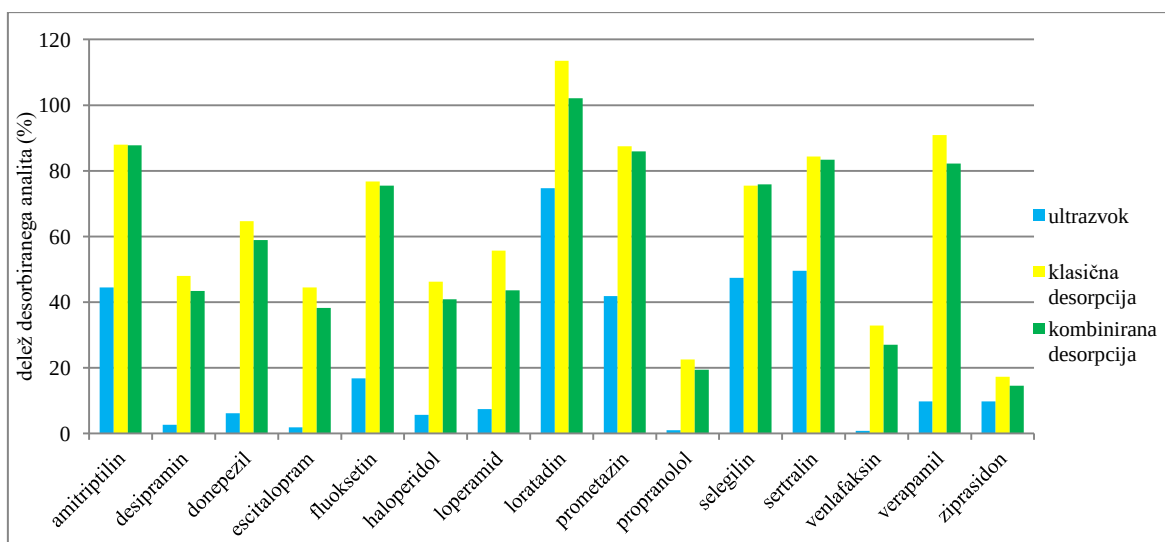


Slika 16: Štirikratna desorpcija v ACN:MeOH 50/50 (v/v), vsakič po 15 min pri 50 °C, za izbranih 15 spojin

Rezultati štirikratne desorpcije za izbranih petnajst učinkovin kažejo, da se analit desorbira skoraj v celoti v prvih 15 min, v drugem, tretjem in četrtem koraku pa je ta delež zanemarljivo majhen oz. ničen. Za vsak korak posebej smo uporabili sveže topilo, da bi se koncentracijski gradient med polimerno fazo in topilom na novo vzpostavil in omogočil boljši prehod spojin v topilo. Še enkrat smo potrdili, da je za desorpcijo ključnih prvih 15 minut. Vsi nadaljnji trije koraki, ki smo jih izvedli, niso smiselni, saj izkoristka metode ne izboljšajo bistveno, hkrati pa podaljšujejo čas eksperimenta.

4.3.5 VPLIV ULTRAZVOKA NA IZKORISTEK DESORPCIJE

V literaturi (24, 26, 54) se poleg termalne desorpcije, ki smo ji želeli poiskati alternativno metodo, in klasične tekočinske desorpcije z vrtenjem Twister® paličice na magnetni plošči omenja tudi možnost uporabe ultrazvoka kot načina desorpcije. Med optimizacijo desorpcije smo preverili, kako ultrazvok vpliva na izkoristek metode. Primerjalno smo izvedli tri načine desorpcije: 1.) desorpcija z uporabo ultrazvoka pri povišani temperaturi (50 °C), 2.) desorpcija z vrtenjem Twister® paličice v topilu na magnetni plošči s segrevanjem (50 °C), 3.) kombinirana desorpcija: klasični desorpciji z vrtenjem v topilu pri povišani temperaturi (50 °C), sledi še korak z uporabo ultrazvoka pri sobni temperaturi. Rezultati so primerjalno predstavljeni na Sliki 17.

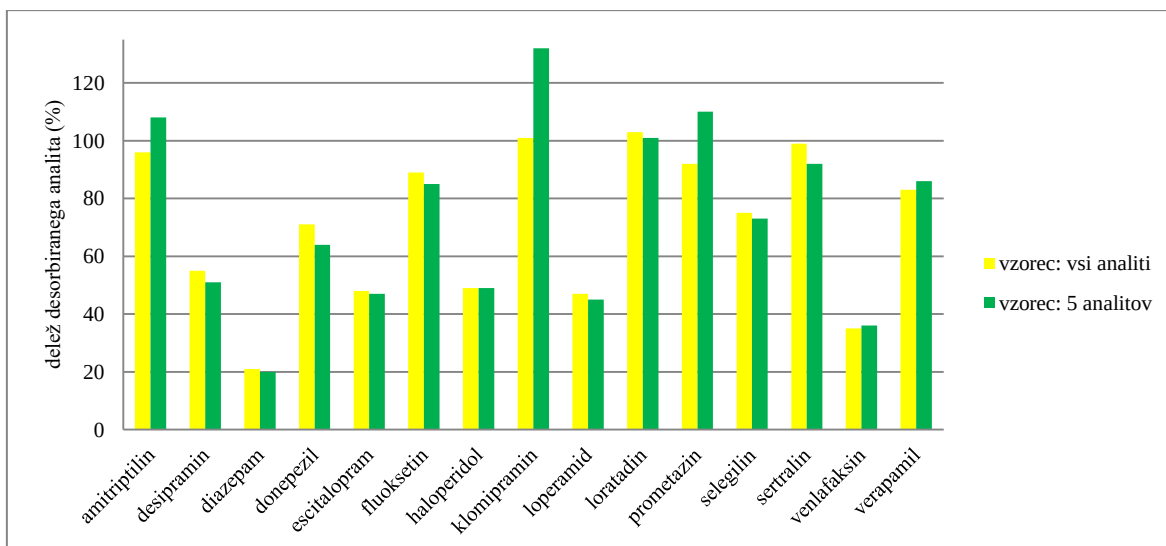


Slika 17: Primerjava treh načinov desorpcije (desorpcija z ultrazvokom, klasična desorpcija in kombinirana desorpcija) za izbranih 15 spojin

Na zgornjem grafu so za izbranih 15 učinkovin predstavljeni deleži desorbiranih analitov, ki jih dosežemo z uporabo treh načinov izvedbe desorpcije. Za vse analite brez izjeme lahko potrdimo, da z desorpcijo z uporabo ultrazvoka dosežemo najslabše izkoristke. Samostojna uporaba tovrstnega načina desorpcije je najmanj učinkovita. Pri ostalih dveh metodah pa so doseženi izkoristki primerljivi ali celo nekoliko nižji pri uporabi kombiniranega pristopa. Sklepamo lahko, da se pri kombinirani desorpciji ves oz. večina analita desorbira v prvih 15 minutah z uporabo klasične desorpcije z vrtenjem Twister® paličic v topilu (zaradi enakih oz. primerljivih izkoristkov s klasičnim načinom). Dodaten korak z uporabo ultrazvoka nič ne doprinese h končnemu rezultatu, zato tudi kombiniranje obeh načinov desorpcije ni smiselno. Od vseh možnosti, ki smo jih proučili, se je kot optimalen postopek izkazal klasičen postopek z vrtenjem Twister® paličic v topilu na magnetni plošči.

4.4 VPLIV ŠTEVILA ANALITOV NA IZKORISTEK

Po končani optimizaciji smo preverili, ali lahko spojine v vzorčni raztopini medsebojno vplivajo na izkoristek ostalih prisotnih spojin. Izbrali smo si 15 od skupno 40 analitov, ki smo jih proučevali, in pripravili tri vzorčne raztopine s po petimi učinkovinami. Istočasno smo izvedli še poskus z vzorčno raztopino vseh 40 spojin. Izračunali smo izkoristke metode za vzorec z vsemi spojinami in za vzorce, ki so vsebovali po 5 analitov, ter jih primerjali za posamezne spojine med seboj (Slika 18). Ugotovili smo, da se izkoristki za posamezen obravnavani analit v vzorcu vseh spojin in v vzorcu s petimi spojinami med seboj bistveno ne razlikujejo. Nekoliko večjo razliko opazimo le pri klomipraminu, kjer pri vzorcu s 5 analiti dosežemo izjemno visok izkoristek (lahko posledica zastajanja analita na Twister® mešalni paličici). Iz tega lahko sklepamo, da prisotnost analitov v vzorcu ne vpliva na ekstrakcijo in desorpcijo drugih spojin v vzorcu. Potrdimo lahko tudi tezo, da spojine ne tekmujejo med seboj za mesto v stacionarni fazi, saj prisotnost večjega števila analitov v vzorcu ni imela negativnega vpliva na končen izkoristek ekstrakcijske metode. Rezultati za vseh 15 spojin, razdeljenih na 3 skupine po 5, ter vzorec z vsemi analiti so primerjalno predstavljeni na Sliki 18.



Slika 18: Vpliv števila analitov v vzorčni raztopini na končni izkoristek metode za 15 testiranih analitov

4.5 STABILNOST ANALITOV PRI POVIŠANI TEMPERATURI

Ugotovili smo, da ekstrakcija in desorpcija omogočata doseganje boljših izkoristkov pri povišani temperaturi. Povišana temperatura lahko povzroči razpad spojin, zato smo preverili stabilnost analitov pri 50 °C v raztopini s pH 9, kar sta osnovna pogoja razvite metode. Stabilnost učinkovin smo spremljali v časovnem intervalu 90 min. V Tabeli 13 so predstavljeni rezultati stabilnostnega poskusa (delež razpadle spojine znotraj 90 min) za vseh 40 analitov v vzorčni raztopini. Delež razpadle spojine smo izračunali s pomočjo Enačbe 4.

Tabela 13: Prikaz stabilnostnih podatkov za 40 analitov pri 50 °C in pH 9

% razpada	15 min	30 min	60 min	90 min
amitriptilin	0	5	6	7
atenolol	0	0	0	0
atorvastatin	0	2	3	5
azitromicin	0	8	9	13
bezafibrat	4	0	1	0
bromazepam	0	0	1	0
desipramin	0	0	2	4
diazepam	5	1	4	2
diklofenak	0	0	0	3
donepezil	0	4	10	3
escitalopram	0	1	4	2
feksofenadin	0	3	3	3
fluoksetin	0	4	8	14
glibenklamid	4	5	2	0

haloperidol	0	2	2	3
imatinib	1	3	1	3
irbesartan	0	4	7	10
karbamazepin	0	0	0	0
klomipramin	0	8	8	13
klonazepam	0	2	0	2
loperamid	0	8	8	16
loratadin	0	7	1	9
metoprolol	1	1	1	0
oksazepam	1	1	3	4
okskarbazepin	0	0	0	4
paracetamol	5	4	1	1
prometazin	0	7	11	16
propranolol	0	0	0	0
raloksifen	0	7	14	25
risperidon	0	3	1	1
rosuvastatin	0	0	0	0
selegilin	0	2	7	6
sertralin	3	8	9	14
tramadol	0	0	0	0
triklosan	0	0	0	2
trimetoprim	0	0	0	0
valsartan	0	0	0	0
venlafaksin	0	0	0	0
verapamil	0	4	5	11
ziprasidon	5	11	16	22

Iz rezultatov, podanih v Tabeli 13, lahko sklepamo, da večina molekul ni občutljivih na pogoje, ki so se med optimizacijo metode izkazali kot najprimernejši. Pri večini spojin je bilo po 90 minutah segrevanja še vsaj 90 % začetne koncentracije analita. Večji razpad opazimo pri devetih spojinah: azitromicin, fluoksetin, ziprasidon, loperamid, prometazin, klomipramin, sertralin, verapamil in raloksifen. Obstočnost analitov v teh primerih negativno vpliva na izkoristek ekstrakcije.

4.6 IZBRANI OPTIMALNI POGOJI

Med optimizacijo metode smo preverili različne parametre, ki lahko vplivajo na uspešnost procesa ekstrakcije ali desorpcije analitov pri uporabi SBSE, ter določili naslednje pogoje:

- Za prvo fazo ekstrakcije analitov iz vzorčne raztopine smo izbrali pH 9 vzorčne raztopine in segrevanje na 50 °C. Z dodatno študijo kinetike prehajanja analitov v stacionarno fazo (ekstrakcija) smo pokazali, da je 150 min primeren čas ekstrakcije glede razmerja porabljenega časa in izkoristka ekstrakcije. Volumen vzorca je bil 20 mL in hitrost vrtenja 990 rpm. Dodatek organskega modifikatorja (MeOH) ali

inertne soli (NaCl) ni imel pozitivnega vpliva na izkoristek ekstrakcije, zato smo ta korak opustili.

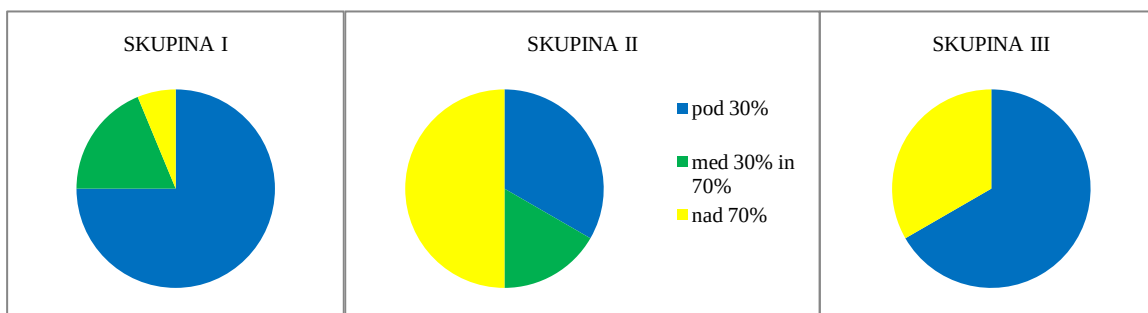
- Kot optimalne pogoje za fazo desorpcije smo določili čas 15 min in temperaturo 50 °C. Izmed testiranih desorpcijskih topil smo izbrali ACN:MeOH (50/50, v/v). Volumen topila je bil 2 mL in hitrost vrtenja 990 rpm. Najboljše rezultate smo dosegli z uporabo desorpcije samo z vrtenjem v topilu, enkratno desorpcijo in brez uporabe ultrazvoka.

4.7 VREDNOTENJE SBSE

4.7.1 IZKORISTEK

Izkoristek metode smo izračunali s pomočjo Enačbe 6, iz katere izhaja, da je izkoristek delež spojine, ki smo jo uspeli ekstrahirati in nato desorbirati ter je podan glede na koncentracijo analita v začetni raztopini. Spojin, ki imajo izkoristek 0 %, torej nismo uspeli ekstrahirati iz vzorčne raztopine in posledično tudi ne validirati. Glede na izkoristek so za to metodo neprimerne naslednje spojine: skupina I – atenolol, feksofenadin, oksazepam, okskarbazepin, paracetamol, rosuvastatin, trimetoprim, skupina II – bezafibrat, diklofenak, glibenklamid, skupina III – atorvastatin, irbesartan, valsartan. Uspešnost ekstrakcije teh spojin bi lahko izboljšali z uporabo drugih stacionarnih faz, žal pa niso komercialno dostopne. Možnosti za izboljšanje izkoristkov, ki so omenjene v literaturi, so npr. derivatizacija spojin in priprava alternativnih stacionarnih faz, lahko tudi specifičnih za posamezen analit oz. skupino spojin (25, 56). Rezultati validacije so za vse spojine predstavljeni v Tabeli 14.

Izkoristke smo za vse tri skupine spojin (razdelitev glede na logP, glej Poglavje 4.1) razdelili na tri območja: pod 30 %, med 30 in 70 % ter nad 70 % in jih grafično prikazali. Delež spojin v posameznem območju je prikazan na Sliki 19, s katere je jasno razvidno, da je delež spojin z najvišjim izkoristkom, nad 70 %, po pričakovanjih najvišji v skupini II, sledi skupina III, v skupini I pa je takih spojin najmanj. Delež spojin z izkoristkom pod 30 % je najvišji v skupini I, sledi skupina III in nato še skupina II. Delež spojin z izkoristkom med 30 in 70 % je podoben pri skupinah I in II, medtem ko v skupini III ni nobenega analita, ki bi ga lahko uvrstili v to območje.



Slika 19: Delež spojin glede na izkoristek, predstavljeno po posameznih skupinah spojin

S pomočjo Enačbe 3 smo izračunali teoretične izkoristke za posamezne analite (Tabela 8). Enačba 3 za izračun upošteva zgolj vrednost porazdelitvenega koeficienta in t. i. faznega razmerja (razmerja med volumnom vzorca in stacionarne faze). Tekom eksperimentalnega dela smo ugotovili, da na izkoristek vplivajo tudi pogoji samega eksperimenta (temperatura, čas, pH), ki pa v enačbi niso zajeti. Prav to je razlog, da prihaja do razhajanj med dejanskimi in teoretičnimi vrednostmi izkoristkov. Teoretični izkoristki so najmanjši za prvo skupino analitov ($\log P$ pod 3), kar smo tudi potrdili tekom naših poskusov. Za večino spojin druge ($\log P$ med 3 in 5) ter tretje skupine ($\log P$ nad 5) so teoretični izkoristki zelo visoki. To smo potrdili tudi pri našem eksperimentalnem delu, a so vseeno odstopanja, saj zlasti pri spojinah tretje skupine lahko pride do vezave učinkovin na steklo, plastiko ali ujetja v Twister® in posledično do izgube analita. S pomočjo Enačbe 3 lahko podamo približno oceno izkoristka, ne moremo pa natančno predvideti, kakšen bo rezultat eksperimentalnega dela.

4.7.2 LINEARNOST

Linearnost metode je njena sposobnost, da v določenem koncentracijskem območju daje odzive, ki so premosorazmerni s koncentracijo preiskovanega analita v vzorcu (55). Linearnost metode SBSE smo preverili v osmih koncentracijskih točkah, v območju od 1,25 ng/L do 1250 ng/L. Uporabili smo metodo internega standarda, da bi čim bolj zmanjšali vpliv zunanjih dejavnikov na razlike med ponovitvami. Rezultati so predstavljeni v skupni Tabeli 14. Za spojine, pri katerih ugotovimo, da je $R^2 \geq 0,99$ v obravnavanem območju, je metoda linearna. To so: karbamazepin, metoprolol, propranolol, risperidon, selegilin, tramadol in venlafaksin (iz skupine I), amitriptilin, desipramin, diazepam, donepezil, escitalopram, fluoksetin, haloperidol, klomipramin,

klonazepam, loperamid, loratadin, prometazin, triklosan in ziprasidon (skupina II) ter sertralin, verapamil in raloksifen (skupina III). Analiti, za katere je izračunana vrednost determinacijskega koeficienta manjša od 0,99, za SBSE niso primerni (bromazepam, imatinib, azitromcin), saj zanje ne velja linearen odnos med odzivom in koncentracijo v vzorcu. Možna razloga za nelinearen odnos so nizki izkoristki pri nekaterih spojinah in možna nestabilnost spojin pri uporabljenih pogojih (stabilnostni podatki, Tabela 13). Za vse primerne analite je območje linearnosti podano v Tabeli 14.

4.7.3 PONOVLJIVOST METODE

Ponovljivost metode smo ovrednotili na šestih ponovitvah z RSD-vrednostmi, ki smo jih dobili s pomočjo Enačbe 6. Kot največjo še sprejemljivo vrednost smo določili $RSD \leq 20\%$. Podatki za posamezne spojine so zbrani v skupni Tabeli 14. Za vse spojine, pri katerih smo potrdili linearnost metode v izbranem območju, lahko ugotovimo tudi ustrezno ponovljivost. Pri vseh analitih, razen raloksifenu in triklosanu, smo dobili RSD-vrednosti manjše od 6 %.

4.7.4 TOČNOST METODE

Točnost metode smo preverili v območju 1,25 ng/L do 1250 ng/L. Za vsak analit smo v vsaki od osmih koncentracijskih točk izračunali odklon od dejanske vrednosti z uporabo Enačbe 8. Najnižjo koncentracijo, kjer je bil odklon $\leq 20\%$ smo opredelili kot LOQ, ki je za večino spojin 1,25 ng/L. 5 ng/L pa za bromazepam, karbamazepin, imatinib in raloksifen.

4.7.5 IZBOR ANALITOV

V Tabeli 14 so zbrane številčne vrednosti, s katerimi lahko ovrednotimo metodo in izberemo analite, ki so primerni za SBSE. Kot neprimerne izločimo spojine, ki jih ne moremo ekstrahirati (izkoristek 0 %), ter spojine, za katere je $R^2 \leq 0,99$. Spojine, ki ustrezajo kriterijem za izkoristek, linearnost, točnost in ponovljivost, so: karbamazepin, metoprolol, propranolol, risperidon, selegilin, tramadol in venlafaksin (iz skupine I), amitriptilin, desipramin, diazepam, donepezil, escitalopram, fluoksetin, haloperidol, klomipramin, klonazepam, loperamid, loratadin, prometazin, triklosan in ziprasidon (skupina II) ter sertralin, verapamil in raloksifen (skupina III).

Tabela 14: Parametri validacije za optimizirano metodo

skupina	učinkovina	log P	območje linearnosti (ng/l)	R ²	LOQ (ng/l)	Točnost (%)	RSD (%)	izkoristek (%)
I	atenolol	0,43	/	/	/	/	/	0
I	azitromicin	2,44	1,25–500	0,9425	1,25	-18,0	20,2	24
I	bromazepam	2,54	5–1250	0,6603	5	-9,2	8,2	<5
I	feksofenadin	2,94	/	/	/	/	/	0
I	karbamazepin	2,77	5–500	0,9976	5	-2,3	2,7	<5
I	metoprolol	1,76	1,25–500	0,9914	1,25	-18,7	3,3	7
I	oksazepam	2,92	/	/	/	/	/	0
I	okskarbazepin	1,82	/	/	/	/	/	0
I	paracetamol	0,91	/	/	/	/	/	0
I	propranolol	2,58	1,25–500	0,9958	1,25	-9,6	2,1	55
I	risperidon	2,63	1,25–500	0,9981	1,25	-5,0	5,8	14
I	rosuvastatin	1,92	/	/	/	/	/	0
I	selegilin	2,85	1,25–1250	0,9996	1,25	-6,0	2,1	90
I	tramadol	2,45	1,25–500	0,9971	1,25	-8,5	4,9	49
I	trimetoprim	1,28	/	/	/	/	/	0
I	venlafaksin	2,74	1,25–500	0,9939	1,25	-0,9	3,6	60
II	amitriptilin	4,81	1,25–1250	0,9996	1,25	-1,0	3,3	113
II	bezafibrat	3,99	/	/	/	/	/	0
II	desipramin	3,90	1,25–500	0,9994	1,25	-3,7	1,5	101
II	diazepam	3,08	1,25–500	0,9990	1,25	0,0	4,3	<5
II	diklofenak	4,26	/	/	/	/	/	0
II	donepezil	4,21	1,25–1250	0,9939	1,25	-17,8	0,9	92
II	escitalopram	3,76	1,25–1250	0,9950	1,25	-6,4	1,7	81
II	fluoksetin	4,17	1,25–1250	0,9995	1,25	-7,1	1,3	122
II	glibenklamid	3,79	/	/	/	/	/	0
II	haloperidol	3,66	1,25–1250	0,9953	1,25	-6,3	2,3	83
II	imatinib	4,38	5–1250	0,9678	5	-7,0	13,2	<5
II	klomipramin	4,88	1,25–1250	0,9992	1,25	-0,3	2,9	116
II	klonazepam	3,15	5–500	0,9948	5	-4,2	2,0	<5
II	loperamid	4,77	1,25–500	0,9960	1,25	-2,8	4,3	65
II	loratadin	4,55	1,25–1250	0,9930	1,25	-6,8	3,2	100
II	prometazin	4,29	1,25–1250	0,9990	1,25	-1,5	2,4	108
II	triklosan	4,98	1,25–1250	0,9988	1,25	-18,7	11,6	45
II	ziprasidon	3,75	1,25–500	0,9967	1,25	-7,2	5,3	18
III	atorvastatin	5,39	/	/	/	/	/	0
III	irbesartan	5,50	/	/	/	/	/	0
III	sertralini	5,15	1,25–1250	0,9996	1,25	-7,4	2,4	130
III	verapamil	5,04	1,25–1250	0,9996	1,25	-1,0	1,8	81
III	raloksifen	5,69	5–1250	0,9959	5	-7,0	13,3	8
III	valsartan	5,27	/	/	/	/	/	0

4.8 APLIKACIJA METODE NA REALNI VZOREC

Po končani fazi optimizacije in vrednotenja smo metodo preverili še na dveh realnih vzorcih. Izbrali smo si vzorec iz čistilne naprave, saj je glavni namen razvoja take metode priprava vzorca za ugotavljanje prisotnosti učinkovin v odpadnih in okoljskih vodah. Preverili smo prisotnost izbranih primernih spojin v vodi pred čiščenjem v čistilni napravi in na iztoku iz nje. Rezultati, pridobljeni z uporabo razvite metode SBSE za predpripravo vzorca, so prikazani v Tabeli 15.

Tabela 15: Prikaz rezultatov uporabe metode SBSE na realnem vzorcu

analit	skupina	konc. pred ČN (ng/l)	konc. po ČN (ng/l)	učinkovitost odstranjevanja (%)
metoprolol	I	63,7	25,3	60,3
propranolol	I	124	118,9	4,1
tramadol	I	3,4	38,6	-1035,3
venlafaksin	I	69,9	2,8	96,0
amitriptilin	II	9,9	5,2	47,5
desipramin	II	1,8	ni odziva	100,0
donepezil	II	15,3	4,9	68,0
escitalopram	II	88,4	62,4	29,4
haloperidol	II	6,1	1,0 (pod LOQ)	85,0*
klomipramin	II	0,4 (pod LOQ)	ni odziva	100,0
loperamid	II	1,0 (pod LOQ)	1,0 (pod LOQ)	0*
loratadin	II	7,6	4,5	40,8
triklosan	II	188,1	108,3	42,4
sertralin	III	0,1 (pod LOQ)	0,1 (pod LOQ)	0*
verapamil	III	22,9	11,7	48,9

*ocenjena vrednost

Preverjali smo prisotnost analitov, ki so se po fizikalno-kemijskih lastnostih in dejanskih rezultatih izkazali kot primerni za SBSE. Končno število iskanih analitov je bilo 24 iz vseh treh skupin (analiti so označeni krepko v Tabeli 14). V odpadni vodi, ki priteka v čistilno napravo, smo zaznali 15 od teh 24 analitov. Štiri spojine iz skupine I, devet jih je iz skupine II in dve spojini iz skupine III. V vzorcu prečiščene in obdelane vode, odvzete na iztoku iz čistilne naprave, smo zaznali še 13 spojin, desipramina in klomipramina nismo več zaznali. Pri vseh spojinah, razen tramadolu, opazimo nižjo koncentracijo na iztoku kot vtoku v čistilno napravo. Višjo koncentracijo na iztoku lahko pripišemo kopičenju spojine v bazenu čistilne naprave in možnemu izhodu iz nje v večji koncentraciji.

V Tabeli 15 je v odstotkih informativno podana tudi učinkovitost odstranjevanja spojin, ki pa zaradi trenutnega vzorčenja lahko poda samo grobo oceno delovanja čistilne naprave. Na podlagi izračunanih podatkov bi lahko trdili, da se najslabše odstranjujejo loperamid in

sertralin (le ocena, ker so izmerjene vrednosti pod LOQ) in propranolol (4 %), najboljše pa venlafaksin (96 %), klomipramin in desipramin (oba 100 %). Za natančnejšo oceno učinkovitosti odstranjevanja učinkovin v čistilni napravi bi morali vzorčenje prilagoditi in upoštevati zadrževalni čas odpadne vode v čistilni napravi.

5 SKLEP

Zdravilne učinkovine so v okolju prisotne v nizkih koncentracijah, zato je vzorce pred analizo potrebno skoncentrirati in ponavadi tudi očistiti. V ta namen smo razvili novo metodo za predpripravo vzorcev na osnovi sorptivnega mehanizma, ki je sestavljena iz dveh stopenj. V prvi stopnji analite ekstrahiramo iz vzorca, v drugem koraku pa jih desorbiramo. Za ekstrakcijo v stacionarno polimerno fazo Twister® paličice smo izbrali postopek, kjer Twister® 150 min vrtimo v 20 mL vzorčne raztopine s pH 9, pri hitrosti 990 rpm in temperaturi 50 °C. Za desorpcijo smo izbrali enostaven postopek z vrtenjem Twister® paličic v 2 mL topila ACN:MeOH (50/50, v/v), s hitrostjo 990 rpm, pri temperaturi 50 °C, 15 min. Razvita tekočinska desorpcija je primerna alternativa termalni desorpciji, saj ne zahteva drage opreme in ne izpostavlja analitov ter polimerne stacionarne faze visokim temperaturam. Analize vzorcev smo izvedli s pomočjo metode LC/MS-MS.

Razvita optimizirana metoda se je izkazala primerna za skupno 24 analitov od 40 izbranih. Spojine, ki ustrezajo kriterijem za izkoristek, linearnost, točnost in ponovljivost, so: karbamazepin, metoprolol, propranolol, risperidon, selegilin, tramadol in venlafaksin (spojine z logP pod 3), amitriptilin, desipramin, diazepam, donepezil, escitalopram, fluoksetin, haloperidol, klomipramin, klonazepam, loperamid, loratadin, prometazin, triklosan in ziprasidon (spojine z logP med 3 in 5) ter sertralin, verapamil in raloksifen (spojine z logP nad 5). Vrednost LOQ je bila za vse spojine, razen karbamazepin, klonazepam in raloksifen (5 ng/L), enaka 1,25 ng/L. Ostalih 16 spojin ni primernih za uporabo metode SBSE. Razlog je verjetno v sami naravi spojin. Hidrofilne spojine niso primerne za ekstrakcijo v polidimetilsiloksansko stacionarno fazo, ki izkazuje hidrofbne lastnosti. Spojine, ki so preveč hidrofbne, lahko izkazujejo tendenco po adsorpciji na steklo, plastiko ali stacionarno fazo, kar se odraža v nizkih izkoristkih.

Po validaciji smo metodo preverili na dveh realnih vzorcih odpadnih voda – vtok v čištilno napravo in iztok iz nje. V prefiltriranem vzorcu vtoka v čištilno napravo smo zaznali 15 spojin v koncentracijah od nekaj ng/L do skoraj 190 ng/L, na iztoku pa 13 spojin v koncentracijah do največ 120 ng/L.

Na področje analiz vodnih vzorcev smo vpeljali novo metodo predpriprave vzorca in jo uspešno uporabili na dveh realnih vzorcih. Njena glavna pomanjkljivost je pomanjkanje več komercialno dostopnih stacionarnih faz, ki bi omogočile ekstrakcijo še večjega števila

analitov. Kot glavni prednosti metode SBSE lahko izpostavimo hitro in preprosto uporabo zaradi oblike ter priročnost za terensko vzorčenje, saj literatura navaja, da so ekstrahirani analiti stabilni vsaj en teden po ekstrakciji (45). Dodatno metoda zahteva uporabo majhnih volumnov topil in tako podpira t. i. zeleno kemijo. Z uvedbo tekočinske desorpcije smo metodo prilagodili za uporabo v laboratorijih, ki ne razpolagajo z drago opremo, namenjeno termalni desorpciji; dodatno pa je tekočinska desorpcija primernejša tudi za termolabilne analite.

6 LITERATURA

- (1) <https://www.uradni-list.si/1/content?id=72463> (dostop: 20. 4. 2016).
- (2) https://podatki.nijz.si/docs/6l_MP_RECEPTI_NIJZ.pdf (dostop: 20. 4. 2016).
- (3) http://www.nijz.si/sites/www.nijz.si/files/datoteke/poraba_ambulantno_predpisanih_zdravil_v_sloveniji_2014.pdf. (dostop: 20. 4. 2016).
- (4) L. H.M.L.M. Santos, A.N. Araujo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M.C.B.S.M. Montenegro: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials*, 2010; 175: 45–95.
- (5) T. Heberer: Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 2002; 131: 5–17.
- (6) M. Al. Aukidy, P. Verlicchi, A. Jelic, M. Petrovic, D. Barcelo: Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the PO Valley, Italy. *Science of the Total Environment*, 2012; 438: 15–25.
- (7) J. R. Vane, R. M. Botting: Mechanism of action of antiinflammatory drugs. *The American Journal of Medicine*, 1998; 104: 2S–8S
- (8) J. Zou, N. F. Neumann, J. W. Holland, M. Belosevic, C. Cunningham, C. J. Secombes, A. F. Rowley: Fish macrophages express a cyclooxygenase-2 homologue after activation. *Biochemical Journal*, 1999; 340: 153–159.
- (9) C. E. Lundholm: DDE-induced eggshell thinning in birds: effects of p,p-DDE on the calcium and prostaglandin metabolism of the eggshell gland. *Comparative Biochemistry and Physiology PART C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1997; 118: 113–128.
- (10) R. Triebskorn, H. Casper, A. Heyd, R. Rikemper, H. R. Koehler, J. Schwaiger: Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part II. Cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 2004; 68: 151–166.
- (11) A. Tauxe-Wuersch, L. F. De Alencastro, D. Grandjean, J. Tarredellas: Occurrence of several acidic drugs in sewage treatment plants in Switzerland and risk assessment. *Water Research*, 2005; 39: 1761–1772.

- (12) M. D. Hernando, E. Heath, M. Petrovic, D. Barcelo: Trace-level determination of pharmaceuticals residues by LC-MS/MS in natural and treated waters. A pilot-survey study. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006; 385: 985–991.
- (13) D. G. Haylett, M. M. Dale: *Pharmacology condensed*, 2nd Edition. Elsevier, 2009: 56, 57, 82.
- (14) R. A. Brain, D. J. Johnson, S. M. Richards, M. L. Hanson, H. Sanderson, M. W. Lam, C. Young, S. A. Mabury, P. K. Sibley, K. R. Solomon: Microcosm evaluation of the effects of an eight pharmaceutical mixture to the aquatic macrophytes *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum*. *Aquatic Toxicology*, 2004; 70: 23–40.
- (15) X. S. Miao, C. D. Metcalfe: Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 2003; 998: 133–141.
- (16) M. J. M. Bueno, A. Aguera, M. D. Hernando, M. J. Gomez, A. R. F. Alba: Evaluation of various liquid chromatography-quadrupole-linear ion trap-mass spectrometry operation modes applied to the analysis of organic pollutants in wastewaters. *Journal of Chromatography A*, 2009; 1216: 5995–6002.
- (17) C. Kyungho: Hazard assessment of commonly used agricultural antibiotics on aquatic ecosystems. *Ecotoxicology*, 2008; 17: 526–538.
- (18) A. Giwercman, L. Rylander, Y. L. Giwercman: Influence of endocrine disruptors on human male fertility. *Reproductive BioMedicine Online*, 2007; 15: 633–642.
- (19) B. Quinn, F. Gagne, C. Blaise: An investigation into the acute and chronic toxicity of eleven pharmaceuticals (and their solvents) found in wastewater effluent on the cnidarian, *Hydra attenuata*. *Science of the Total Environment*, 2008; 389: 306–314.
- (20) D. B. Huggett, B.W. Brooks, B. Peterson, C. M. Foran, D. Schlenk: Toxicity of select Beta Adrenergic Receptor-Blocking Pharmaceuticals (B-Blockers) on Aquatic organisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2002; 43: 229–235.
- (21) B. W. Brooks, C. M. Foran, S. M. Richards, J. Weston, P. K. Turner, J. K. Stanley, K. R. Solomon, M. Slattery, T. W. La Point: Aquatic ecotoxicology of fluoxetine. *Toxicology Letters*, 2002; 142: 169–183.
- (22) V. Calisto, I. E. Valdemar: Psychiatric pharmaceuticals in the environment.: *Chemosphere*, 2009; 77: 1257–1274.
- (23) C. M. Flaherty, S. I. Dodson: Effects of pharmaceuticals on *Daphnia* survival, growth and reproduction. *Chemosphere*, 2005; 61: 200–207.

- (24) M. Kawaguchi, R. Ito, K. Saito, H. Nakazawa: Novel stir bar sorptive extraction methods for environmental and biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2006; 40: 500–508.
- (25) A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L. A. Fernandez, N. Etxebarria, O. Zuloaga: Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions. *Journal of Chromatography A*, 2010; 1217: 2642–2666.
- (26) J. M. F. Nogueira: Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques. *Analytica Chimica Acta*; 757: 1–10.
- (27) F. Požgan, B. Štefane: Uvod v laboratorijsko organsko kemijo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani, 2009:79–85.
- (28) http://www.chromacademy.com/lms/sco59/Sample_Preparation_Liquid-Liquid_Extraction_Techniques.pdf. (dostop: 27. 4. 2016).
- (29) M. C. Hennion: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1999; 856: 3–54.
- (30) N. J. K. Simmpson: Solid-phase extraction principles, techniques and applications. Marcel Dekker, Inc, 2000: 2,3.
- (31) J. P. Wasyłka, N. Szczepanska, M. Guardia, J. Namiesnik: Modern trends in solid-phase extraction: new sorbent media. *Trends in Analytical Chemistry*, 2016; 77: 23–43.
- (32) [http://www.waters.com/waters/en_PL/Beginner's-Guide-to-SPE-\[Solid-Phase-Extraction\]/nav.htm?locale=en_PL&cid=134721476](http://www.waters.com/waters/en_PL/Beginner's-Guide-to-SPE-[Solid-Phase-Extraction]/nav.htm?locale=en_PL&cid=134721476) (dostop: 27. 4. 2016) .
- (33) <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf>. (dostop: 27. 4. 2016).
- (34) http://www.horizontechinc.com/PDF/Product%20Brochures/B0051508_01_SPE-DEX_4790_brochure. (dostop: 28. 4. 2016).
- (35) K. Ridgway, S. P.D. Lalljie, R. M. Smith: Sample preparation techniques for the determination of trace residues and contaminants in food. *Journal of Chromatography A*, 2007; 1153: 36–53.
- (36) E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers: Stir bar sorptive extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles. *Journal of Microcolumn Separations*, 1999; 11: 737–747.
- (37) M. He, B. Chen, B. Hu: Recent developments in stir bar sorptive extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2013; 406: 2001–2026.

- (38) F. M. Lancas, M. Eugenia, C. Queiroz, P. Grossi, I. R. B. Olivares: Recent development and applications of stir bar sorptive extraction. *Journal of Separation Science*, 2009; 32: 813–824.
- (39) <https://www.environment.gov.au/protection/chemicals-management/pops>. (dostop: 1. 5. 2016).
- (40) F. J. Camino Sanchez, R. Rodriguez-Gomez, A. Zafra-Gomez, A. Santos -Fandila, J. L. Vilchez: Stir bar sorptive extraction: recent applications, limitations and future trends. *Talanta*, 2014; 130: 388–399.
- (41) F. David, P. Sandra: Stir bar sorptive extraction for trace analysis. *Journal of Chromatography A*, 2007; 1152: 54–69.
- (42) M. Kawaguchi, R. Ito, H. Nakazawa, A. Takatsu: Environmental and biological applications of stir bar sorptive extraction. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 2012; 3: 797–818.
- (43) J. Martin, D. Camacho-Munoz, J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso: Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants: Removal and ecotoxicological impact of wastewater discharges and sludge disposal. *Journal of Hazardous Materials*, 2012; 239–240: 40–47.
- (44) E. Magi, C. Scapolla, M. Carro, P. Rivaro, K. T. N. Nguyen: Emerging pollutants in aquatic environments: monitoring of UV filters in urban wastewater treatment plants. *Analytical Methods*, 2013; 5: 428–433.
- (45) F. David: Application of sti-bar sorptive extraction in food analysis. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation*, 2012; 4: 473–493.
- (46) S. Seethapathy, T. Gorecki: Applications of polydimethylsiloxane in analytical chemistry: A rewiev. *Analytica Chimica Acta*, 2012; 750: 48–62.
- (47) F. A. Mellon: Mass spectrometry: Principles and instrumentation. *Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition* (second edition), 2003: 3739–3749.
- (48) K. Vekey: Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. *Journal of Chromatography A*, 2001; 921: 227–236.
- (49) https://masspec.scripps.edu/mshistory/whatisms_details.php#detectors. (dostop: 2. 5. 2016).
- (50) <http://www.intechopen.com/books/calcific-aortic-valve-disease/proteomics-and-metabolomics-in-aortic-stenosis-studying-healthy-valves-for-a-better-understanding-of>. (dostop: 2. 5. 2016)

- (51) F. M. Fortunato, M. A. Bechlin, J. A. Gomes Neto, G. L. Donati, B. T. Jones: Internal standard addition calibration: Determination of calcium and magnesium by atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*; 122: 63–69.
- (52) D. A. Goncalves, B. T. Jones, G. L. Donati: The reversed-axis method to estimate precision in standard additions analysis. *Microchemical Journal*, 2016; 124: 155–158.
- (53) <http://www.drugbank.ca/> (dostop: 6. 6. 2016).
- (54) P. Serodio, J. M. F. Nogueira: Multi-residue screening of endocrine disrupters chemicals in water samples by stir bar sorptive extraction-liquid desorption-capillary gas chromatography-mass spectrometry detection. *Analytica Chimica Acta*, 2004; 517: 21–32.
- (55) <http://www.fda.gov/downloads/scienceresearch/fieldscience/laboratorymanual/ucm>. (dostop: 1. 8. 2016).
- (56) N. Gilart, R. M. Marce, F. Borrull, N. Fontanals: New coatings for stir-bar sorptive extraction of polar emerging organic contaminants. *Trends in Analytical Chemistry*, 2014; 54: 11–23.
- (57) <https://www.chromspec.com/content/spe>. (dostop: 28. 4. 2016)
- (58) http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Solid+Phase+Microextraction&lang=1. (dostop: 17. 8. 2016).
- (59) <http://www.laborpraxis.vogel.de/index.cfm?pid=7534&pk=449709&fk=735316&op=1&type=article#2>. (dostop: 17. 8. 2016).