

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**TAMARA BERGOČ**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**TAMARA BERGOČ**

**RAZVOJ IN VALIDACIJA METODE ZA EKSTRAKCIJO IN  
KVANTIFIKACIJO NEKATERIH ANTIDEPRESIVOV  
IZ ODPADNIH VOD**

**DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR  
EXTRACTION AND QUANTIFICATION OF SELECTED  
ANTIDEPRESSANTS IN WASTEWATER**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm. Meritve so bile opravljene na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko.

## ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Juriju Trontlju, mag. farm. za vso strokovno pomoč in svetovanje pri nastajanju magistrske naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi asist. Aniti Klančar, mag. farm. za nesebično pomoč in vodenje skozi laboratorijsko delo.

Posebna zahvala gre tudi družini in vsem bližnjim, ki so mi tekom študija stali ob strani in me podpirali.

## IZJAVA

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

Tamara Bergoč

**KAZALO VSEBINE**

KAZALO VSEBINE.....	I
KAZALO SLIK.....	V
KAZALO TABEL.....	V
POVZETEK .....	VIII
ABSTRACT .....	IX
SEZNAM OKRAJŠAV .....	X
1 UVOD .....	1
1.1 DEPRESIVNA MOTNJA .....	1
1.1.1 Hipoteza monoaminskega pomanjkanja ali monoaminska hipoteza.....	1
1.1.2 Hipoteza receptorjev živčnih prenašalcev .....	1
1.2 ZDRAVLJENJE DEPRESIJE .....	1
1.2.1 Selektivni zaviralci privzema serotonina.....	2
1.2.1.1 Fluoksetin.....	2
1.2.1.2 Sertralin.....	3
1.2.1.3 Escitalopram .....	3
1.2.2 Neselektivni zaviralci privzema serotonina in noradrenalina.....	4
1.2.2.1 Venlafaksin .....	4
1.2.3 Triciklični antidepresivi.....	5
1.2.3.1 Amitriptilin .....	5
1.2.3.2 Dezipramin.....	5
1.3 ZDRAVILNE UČINKOVINE V OKOLJU .....	6
1.3.1 Viri okoljskega onesnaževanja .....	7
1.3.2 Antidepresivi v okolju .....	7
1.3.2.1 Odpadna voda iz čistilnih naprav.....	8
1.3.2.2 Površinske vode .....	8
1.3.2.3 Podzemne vode .....	8
1.3.2.4 Pitna voda .....	8
1.4 STRUPENOST ZDRAVILNIH UČINKOVIN .....	11
1.4.1 Strupenost antidepresivov .....	11
1.5 METODE EKSTRAKCIJE ZA PRIPRAVO VZORCEV .....	13
1.5.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu .....	13

1.5.2	Horizon Technology SPE-DEX <sup>®</sup> .....	14
1.5.3	Ekstrakcija tekoče-tekoče .....	14
1.6	MASNA SPEKTROMETRIJA .....	15
2	NAMEN DELA.....	16
3	MATERIALI IN METODE .....	17
3.1	MATERIALI .....	17
3.1.1	Standardi.....	17
3.1.2	Topila in reagenti.....	17
3.1.3	Naprave in pribor.....	18
3.2	METODE.....	20
3.2.1	Priprava osnovnih raztopin.....	20
3.2.1.1	Primarna osnovna raztopina.....	20
3.2.1.2	Sekundarna osnovna raztopina .....	20
3.2.1.3	Delovna raztopina .....	20
3.2.2	Priprava fosfatnih pufrov .....	20
3.2.2.1	Priprava 50, 100 in 250 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufra, pH 3 in pH 7 .....	20
3.2.2.2	Priprava 25 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pufra , pH 7 .....	21
3.2.3	Razvoj LLE .....	21
3.2.3.1	Priprava 8 % ACN z 0,05 % HCOOH (rekonstitucijsko topilo) .....	21
3.2.3.2	Priprava standardov za LLE.....	21
3.2.3.3	Metoda LLE .....	21
3.2.4	Optimizacija SPE.....	22
3.2.4.1	Priprava elucijskega topila.....	22
3.2.4.2	Priprava topila za rekonstitucijo z znano koncentracijo za določanje ME .....	22
3.2.4.3	Priprava standardov .....	22
3.2.4.4	Priprava realnega vzorca.....	23
3.2.4.5	Metoda SPE .....	23
3.2.4.6	Linearnost SPE .....	23
3.2.4.7	Izračun učinkovitosti postopka priprave, vpliva matriksa in izkoristka ter metoda standardnega dodatka.....	24
3.2.5	Optimizacija SPE-DEX .....	26
3.2.5.1	Priprava elucijskega topila.....	26
3.2.5.2	Priprava topila za rekonstitucijo z znano koncentracijo .....	26

3.2.5.3	Priprava standardov .....	27
3.2.5.4	Priprava realnega vzorca.....	27
3.2.5.5	Metoda SPE-DEX.....	27
3.2.5.6	Linearnost SPE-DEX.....	28
3.2.5.7	Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije.....	28
3.2.5.8	Vpliv molarnosti pufra na izkoristek ekstrakcije.....	29
3.2.5.9	Ponovljivost ekstrakcije s SPE-DEX metodo .....	30
3.2.5.10	Ponovljivost injiciranja na masnem spektrometru .....	30
3.2.5.11	Izračun učinkovitosti postopka priprave, vpliva matriksa in izkoristka ter metoda standardnega dodatka.....	30
3.2.6	Tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo ..	32
4	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	34
4.1	RAZVOJ LLE.....	34
4.1.1	Primerjava ekstrakcijskih topil .....	34
4.1.2	Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije .....	34
4.1.3	Vpliv časa na izkoristek ekstrakcije .....	35
4.1.4	Zaporedna ekstrakcija.....	37
4.2	OPTIMIZACIJA SPE .....	39
4.2.1	Linearnost SPE .....	39
4.2.2	Učinkovitost postopka priprave in izkoristek ekstrakcije ter vpliv matriksa	41
4.2.3	Določanje koncentracij v odpadni vodi .....	42
4.3	OPTIMIZACIJA SPE-DEX .....	46
4.3.1	Linearnost SPE-DEX.....	46
4.3.2	Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije .....	48
4.3.3	Vpliv molarnosti pufra na izkoristek ekstrakcije.....	48
4.3.4	Ponovljivost ekstrakcije s SPE-DEX metodo.....	49
4.3.5	Učinkovitost postopka priprave in izkoristek ekstrakcije ter vpliv matriksa	49
4.3.6	Določanje koncentracij v odpadni vodi .....	50
4.3.7	Ponovljivost injiciranja na masnem spektrometru.....	51
4.4	SKUPNA PRIMERJAVA METOD .....	51
4.4.1	Primerjava validacijskih parametrov .....	51
4.4.2	Primerjava rezultatov, pridobljenih iz vzorcev odpadnih voda.....	55

---

4.5	PRIMERJAVA KONCENTRACIJ ANTIDEPRESIVOV V ODPADNIH VODAH MED SLOVENIJO IN OSTALIMI DRŽAVAMI.....	57
5	SKLEP.....	58
	LITERATURA .....	60

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Fluoksetin .....	3
Slika 2: Sertralin .....	3
Slika 3: Escitalopram .....	4
Slika 4: Venlafaksin .....	4
Slika 5: Amitriptilin .....	5
Slika 6: Dezipramin .....	6
Slika 7: Metoda standardnega dodatka .....	26
Slika 8: Odziv na LC-MS/MS v odvisnosti od časa stresanja (Graf A predstavlja vzorec z neuravnanim pH vodne faze, Graf B predstavlja vzorec z uravnanim pH vodne faze na vrednost 3) .....	37
Slika 9: Primerjava izkoristkov enkratne in zaporedne ekstrakcije pri posameznih učinkovinah z dodanimi intervali standardnih napak vzorca .....	38
Slika 10: LC-MS/MS kromatogrami ločbe preiskovanih antidepresivov pri vzorcu odpadne vode iz iztoka čistilne naprave, odvzetega 20. 4. 2015 .....	44
Slika 11: LC-MS/MS kromatogrami ločbe preiskovanih antidepresivov pri vzorcu odpadne vode iz iztoka čistilne naprave, odvzetega 20. 4. 2015, ki smo mu pred ekstrakcijo dodali sekundarno osnovno raztopino .....	45
Slika 12: Primerjava izkoristkov treh metod ekstrakcije z dodanimi intervali standardnih napak vzorca .....	53
Slika 13: Grafični prikaz kalibracijskih premic z metodo SPE za izbrane antidepresive ...	53
Slika 14: Grafični prikaz kalibracijskih premic z metodo SPE-DEX za izbrane antidepresive .....	54
Slika 15: Primerjava koncentracij antidepresivov v različnih vzorcih, ekstrahiranih z dvema metodama .....	56
Slika 16: Linearnost metode standardnega dodatka (metoda SPE) .....	56
Slika 17: Linearnost metode standardnega dodatka (metoda SPE-DEX) .....	57

**KAZALO TABEL**

Tabela 1: Koncentracije antidepresivov v različnih vodnih okoljih .....	9
Tabela 2: Priprava standardnih raztopin za direktno analizo na masnem detektorju .....	22



Tabela 3: Podatki o vzorcih in njihovi pripravi za določitev linearnosti SPE metode .....	23
Tabela 4: Priprava topila za rekonstitucijo z znanimi koncentracijami.....	26
Tabela 5: Metoda ekstrakcije na SPE-DEX .....	27
Tabela 6: Podatki o vzorcih in njihovi pripravi za določitev linearnosti SPE-DEX metode .....	28
Tabela 7: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze pri tekočinski kromatografiji .....	32
Tabela 8: Parametri ionskega izvora .....	33
Tabela 9: MRM prehodi, napetosti fragmentorja in kolizijske energije izbranih antidepresivov.....	33
Tabela 10: Primerjava ekstrakcijskih topil za LLE .....	34
Tabela 11: Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije .....	35
Tabela 12: Vpliv časa stresanja na izkoristek ekstrakcije (neuravnan pH).....	36
Tabela 13: Vpliv časa stresanja na izkoristek ekstrakcije (pH 3).....	36
Tabela 14: Ponovljivost enkratne in zaporedne ekstrakcije .....	38
Tabela 15: Izkoristki in determinacijski koeficienti (metoda SPE).....	40
Tabela 16: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepresivov v vzorcu – klasična metoda SPE (vzorec odvzet 7. 4. 2015) .....	42
Tabela 17: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepresivov v vzorcu – klasična metoda SPE (vzorec odvzet 20. 4. 2015) .....	42
Tabela 18: Izračunane koncentracije antidepresivov v dveh vzorcih odpadnih vod, ekstrahiranih z metodo SPE, ter izračunani parametri premice (naklon, presečišče z y-osjo, $R^2$ ).....	43
Tabela 19: Linearnost SPE-DEX pri pH 3 in pH 7 .....	47
Tabela 20: Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije .....	48
Tabela 21: Vpliv molarnosti pufru na izkoristek ekstrakcije.....	48
Tabela 22: Ponovljivost SPE-DEX metode.....	49
Tabela 23: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepresivov v vzorcu – metoda SPE-DEX; neredčen vzorec .....	50

Tabela 24: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepresivov v vzorcu – metoda SPE-DEX; 10-krat redčen vzorec.....	50
Tabela 25: Izračunane koncentracije antidepresivov v vzorcu odpadne vode, ekstrahiranem z metodo SPE-DEX, ter izračunani parametri premice (naklon, presečišče z y-osjo, $R^2$ ) ..	51
Tabela 26: Ponovljivost injiciranja na LC-MS/MS .....	51
Tabela 27: Osnovni validacijski parametri standardnih raztopin izbranih antidepresivov v ultračisti vodi .....	52
Tabela 28: Primerjava koncentracij in determinacijskih koeficientov standardnega dodatka za posamezne antidepresive.....	55

## POVZETEK

V zadnjih letih je opaziti povečano predpisovanje zdravil, ki delujejo na centralni živčni sistem, predvsem antidepresivov. To vodi v vse večji pojav zdravilnih učinkovin v odpadnih, površinskih in podzemnih vodah ter pitni vodi, kar postaja velik okoljski problem, saj imajo škodljiv vpliv na vodne organizme. Cilj magistrske naloge je bil izbrati in optimizirati postopek ekstrakcije, ki vključuje čiščenje in koncentriranje vzorcev odpadnih voda. Osredotočili smo se na naslednje antidepresive: escitalopram, venlafaksin, dezipramin, amitriptilin, fluoksetin in sertralin. Priprava vzorcev je bila opravljena na tri načine: s tekočinsko ekstrakcijo, s klasično (ročno) ekstrakcijo na trdnem nosilcu in z avtomatizirano ekstrakcijo na trdnem nosilcu.

Metodo tekočinske ekstrakcije smo razvili od začetka in smo preizkusili različna ekstrakcijska topila, različne pH vodne faze, čase stresanja ter izvedli zaporedno ekstrakcijo. Metodi ekstrakcije na trdnem nosilcu, klasična in avtomatizirana ekstrakcija, sta bili deloma že razviti, mi pa smo ju optimizirali. Določili smo osnovne validacijske parametre (linearnost, ponovljivost, izkoristek, meja določitve) in ju uporabili na izbranih vzorcih odpadnih vod, v katerih smo določevali izbrane antidepresive. Ekstrakte smo analizirali s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo.

Pri tekočinski ekstrakciji smo na podlagi dobljenih rezultatov izbrali čas stresanja 1 h, pH vodne faze 3 in diklorometan kot ekstrakcijsko topilo, zaporedna ekstrakcija pa je boljša od enkratne. Zaradi nizkih izkoristkov in slabe ponovljivosti bi bila potrebna dodatna optimizacija, katere smiselnost pa je glede na dobljene izkoristke vprašljiva. Metodi ekstrakcije na trdnem nosilcu sta linearni v območju 0,01 - 1 µg/L ter ponovljivi, meje določitve so bile med 10 in 50 ng/L. Izkoristki klasične ekstrakcije na trdnem nosilcu so bili 105,2 - 108,6 %, pri novejši avtomatizirani metodi pa nekoliko nižji: 64,4 - 74,8 %. Ugotavljali smo pojav antidepresivov v odpadni vodi ter od vseh preiskovanih antidepresivov določili prisotnost le escitaloprama in venlafaksina. Za izračun koncentracij smo uporabili metodo standardnega dodatka, ker omogoča merjenje nizkih koncentracij, hkrati naredimo kalibracijo in izključimo vpliv matriksa. Ugotovili smo, da matriks ni značilno vplival na odziv signalov pri analizi. Najbolj primerna za ekstrakcijo antidepresivov iz odpadnih vod je avtomatizirana metoda, saj ima številne prednosti predvsem z vidika enostavnosti izvedbe v primerjavi s klasično ekstrakcijo na trdnem nosilcu, ki zahteva stalno prisotnost operaterja.

**Ključne besede:** ekstrakcija, antidepresivi, odpadne vode, LC-MS/MS.

## ABSTRACT

Nowadays, we notice an increased number of prescriptions for psychiatric pharmaceuticals, especially antidepressants. Their increased consumption suggests a higher exposure in wastewater, environmental and tap water. Pharmaceuticals are highly active compounds and they can have an effect on aquatic organisms. The aims of this master's thesis were to choose and optimize a method for extraction, which includes purification of wastewater samples and concentration of analytes. We selected the following antidepressants: escitalopram, venlafaxine, desipramine, amitriptyline, fluoxetine and sertraline. In this study, three sample preparation techniques were evaluated: liquid-liquid extraction, classic (manual) solid phase extraction and automated solid phase extraction on extraction discs.

A method for liquid-liquid extraction was developed. We used various organic solvents, we changed pH of aqueous phase and we examined different shaking times and successive extraction. We optimized both methods with solid phase extraction that were already partly developed. We determined the validation parameters, such as linearity, repeatability, recovery and limit of quantification. The wastewater samples were extracted using both solid-phase extractions. In these samples we evaluated the occurrence of antidepressants. Samples were analyzed by the liquid chromatography-tandem mass spectrometry.

For liquid-liquid extraction shaking time 1 h, pH of aqueous phase 3, dichloromethane as organic solvent and successive extraction was chosen, but repeatability was poor and recoveries were low. The linearity for analytical methods with both solid-phase extractions was proved in concentration range between 0,01 - 1 µg/L. We determined the repeatability of both methods and limits of quantification for all tested antidepressants. Classic solid-phase extraction recoveries were 105,2 - 108,6 %, while the SPE-DEX recoveries were lower: 64,4 - 74,8 %. We measured the selected antidepressants in an outflow from a wastewater treatment plant. In the collected samples, we found escitalopram and venlafaxine in measurable concentrations. A method of standard addition was used to quantify the selected antidepressants in the collected samples. This method allows a measurement of very low concentrations of analytes and enables the calibration and elimination of the matrix effect at the same time. Indeed, the measured matrix effect was proven to be non-significant. The most appropriate method for extraction of antidepressants from wastewater is SPE-DEX, since it has many advantages over the classic solid-phase extraction, especially because of its simplicity and ease of use.

**Keywords:** extraction, antidepressants, wastewater, LC-MS/MS

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ACN – acetonitril

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

ČN – čistilna naprava

DCM – diklorometan

EI – elektronska ionizacija (*ang. Electron Ionization*)

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

EtAc – etil acetat

GC-MS – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

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

LLE – ekstrakcija tekoče-tekoče (*ang. Liquid-Liquid Extraction*)

LOD – meja zaznavnosti (*ang. Limit of Detection*)

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

MBE – ekstrakcija na osnovi membrane (*ang. Membrane-based Extraction*)

ME – matriks efekt

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

n.d. – nedoločeno

PE – učinkovitost postopka priprave (*ang. Process Efficiency*)

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

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

RSD – relativna standardna deviacija

SFE – superkritična tekočinska ekstrakcija (*ang. Supercritical Fluid Extraction*)

SNRI – neselektivni zaviralci privzema serotonina in noradrenalina

SOR – standardna osnovna raztopina

SPE – ekstrakcija na trdnih nosilcih (*ang. Solid-phase Extraction*)

SPME – mikroekstrakcija na trdnih nosilcih (*ang. Solid-phase Microextraction*)

SSRI – selektivni zaviralci privzema serotonina

TCA – triciklični antidepresivi

ZDA – Združene države Amerike

## **1 UVOD**

### **1.1 DEPRESIVNA MOTNJA**

Depresivna motnja ali depresija je kronična motnja razpoloženja, ki se kaže s psihološkimi, vedenjskimi in telesnimi simptomi. Značilne so motnje razpoloženja, prav tako tudi motnje spanja, apetita, spolnosti, bolečina in mišični krči. Za potrditev diagnoze depresivne motnje morajo ti simptomi trajati vsaj dva tedna, lahko se pojavijo le enkrat v življenju bolnika ali večkrat. Ocenjujejo, da je depresija najpogostejša duševna motnja v svetu. Za razvoj depresije pri bolniku je odgovorna kombinacija genetskih, biokemijskih, okoljskih in psiholoških dejavnikov (1, 2).

#### **1.1.1 Hipoteza monoaminskega pomanjkanja ali monoaminska hipoteza**

To je najpomembnejša teorija o nastanku depresije. Zasnoval jo je Schildkraut že leta 1965. Predpostavlja, da depresija nastane zaradi pomanjkanja monoaminskih prenašalcev v možganih. Sprva so mislili, da je vzrok v noradrenalinu, kasnejše raziskave pa so pokazale, da igra glavno vlogo serotonin (3). Manjšo vlogo ima tudi dopamin (1). Serotonin vpliva na spanje, apetit, počutje in spolnost. Noradrenalin uravnava koncentracijo, fino motoriko, vpliva na krvni tlak, utrip, prenos bolečine, delno tudi na občutek zadovoljstva (1).

Pomanjkanje monoaminskih prenašalcev je lahko posledica zmanjšanja vnosa predhodnikov noradrenalina in serotonina, motnje sinteze ali motnje razgradnje monoaminskih prenašalcev v presinaptičnih nevronih, spremembe presinaptičnih receptorjev ali spremembe transporterjev, ki omogočajo ponovni privzem monoaminskih prenašalcev (1).

#### **1.1.2 Hipoteza receptorjev živčnih prenašalcev**

Ta hipoteza razlaga, da je razvoj depresije povezan s povečanim številom receptorjev za serotonin in noradrenalin. Do tega pride zaradi prilagoditve na nizke koncentracije prenašalcev v sinapsi. Antidepresivi te koncentracije zvišajo, sledi adaptacija in zmanjšano število presinaptičnih receptorjev (1).

### **1.2 ZDRAVLJENJE DEPRESIJE**

Depresijo lahko uspešno zdravimo. Pomemben je hiter začetek zdravljenja, saj je le-to tako bolj uspešno. Pri zdravljenju gre najpogosteje za kombinacijo psihoterapije in

farmakoterapije z antidepresivi. Glede na mehanizem lahko učinkovine razdelimo v več skupin:

- selektivni zaviralci privzema serotonina
- neselektivni zaviralci privzema serotonina in noradrenalina
- selektivni zaviralci privzema noradrenalina
- neselektivni zaviralci privzema noradrenalina in dopamina
- noradrenergični in selektivni serotoninergični antidepresivi
- selektivni pospeševalci privzema serotonina
- zaviralci monoaminoooksidaz
- triciklični antidepresivi
- agonisti melatonina in
- ojačevalci antidepresivnega učinka (1).

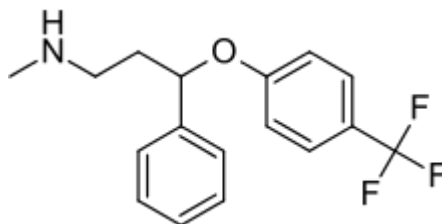
### **1.2.1 Selektivni zaviralci privzema serotonina**

Selektivni zaviralci privzema serotonina (SSRI) so trenutno najpogosteje predpisana zdravila za zdravljenje depresije. Uporabljajo pa se tudi za zdravljenje drugih bolezni in motenj (3). Zavirajo serotoninški prenašalec in s tem preprečijo ponoven privzem že sproščenega serotonina v presinaptični nevron. Povišan nivo serotonina aktivira pre- in postsinaptične receptorje. Zniža se občutljivost presinaptičnih receptorjev, vendar šele po nekaj tednih. To pojasnjuje, zakaj antidepresivi učinkujejo po dobrem mesecu terapije (1). V to skupino sodijo naslednje učinkovine: sertralin, citalopram, escitalopram (enantiomer citaloprama), fluoksetin, fluvoksamin in paroksetin (3). Ukinjanje antidepresivov mora biti postopno in počasno, kar pomeni, da je potrebno odmerek titrirati. S tem se lahko izognemo nastanku odtegnitvenega sindroma, ki nastane ob nenadni prekinitvi jemanja SSRI (1). Sočasno zdravljenje z neselektivnimi ireverzibilnimi zaviralci monoaminoooksidaze je kontraindicirano, saj lahko pride do pojava serotoninškega sindroma (4).

#### **1.2.1.1 Fluoksetin**

Fluoksetin je selektivni zaviralec privzema serotonina in nima nobene afinitete do drugih receptorjev. Uporablja se za zdravljenje velikih depresivnih epizod, obsesivno-kompulzivnih motenj, bulimije, nervoze, paničnih motenj in predmenstruacijskih distrofičnih motenj. Za zdravljenje depresivnih motenj dnevno priporočajo odmerek 20

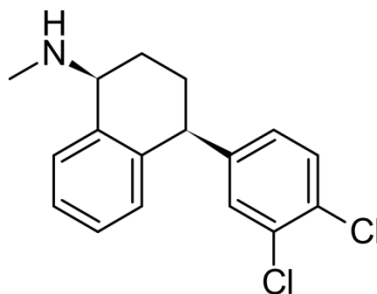
mg. Absorpcija iz prebavil je dobra. Presnova v aktivni presnovek dezmetilfluoksetin poteka v jetrih (4).



Slika 1: Fluoksetin

### 1.2.1.2 Sertralin

Sertralin zavira ponovni privzem serotonina, šibko vpliva na privzem noradrenalina in dopamina. Uporablja se za zdravljenje depresije, obsesivno-kompulzivnih motenj, paničnih, anksioznih motenj, posttravmatskih stresnih motenj in predmenstruacijskih distrofičnih motenj. Običajni dnevni odmerek pri zdravljenju depresije je 50 mg. Presnavlja se v jetrih s citokromi v dezmetilsertralin. Ta se še nadaljnje presnavlja v neaktivne metabolite, ki se izločajo z blatom in urinom. Le manj kot 0,2 % nespremenjenega sertralina se izloča tudi v urin (4).

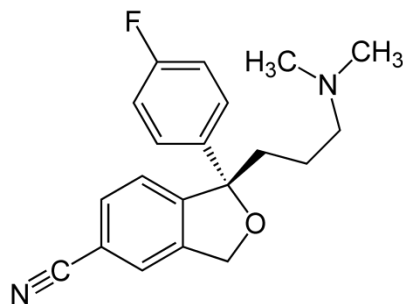


Slika 2: Sertralin

### 1.2.1.3 Escitalopram

Escitalopram je selektivni zaviralec ponovnega privzema serotonina, le malo afinitete ima do drugih receptorjev. Indiciran je za zdravljenje epizod depresije, paničnih motenj, socialne anksiozne motnje in obsesivno-kompulzivnih motenj. Običajni dnevni odmerek je 10 mg dnevno. Absorpcija escitaloprama je skoraj popolna. V jetrih poteka metabolizem do demetiliranih in didemetiliranih presnovkov. Izločanje pa poteka v obliki presnovkov in delno tudi v obliki glukuronidov preko jeter in tudi prek ledvic. V urin se velika večina odmerka izloči v obliki presnovkov (4).





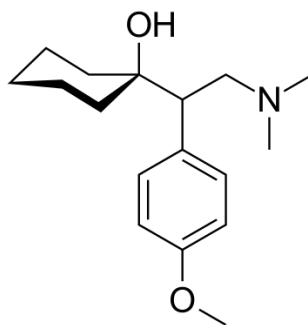
Slika 3: Escitalopram

### 1.2.2 Neselektivni zaviralci privzema serotonina in noradrenalina

Kot že samo ime pove, neselektivni zaviralci privzema serotonina in noradrenalina (SNRI) zavirajo ponovni privzem serotonina in noradrenalina, v manjši meri tudi dopamina. Uporabljajo se za zdravljenje različnih vrst depresije, anksioznosti in kronične bolečine. Veljajo za varne učinkovine in so alternativa SSRI. Med SNRI, ki so registrirani v Republiki Sloveniji, sodita venlafaksin in duloksetin (1). Ravno tako kot velja za SSRI, je tudi za SNRI kontraindicirano sočasno jemanje z ireverzibilnimi zaviralci monoaminooksidaze (4).

#### 1.2.2.1 Venlafaksin

Venlafaksin zavira ponovni privzem serotonina in noradrenalina, šibko zavira ponovni privzem dopamina ter zmanjša odzivnost adrenergičnih beta receptorjev. Uporablja se za zdravljenje hudih depresivnih epizod, generalizirane anksiozne motnje, panične motnje z agorafobijo ali brez nje ter za preprečevanje ponovitev hudih depresivnih epizod. Odmerjanje je zelo odvisno od bolnika in bolezni, za katero se zdravi. Največji odmerek je 375 mg/dan. Absorpcija je vsaj 92 %. Presnavlja se v jetrih s citokromi. Glavni aktivni presnovek je O-desmetilvenlafaksin, manj pomemben pa N-desmetilvenlafaksin. 5 % odmerka se izloči v obliki nespremenjenega venlafaksina (4).



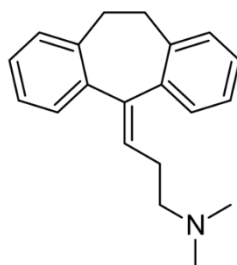
Slika 4: Venlafaksin

### 1.2.3 Triciklični antidepresivi

Triciklični antidepresivi (TCA) in zaviralci monoaminooksidaz so pomemben mejnik v zgodovini zdravljenja depresije. Prvi odkriti TCA je bil imipramin, ki so mu že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja odkrili antidepresivno delovanje. TCA razdelimo v dve podskupini: terciarni amini, ki večinoma zavirajo ponoven privzem serotonina, in sekundarni amini, ki zavirajo ponoven privzem noradrenalina v presinaptične nevrone (1). Danes se TCA ne uporablja veliko, ker so možni neželeni učinki zelo resni. To so vrtoglavica, zaspanost, suha usta in povišanje telesne mase (2). Sočasno zdravljenje z zaviralci monoaminooksidaze privede do hiperpiretične krize, hudih napadov in smrti (4).

#### 1.2.3.1 Amitriptilin

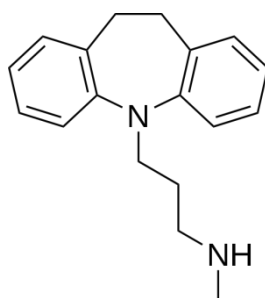
Amitriptilin je triciklični antidepresiv in je terciarni amin. Je inhibitor ponovnega prevzema noradrenalina in serotonina v živčne celice ter antagonist  $\alpha_1$  adrenergičnih receptorjev. Zaradi antagonističnega delovanja na muskarinskih in histaminskih H1 receptorjih, povzroča antiholinergične učinke in sedacijo. Uporablja se za zdravljenje depresije. Vzdrževalni odmerek je 50 – 100 mg na dan. Absorpcija je hitra, v jetrih poteka N-demetilacija v nortriptilin, sledi hidrosilacija in oksidacija v aktivne metabolite. Izloča se s sečem in blatom v obliki amitriptilina in ostalih presnovkov (4).



Slika 5: Amitriptilin

#### 1.2.3.2 Dezipramin

Sodi v podskupino sekundarnih aminov. Priporočen dnevni odmerek je 100 – 200 mg na dan. Metabolizem dezipramina poteka v jetrih, približno 70 % pa se ga izloča z urinom (5). Dezipramin je glavni metabolit imipramina (6).



Slika 6: Dezipramin

### 1.3 ZDRAVILNE UČINKOVINE V OKOLJU

Raziskovalci na številnih področjih sintetizirajo veliko najrazličnejših molekul, med njimi tudi zdravilne učinkovine, ki se z neprimernim odstranjevanjem in tudi z izločanjem iz teles pacientov pojavijo tudi v okolju. Izmed vseh sinteznih spojin, ki jih človek spušča v okolje, so zdravilne učinkovine med najučinkovitejšimi, ker so tako načrtovane, da se že v zelo nizkih koncentracijah z visokimi afinitetami vežejo na različne receptorje. Že v šestdesetih letih prejšnjega stoletja je študija pokazala, da v čistilnih napravah učinkovin le-te ne odstranjujejo popolnoma. Dejstvu, da so učinkovine mogoče ena izmed potencialnih onesnaževalcev za okolje, doslej mnogi raziskovalci in regulativne oblasti niso posvečali dovolj velike pozornosti (7). V devetdesetih letih prejšnjega stoletja so raziskovalci odkrili, da imajo nekatere komponente zmožnost reagirati z okoljem in da so lahko usodne za vodne organizme že v zelo nizkih koncentracijah, v ng/L (8, 9). Pomembno je tudi dejstvo, da se učinkovine ne nahajajo same v vodnem okolju, temveč gre za kompleksno zmes. Dokazi kažejo, da se v tem primeru učinki posameznih komponent seštevajo ali potencirajo, oziroma da gre za sinergističen učinek (7). Do danes so v okolju našli različne skupine učinkovin: antiepileptike, zaviralce adrenergičnih receptorjev  $\beta_1$ , antidepresive, anksiolitike, sedative, kontraceptive, zdravila za zniževanje krvnega holesterola, antibiotike, hormone... (10, 11, 12).

Število študij o zdravilnih učinkovinah v okolju je v zadnjem času naraslo. Študije razkrivajo prisotnost različnih učinkovin v pritokih in iztokih čistilnih naprav, v površinskih vodah, v podzemnih vodah, v pitni vodi, morju in sedimentih (13). Veliko zaskrbljenost povzroča onesnaževanje podtalnice preko površinskih voda. Prisotnost učinkovin v pitni vodi in vodi, iz katere pridobivajo pitno vodo, je pomemben predmet razprave za zdravje ljudi (11). Zaradi tega je pomembno identificirati in določiti koncentracije učinkovin ter

metabolitov v okolju, razumeti mobilnost in njihov obstoj pod različnimi okoljskimi dejavniki, raziskati vire onesnaževanja, oceniti uspešnost čistilnih naprav pri odstranjevanju teh snovi ter pot vstopa in učinke na vodne organizme (7).

### **1.3.1 Viri okoljskega onesnaževanja**

Najbolj očitna pot onesnaževanja okolja je izločanje nespremenjenih učinkovin prek blata in urina. Vendar to ni edini vir. Veliko učinkovin se v telesu presnavlja, ker telo lažje izloča hidrofilne snovi. Presnovki so ravno tako prisotni v okolju. Nekateri ljudje zdravila, ki jih ne potrebujejo več ali niso več uporabna (pretečen rok uporabe), zavržejo v odtok ali stranišče, namesto da bi jih odnesli na zbirna mesta za neuporabljena zdravila ali jih zavržli v posebne odpadke za sežig. Velik problem je tudi metanje neuporabljenih zdravil med mešane komunalne odpadke, saj se vode iz smetišč lahko stekajo v površinske vode ali v podtalnico. Na kmetijskih površinah se velikokrat uporablja kot gnojilo ravno usedlina oziroma trdni zaostanek, ki nastane v čistilnih napravah. V veterinarski medicini ravno tako uporablja zdravila za zdravljenje živali in tudi te izločajo presnovke prek urina in blata. Vse to so možni viri onesnaževanja okolja, v katere je večinoma vpleten človek. Pomemben vir onesnaževanja, na katerega ne smemo pozabiti, je farmacevtska industrija, bolnišnice, domovi upokojencev ter tudi odplake iz čistilnih naprav, ki znatno povečajo vnos učinkovin v okoljske vode (13).

### **1.3.2 Antidepresivi v okolju**

Današnji čas je za večino ljudi zelo stresen, kar se kaže v porastu psihičnih motenj, posledično se tudi število predpisanih zdravil, ki delujejo v centralnem živčnem sistemu, povečuje (14). SSRI so podskupina antidepresivov, ki so najpogosteje predpisana za zdravljenje depresivne motnje (14, 15). V okolju se pojavljajo v zaznavnih koncentracijah ravno zaradi porasta jemanja teh zdravil. Drugi razlog za to je kronična terapija pri zdravljenju depresije, saj morajo nekateri bolniki jemati antidepresive tudi do konca življenja (14). Gre za lipofilne učinkovine, ki se v jetrih metabolizirajo v bolj hidrofilne metabolite (16). To so lahko aktivni metaboliti ali le spojine, v katere se presnovijo učinkovine za lažje izločanje iz telesa. Vse te spojine pa se tudi lahko nahajajo v različnih vodah v okolju (14).

Veliko študij je pokazalo nepopolno odstranitev antidepresivov v čistilnih napravah, kar vodi v onesnaževanje okolja. Prisotnost antidepresivov, predvsem pa podskupine SSRI, so

našli v iztokih čistilnih naprav, površinskih, podzemnih vodah in pitni vodi v Evropi, Združenih državah Amerike in Kanadi (16). Podatki o koncentracijah antidepresivov v okolju so zbrani v tabeli 1. Za dezipramin je na voljo le malo podatkov. Na Poljskem so proučevali njegovo prisotnost v vodovodni vodi in v reki, vendar ga merilni sistemi niso zaznali. Ostali antidepresivi, fluoksetin, escitalopram, sertralin, venlafaksin in amitriptilin, so bili zaznani v ZDA, Kanadi in Evropi. Najvišje koncentracije so določili v Kanadi (10, 11, 12, 14, 15, 17 – 39).

#### **1.3.2.1 Odpadna voda iz čistilnih naprav**

V vseh primerih, kjer so podatki za pritok in iztok iz čistilne naprave, so koncentracije antidepresivov nižje v iztokih kot v pritokih. V čistilnih napravah ne pride do popolne odstranitve, kar vodi do pojava antidepresivov v površinskih vodah, le da so v nižjih koncentracijah. V najvišjih koncentracijah se pojavlja venlafaksin, sledi mu escitalopram, kar v veliki večini velja za ZDA, Kanado in Evropo (Tabela 1) (10, 12, 14, 17 – 22, 27 – 30, 32, 33).

#### **1.3.2.2 Površinske vode**

V Kanadi in ZDA se pojavljajo v rekah vsi antidepresivi razen dezipramina. Koncentracije se gibljejo približno do 100 ng/L, le venlafaksin se pojavlja v višjih koncentracijah, tudi do 1 µg/L. V Evropi so te koncentracije nižje kot v Kanadi in ZDA, v nekaterih primerih so bile vrednosti pod mejo določitve (Tabela 1) (11, 15, 18, 19, 22, 23, 30 – 33, 35 – 38).

#### **1.3.2.3 Podzemne vode**

Za podzemne vode je na voljo le malo podatkov. Opisan je primer določitve fluoksetina v ZDA. Zdravilne učinkovine so v podzemnih vodah iskali tudi v Srbiji. Od antidepresivov so analizirali venlafaksin, vendar so rezultati pokazali, da je le ta pod mejo določanja (Tabela 1) (11, 24).

#### **1.3.2.4 Pitna voda**

O določevanju učinkovin v pitni vodi je tudi narejenih veliko študij. V ZDA so našli v pitni vodi fluoksetin v koncentracijah pod 1 ng/L. V evropskih državah so bile koncentracije večinoma pod mejo določanja (Tabela 1) (11, 24, 25, 26, 32, 36, 37, 38).

Tabela 1: Koncentracije antidepresivov v različnih vodnih okoljih

Vzorec	Država (leto)	Koncentracija (ng/L)						Vir		
		AMITRIPTILIN	DEZIPRAMIN	ESCITALOPRAM	FLUOKSETIN	SERTRALIN	VENLAFAKSIN			
ODPADNE VODE	Čistilne naprave - pritok	Kanada, 2007			307	18			17	
		Kanada, 2008	17,6 - 20,8		52,2 - 52,7	3,1 - 3,5	6 - 6,1	195,7 - 213	18	
		Kanada, 2009			136 - 223	20 - 91	14 - 34	526 - 1115	19	
		Kanada, 2012	138		236	18	20	<b>1343</b>	20	
		Češka, 2014			83		12	29	10	
		Portugalska, 2014			147,54	169,97	<b>100,04</b>		14	
		Portugalska, 2011			<14 - <b>32228</b>	<17 - <b>3465</b>			12	
		Norveška, 2005			13 - 612	0,4 - 2,4	2,0 - 16,3		27	
		Norveška, 2007			303,6	18,7	19,8		28	
		Velika Britanija, 2011	<b>659</b>			86,1		249	30	
		Španija, 2009				26			33	
	Odpadna voda	Srbija, 2014						154	11	
		Španija, 2007				40 - 100			34	
		ZDA, 2008	37 - 290			42 - 180	78 - 120		21	
	Čistilne naprave - iztok	Kanada, 2007			207	14			17	
		Kanada, 2008	15,6 - 21		46,8 - 57,8	2 - 3,7	5,1 - 5,8	175,9 - 214,6	18	
		Kanada, 2012	71		173	11	12	<b>1087</b>	20	
		ZDA, 2008	25 - 86			40 - 73	<b>57 - 87</b>		22	
		Češka, 2014			73		3	28	10	
		Portugalska, 2014			90,02	<b>81,1</b>	<LOD		14	
		Norveška, 2005			9,2 - <b>382</b>	1,3	0,9 - 2		27	
		Norveška, 2007			21,9 - 238,4	0,6 - 8,4	3,7 - 14,6		28	
		Avstrija, 2005			44 - 322			117 - 206	29	
		Velika Britanija, 2011	<b>129,8</b>				29,3		187,5	30
		Francija, 2004	6							32
		Španija, 2009					16			33
Indija, 2009				430 000				39		

	Trdni zaostanek*									
		Kanada, 2012	418		657	94	351	349	20	
<b>OSTALE VODE</b>	<b>Površinske vode (reke, jezera)</b>	Kanada, 2009			4 - 206	4 - <b>141</b>	6,0 - 17,0	4 - 901	19	
		Kanada, 2008	0,87 - 3,7		3,4 - 11,5	0,42 - 1,3	0,84 - 2,4	12,9 - 45,9	18	
		ZDA, 2008			40 - 90	12 - 20	33 - <b>49</b>	<b>600 - 1000</b>	15	
		ZDA, 2008	<LOD			<LOD	<LOD	<LOD	22	
		ZDA, 2006			<0,5 - <b>219</b>	<0,5 - 43,2	<0,5 - 37,5	<0,5 - 690	23	
		Velika Britanija, 2011	<b>29,5</b>			9		35,1	30	
		Wales, 2006, 2007	0,5 - 21							31
			0,5 - 13							
		Francija, 2004	<LOD							32
		Španija, 2009					3			33
		Španija, 2007				<LOD - 120 (43)	<LOD - 44 (14)		22 - 387 (57)	35
		Španija, 2011						11	12	36
		Španija, 2011	<1			54	<1		395,5	37
		Poljska, 2014	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	<LOD	0,8	38
			<LOD	<LOD	17	3,2	<3,1	250		
	Srbija, 2014							<0,7 - 5,3	11	
	Indija, 2009				2000 - 8000				39	
					400 - 76000					
	<b>Podzemne vode</b>	ZDA, 2000				<b>56</b>			24	
		Srbija, 2014						<LOD	11	
	<b>Vodovodna voda</b>	ZDA, 2000				<LOD			24	
		ZDA, 2006, 2007				0,8			25	
						<b>0,64</b>				
		ZDA, 2008				<0,50			26	
		Francija, 2004	<b>1,4</b>						32	
Španija, 2011						<LOD	<LOD	36		
Španija, 2011		<LOD			<LOD	<LOD		<b>9</b>	37	
Srbija, 2014							<LOD	11		
Poljska, 2014	<LOD	<LOD	<b>1,5</b>	<LOD	<LOD	1,9	38			

Z mastnim tiskom so navedene najvišje izmerjene vrednosti pri posamezni učinkovini in vrsti vzorca. LOD – meja zaznavnosti; \* po čiščenju odpadnih vod

## 1.4 STRUPENOST ZDRAVILNIH UČINKOVIN

Vodni organizmi so učinkovinam in njihovim aktivnim presnovkom izpostavljeni prek različnih poti. Vodno onesnaževanje je zelo problematično, saj se vodna živa bitja temu ne morejo izogniti in so lahko izpostavljena vse življenje. Učinki izpostavljenosti se lahko pokažejo zelo pozno, saj se snovi počasi akumulirajo in ko presežejo določeno mejo, je že prepozno, saj pride do nepovratnih poškodb (40). Ocenjevanje vplivov strupenosti na netarčne organizme vključuje različne teste, s katerimi raziskovalci ocenijo, kakšen vpliv imajo zdravilne učinkovine tako pri akutni kot kronični izpostavljenosti. Opazujemo lahko vpliv na rast organizmov, spremembe v razmnoževanju, obnašanju in mnogih drugih vidikih. Največ pozornosti in raziskav je glede na podatke v literaturi usmerjenih v določevanje nesteroidnih protivnetnih učinkovin, učinkovin za zniževanje krvnega holesterola, antibiotikov in hormonov (13).

### 1.4.1 Strupenost antidepresivov

Antidepresivi se v okolju pojavljajo v koncentracijah ng/L, kar lahko predstavlja grožnje organizmom v naravi. Še večji problem je, ker se pojavljajo v okolju v obliki mešanice; zaradi tega kronična izpostavljenost v vodnih organizmih sproži strupene efekte (13). Antidepresivi spreminjajo regulacijo prenašalcev živčevju (serotonina, noradrenalina, dopamina) in rušijo usklajenost med perifernim in centralnim živčevjem (38). Ne samo na živalski svet, tudi na alge in fitoplankton SSRI delujejo uničujoče. Ugotovili so, da je sertralin bolj toksičen od fluoksetina (42).

Fluoksetin je najbolj preiskovani SSRI tako v vodah kot v vodnih živih organizmih (43). Dokazali so številne negativne vplive na parjenje, gnezdenje, apetit, rast ter nesposobnost obrambe ob napadu sovražnika pri številnih ribjih vrstah (npr. črnoglavi pisanec (*Pimephales promelas*), siamska bojovnica (*Betta splendens*) in križanec med črtastim in belim brancinom (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*)) (44 – 47).

Pri preučevanju sertralina so ugotovili dihalno in gibalno disfunkcijo, zaznali so zmanjšano učinkovitost antioksidativnega sistema, kar je vodilo v povečano nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti pri obrežni rakovici (*Carcinus maenas*) (48). Serotonin ima tudi anorektičen vpliv na apetit pri ribah (49), privede pa tudi do značilnih sprememb v hitrosti premikanja, kar so potrdili pri postranici (*Echinogammarus marinus*) (50).



Tudi citalopram zmanjšuje apetit, kar so ugotovili pri navadnem zetu (*Gasterosteus aculeatus*), saj se je hranjenje zmanjšalo za 30 – 40 % (51). Drugi opazen vpliv pa je anksiolitičen efekt (52).

Dokazali so, da venlafaksin podaljša čas, potreben za ulovitev plena pri križancu med črtastim brancinom in belim brancinom (*Morone saxatilis x Morone chrysops*) (53). Preučevali so izpostavljenost venlafaksina in fluoksetina pri dveh vrstah polžev (*Urosalpinx cinerea* in *Lithopoma americanum*). Venlafaksin pospeši hitrost plazenja pri obeh vrstah, medtem ko jo fluoksetin upočasni. Izpostavljenost venlafaksinu povzroči pospešeno gibanje in večkratno vrnitev na površino, fluoksetin pa deluje ravno obratno (54).

Opisan je poskus izpostavljenosti navadne cebrice (*Danio rerio*) amitriptilinu. Rezultati so pokazali, da se zmanjša čas izvalitve in dolžina zarodka (55).

Večina raziskav o onesnaževanju okolja se nanaša le na eno aktivno komponento. Vendar so v okolju učinkovine prisotne v zmesi z drugimi aktivnimi substancami, presnovki in drugimi produkti. Podatki kažejo, da imajo zmesi aktivnih substanc drugačen vpliv na vodne živali in rastline kot posamezne komponente. V splošnem pa je teh podatkov malo (13). Nekateri primeri v literaturi razkrivajo, da se učinek zmesi učinkovin, v koncentracijah, ki jih najdemo v okolju, sešteva (41).

Snovi, ki se nahajajo v vodah, prehajajo v vodne organizme po različnih poteh. Posamezna tkiva imajo različno afiniteto za različne komponente, zato je distribucija posameznih učinkovin različna. Ugotovili so, da se antidepresivi nahajajo v najvišjih koncentracijah v jetrih, nato v možganih, najnižje koncentracije pa so v mišicah (56, 57). V vseh tkivih se pojavljajo višje koncentracije presnovkov antidepresivov (dezmetilsertralin, norfluoksetin) kot samih učinkovin (sertralin, fluoksetin) (57).

Pri vodnih organizmih bi glede na povezanost anksiozne motnje z depresijo lahko omenili tudi anksiolitik oksazepam, ki nastopa v površinskih vodah pri koncentracijah okrog 1 µg/L. Ta se v ribjih tkivih tudi do 6x koncentrira in značilno spremeni vedenje rib, npr. pri navadnem ostrizu, ki je tudi pri nas avtohtona sladkovodna vrsta, se poveča hranjenje in napadalnost (58).

## 1.5 METODE EKSTRAKCIJE ZA PRIPRAVO VZORCEV

Kadar je osnovni namen izolacija in koncentriranje analitov, je predpriprava vzorca ključna, kljub naprednejšim visoko učinkovitim analiznim napravam. S predpripravo zmanjšamo tudi vpliv matriksa. Današnje tehnike priprave vzorcev naj bi bile čim bolj avtomatizirane, hitre, sklopljene z različnimi analiznimi instrumenti, hkrati pa naj bi čim bolj zmanjšali volumen potrebnih topil za pripravo. Na voljo je veliko tehnik za pripravo vzorca. Med drugimi so to tudi ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE), superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE), ekstrakcija na osnovi membrane (MBE), ekstrakcija na trdnih nosilcih (SPE), mikroekstrakcija na trdnih nosilcih (SPME) (59).

### 1.5.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) temelji na porazdelitvi spojin med tekočo (vzorec) in trdno fazo, pri čemer se iz raztopine željeni analit loči od preostalih spojin glede na afiniteto do trdne stacionarne faze. SPE se uporablja pred analizo za čiščenje in koncentriranje vzorca (59, 60). SPE je postala zelo razširjena metoda za pripravo vzorcev za analize, tudi na področju problematike zdravilnih učinkovin v okolju. SPE je zamenjala klasično metodo ekstrakcijo tekoče-tekoče, pred katero ima številne prednosti:

- višji izkoristek,
- bolj učinkovito koncentriranje,
- manjša poraba organskih topil,
- ni težav s tvorbo emulzije ali s penjenjem,
- krajši čas priprave vzorca,
- lažje opravljanje in lažja možnost sklopitve z analiznimi instrumenti (59, 61).

Postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu največkrat vključuje naslednje stopnje: predpriprava stacionarne faze (aktivacija stacionarne faze omogoči vezavo spojin), nanos vzorca, katerega lahko pred nanosom filtriramo, kadar je to potrebno (med prehodom stacionarne faze se spojine vežejo na sorbent), spiranje sorbenta (odstranimo neželene spojine), sušenje sorbenta (odstranimo medij, v katerem so bile prisotne spojine), spiranje analitov (desorpcija spojin iz sorbenta s topilom). Temu sledi izhlapevanje elucijskega topila in raztapljanje posušenega ostanka v topilu, primernem za analizo (61).

Prava izbira sorbenta je ključnega pomena, saj vpliva na selektivnost, afiniteto in kapaciteto vezave. Izbira polnila je odvisna od spojin, ki jih želimo analizirati, in od

interakcij med spojinami in sorbentom. Na trgu je veliko različnih sorbentov, ki pa jih delimo v dve večji skupini: silikatni in polimerni. Silikatni sorbenti imajo največkrat vezane hidrofobne verige (C2 do C18) in so primerni za reverzno fazno SPE. Polimerni sorbenti imajo običajno vezane hidrofobne in hkrati polarne skupine, ki izkoriščajo več vrst vezave: dipol – dipol, pi – pi in van der Waalsove vezi (61, 62).

### **1.5.2 Horizon Technology SPE-DEX®**

Horizon Technology SPE-DEX® (v nadaljevanju SPE-DEX) je delno avtomatiziran sistem ekstrakcije na trdnem nosilcu. Namenjen je hitri ekstrakciji organskih komponent iz okoljskih vodnih vzorcev, kateri sledi nadaljnja analiza s plinsko kromatografijo, tekočinsko kromatografijo, plinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo ali tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo. Primeren je za čiste kot tudi za bolj umazane vzorce iz okolja, kot so pitna voda, podzemne vode, morska voda, pritoki in iztoki iz čistilnih naprav ter odpadne vode. Glavne prednosti so krajši čas ekstrakcije ter sočasna filtracija, zato predhodno filtriranje ni potrebno. Ostale prednosti so še, da se je zmanjšal volumen porabljenih topil v primerjavi z ekstrakcijo tekoče-tekoče za kar 90 %, procesi dodajanja topil, namakanja in sušenja diska, spiranja steklenice ter spiranja spojin s kartuše pa so avtomatizirani (63).

### **1.5.3 Ekstrakcija tekoče-tekoče**

Ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE) se prav tako kot SPE uporablja pred analizo za pripravo vzorca. Osnova tega postopka je porazdelitev spojin med dvema topiloma, ki se med sabo ne mešata in tvorita dve fazi. Običajno se porazdeljujejo komponente med vodno raztopino in organskim topilom (60, 64). Zmes najprej zadosten čas močno stresamo, tako da zagotovimo ustrezno stično površino, da dosežemo ravnotežje koncentracij, kot ga opredeljuje porazdelitveni koeficient. Spojine pri tem prehajajo iz vodne raztopine v organsko topilo. Po končanem stresanju pustimo, da se fazi ponovno ločita, organsko fazo ločimo od vodne, sledi odparitev topila in raztapljanje posušenega ostanka v topilu, primernem za analizo (64).

Prilagajanje pH-ja v vodni raztopini je pomembno, saj lahko s tem zagotovimo višji izkoristek. Spojine z bazičnimi ali kislimi funkcionalnimi skupinami deloma disocirajo v vodnem okolju, zato je potrebno za večji izkoristek upoštevati tudi pKa učinkovine. Z močno kislino ali bazo uravnamo pH za vsaj dve enoti razlike od pKa. Če ločujemo kisle

analite, mora imeti vodna raztopina vsaj dve enoti nižji pH od pKa analita, za bazične spojine pa dve enoti višji pH od pKa spojine. S tem zagotovimo, da je velika večina analita v neionizirani obliki, saj bo le tako prehajala v organsko fazo. Pri nevtralnih spojinah (brez kislinskih ali bazičnih funkcionalnih spojin) to ni potrebno, saj je izkoristek odvisen le od porazdelitvenega koeficienta (64).

Ekstrakcija tekoče-tekoče se danes manj uporablja in jo zamenjuje SPE zaradi navedenih prednosti pod točko 1.5.1.

## 1.6 MASNA SPEKTROMetriJA

Masni spektrometer deluje tako, da spreminja analizirane molekule v ionizirano obliko z negativnim ali pozitivnim nabojem. Ionizacija in nadaljnja fragmentacija potekata v predelu masnega spektrometra, ki se imenuje vir ionov. Ta prostor ioni in fragmenti pospešeno zapuščajo in vstopijo v masni analizator. Tu se ioni ločujejo glede na razmerje med maso ( $m$ ) in nabojem ( $z$ ) v magnetnem ali elektrostatskem polju ( $m/z$ ). Rezultat te analize je masni spekter v obliki histograma, v katerem je podana intenziteta ionov v odvisnosti od  $m/z$  (64).

Pri GC-MS analizah se pogosto za ionizacijo uporablja elektronska ionizacija (EI), kjer v vakuumu elektroni trčijo v preiskovane spojine, iz katerih nastanejo radikal-kationi, ki vstopajo nato v masni detektor. Pri LC-MS/MS analizah pa je najpomembnejša elektrorazprševalna ionizacija (ESI), mnogo manj pa se uporablja kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (APCI) (64).

V masnem analizatorju se ioni porazdelijo glede na razmerje  $m/z$ . Danes se veliko uporablja kvadrupolni masni analizator, posebej v izvedbi trojni kvadrupol za ultimativno metodo kvantifikacije malih molekul, za identifikacije pa se zaradi večje natančnosti merjenja mase pogosto uporablja TOF (*ang. time-of-flight*) in posebna izvedba ionske pasti, orbitrap. Za kvantitativno delo, kot je naše, je torej najpomembnejša vrsta masnega detektorja trojni kvadrupol (QQQ), ki omogoča ponovljivo fragmentacijo starševskih ionov analitov na hčerinske, s čimer dosežemo hkratno kvantifikacijo z izjemnim razmerjem signal/šum in hkratno zanesljivo identifikacijo iskanih (znanih) spojin (64).

## 2 NAMEN DELA

Pojav zdravilnih učinkovin v odpadnih, površinskih in podzemnih vodah, kot tudi v morju, sedimentih in pitni vodi, postaja velik okoljski problem, saj imajo lahko pomemben vpliv na vodne organizme. Zdravilne učinkovine in njihovi metaboliti neprestano vstopajo v okolje zaradi vse večje uporabe le-teh. V zadnjih letih je moč opaziti povečano predpisovanje zdravil, ki delujejo na centralni živčni sistem, ker je življenje večine ljudi vse bolj stresno. Med njimi so tudi v veliki meri antidepresivi, zato smo se odločili, da se bomo osredotočili na to skupino zdravilnih učinkovin. Naš cilj je bil izbrati in optimizirati postopek ekstrakcije, ki vključuje čiščenje in koncentriranje vzorcev, poleg tega pa omogoča kar se da dobro ponovljivost in občutljivost.

Razvili, optimizirali in ovrednotili bomo tri načine ekstrakcije: tekočinsko (LLE), klasično (ročno) ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE) in polavtomatski SPE-DEX, na podlagi rezultatov pa bomo izbrali najprimernejšega. Metodo LLE bomo razvili v celoti in preučili parametre, ki najpomembneje vplivajo na izkoristek. Tako bomo preizkusili različna ekstrakcijska topila, različne pH vodne faze, spreminjali bomo čase stresa in poskušali ugotoviti, ali je zaporedna ekstrakcija boljša od enkratne. Ekstrakte bomo analizirali z aparatom LC-MS/MS. V nadaljevanju bomo optimizirali metodi SPE in SPE-DEX, ki sta bili predhodno razviti. Tudi v tem primeru bomo analizo ekstraktov izvedli z aparatom LC-MS/MS. Določili bomo, ali sta metodi v izbranem območju linearni za vse izbrane antidepresive, ponovljivost obeh postopkov ter meje določitve.

Optimizirani metodi SPE in SPE-DEX bomo uporabili na izbranih vzorcih odpadnih vod iz Slovenije, kjer bomo izmerili koncentracije izbranih antidepresivov, hkrati pa bomo na teh vzorcih določili tudi učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa in izkoristek ekstrakcije. Na podlagi naših meritev bomo poskušali primerjati Slovenijo z ostalimi državami.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Standardi

- Fluoksetin (FLU): N-metil-3-fenil-3-[4-(trifluorometil)fenoksi]propan-1-amin (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)
- Sertralin (SER): (1S,4S)-4-(3,4-diklorofenil)-N-metil-1,2,3,4-tetrahidronaftalen-1-amin (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)
- Escitalopram (ESC): (1S)-1-[3-(dimetilamino)propil]-1-(4-fluorofenil)-3H-2-benzofuran-5-karbonitril (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)
- Venlafaksin (VEN): 1-[2-(dimetilamino)-1-(4-metoksifenil)etil]cikloheksan-1-ol (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)
- Amitriptilin (AMI): 3-(10,11-dihidro-5H-dibenzo[a,d]ciklohepten-5-iliden)-N,N-dimetilpropan-1-amin (Fluka Chemie AG, Buchs, Švica)
- Dezipramin (DEZ): 3-(5,6-dihidrobenzo[b][1]benzazepin-11-il)-N-metilpropan-1-amin (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)

##### 3.1.2 Topila in reagenti

- Ultračista voda, pridelana z Milli-Q – Advantage A 10 (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH), 96 %, M = 46,07 g/mol (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- Acetonitril (CH<sub>3</sub>CN), M = 41,05 g/mol (MS-grade, J.T. Baker, Deventer, Nizozemska)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH), ≥ 99,9 %, M = 32,04 g/mol (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)
- 2-propanol ((CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHOH), M = 60,10 g/mol (Sigma – Aledrich, Steinheim, Nemčija)
- Klorovodikova kislina (HCl 1 M), M = 36,46 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Natrijev hidroksid (NaOH 1 M), M = 40,00 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Kalijev dihidrogen fosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), ≥ 99,5 %, M = 74,55 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

- Heksan (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), M = 85,18 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Etil acetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), M = 88,11 g/mol (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)
- Diklorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), M = 84,93 g/mol (Sigma – Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Mravljična kislina (HCOOH), 98 – 100 %, M = 46,03 g/mol (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)

### 3.1.3 Naprave in pribor

- Polavtomatske pipete: 2 – 20 μL, 20 – 200 μL, 100 – 1000 μL, 1 – 10 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Tehnica AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)
- pH meter PA 220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)
- Pufrne raztopine: pH 4, pH 7, pH 10 (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- TurboVap LV (Caliper, Hopkinton, Massachusetts, ZDA)
- Elektro magnetno mešalo HI 190M (Hanna instruments, Póvoa de Varzim, Portugalska)
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Stresalnik Vibromix 403 EVT (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Centrifuga Centric 322a (Tehtnica, Železniki, Slovenija)
- Vakuumsko-filtracijski sistem z vodno črpalko (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Nemčija)
- Hladilnik 3 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Plastične mikrocentrifugirke 1,5 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Centrifugirke TPP (TPP, Techno Plastic, Products AG, Trasadingen, Švica)
- pH lističi, pH-indicator strips pH 0 – 14 (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Filter ø 70 mm, 589<sup>1</sup> (Schleicher & Schuell BioScience GmbH, Dassel, Nemčija)
- Steklovina: čaše, merilne bučke, lij, epruvete, stekleni vsebniki z navojnim pokrovom (250 mL), merilni valj, polnilne pipete, lij ločnik, vialo, stekleni vložki
- Ostalo: nastavki za pipete, spatule, vzmeti za steklene vložke, zamaški za vialo, Parafilm M, stoparica, magneti, škarje, pinceta, zaščitne rokavice

**Sistem za SPE:**

- Oljna vakuumška črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
- Kadička Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA)
- Kartuše Strata-X 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Plastične brizge 60 mL BD Plastipak (BD Biosciences, ZDA)
- Adapterski nastavki za brizge BD Plastipak (BD Biosciences, ZDA)

**Sistem za Horizon Technology SPE-DEX®:**

- Programska oprema Envision™ platform Controller software
- Oljna vakuumška črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
- Industrijski plin N<sub>2</sub>
- Diski (Atlantic® HLB SPE Disk, Horizon Technology inc., New Hampshire, ZDA)
- Filtri (Atlantic® Fast Flow Sediment Pre-Filters, 1 µm in 5 µm)
- Stekleni vsebnik 1000 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- Viala za eluat 20 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- Posode za odpad



## 3.2 METODE

### 3.2.1 Priprava osnovnih raztopin

#### 3.2.1.1 Primarna osnovna raztopina

Pripravili smo raztopino obravnavanih antidepresivov s koncentracijo 1 mg/mL po sledečem postopku. Na tehtič smo natehtali potrebno maso posameznih antidepresivov in jih raztopili v 1 mL metanola.

#### 3.2.1.2 Sekundarna osnovna raztopina

Sekundarno osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/L smo pripravili s 1000-kratnim redčenjem primarne osnovne raztopine, tako da smo 25  $\mu$ L primarne osnovne raztopine prenesli v 25 mL bučko in z metanolom dopolnili do oznake.

#### 3.2.1.3 Delovna raztopina

Za pripravo delovne raztopine s koncentracijo 1  $\mu$ g/L smo odpipetirali 1 mL sekundarne osnovne raztopine in ga prenesli v 1 L merilno bučko ter dopolnili z ultračisto vodo do oznake.

### 3.2.2 Priprava fosfatnih pufrov

#### 3.2.2.1 Priprava 50, 100 in 250 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4$ pufra, pH 3 in pH 7

Za pripravo 1 L 50 mM pufra smo si predhodno preračunali potrebno količino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Natehtali smo 6,80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , ga kvantitativno prenesli v 1 L merilno bučko, raztopili v ultračisti vodi, dopolnili merilno bučko do oznake in premešali. Pripravljeno raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo s pH metrom umerili na pH  $3,00 \pm 0,05$  s postopnim dodajanjem 1 M HCl. Za pripravo pufra s pH 7 smo naredili enak postopek priprave, le da smo pH umerili na vrednost  $7,00 \pm 0,05$  z dodajanjem 1 M NaOH.

Za pripravo 1 L 250 mM pufra smo natehtali 34,02 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Postopek nadaljnje priprave je bil enak zgornjemu.

Za pripravo 1 L 100 mM pufra smo natehtali 13,61 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Nadaljnji postopek je bil enak zgornjemu. Ta puffer smo pripravili tudi s pH 5. Pripravljeno raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo s pH metrom umerili na vrednost  $5,00 \pm 0,05$  s postopnim dodajanjem 1 M NaOH.

### 3.2.2.2 Priprava 25 mM $KH_2PO_4$ pufra, pH 7

25 mM pufer smo pripravili z 10-kratnim redčenjem 250 mM pufra s pH 7 iz poglavja 3.2.2.1. 10 mL 250 mM pufra smo prenesli v 100 mL merilno bučko in dopolnili do oznake z ultračisto vodo ter dobro premešali.

### 3.2.3 Razvoj LLE

#### 3.2.3.1 Priprava 8 % ACN z 0,05 % $HCOOH$ (rekonstitucijsko topilo)

V 50 mL bučko smo odpipetirali 4 mL acetonitrila in dopolnili z ultračisto vodo do oznake. S tem smo dobili 8 % ACN. Za dokončno pripravo rekonstitucijskega topila smo v bučko dodali še 25  $\mu$ L mravljične kisline in dobili 8 % ACN z 0,05 %  $HCOOH$ .

#### 3.2.3.2 Priprava standardov za LLE

Za potrebe izračuna izkoristka ekstrakcije smo pripravili 2 standarda s pričakovanimi koncentracijama 50 in 100  $\mu$ g/L ob predpostavki 100 % izkoristka.

- 100  $\mu$ g/L: 900  $\mu$ L metanola in 100  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 50  $\mu$ g/L: 950  $\mu$ L metanola in 50  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine

#### 3.2.3.3 Metoda LLE

V steklen vsebnik z navojnim pokrovom smo prenesli 100 mL delovne raztopine in 10 mL izbranega topila. Na stresalniku smo steklene vsebnike vpeli horizontalno in jih stresali eno uro pri srednji hitrosti 150 obratov na minuto. Po končani ekstrakciji smo obe fazi iz steklenega vsebnika prenesli v lij ločnik ter počakali, da se fazi popolnoma ločita. Vodno fazo smo zavrgli, organsko fazo pa smo prenesli v čašo in iz vsake paralelke odpipetirali 1 mL v mikrocentrifugirke ter posušili do suhega. Sušenje je potekalo pol ure v vodni kopeli s 60 °C v napravi TurboVap z zvrtnim tokom dušika. Zaostanek smo raztopili v 100  $\mu$ L rekonstitucijskega topila. Mikrocentrifugirke smo 2 minuti mešali z vrtnjenjem in nato vsebino prenesli v vialo s steklenimi vložki. Odzive antidepressivov smo izmerili s tekočinsko kromatografijo sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS).

Izkoristek smo izračunali po enačbi 1.

$$\text{Izkoristek (\%)} = \frac{\text{odziv vzorca}}{\text{odziv standarda}} * 100$$

(enačba 1)

### 3.2.4 Optimizacija SPE

#### 3.2.4.1 Priprava elucijskega topila

Elucijsko topilo je mešanica acetonitrila, metanola in 2-propanola v razmerju 2 : 1 : 1. S polnilnimi pipetami smo odmerili potrebne volumne, jih prenesli v merilno bučko in premešali.

#### 3.2.4.2 Priprava topila za rekonstitucijo z znano koncentracijo za določanje ME

Pripravili smo 10 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 2 µg/L. V 10 mL merilno bučko smo najprej nalili nekaj mL elucijskega topila, nato smo dodali 20 µL sekundarne osnovne raztopine ter z elucijskim topilom dopolnili do oznake in dobro premešali. Prav tako smo pripravili 10 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 20 µg/L. Postopek je enak, le da smo k elucijskemu topilu v 10 mL bučki dodali 200 µL sekundarne osnovne raztopine.

#### 3.2.4.3 Priprava standardov

Standarde v koncentracijskem območju od 0,1 do 10 µg/L smo pripravili iz standardne raztopine s koncentracijo 10 µg/L. To smo predhodno pripravili v 5 mL merilni bučki, v katero smo odpipetirali 50 µL sekundarne osnovne raztopine ter dopolnili z metanolom. V tabeli 2 so navedeni potrebni volumni raztopine s koncentracijo 10 µg/L in topila za pripravo standardov z določeno koncentracijo.

Tabela 2: Priprava standardnih raztopin za direktno analizo na masnem detektorju

Koncentracija standardov (µg/L)	Volumen standardne raztopine 10 µg/L (µL)	Volumen topila (µL)
0,1	10	990
0,5	50	950
1	100	900
5	500	500
10	1000	0

### 3.2.4.4 Priprava realnega vzorca

Realen vzorec iz čistilnih naprav smo filtrirali preko vakuumsko-filtracijskega sistema z vodno črpalko najprej prek filtra z velikostjo por 1  $\mu\text{m}$ , nato pa še prek celulozno acetatnega filtra z velikostjo por 0,45  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.4.5 Metoda SPE

Najprej smo k 250 mL vodnega vzorca dodali 50 mL 250 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufra s pH 7 in premešali. Pred samim nanosom vzorca na kolono, je potrebno stacionarno fazo aktivirati. V ta namen smo na kolono nanесли 10 mL metanola, za ekvilibracijo pa smo nanесли potem še 3 mL 25 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pufra s pH 7. Pretok je bil 1 mL/min. Po aktivaciji smo nanесли na kolono vzorec ter uravnali pretok na 8 mL/min s pomočjo vakuumske črpalke. Sledilo je vakuumsko sušenje za 10 minut in elucija s 4 mL elucijskega topila v epruvete. Eluat smo prenesli v 25 mL bučke in z elucijskim topilom dopolnili do oznake. Iz bučke smo 1 mL prenesli v vialo ter analizirali z LC-MS/MS.

Ta postopek smo izvedli tudi s 250 mM pufrom  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s pH 3.

### 3.2.4.6 Linearnost SPE

Za določitev linearnosti SPE metode smo pripravili vzorce s petimi različnimi koncentracijami in vzorec s koncentracijo 0 oziroma slepi vzorec. Linearnost smo določili pri pH 3 in 7. Postopek je bil enak, kot je opisan v poglavju 3.2.4.5. V tabeli 3 so podane koncentracije vzorcev, ki smo jih pripravili za nanos na kolono, in potrebni volumni sekundarne osnovne raztopine za pripravo 250 mL vzorca.

Tabela 3: Podatki o vzorcih in njihovi pripravi za določitev linearnosti SPE metode

Volumen sekundarne osnovne raztopine s koncentracijo 1 mg/L ( $\mu\text{L}$ )	Koncentracija vzorca (ng/L)
0	0
250*	10
12,5	50
25	100
125	500
250	1000

\* Iz sekundarne osnovne raztopine smo pripravili vmesno raztopino s koncentracijo 10  $\mu\text{g/L}$  in to smo nato uporabili za pripravo vzorca s koncentracijo 10 ng/L.

Za vsako spojino smo izračunali determinacijski koeficient korelacije ( $R^2$ ). X koordinata je koncentracija vzorca pred eluiranjem, y koordinata pa odziv spojine pri tej koncentraciji. Za določitev linearnosti metode smo se ravnali po FDA smernicah. Te določajo za mejo linearnosti metode vrednost  $R^2 \geq 0,99$  (65).

### ***3.2.4.7 Izračun učinkovitosti postopka priprave, vpliva matriksa in izkoristka ter metoda standardnega dodatka***

Pripravili smo 250 mM pufer  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  s pH 7 in vzorec iz čistilne naprave po postopku, ki je opisan v poglavju 3.2.4.4. Pripravljeni vzorci za ekstrakcijo so bili sledeči:

- slepi vzorec (100 mL ultračiste vode in 20 mL pufra )
- 100 mL vzorca iz ČN in 20 mL pufra
- 100 mL vzorca iz ČN, 20 mL pufra in 20  $\mu\text{L}$  sekundarne osnovne raztopine (SOR)
- 100 mL vzorca iz ČN, 20 mL pufra in 100  $\mu\text{L}$  sekundarne osnovne raztopine (SOR)
- 100 mL vzorca iz ČN, 20 mL pufra in 200  $\mu\text{L}$  sekundarne osnovne raztopine (SOR)

Da smo lahko izračunali želene parametre, smo morali pripraviti tudi vzorce z znano koncentracijo standarda. To so zadnji trije od zgoraj naštetih, ko smo v vzorec dodali sekundarno osnovno raztopino različnih volumnov. Postopek ekstrakcije je opisan v poglavju 3.2.4.5, le da smo v tem primeru zmanjšali volumen vzorca na 100 mL. To smo naredili, ker smo predvidevali, da se bodo kartuše zamašile s snovmi, ki ostanejo v odpadni vodi tudi po filtriranju, kar posledično pomeni ustavitev celotnega procesa ekstrakcije. Eluat smo prenesli v 10 mL merilno bučko in dopolnili do oznake z elucijskim topilom. Iz bučke smo 1 mL prenesli v vialo ter analizirali z LC-MS/MS.

Iz bučke, v kateri je bil eluat slepega vzorca (brez dodatka standardne raztopine), smo po 1 mL prenesli v mikrocentrifugirke in posušili na TurboVap-u do suhega. Po sušenju smo v dve mikrocentrifugirki dodali 1 mL elucijskega topila, v naslednji dve mikrocentrifugirki 100  $\mu\text{L}$  elucijskega topila, v dve 1 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 2  $\mu\text{g/L}$  in v dve 1 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 20  $\mu\text{g/L}$ , z namenom določanja ME (Enačba 3) in izkoristka ekstrakcije (Enačba 4). Mikrocentrifugirke smo 2 minuti mešali z vrtinčenjem, prenesli v vialo ter analizirali na LC-MS/MS. Pripravili smo tudi vzorce standardne raztopine s koncentracijami 2, 10 in 20  $\mu\text{g/L}$ .

Za vsak antidepresiv smo iz odzivov vzorcev iz ČN z znanimi koncentracijami standarda (0,2, 1 in 2  $\mu\text{g/L}$ ), s pomočjo programa Excel, izračunali parametre umeritvenih premic. To

so naklon ( $k$ ), presečišče z  $y$  osjo ( $n$ ) in determinacijski koeficient ( $R$ ). Določili smo tudi enačbo premice:

$$y = k * x + n \quad (\text{enačba 2})$$

kjer  $y$  predstavlja odziv vzorca,  $x$  pa koncentracijo.

Vpliv matriksa (ME) smo izračunali po enačbi 3:

$$ME (\%) = \frac{B - D}{A} * 100 \quad (\text{enačba 3})$$

Izkoristek (v procentih) smo izračunali po enačbi 4:

$$\text{Izkoristek} (\%) = \frac{C - D}{B - D} * 100 \quad (\text{enačba 4})$$

Učinkovitost postopka priprave (PE, v procentih) vključuje tako izkoristek kot tudi vpliv matriksa. Poleg tega se v izračunu PE upoštevajo tudi izgube analitov zaradi nestabilnosti pri postopku priprave in izgube zaradi načrtnih izgub vzorca. Učinkovitost postopka priprave smo izračunali po enačbi 5:

$$PE (\%) = \frac{C - D}{A} * 100 \quad (\text{enačba 5})$$

A...odziv standarda s koncentracijo  $x$

B...odziv vzorca s topilom za rekonstitucijo z znano koncentracijo  $x$

C... odziv vzorca z dodatkom SOR

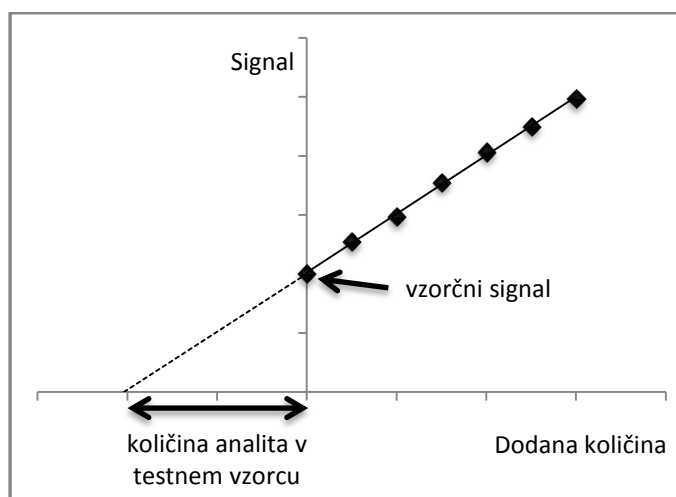
D... odziv vzorca

Koncentracije antidepresivov smo izračunali z metodo standardnega dodatka. Za izvedbo potrebujemo enake volumne preiskovane raztopine. V vse, razen v eno, dodamo različne znane koncentracije SOR in jih nato pripravimo po enakem postopku. Z določeno analizno metodo izmerimo odzive analita v posameznih raztopinah in jih grafično prikažemo, tako da  $y$  os predstavlja odziv,  $x$  os pa koncentracijo analita v raztopini (Slika 7). Skozi točke

potegnemo premico in jo ekstrapoliramo do točke na osi x, kjer je  $y = 0$ . Ta vrednost na x predstavlja koncentracijo analita v raztopini, izračunamo pa jo z enačbo 6 (66).

$$\text{Koncentracija} = - \frac{\text{presečišče z y osjo}}{\text{naklon premice}}$$

(enačba 6)



Slika 7: Metoda standardnega dodatka

### 3.2.5 Optimizacija SPE-DEX

#### 3.2.5.1 Priprava elucijskega topila

Elucijsko topilo je kombinacija acetonitrila, metanola in 2-propanola v razmerju 2 : 1 : 1. Postopek priprave je opisan v poglavju 3.2.4.1.

#### 3.2.5.2 Priprava topila za rekonstitucijo z znano koncentracijo

Pripravili smo 10 mL topila za rekonstitucijo z znanimi koncentracijami. V 10 mL merilno bučko smo najprej nalili nekaj mL topila (zmes acetonitrila, metanola in 2-propanola v razmerju 2 : 1 : 1), nato smo dodali potreben volumen sekundarne osnovne raztopine (Tabela 4) ter s topilom dopolnili do oznake in dobro premešali.

Tabela 4: Priprava topila za rekonstitucijo z znanimi koncentracijami

Koncentracija analitov v topilu ( $\mu\text{g/L}$ )	Volumen sekundarne osnovne raztopine s koncentracijo 1 mg/L ( $\mu\text{L}$ )
2	20
10	100
20	200

### 3.2.5.3 Priprava standardov

Postopek priprave enak kot v poglavju 3.2.4.3.

### 3.2.5.4 Priprava realnega vzorca

Realen vzorec je bil odpadna voda, odvzeta na iztoku komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane.

### 3.2.5.5 Metoda SPE-DEX

Metoda SPE-DEX je deloma avtomatizirana. Avtomatizirani so naslednji postopki: priprava SPE diska (aktivacija stacionarne faze), nanos vzorca, sušenje in spiranje z elucijskim topilom v stekleničko. Sočasno se vzorec tudi filtrira, kar pomeni, da tega koraka predhodno ni potrebno storiti. Kdor izvaja ekstrakcijo, mora napolniti steklenice z ustreznimi topili, odmeriti volumen vzorca, ga prenesti v steklenico in le-to namestiti na napravo ter zagnati program. Po končani eluciji je potrebno eluat prenesti v merilno bučko in dopolniti do konstantnega volumna. Zaradi delnega samodejnega postopka ekstrakcije je raziskovalec veliko bolj razbremenjen, med ekstrakcijo lahko pripravi naslednji vzorec za ekstrakcijo, sam postopek ekstrakcije pa je hitrejši od klasičnega SPE.

250 mL vzorca smo razredčili z 250 mL 50 mM pufru  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ . Vzorce smo pripravljali v treh paralelkah. Uporabili smo predhodno razvito metodo sprogramirano v programu, posamezni cikli le-te pa so navedeni v tabeli 5.

Tabela 5: Metoda ekstrakcije na SPE-DEX

	topilo	čas namakanja (s)	čas sušenja (s)
	metanol	15	0
predpriprava SPE	metanol	15	15
	diska		
	ultračista voda	15	15
	ultračista voda	10	10
nanos vzorca			
	sušenje	60	
	spiranje	180	60
	elucijsko topilo		

Eluat smo prenesli v 25 mL merilno bučko in dopolnili z elucijskim topilom do oznake. 1 mL eluata smo odpipetirali v vialo ter analizirali z LC-MS/MS.



### 3.2.5.6 Linearnost SPE-DEX

Linearnost smo določili tudi za SPE-DEX metodo. Prav tako kot pri določevanju linearnosti na SPE, smo tudi tu uporabili 5 vzorcev z naraščajočimi koncentracijami v območju od 10 do 1000 ng/L ter slepi vzorec. Linearnost smo določili pri pH 3 in 7. Postopek ekstrakcije je bil enak kot je opisan v poglavju 3.2.5.5. Tabela 6 podaja koncentracije vzorcev, ki smo jih pripravili za ekstrakcijo s SPE-DEX, in potrebne volumne sekundarne osnovne raztopine za pripravo 250 mL vzorca z določeno koncentracijo.

**Tabela 6: Podatki o vzorcih in njihovi pripravi za določitev linearnosti SPE-DEX metode**

<b>Volumen sekundarne osnovne raztopine s koncentracijo 1 mg/L (<math>\mu</math>L)</b>	<b>Koncentracija vzorca (ng/L)</b>
0	0
250*	10
12,5	50
25	100
125	500
250	1000

\* Iz sekundarne osnovne raztopine smo pripravili vmesno raztopino s koncentracijo 10  $\mu$ g/L in to smo nato uporabili za pripravo vzorca s koncentracijo 10 ng/L.

Za vsako spojino smo izračunali determinacijski koeficient korelacije. X koordinata je koncentracija vzorca pred eluiranjem, y koordinata pa odziv spojine pri tej koncentraciji. Za določitev linearnosti metode smo se ravnali po FDA smernicah. Te določajo za mejo linearnosti metode vrednost  $R^2 \geq 0,99$  (65).

### 3.2.5.7 Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije

Preverili smo vpliv pH na izkoristek ekstrakcije. Pripravili smo si 100 mM pufre s tremi različnimi pH-ji: 3, 5 in 7. Določevali smo koncentracijo antidepresivov v 24-urnem kompozitnem vzorcu odpadne vode. Kompozitni (sestavljene) vzorec je enoviti vzorec, ki je sestavljen iz večjega števila vzorcev, v vnaprej določenih časovnih intervalih, znotraj 24 ur. Vzorci za ekstrakcijo so si sledili po naslednjem zaporedju:

- slepi vzorec (100 mL ultračiste vode)

- 100 mL vzorca odpadne vode in 100 mL 100 mM pufra, pH 3
- 100 mL vzorca odpadne vode, 100 mL 100 mM pufra, pH 3 in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 100 mL vzorca odpadne vode in 100 mL 100 mM pufra, pH 5
- 100 mL vzorca odpadne vode, 100 mL 100 mM pufra, pH 5 in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 100 mL vzorca odpadne vode in 100 mL 100 mM pufra, pH 7
- 100 mL vzorca odpadne vode, 100 mL 100 mM pufra, pH 7 in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine

Za vsak vzorec smo izvedli dve paralelki. Nadaljnji koraki so enaki kot v poglavju 3.2.5.5. Tiste vzorce, ki jim pred začetkom ekstrakcije nismo dodali sekundarne osnovne raztopine, smo po eluciji tudi sušili. In sicer smo iz teh merilnih bučk po 1 mL prenesli v mikrocentrifugirke in posušili do suhega na TurboVap-u. Suh preostanek smo rekonstituirali v 1 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 10  $\mu$ g/L, 2 minuti mešali z vrtinčenjem, prenesli v vialo ter analizirali na LC-MS/MS. Izkoristek smo izračunali po enačbi 4.

### **3.2.5.8 Vpliv molarnosti pufra na izkoristek ekstrakcije**

Preverili smo, kako molarost pufra vplivata na izkoristek ekstrakcije antidepressivov iz realnega vzorca. Za primerjavo smo uporabili dva različna pufra, pripravljena po zgoraj opisanih postopkih: 50 mM pufer s pH 3 in 250 mM pufer s pH 3. Za ekstrakcijo smo uporabili vzorec, odvzet iz iztoka komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane (7. 4. 2015). Za ekstrakcijo smo si pripravili naslednje kombinacije:

- slepi vzorec (250 mL ultračiste vode)
- 250 mL vzorca iz ČN in 250 mL 50 mM pufra, pH 3
- 250 mL vzorca iz ČN, 250 mL 50 mM pufra, pH 3 in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine (SOR)
- 250 mL vzorca iz ČN in 250 mL 250 mM pufra, pH 3
- 250 mL vzorca iz ČN, 250 mL 250 mM pufra, pH 3 in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine (SOR)

Za vsako kombinacijo smo naredili dve paralelki. Nadaljevanje postopka je opisano v poglavju 3.2.5.5. Eluat smo razredčili z elucijskim topilom v 25 mL bučki. Tiste vzorce, ki

jim pred začetkom ekstrakcije nismo dodali sekundarne osnovne raztopine, smo po eluciji tudi sušili. In sicer smo iz teh merilnih bučk po 1 mL prenesli v mikrocentrifugirke in posušili do suhega na TurboVap-u. Suh preostanek smo rekonstituirali v 1 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 10 µg/L, 2 minuti mešali z vrtinčenjem, prenesli v vialo ter analizirali na LC-MS/MS. Izkoristek smo izračunali po enačbi 4.

### **3.2.5.9 Ponovljivost ekstrakcije s SPE-DEX metodo**

Pripravili smo 50 mM pufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, s pH 3. Naš vzorec, s katerim smo naredili ekstrakcijo, je bila delovna raztopina (koncentracija 1 µg/L). Ponovljivost smo izvedli na šestih zaporednih vzorcih, in sicer smo v steklenici zmešali 250 mL 50 mM pufru s pH 3 in 250 mL delovne raztopine (1 µg/L). Nadaljnji koraki so enaki kot v poglavju 3.2.5.5. Da smo določili, ali je metoda ponovljiva, smo izračunali relativno standardno deviacijo po enačbi 7.

$$\text{Relativna standardna deviacija (\%)} = \frac{\text{standardna deviacija}}{\text{povprečje odzivov vzorca}} * 100 \quad (\text{enačba 7})$$

### **3.2.5.10 Ponovljivost injiciranja na masnem spektrometru**

Na masnem spektrometru smo preverili ponovljivost injiciranja. Med analizo vzorcev iz prejšnjega poglavja smo naključni vzorec injicirali petkrat zapored. Za eno spojino iz iste vialo smo tako dobili pet odzivov. Za določitev ponovljivost smo izračunali povprečno vrednost odzivov in standardno deviacijo, s pomočjo katerih smo izračunali RSD po enačbi 7.

### **3.2.5.11 Izračun učinkovitosti postopka priprave, vpliva matriksa in izkoristka ter metoda standardnega dodatka**

Pripravili smo 50 mM pufer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> s pH 3 in vzorec iz čistilne naprave. Vzorec iz ČN smo tudi 10-krat redčili. To smo storili zato, ker smo želeli kasneje uporabiti to metodo še za druge potencialne onesnaževalce okolja, ki nastopajo v bistveno višjih koncentracijah (npr. kofein se v odpadnih vodah nahaja tudi v koncentracijah do 1 mg/L). Hkrati to ni problematično za antidepresive, saj je zanje to zelo občutljiva metoda in z redčenjem ne izgubimo na uporabnosti. Poleg tega pa z redčenjem zmanjšamo tudi vpliv matriksa.

Pripravljeni vzorci za ekstrakcijo so bili sledeči:

- slepi vzorec (500 mL ultračiste vode)

- 250 mL vzorca iz ČN in 250 mL pufra
- 250 mL vzorca iz ČN, 250 mL pufra in 50  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 250 mL vzorca iz ČN, 250 mL pufra in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 250 mL vzorca iz ČN, 250 mL pufra in 500  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 25 mL vzorca iz ČN, 225 mL ultračiste vode in 250 mL pufra
- 25 mL vzorca iz ČN, 225 mL ultračiste vode, 250 mL pufra in 50  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 25 mL vzorca iz ČN, 225 mL ultračiste vode, 250 mL pufra in 250  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine
- 25 mL vzorca iz ČN, 225 mL ultračiste vode, 250 mL pufra in 500  $\mu$ L sekundarne osnovne raztopine

Vzorcem smo dodali znan volumen sekundarne osnovne raztopine in po eluiranju dobili vzorce z dodanimi določenimi koncentracijami standarda (2, 10 in 20  $\mu$ g/L) ob predpostavki 100 % izkoristka. Postopek ekstrakcije je opisan v poglavju 3.2.5.5.

Iz bučke, v kateri je bil eluat slepega vzorca (brez dodatka standardne raztopine), in iz bučke z eluatom redčenega slepega vzorca (brez dodatka standardne raztopine) smo po 1 mL prenesli v mikrocentrifugirke in posušili na TurboVap-u do suhega. Po sušenju smo preostanek rekonstituirali v različnih topilih. V dve mikrocentrifugirki smo dodali 1 mL elucijskega topila, v naslednji dve mikrocentrifugirki 100  $\mu$ L elucijskega topila, v dve 1 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 2  $\mu$ g/L in v dve 1 mL topila za rekonstitucijo s koncentracijo 20  $\mu$ g/L, z namenom določanja ME (Enačba 3) in izkoristka ekstrakcije (Enačba 4). To smo naredili za redčen in neredčen vzorec. Mikrocentrifugirke smo 2 minuti mešali z vrtnčenjem, prenesli v vialo ter analizirali na LC-MS/MS. Pripravili smo tudi vzorce standardne raztopine s koncentracijami 2, 10 in 20  $\mu$ g/L.

Iz odzivov vzorcev z znanimi koncentracijami standarda (0,2, 1 in 2  $\mu$ g/L) smo, s pomočjo programa Excel, izračunali parametre umeritvenih premic. To so naklon ( $k$ ), presečišče z  $y$  osjo ( $n$ ) in determinacijski koeficient ( $R$ ). Določili smo enačbo premice  $y = k \cdot x + n$  (enačba 2), v kateri  $y$  predstavlja odziv vzorca,  $x$  pa koncentracijo.

Učinkovitost postopka priprave (PE, v procentih) smo izračunali z enačbo 5, vpliv matriksa (ME) po enačbi 3 in izkoristek (v procentih) po enačbi 4. Koncentracijo antidepresivov

smo izračunali na enak način kot v poglavju 3.2.4.7, in sicer po metodi standardnega dodatka z enačbo 6.

### 3.2.6 Tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo

Za analizo vzorcev smo uporabili tekočinsko kromatografijo, sklopljeno s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Kromatografska separacija je potekala na reverzno fazni koloni Poroshell C18 100 × 3 mm (Agilent Technologies, ZDA) pri temperaturi 50 °C. Mobilna faza je bila sestavljena iz A: 0,05 % HCOOH v vodi in B: 99 % ACN. Uporabljena je bila gradientna elucija s procenti topila A in pretoki, kot so navedeni v tabeli 7. Postopoma smo povečevali delež organskega topila in s tem se je skrajšal čas elucije. Poleg tega ta način omogoča tudi boljšo ločitev preiskovanih snovi. Volumen injiciranja vsakega vzorca je bil 1 µL, čas analize posameznega vzorca pa 8,2 min.

Tabela 7: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze pri tekočinski kromatografiji

Čas (min)	Pretok (mL/min)	Delež topila A (%)
0,5	0,5	85
1	0,65	85
2	0,65	67
3	0,65	65
4,8	0,65	60
5,1	0,65	50
5,3	0,65	30
6,5	0,65	5
6,7	0,65	5
6,9	0,65	92
8,2	0,5	

Sistem tekočinske kromatografije je sklopljen z elektronskim razprševalnikom Agilent Jet Stream ESI, kjer poteka ionizacija analitov. Nastali molekularni in fragmentirani ioni potujejo v masni analizator, kjer poteka ločevanje. V našem primeru je to trojni kvadrupolni masni analizator. Nastavitve ionskega izvora so podane v tabeli 8.

Tabela 8: Parametri ionskega izvora

Temperatura sušilnega plina	275 °C
Pretok plina	10 L/min
Nebulizator	45 psi (3,1 bar)
Temperatura plašča	350 °C
Pretok plina v plašču	11 L/min
Napetost na kapilari	4000 V
Napetost na šobi	1000 V

Za kvantifikacijo smo uporabili multirezidualno analizo (MRM). Masni prehodi, kolizijske energije in napetosti fragmentorja izbranih antidepresivov ter polarnost so zbrani v tabeli 9.

Tabela 9: MRM prehodi, napetosti fragmentorja in kolizijske energije izbranih antidepresivov

	<i>m/z</i> prehod	Napetost fragmentorja (V)	Kolizijska energija (eV)	Polariteta ionizacija
<b>amitriptilin</b>	278,2 → 91	103	24	pozitivna
<b>dezipramin</b>	267,2 → 72,1	98	12	pozitivna
<b>escitalopram</b>	325,2 → 109	81	29	pozitivna
<b>fluoksetin</b>	310,1 → 148,1	100	1	pozitivna
<b>sertralin</b>	306,1 → 158,9	60	24	pozitivna
<b>venlafaksin</b>	278,2 → 58,1	81	17	pozitivna

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 RAZVOJ LLE

#### 4.1.1 Primerjava ekstrakcijskih topil

Na izkoristek ekstrakcije antidepresivov iz vodne raztopine vpliva narava organskega topila, zato smo sprva preverili različna topila in izbrali najbolj primerne za nadaljnje poskuse. Uporabili smo naslednja topila: heksan, etil acetat (EtAc), heksan : EtAc = 80/20 (v/v), 50/50 (v/v) in 20/80 (v/v) ter diklorometan (DCM). V steklen vsebnik z navojnim pokrovom smo prenesli 100 mL delovne raztopine in 10 mL enega izmed topil. Za vsako topilo smo izvedli dve paralelki. Nadaljnji postopek je povzet v poglavju 3.2.3.3. Pripravili smo tudi standard s koncentracijo 100 µg/L. Izkoristek (%) smo izračunali po enačbi 1, RSD (%) pa po enačbi 7.

Tabela 10: Primerjava ekstrakcijskih topil za LLE

	Izkoristek [%] (RSD)				DCM
	Heksan	Heksan : EtAc 80 : 20	Heksan : EtAc 50 : 50	Heksan : EtAc 20 : 80	
ESC	0,1 (13,8)	0,0 (35,5)	0,3 (125,7)	3,9 (84,0)	24,8 (51,2)
VEN	0,0 (18,3)	0,0 (10,9)	0,1 (106,0)	0,5 (84,7)	3,8 (43,6)
DEZ	0,0 (31,6)	0,0 (16,3)	0,1 (107,5)	2,5 (88,7)	5,7 (56,0)
AMI	7,5 (17,9)	0,1 (72,6)	9,9 (143,4)	34,1 (85,1)	24,9 (56,1)
FLU	0,2 (20,9)	0,0 (33,1)	0,9 (124,8)	20,1 (87,7)	10,4 (57,9)
SER	2,3 (24,3)	0,0 (12,6)	4,4 (135,6)	39,2 (87,2)	21,5 (67,3)

DCM – diklorometan; EtAc – etil acetat

Ugotovili smo, da je za ekstrakcijo najmanj primeren etil acetat, saj je z vodno fazo tvoril emulzijo, fazi pa se nista ločili tudi po daljšem času mirovanja. Zaradi tega vzorca nismo mogli analizirati. Najboljše rezultate glede izkoristka je izmed vseh izbranih topil dal DCM, vendar so bili tudi v tem primeru izkoristki manjši od 25 %. Ponovljivost je bila pri DCM slaba, saj so RSD za vse učinkovine presegale 40 % (Tabela 10). Kljub nizkim izkoristkom smo optimizacijo nadaljevali z DCM, saj se je izkazal za najboljše ekstrakcijsko topilo.

#### 4.1.2 Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije

Preverili smo, kako vpliva pH na izkoristek ekstrakcije. Delovno raztopino smo umerili na različne pH vrednosti (pH 3, 5, 7 in 9) z 1 M HCl oziroma 1 M NaOH. Vsako delovno

raztopino z določenim pH-jem smo stresali z DCM ter za vsako kombinacijo naredili dve paralelki. 100 mL vzorca z določenim pH-jem in 10 mL DCM smo prenesli v steklen vsebnik z navojnim pokrovom ter jih horizontalno postavljene stresali na stresalniku eno uro pri hitrosti 150 obratov na minuto. Nadaljevanje postopka je bilo enako kot v poglavju 3.2.3.3. Izkoristek (%) smo izračunali po enačbi 1, RSD (%) pa po enačbi 7.

Tabela 11: Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije

	Izkoristek [%] (RSD)			
	pH 3	pH 5	pH 7	pH 9
<b>ESC</b>	11,8 (13,2)	24,6 (4,2)	47,2 (15,8)	77,4 (15,0)
<b>VEN</b>	0,2 (8,2)	1,3 (28,3)	19,5 (60,2)	50,7 (22,2)
<b>DEZ</b>	2,4 (18,8)	3,1 (30,7)	23,3 (25,7)	38,4 (27,0)
<b>AMI</b>	22,1 (28,3)	34,1 (42,5)	14,8 (88,5)	27,2 (26,8)
<b>FLU</b>	1,5 (15,3)	4,8 (41,9)	12,7 (31,9)	21,0 (52,5)
<b>SER</b>	5,6 (31,2)	26,1 (39,0)	10,0 (65,0)	14,7 (51,8)

Rezultati (Tabela 11) so pokazali, da naj bi bil najboljša izbira pH 9, saj pri tem pH dobimo najvišje izkoristke, a še vedno so le-ti razmeroma nizki. V tem primeru pri pH 9 je ponovljivost slabša kot pri pH 3. V večini primerov je RSD višji od 15 %, kar ni sprejemljivo za dobro ponovljivost, zato smo za nadaljnji razvoj uporabili pH delovne raztopine pri vrednosti 3, saj je bila tu najboljša ponovljivost.

#### 4.1.3 Vpliv časa na izkoristek ekstrakcije

Čas stresa je tudi pomemben in vpliva na izkoristek ekstrakcije, zato smo v enem izmed poskusov preučili tudi ta parameter, hkrati pa smo izvedli še vpliv pH-ja. Za poskus smo uporabili delovno raztopino. V prvem poskusu pH-ja nismo uravnali, s pH lističi pa smo ugotovili, da znaša približno 4,5. V drugem smo delovno raztopino uravnali z 1 M HCl na pH 3. Kot ekstrakcijsko topilo smo uporabili DCM. Da bi določili vpliv časa stresa, smo obe delovni raztopini stresali 0,5, 1 in 2 uri. Vsebnike smo stresali horizontalno pri srednji hitrosti 150 obratov na minuto. Nadaljnji postopek je bil enak kot v poglavju 3.2.3.3. Izkoristek (%) smo izračunali po enačbi 1, RSD (%) pa po enačbi 7.



Tabela 12: Vpliv časa stresanja na izkoristek ekstrakcije (neuravnan pH)

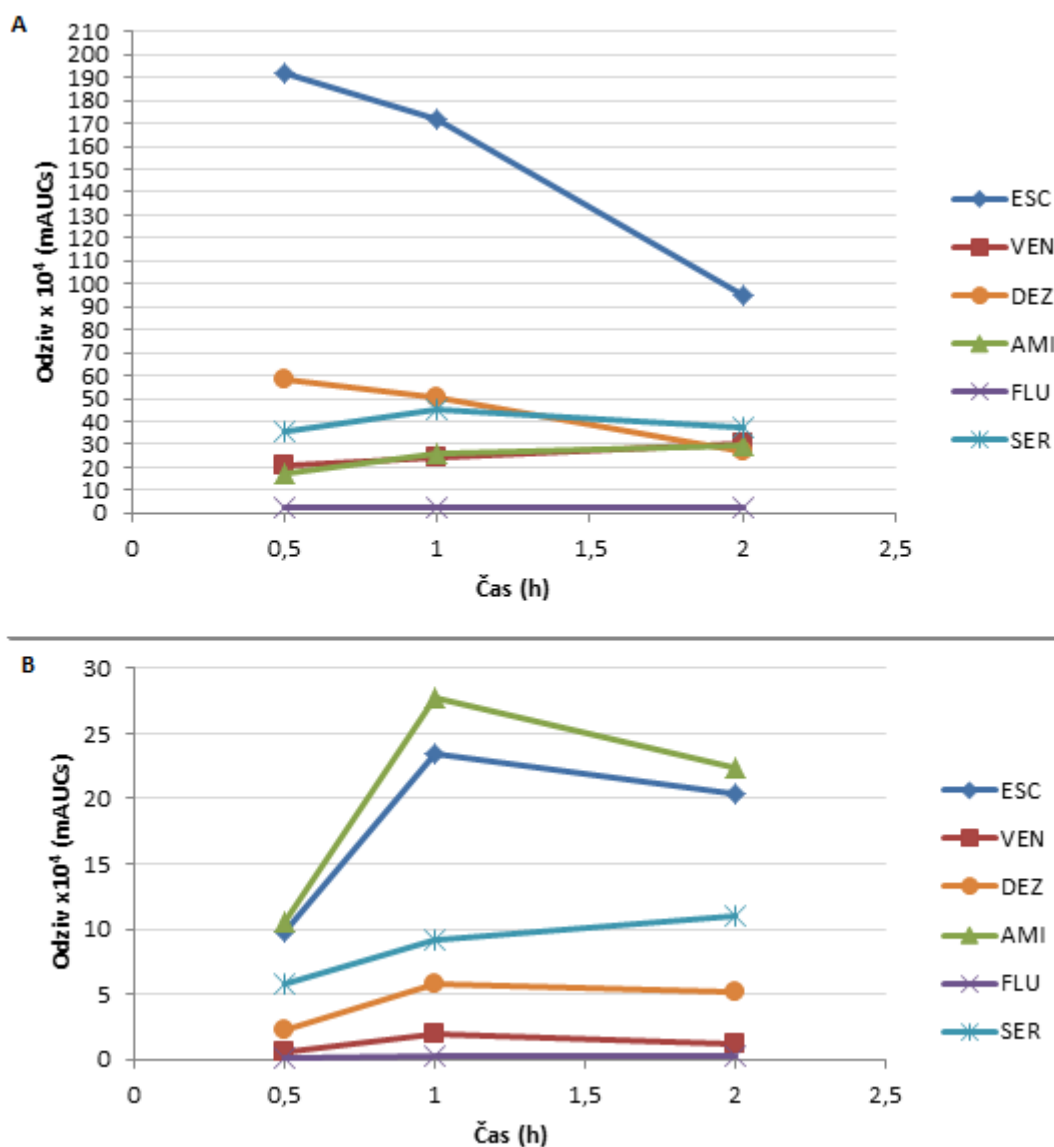
	Izkoristek [%] (RSD)		
	0,5 h	1 h	2 h
<b>ESC</b>	51,4 (13,7)	46,1 (12,8)	25,5 (114,8)
<b>VEN</b>	3,1 (53,0)	3,6 (34,6)	4,5 (113,9)
<b>DEZ</b>	11,2 (21,4)	9,7 (23,4)	5,1 (116,3)
<b>AMI</b>	9,9 (43,7)	14,8 (38,9)	16,6 (112,6)
<b>FLU</b>	8,6 (11,8)	9,4 (48,2)	7,8 (116,3)
<b>SER</b>	11,8 (17,7)	15,0 (52,1)	12,7 (116,5)

Tabela 13: Vpliv časa stresanja na izkoristek ekstrakcije (pH 3)

	Izkoristek [%] (RSD)		
	0,5 h	1 h	2 h
<b>ESC</b>	2,6 (142,6)	6,3 (65,9)	5,5 (70,7)
<b>VEN</b>	0,1 (114,0)	0,3 (69,8)	0,2 (62,2)
<b>DEZ</b>	0,4 (137,7)	1,1 (96,9)	1,0 (82,6)
<b>AMI</b>	6,0 (131,6)	15,7 (63,0)	12,7 (62,1)
<b>FLU</b>	0,4 (80,0)	1,0 (66,6)	0,8 (46,9)
<b>SER</b>	1,9 (78,4)	3,1 (54,5)	3,7 (48,5)

Rezultati, zbrani v tabeli 12 in 13, so pokazali, da je bil izkoristek ekstrakcije slabši za vse učinkovine v vseh treh časovnih točkah pri pH 3. Boljše izkoristke smo dobili pa v primeru, ko pH-ja vzorca nismo uravnavali in je ta znašal približno 4,5. Ponovljivost zopet ni bila dobra, saj so bile vrednosti RSD nad 15 % v veliki večini.

Slika 8 prikazuje dva grafa. Graf A predstavlja odvisnost odziva posameznih učinkovin na LC-MS/MS od časa stresanja pri neuravnanim pH, graf B pa pri pH 3. Pri vzorcu z neuravnanim pH-jem (Graf A) ne moremo določiti, kateri čas stresanja bi bil najboljši, saj imajo odzivi različen trend. Vendar pa se iz grafa B, ko smo vzorcu uravnali pH na vrednost 3, lepo vidi, da je največji odziv opazen po 1 h, kar pomeni, da je takrat največ učinkovin prešlo v organsko fazo. To ne velja za sertralin, saj je izkoristek zanj boljši po dvournem stresanju. Po 2 h smo izmerili nižji odziv antidepressivov v organski fazi kot po 1 h stresanja, kar si sicer težko razložimo, a takšne so bile naše meritve. Zato smo se odločili, da bo čas stresanja v nadaljnjih poskusih 1 h.



Slika 8: Odziv na LC-MS/MS v odvisnosti od časa stresanja (Graf A predstavlja vzorec z neuravnanim pH vodne faze, Graf B predstavlja vzorec z uravnanim pH vodne faze na vrednost 3)

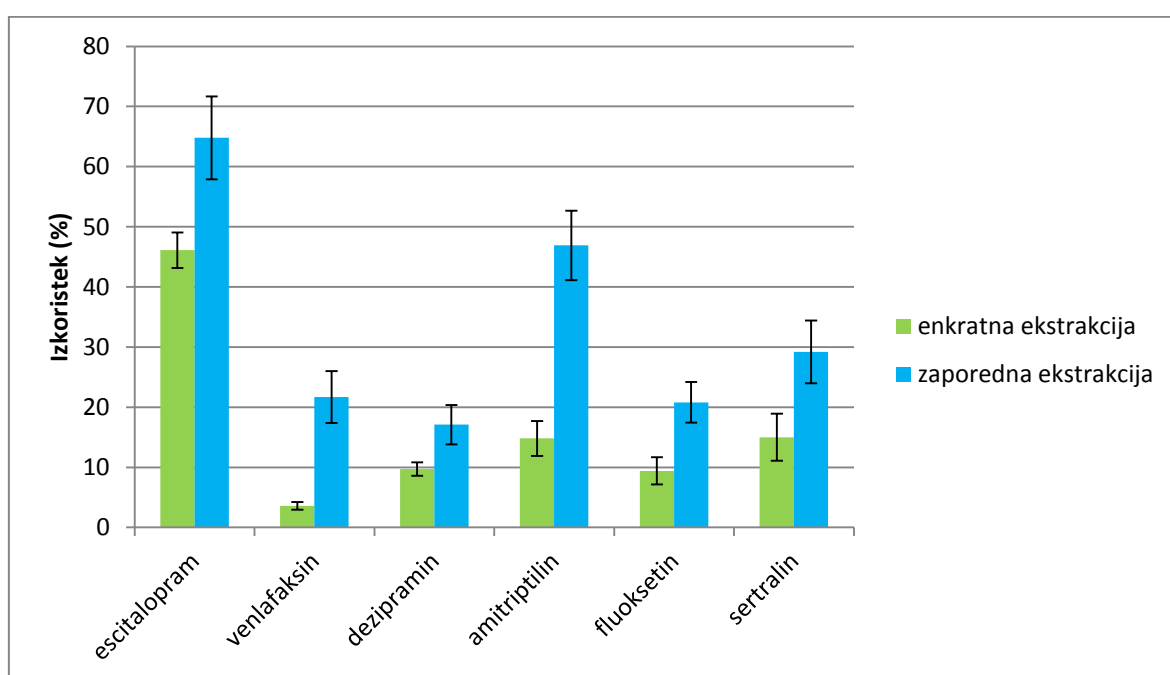
#### 4.1.4 Zaporedna ekstrakcija

Eden izmed načinov izboljšanja izkoristka ekstrakcije je tudi zaporedna ekstrakcija. V steklenem vsebniku smo zmešali 100 mL vzorca, to je bila delovna raztopina, in 10 mL DCM. Sledilo je enourno stresanje v horizontalnem položaju pri hitrosti 150 obratov na minuto. Nato smo prenesi obe fazi v lij ločnik in počakali, da se fazi popolnoma ločita. Organsko fazo, ki je bila na dnu, smo ločili, vodni fazi, ki je ostala v liju ločniku, pa smo dodali svež DCM. Vsebnike smo zopet stresali 1 uro pri enakih pogojih ter nato fazi prelili v lij ločnik. Organsko fazo smo ločili v čašo in jo združili z DCM iz prvega stresanja. Ta poskus smo izvedli v treh paralelkah. V mikrocentrifugirke smo prenesli po 1 mL iz vsake paralelke ter posušili do suhega. Zaostanku v mikrocentrifugirkah smo dodali po 100  $\mu$ L

rekonstitucijskega topila, 2 minuti mešali z vrtnčenjem, prenesli v vialo s steklenimi vložki ter vzorce analizirali z LC-MS/MS. Pričakovana koncentracija pri 100 % izkoristku je bila 50 µg/L, zato smo pripravili tudi standard s to koncentracijo. Izkoristek smo izračunali po enačbi 1.

Tabela 14: Ponovljivost enkratne in zaporedne ekstrakcije

	RSD (%)					
	ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
Enkratna ekstrakcija	12,8	34,6	23,4	38,9	48,2	52,1
Zaporedna ekstrakcija	33,1	48,4	46,8	47,2	39,7	43,9



Slika 9: Primerjava izkoristkov enkratne in zaporedne ekstrakcije pri posameznih učinkovinah z dodanimi intervali standardnih napak vzorca

Iz rezultatov izkoristkov (Slika 9) se je izkazalo, da je zaporedna ekstrakcija boljša od enkratne za vse učinkovine. Pri escitalopramu je izkoristek v obeh primerih ekstrakcije najvišji. Pri venlafaksinu se je izkoristek pri zaporedni ekstrakciji povečal 6-krat, pri amitriptilinu pa približno 3-krat. Pri ostalih antidepresivih pa se je izkoristek povečal okrog 2-krat. Vendar kljub boljšim izkoristkom, pa je ponovljivost zaporedne ekstrakcije slabša, saj so vrednosti RSD > 33 % (Tabela 14). Tudi pri enkratni ekstrakciji je ponovljivost neprimerna, razen za escitalopram je v okviru dovoljene vrednosti.

Predstavljene so začetne stopnje razvoja metode LLE za ekstrakcijo antidepresivov iz vodne faze. Za ekstrakcijsko topilo smo izbrali DCM in uravnan pH vodne faze na 3. Steklениčke smo stresali 1 h pri hitrosti 150 obratov na minuto, na kar smo zamenjali organsko topilo s svežim in stresali ponovno 1 h pri istih pogojih. Vendar kljub temu smo prišli do zaključka, da metoda LLE ni najbolj primerna za ekstrakcijo antidepresivov, saj so izkoristki zelo nizki, metoda pa ni ponovljiva. Težava so organska topila, ki z vodo tvorijo težko ločljive disperzije, in zaradi tega otežujejo ločevanje. Najbolj primeren glede tega bi bil DCM, vendar je to nevarna kemikalija, ki ima škodljive učinke tako na zdravje kot tudi na okolje. Pridobljeni rezultati služijo kot osnova za nadaljnjo izboljšavo. Metodo bi bilo potrebno dodatno optimizirati, da bi povišali izkoristke ter izboljšali ponovljivost, vendar je LLE obsoletna metoda s številnimi slabostmi in novejšje metode izkazujejo številne prednosti, kot na primer manjša poraba topil in krajši čas eksperimentov. Odločili smo se, da preverimo uspešnost ekstrakcije z novejšimi pristopi.

## **4.2 OPTIMIZACIJA SPE**

Izhodišče je bila predhodno razvita in uporabljena metoda v laboratorijih na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so jo raziskovalci na katedri razvili na vzorcih, pripravljenih v ultračisti vodi, z znanimi koncentracijami analitov, in jo nato uporabili na vzorcih odpadnih voda. Metodo so razvili z manjšim naborom analitov iz različnih farmakoloških skupin. Na osnovi teh predhodnih rezultatov smo nadaljevali z optimizacijo metode za izbrane antidepresive. Preverili smo linearnost metode, določili mejo določitve, izkoristek, procent napake za vsak antidepresiv ter izračunali učinkovitost metode, vpliv matriksa in koncentracijo antidepresivov v odpadnih vodah.

### **4.2.1 Linearnost SPE**

Linearnost je zmožnost metode, da v določenem območju zagotavlja rezultate, ki so premo sorazmerni s koncentracijo oziroma vsebnostjo preiskovane spojine v vzorcu (64). Linearnost metode SPE smo ugotavljali v koncentracijskem območju 0,01 - 1  $\mu\text{g/L}$ . Za pH 3 in pH 7 smo izvedli ekstrakcijo slepega vzorca ter petih različnih koncentracij antidepresivov, in sicer smo za vsako koncentracijo naredili tri paralelke. Nato smo izračunali povprečne vrednosti odzivov antidepresivov za vsako koncentracijo, ki so nam služile za izračun naslednjih parametrov: RSD, izkoristek,  $R^2$ , določili regresijsko premico in mejo določitve (Tabela 15).

Tabela 15: Izkoristki in determinacijski koeficienti (metoda SPE)

		RSD (%)	Izkoristek (%)	R <sup>2</sup>	% napake pri koncentraciji 100 ng/L	Meja določitve (ng/L)
ESC	pH 3	0,1	106,5	0,9999	-4,7	50
	pH 7	0,2	125,8	0,9969	-5,5	50
VEN	pH 3	0,7	108,6	0,9999	-1,9	50
	pH 7	0,5	130,0	0,9997	-5,4	50
DEZ	pH 3	1,5	106,5	1,0000	-0,6	10
	pH 7	0,7	121,6	0,9999	-5,2	50
AMI	pH 3	0,5	105,2	0,9999	-2,1	50
	pH 7	0,3	123,3	0,9999	-3,2	50
FLU	pH 3	3,4	107,0	0,9997	-0,1	10
	pH 7	2,5	120,9	0,9988	-14,4	50
SER	pH 3	0,5	107,0	0,9996	-2,2	50
	pH 7	0,5	119,1	0,9999	-3,5	50

Za vse izbrane učinkovine pri pH 3 in 7 je metoda linearna v območju 0,01 - 1 µg/L, saj so vsi R<sup>2</sup> višji od vrednosti, ki zagotavlja linearnost metode (R<sup>2</sup> ≥ 0,99).

Iz regresijske premice smo za vsako učinkovino izračunali koncentracijo, nato pa izračunali procent odstopanja izračunane koncentracije od dejanske. Meja sprejemljivosti odstopanja izračunane koncentracije od dejanske je bila ± 20 %. Vsi rezultati so temu pogoju ustrezali.

Procent napake smo določili za celotno koncentracijsko območje. Najnižja koncentracija, pri kateri smo izračunali procent napake manjši od ± 20 %, je meja določitve. Meja določitve je najnižja koncentracija spojine v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo z ustrezno natančnostjo in točnostjo. Vrednosti so zapisane v tabeli 15.

Ponovljivost ekstrakcije smo ugotavljali na treh paralelkah koncentracije 1 µg/L in izračunali RSD. Za mejo sprejemljive ponovljivosti smo določili vrednost RSD ≤ 20 %. Na podlagi rezultatov v tabeli 15 lahko zaključimo, da vsi rezultati dosegajo sprejemljive vrednosti pri pH 3 in 7. Ravno tako smo pri tej koncentraciji izračunali tudi izkoristek ekstrakcije. Izračunali smo ga z enačbo 1. Izkoristki so bili okrog 100 %. Pri pH 3 so bili izkoristki med seboj bolj primerljivi (med 105,2 % in 108,6 %) kot pri pH 7 (med 119,1 % in 130,0 %), zato smo za nadaljnjo delo izbrali pH 3.

#### 4.2.2 Učinkovitost postopka priprave in izkoristek ekstrakcije ter vpliv matriksa

Realni vzorci, v našem primeru je to odpadna voda iz čistilnih naprav, lahko vsebujejo poleg pričakovanih preiskovanih spojin tudi druge komponente (sluzi, trde delce, detergente, maščobe, minerale, mikroorganizme,...), ki jim pravimo ozadje ali matriks. Ta lahko vpliva na izkoristek ekstrakcije, lahko ga poveča ali zmanjša. Vpliv je potrebno določiti, saj brez tega lahko določimo lažno previsoke ali prenizke koncentracije. Kadar znaša ME nad 100 %, pride do povečanja odziva na LC-MS/MS in obratno, če je ME pod 100 %, je odziv nižji. Poleg tega je potrebno določiti, kakšna je učinkovitost postopka priprave, saj le ta ni 100 % in lahko privede do izračuna napačnih vrednosti koncentracij analitov v vzorcih.

Analizirali smo dva vzorca. Oba vzorca sta bila odpadna voda, vzeta na iztoku komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane. Prvi je bil vzet 7. 4. 2015, drugi 20. 4. 2015. Vzorca smo ekstrahirali s klasično metodo SPE. Vzorec, odvzet 20. 4. 2015, smo ekstrahirali tudi z metodo SPE-DEX. Ker je bila voda umazana, smo predvidevali, da se bodo kartuše zamašile, zato smo za ekstrakcijo z metodo SPE vzorec 10-krat redčili. V tabeli 16 in tabeli 17 so za oba vzorca zbrani podatki za PE, ME, izkoristek in koncentracijo za vsak antidepresiv. Učinkovitost postopka priprave smo določili pri dveh koncentracijah 0,2 in 2 µg/L. Vrednosti se gibljejo med 62,8 % in 96,4 %, po pričakovanjih pa so te vrednosti nekoliko višje pri višji koncentraciji. Te vrednosti bi sicer morale biti enake. Vendar je zaradi izgub, vezave na delovni material, to različno, izgube pa so bolj opazne pri nižjih koncentracijah kot višjih.

ME ni značilno vplival na odziv signalov pri analizi, saj so rezultati znotraj dovoljene meje  $\pm 15$  %. Zaradi tehničnih težav ena vrednost za venlafaksin ni bila izmerjena.

Izkoristek ekstrakcije smo izračunali po enačbi 4. Za prvi vzorec so bili izkoristki med 69,1 in 102,0 %, medtem ko za drugi vzorec med 62,5 in 90,1 %. Če primerjamo med seboj rezultate izkoristkov za vsak posamezen antidepresiv, so izkoristki med sabo primerljivi ( $\pm 10$  %) za vzorce z višjo koncentracijo. Večja odstopanja pa so pri analitih pri nižji koncentraciji. Predvsem je možno lepljenje na delovni material, s tem se izgublja preiskovani analit, odstopanja na rezultatih pa se tako bolj poznajo pri nižji koncentraciji.

**Tabela 16: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepressivov v vzorcu – klasična metoda SPE (vzorec odvzet 7. 4. 2015)**

		ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
PE (%)	0,2 µg/L*	92,6	85,7	79,5	86,3	62,8	68,8
	2 µg/L*	96,4	93,9	85,5	94,9	82,3	87,0
ME (%)	0,2 µg/L*	101,7	/	88,8	98,5	91,0	96,3
	2 µg/L*	99,9	92,0	88,4	102,4	90,5	101,5
Izkoristek (%)	0,2 µg/L*	90,5	95,6	89,5	87,6	69,1	71,5
	2 µg/L*	96,5	102,0	96,7	92,7	90,9	85,7

\* koncentracija standardne raztopine v vzorcu po eluiranju, pri katerih smo izračunali posamezne parametre.

**Tabela 17: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepressivov v vzorcu – klasična metoda SPE (vzorec odvzet 20. 4. 2015)**

		ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
PE (%)	0,2 µg/L*	70,7	74,7	77,6	64,9	74,6	64,8
	2 µg/L*	83,0	85,8	78,9	83,8	76,3	74,6
ME (%)	0,2 µg/L*	98,5	91,6	97,3	96,2	110,1	103,7
	2 µg/L*	93,9	95,2	91,0	98,5	92,3	94,7
Izkoristek (%)	0,2 µg/L*	71,8	81,6	79,8	67,5	67,8	62,5
	2 µg/L*	88,4	90,1	86,7	85,1	82,7	78,8

\* koncentracija standardne raztopine v vzorcu po eluiranju, pri katerih smo izračunali posamezne parametre.

#### 4.2.3 Določanje koncentracij v odpadni vodi

Koncentracijo antidepressivov smo izračunali po metodi standardnega dodatka, ki je opisana v poglavju 3.2.4.7. Na graf smo nanašali odzive vzorcev, ki smo jim pred ekstrakcijo dodali sekundarno osnovno raztopino različnih koncentracij. Odziv 0 je predstavljal vzorec brez dodane sekundarne osnovne raztopine. Za vsak antidepressiv smo narisali premico, določili naklon, presečišče z y-osjo,  $R^2$  ter z enačbo 6 izračunali koncentracijo v odpadni vodi. Rezultati so zbrani v tabeli 18. Ugotovili smo, da v obeh vzorcih, ki smo ju ekstrahirali z metodo SPE, ni dezipramina, amitriptilina, fluoksetina in sertralina, hkrati pa je koncentracija venlafaksina višja kot koncentracija escitaloprama. Escitalopram se pojavlja v nizkih koncentracijah, in sicer 150,6 in 56,9 ng/L, medtem ko je koncentracija venlafaksina nekoliko višja, 1509,5 ter 293,6 ng/L.

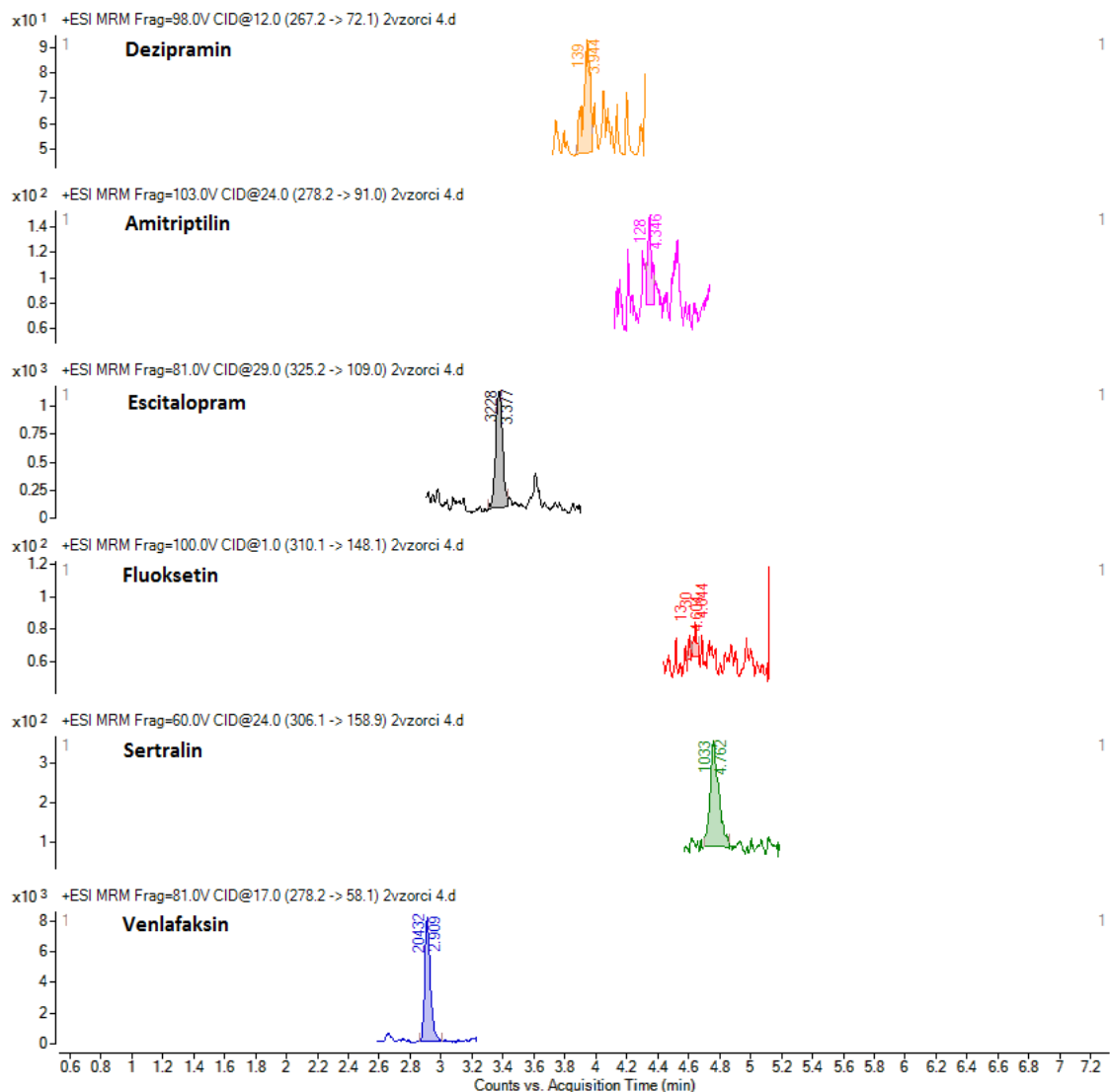
**Tabela 18:** Izračunane koncentracije antidepressivov v dveh vzorcih odpadnih vod, ekstrahiranih z metodo SPE, ter izračunani parametri premice (naklon, presečišče z y-osjo,  $R^2$ )

		<b>ESC</b>	<b>VEN</b>	<b>DEZ</b>	<b>AMI</b>	<b>FLU</b>	<b>SER</b>
<b>7. 4. 2015</b>	Naklon	36773	57460	37450	17453	2321	26646
	Presečišče z y-osjo	5538	86735	-14702	-4916	-788	-8324
	$R^2$	0,9995	0,9988	0,9979	0,9990	0,9984	0,9977
	Koncentracija (ng/L)	150,6	1509,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>20. 4. 2015</b>	Naklon	33557	62258	44521	14820	2170	23672
	Presečišče z y-osjo	1239	18277	-3789	-1548	-567	-3163
	$R^2$	1,0000	1,0000	0,9999	0,9999	0,9985	0,9997
	Koncentracija (ng/L)	56,9	293,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

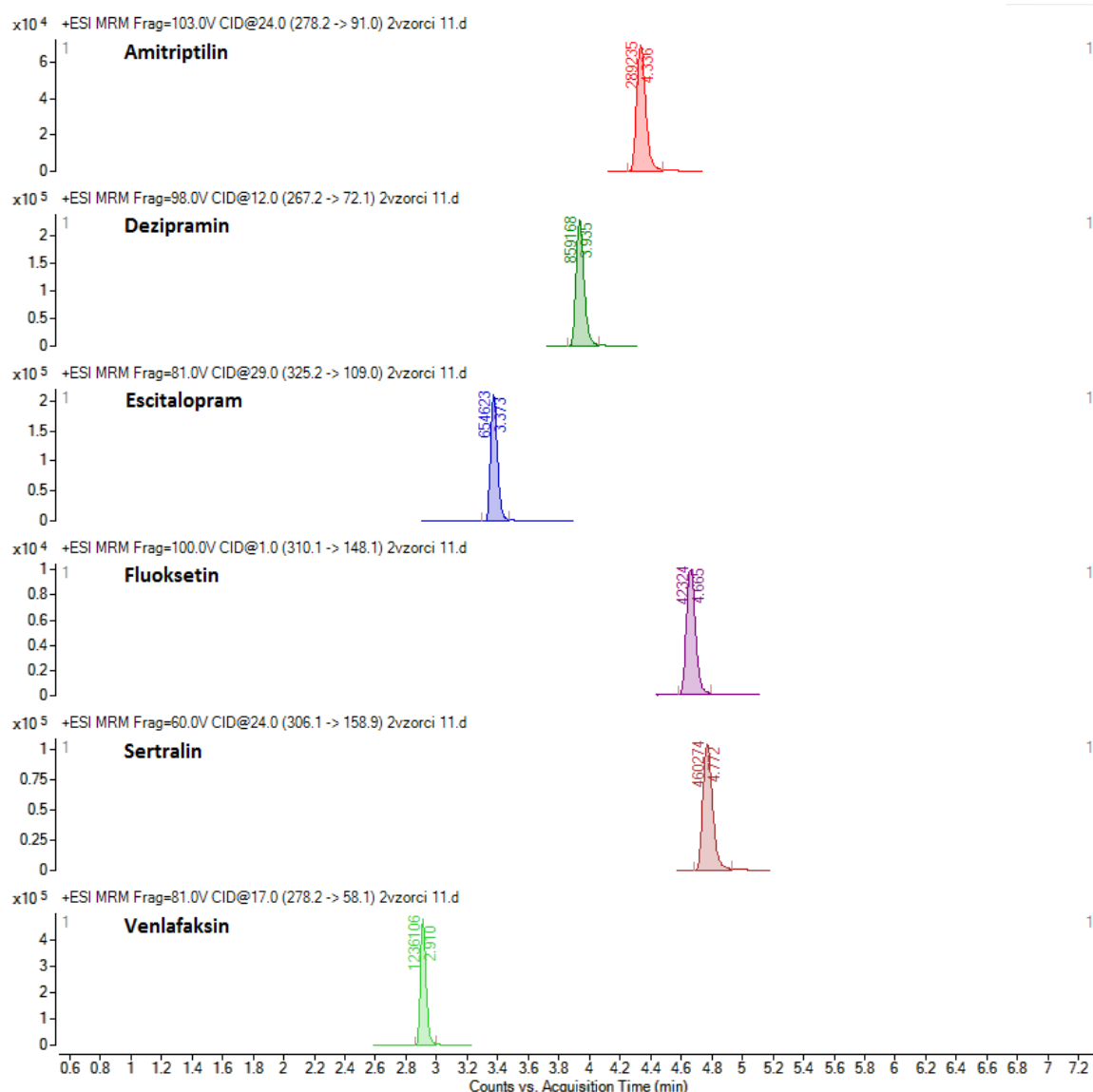
n.d. – nedoločeno

Na sliki 10 so predstavljeni LC-MS/MS kromatogrami preiskovanih antidepressivov v vzorcu odpadne vode, iz iztoka komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane, ki smo ga ekstrahirali s SPE. Na sliki 11 pa so predstavljeni LC-MS/MS kromatogrami preiskovanih antidepressivov v vzorcu odpadne vode, iz iztoka komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane, ki smo mu pred začetkom ekstrakcije dodali znano koncentracijo sekundarne osnovne raztopine.





Slika 10: LC-MS/MS kromatogrami ločbe preiskovanih antidepresivov pri vzorcu odpadne vode iz iztoka čistilne naprave, odvzeta 20. 4. 2015



Slika 11: LC-MS/MS kromatogrami ločbe preiskovanih antidepresivov pri vzorcu odpadne vode iz iztoka čistilne naprave, odvzeta 20. 4. 2015, ki smo mu pred ekstrakcijo dodali sekundarno osnovno raztopino

Koncentracije učinkovin v odpadnih in ostalih vodah se iz dneva v dan spreminjajo, zato je težko narediti primerjavo z ostalimi državami. Na podlagi pridobljenih rezultatov lahko samo okvirno povemo, kam Slovenija sodi. Za primerjavo smo izbrali štiri evropske države (Češka, Portugalska, Srbija, Poljska), v katerih so bile raziskave narejene v letu 2014. Koncentracije izbranih antidepresivov v odpadnih vodah v teh državah so zbrani v tabeli 1 v prvem poglavju. Amitriptilina in dezipramina v nobeni od teh štirih raziskav niso določili, ravno tako kot pri nas. V našem vzorcu nismo določili fluoksetina in sertralina, medtem ko je fluoksetin prisoten v odpadni vodi na Poljskem in Portugalskem (12, 14, 38), sertralin pa na Češkem (10). Koncentracije escitaloprama in venlafaksina so v Sloveniji in

ostalnih državah glede na te rezultate podobne. Vzrokov, zakaj je tako težko primerjati med sabo države glede na koncentracije učinkovin v odpadni vodi, je veliko. Na prvem mestu je različna poraba po posameznih državah, zato direktna primerjava ni možna. Problem je tudi poseljenost, saj lahko nekje na določeni površini živi malo ljudi, spet drugod pa mogoče tudi do 10-krat več. Čistilne naprave so nekje obnovljene ali na novo izgrajene, v revnejših državah so te že dotrajane in niso sposobne odstraniti učinkovin v dovolj velikem obsegu. Tudi ozaveščenost ljudi, kako naj ravnajo z nerabljenimi zdravili, ni povsod enaka, zato marsikdo še vrže neuporabljena zdravila v stranišče. To so le nekateri vzroki, zakaj je zapleteno primerjati take podatke.

### **4.3 OPTIMIZACIJA SPE-DEX**

Izhodišče je bila predhodno razvita in uporabljena metoda v laboratorijih na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, ki so jo raziskovalci na katedri razvili na vzorcih, pripravljenih v ultračisti vodi, z znanimi koncentracijami analitov, in jo nato uporabili na vzorcih odpadnih voda. Metodo so razvili z manjšim naborom analitov iz različnih farmakoloških skupin. Na podlagi teh rezultatov smo nadaljevali z optimizacijo metode za izbrane antidepresive na različnih nivojih. Preverili smo linearnost metode, določili mejo določitve, izkoristek, procent napake za vsak antidepresiv, ugotavljali smo vpliv pH in molarnosti na izkoristek ter izračunali učinkovitost metode, vpliv matriksa in koncentracijo antidepresivov v odpadnih vodah.

#### **4.3.1 Linearnost SPE-DEX**

Linearnost metode SPE-DEX smo ugotavljali v koncentracijskem območju 0,01 - 1 µg/L. Za pH 3 in 7 smo izvedli ekstrakcijo slepega vzorca ter petih različnih koncentracij antidepresivov, in sicer smo za vsako koncentracijo naredili tri paralelke. Nato smo izračunali povprečne vrednosti odzivov antidepresivov za vsako koncentracijo, ki so nam služile za izračun naslednjih parametrov: RSD, izkoristek,  $R^2$ , določili regresijsko premico in mejo določitve (Tabela 19).

Tabela 19: Linearnost SPE-DEX pri pH 3 in pH 7

		RSD (%)	Izkoristek (%)	R <sup>2</sup>	% napake pri koncentraciji 100 ng/L	Meja določitve (ng/L)
ESC	pH 3	2,0	74,8	0,9997	-3,0	10
	pH 7	2,2	72,1	0,9985	9,8	50
VEN	pH 3	4,0	64,4	0,9996	-5,5	10
	pH 7	1,9	73,0	0,9978	5,6	100
DEZ	pH 3	2,7	73,7	0,9996	10,0	50
	pH 7	2,7	61,8	0,9978	8,1	50
AMI	pH 3	1,4	69,1	0,9996	13,3	50
	pH 7	1,4	67,2	0,9977	7,1	50
FLU	pH 3	1,6	69,1	0,9994	13,1	50
	pH 7	3,8	66,0	0,9986	7,2	50
SER	pH 3	2,1	68,3	0,9997	9,1	10
	pH 7	1,9	56,2	0,9978	6,5	50

Za vse antidepresive pri pH 3, kot tudi pH 7 je metoda SPE-DEX linearna v območju 0,01 - 1 µg/L, saj so vsi R<sup>2</sup> višji od vrednosti, ki zagotavlja linearnost metode (R<sup>2</sup> ≥ 0,99).

Iz regresijske premice smo za vsako učinkovino izračunali koncentracijo, nato pa izračunali procent odstopanja izračunane koncentracije od dejanske. Določena meja odstopanja izračunane koncentracije od dejanske je bila ± 20 %. Vsi rezultati so temu pogoju ustrezali. Hkrati smo določili procent napake za celotno koncentracijsko območje. Najnižja koncentracija, pri kateri smo izračunali procent napake manjši od ± 20 %, je meja določitve. Te vrednosti so zapisane v tabeli 19.

Ponovljivost ekstrakcije smo ugotavljali na treh paralelkah koncentracije 1 µg/L in izračunali RSD. Za mejo sprejemljive ponovljivosti smo določili vrednost RSD ≤ 20 %. Na podlagi rezultatov v tabeli 19 lahko povemo, da so vse vrednosti RSD manjše od sprejemljive meje tako pri pH 3 kot pri 7. Če primerjamo med seboj obe metodi, SPE in SPE-DEX, lahko povemo, da imata obe metodi ustrezno ponovljivost pri koncentraciji 1 µg/L, pri SPE pa smo izračunali v povprečju 2 % nižje vrednosti RSD kot pri SPE-DEX. Pri koncentraciji 1 µg/L smo izračunali tudi izkoristek ekstrakcije z enačbo 1. Tudi v tem primeru smo dobili višje izkoristke pri pH 3 (68,3 – 73,7 %) kot pri pH 7 (56,2 – 73,0 %), vendar so izkoristki ekstrakcije nižji, kot smo jih dobili z metodo SPE.

### 4.3.2 Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije

Preverili smo vpliv treh pH-jev: 3, 5 in 7. Najvišje izkoristke smo dobili pri pH 3 za vse učinkovine, razen za venlafaksin. Za tega se je izkazalo, da je ekstrakcija učinkovitejša pri pH 5. Razlike med izkoristki so izjemno majhne (Tabela 20).

Tabela 20: Vpliv pH na izkoristek ekstrakcije

	Izkoristek (%)		
	pH 3	pH 5	pH 7
<b>ESC</b>	88,3	86,0	81,2
<b>VEN</b>	81,8	83,4	82,3
<b>DEZ</b>	88,9	88,0	73,2
<b>AMI</b>	88,6	84,8	72,5
<b>FLU</b>	86,6	82,4	77,9
<b>SER</b>	87,6	80,4	66,8

Ugotovili smo, da je najbolj primeren pH za ekstrakcijo večine antidepresivov pH 3 in tega smo v nadaljevanju tudi uporabljali.

### 4.3.3 Vpliv molarnosti pufru na izkoristek ekstrakcije

Preverili smo vpliv dveh molarnosti (50 in 250 mM). Realen vzorec odpadne vode je kompleksno sestavljen in komponente, ki so prisotne v njem, lahko pomembno vplivajo na pH. Če se želimo čim bolj približati pH-ju vzorca, ki bi bil najbolj primeren za ekstrakcijo, moramo uporabiti pufer z višjo kapaciteto. To dosežemo tako, da povišamo molarnost. Če pufrna kapaciteta ni dovolj visoka, bo imel vzorec drugačen pH, kot bi si ga želeli in s tem ne bi dobili pravega izkoristka. Izkoristki pri višji molarnosti so bili primerljivi kot izkoristki pri nižji, saj se med sabo niso razlikovali za več kot 3 % za posamezne učinkovine (Tabela 21).

Tabela 21: Vpliv molarnosti pufru na izkoristek ekstrakcije

	Izkoristek (%)	
	pH 3, 50 mM	pH 3, 250 mM
<b>ESC</b>	44,6	43,9
<b>VEN</b>	41,6	42,2
<b>DEZ</b>	42,6	42,1
<b>AMI</b>	42,0	41,1
<b>FLU</b>	40,8	38,6
<b>SER</b>	40,9	38,2

Za nadaljnje poskuse smo se odločili, da bomo uporabili 50 mM pufer s pH 3.

#### 4.3.4 Ponovljivost ekstrakcije s SPE-DEX metodo

Ponovljivost je natančnost rezultatov, pridobljenih z določeno metodo, v kratkem časovnem obdobje, pod ponovljivimi pogoji (isti analitik in isti vzorec v istem dnevu znotraj istega laboratorija) (64). Ugotavljali smo, ali je metoda SPE-DEX ponovljiva za ekstrakcijo vseh obravnavanih antidepresivov. Za ekstrakcijo smo uporabili koncentracijo antidepresivov 1 µg/L. Izračunali smo standardne odklone in RSD. Za zadovoljivo mejo ponovljivosti smo izbrali vrednost  $RSD \leq 20\%$ . Rezultati so zbrani v tabeli 22. Na podlagi teh rezultatov lahko trdimo, da je metoda ekstrakcije SPE-DEX ponovljiva, saj zadošča postavljenemu kriteriju.

Tabela 22: Ponovljivost SPE-DEX metode

	ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
<b>RSD (%)</b>	2,29	0,80	1,46	1,07	2,72	2,56

#### 4.3.5 Učinkovitost postopka priprave in izkoristek ekstrakcije ter vpliv matriksa

V poglavju 4.2.2 so predstavljeni rezultati ekstrakcije vzorca odpadne vode iz iztoka komunalne ČN vasi iz obrobja Ljubljane, odvzetega 20. 4. 2015, z metodo SPE, v tem poglavju pa so zbrani rezultati ekstrakcije istega vzorca z novejšo metodo SPE-DEX. V tabeli 23 so zbrane izračunane vrednosti za neredčen vzorec, za primerjavo pa smo naredili ekstrakcijo tudi z 10-krat redčenim vzorcem (Tabela 24).

Učinkovitost postopka priprave je boljša pri redčenem vzorcu za vse antidepresive razen za venlafaksin (Tabeli 23 in 24). Tu lahko sklepamo, da ravno snovi, ki so prisotne v odpadni vodi, motijo ekstrakcijo in njeno učinkovitost. V primerjavi z metodo SPE je SPE-DEX glede na rezultate, zbrane v tabelah 17 in 24, učinkovitejša metoda, vendar so razlike majhne.

ME ni značilno vplival na odziv signalov pri analizi, saj so rezultati znotraj dovoljene meje  $\pm 15\%$ , razen za fluoksetin, kjer ena vrednost pri neredčenem vzorcu odstopa.

Izkoristki ekstrakcije so boljši za vzorec, ki smo ga 10-krat redčili, kar ponovno potrjuje dejstvo, da preostale komponente v vzorcu odpadne vode motijo proces ekstrakcije. Vrednosti izkoristkov ekstrakcije iz odpadnih vod za antidepresive se gibljejo med 73,4 in 83,7 % za redčen vzorec. Če primerjamo med seboj izkoristke ekstrakcije antidepresivov,

ki smo jih dobili z eno in drugo metodo, so vrednosti primerljive, saj so po metodi SPE izkoristki 62 – 102 %.

**Tabela 23: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepressivov v vzorcu – metoda SPE-DEX; neredčen vzorec**

		<b>ESC</b>	<b>VEN</b>	<b>DEZ</b>	<b>AMI</b>	<b>FLU</b>	<b>SER</b>
PE (%)	0,2 µg/L*	62,1	73,5	68,3	57,0	51,0	34,9
	2 µg/L*	77,9	79,0	77,1	78,7	67,0	66,2
ME (%)	0,2 µg/L*	101,8	100,1	115,1	97,2	123,4	106,7
	2 µg/L*	91,4	95,4	94,2	96,2	95,2	93,7
Izkoristek (%)	0,2 µg/L*	61,0	73,5	59,3	58,7	41,4	32,7
	2 µg/L*	85,3	82,7	81,8	81,8	70,4	70,7

\* koncentracija standardne raztopine v vzorcu po eluiranju, pri katerih smo izračunali posamezne parametre.

**Tabela 24: Izračunane vrednosti za učinkovitost postopka priprave, vpliv matriksa, izkoristek ekstrakcije ter koncentracije antidepressivov v vzorcu – metoda SPE-DEX; 10-krat redčen vzorec**

		<b>ESC</b>	<b>VEN</b>	<b>DEZ</b>	<b>AMI</b>	<b>FLU</b>	<b>SER</b>
PE (%)	0,2 µg/L*	77,4	72,7	89,9	76,9	85,4	80,3
	2 µg/L*	76,5	71,8	79,2	80,5	77,0	76,9
ME (%)	0,2 µg/L*	100,3	99,1	114,6	101,1	115,1	105,8
	2 µg/L*	93,5	97,5	95,2	96,2	92,8	93,5
Izkoristek (%)	0,2 µg/L*	77,2	73,4	78,4	76,1	74,2	75,9
	2 µg/L*	81,8	73,7	83,2	83,7	82,9	82,3

\* koncentracija standardne raztopine v vzorcu po eluiranju, pri katerih smo izračunali posamezne parametre.

Glede na pridobljene rezultate lahko rečemo, da sta klasična metoda SPE in napredna metoda SPE-DEX med sabo primerljivi, vendar bi za ekstrakcijo antidepressivov izbrali novejšo metodo, ki ima veliko prednosti, kot so krajši čas ekstrakcije, manjše možnosti mašenja kartuš, predhodno filtriranje ni potrebno ter zmanjšan volumen porabljenih topil v primerjavi z ostalimi metodami. Poleg tega so nekateri procesi avtomatizirani, zaradi tega je delo za operaterja dokaj nezahtevno.

#### 4.3.6 Določanje koncentracij v odpadni vodi

Koncentracijo smo ravno tako kot za SPE izračunali z metodo standardnega dodatka. V neredčenem vzorcu smo za escitalopram in venlafaksin določili podobne koncentracije, kot

v vzorcu, ki smo ga ekstrahirali z metodo SPE. Rezultati so navedeni v tabeli 25. Escitaloprama je bilo v vzorcu 86,1 ng/L, venlafaksina pa 286,2 ng/L. Dezipramin in sertralin sta bila pod mejo določitve, amitriptilina in fluoksetina pa nismo določili.

**Tabela 25:** Izračunane koncentracije antidepresivov v vzorcu odpadne vode, ekstrahiranem z metodo SPE-DEX, ter izračunani parametri premice (naklon, presečišče z y-osjo,  $R^2$ )

	ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
Naklon	30643	54561	35104	13651	1835	16512
Presečišče z y-osjo	26390	156138	615	-6756	-738	6419
$R^2$	0,9950	0,9934	0,9928	0,9910	0,9958	0,9883
Koncentracija (ng/L)	86,1	286,2	< LOQ	n.d.	n.d.	< LOQ

LOQ – meja določitve  
n.d. – nedoločeno

#### 4.3.7 Ponovljivost injiciranja na masnem spektrometru

Ponovljivost analizne metode smo ugotavljali na vzorcu s koncentracijo 1  $\mu\text{g/L}$ . Injektor je izvedel pet zaporednih injiciranj, mi pa smo iz petih odzivov za vsak posamezen antidepresiv izračunali povprečje odzivov ter standardni odklon, kar je služilo za izračun RSD. Za mejo ponovljivost analizne metode smo določili vrednost  $\leq 5\%$ . Rezultati zbrani v tabeli 26 kažejo, da je analizna metoda ponovljiva za vse izbrane učinkovine.

**Tabela 26:** Ponovljivost injiciranja na LC-MS/MS

	ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
RSD (%)	0,6	0,7	1,1	0,8	1,5	0,9

## 4.4 SKUPNA PRIMERJAVA METOD

### 4.4.1 Primerjava validacijskih parametrov

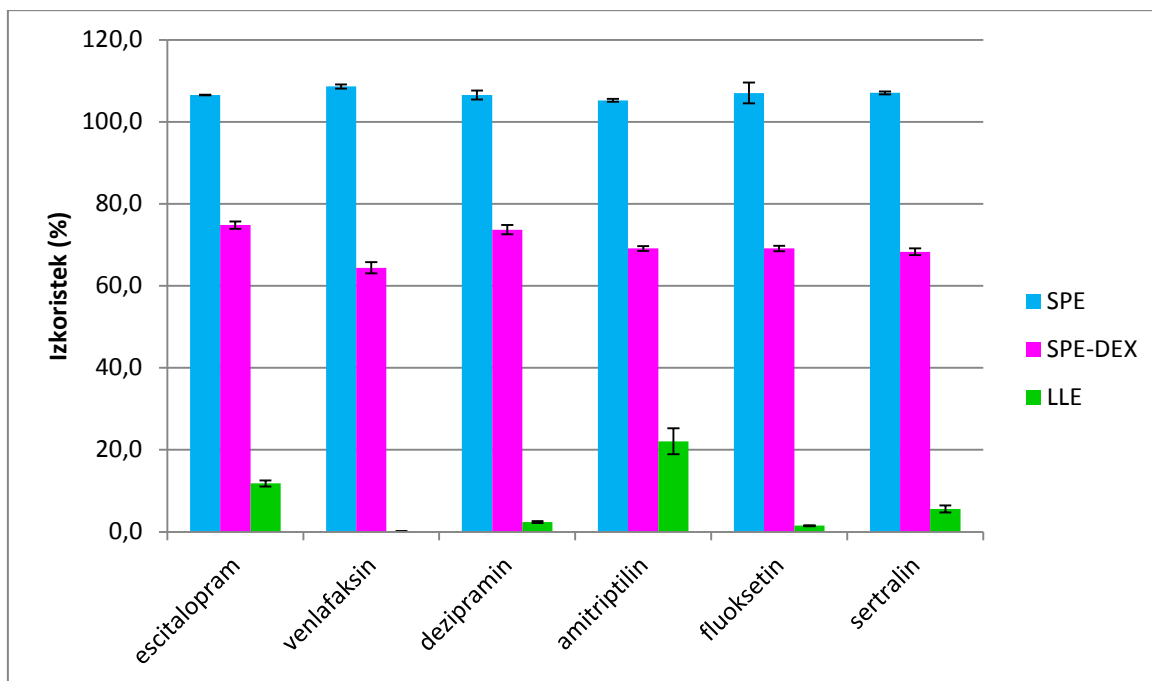
V tabeli 27 so zbrani osnovni validacijski parametri za vse tri preučevane ekstrakcijske metode. Ponovljivost je za vse izbrane antidepresive dobra za metodi SPE in SPE-DEX. Izkoristki so pri metodi SPE nad 100 %, medtem ko so pri SPE-DEX med 64 in 75 %. Pri LLE so izkoristki zelo nizki v primerjavi z ostalima metodama, kar je vidno tudi na stolpičnem diagramu (Slika 12), na katerem so prikazani tudi intervali standardnih napak vzorca. Meje določitve se gibljejo med 10 in 50 ng/L odvisno od učinkovine in metode. Pri escitalopramu, venlafaksinu in sertralinu se meja določitve z metodo SPE-DEX v primerjavi s SPE izboljša, in sicer iz 50 ng/L na 10 ng/L. Za obe metodi so vsi  $R^2 > 0,999$ ,



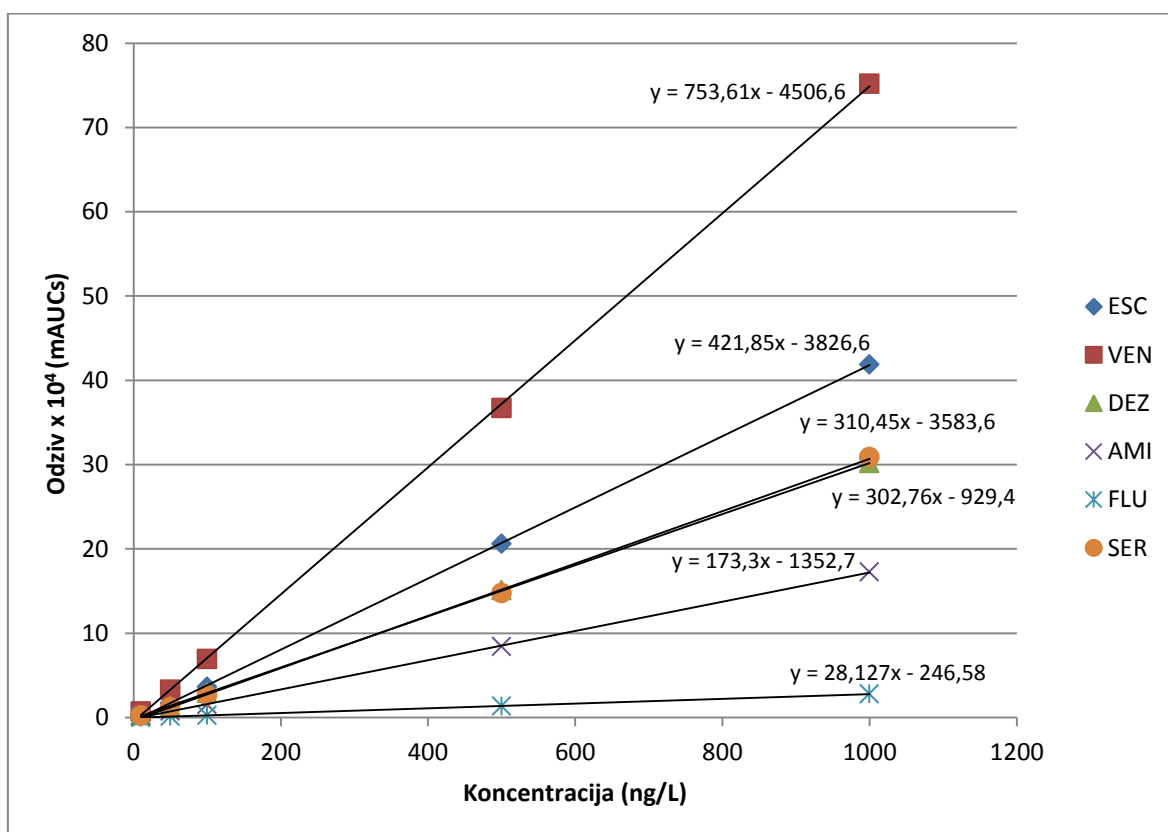
kar nakazuje linearnost metod. Grafični prikaz kalibracijskih premic za obe metodi je predstavljen na slikah 13 in 14. LLE je zelo slabo ponovljiva metoda in tudi izkoristki so zelo slabi (0 – 22 %). Zaradi slabih rezultatov smo opustili razvoj te metode.

Tabela 27: Osnovni validacijski parametri standardnih raztopin izbranih antidepresivov v ultračisti vodi

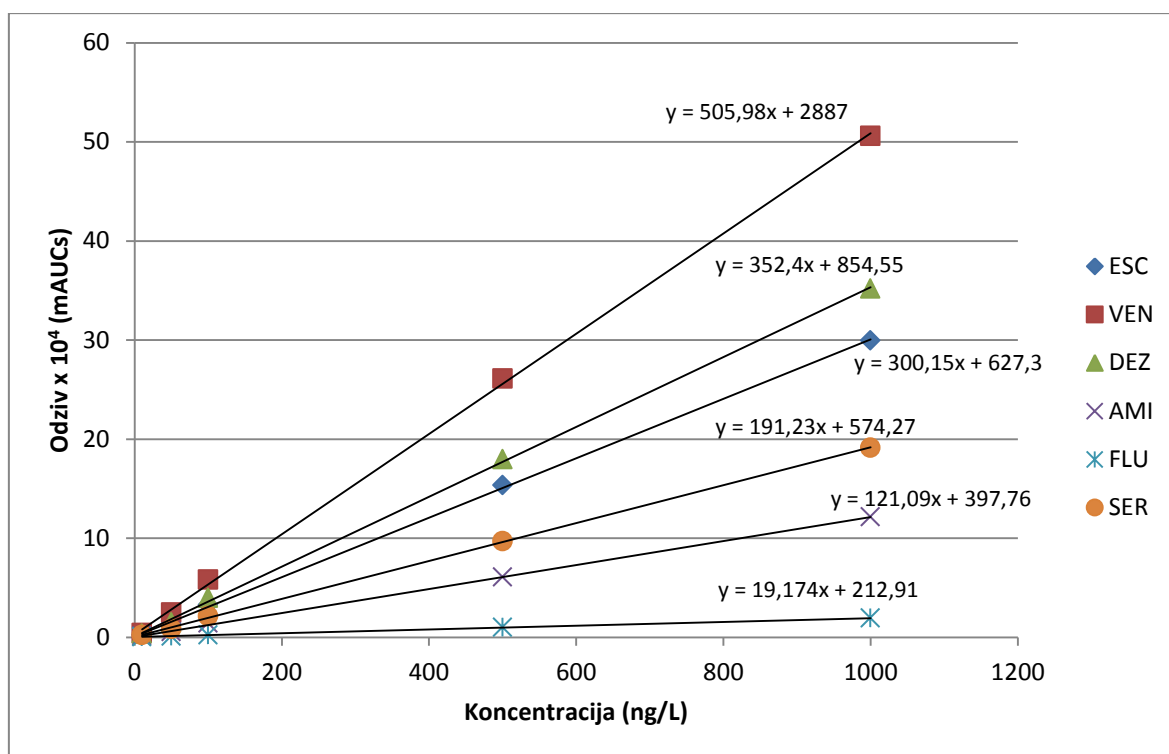
	<b>SPE</b>	<b>SPE-DEX</b>	<b>LLE</b>
<b>Escitalopram</b>			
Izkoristek (RSD) [%]	106,5 (0,1)	74,8 (2,0)	11,8 (13,2)
LOQ [ng/L]	50	10	
R <sup>2</sup>	0,9999	0,9997	
<b>Venlafaksin</b>			
Izkoristek (RSD) [%]	108,6 (0,7)	64,4 (4,0)	0,2 (8,2)
LOQ [ng/L]	50	10	
R <sup>2</sup>	0,9999	0,9996	
<b>Dezipramin</b>			
Izkoristek (RSD) [%]	106,5 (1,5)	73,7 (2,7)	2,4 (18,8)
LOQ [ng/L]	10	50	
R <sup>2</sup>	1,0000	0,9996	
<b>Amitriptilin</b>			
Izkoristek (RSD) [%]	105,2 (0,5)	69,1 (1,4)	22,1 (28,3)
LOQ [ng/L]	50	50	
R <sup>2</sup>	0,9999	0,9996	
<b>Fluoksetin</b>			
Izkoristek (RSD) [%]	107,0 (3,4)	69,1 (1,6)	1,5 (15,3)
LOQ [ng/L]	10	50	
R <sup>2</sup>	0,9997	0,9994	
<b>Sertralin</b>			
Izkoristek (RSD) [%]	107,0 (0,5)	68,3 (2,1)	5,6 (31,2)
LOQ [ng/L]	50	10	
R <sup>2</sup>	0,9996	0,9997	



Slika 12: Primerjava izkoristkov treh metod ekstrakcije z dodanimi intervali standardnih napak vzorca



Slika 13: Grafični prikaz kalibracijskih premic z metodo SPE za izbrane antidepresive



Slika 14: Grafični prikaz kalibracijskih premic z metodo SPE-DEX za izbrane antidepresive

Za ekstrakcijo antidepresivov in tudi drugih učinkovin je v literaturi navedeno veliko razvitih metod s SPE, nekoliko manj z LLE, metodo SPE-DEX pa ni prav veliko (67), tudi za ostale učinkovine ta metoda ni bila pogosto uporabljena (68, 69, 70). Analizo se največkrat izvajali z LC-MS/MS (14, 15, 18 – 20, 23, 27, 28, 38) ali redkeje tudi z GC-MS (24, 32). Za veliko raziskav z metodo SPE so uporabljali kartuše Oasis HLB<sup>®</sup> (14, 15, 23, 38), ki ima podobno sestavo stacionarne faze, kot smo jo mi uporabljali za ekstrakcijo s SPE-DEX (Atlantic<sup>®</sup> HLB SPE Disk). pH vzorcev so umerili na vrednost 3 (14, 15, 18, 20), tako kot smo naredili tudi mi, v nekaterih primerih pa tudi na pH 12 (27, 29). Linearnost so določevali v območju s spodnjimi mejami od 0,1 do 10 ng/L in z zgornjimi mejami 1000 – 2000 ng/L (15, 20, 68). Mi smo linearnost dokazali v območju 10 – 1000 ng/L. Vrednosti za meje določitve so v pregledanih člankih za metodo SPE različne in znašajo od 0,04 ng/L (20) do 13 ng/L (19). Večinoma so vse vrednosti za meje določitve pod 1 ng/L (15, 20, 23, 27, 38). Mi smo za metodo SPE izmerili meje določitve med 10 in 50 ng/L. Toda potrebno je omeniti, da so bile te meje določene z različnimi metodološkimi pristopi, na primer večinoma so jih določevali na vzorcih z obogatitvijo čiste vode s standardi in ne v prisotnosti matriksa odpadnih vod. Poleg tega ocenjene vrednosti mnogokrat izstopajo iz intervala linearnosti. Zaradi teh razlogov težko direktno primerjamo naše meje določitve z do sedaj objavljenimi metodami.

#### 4.4.2 Primerjava rezultatov, pridobljenih iz vzorcev odpadnih voda

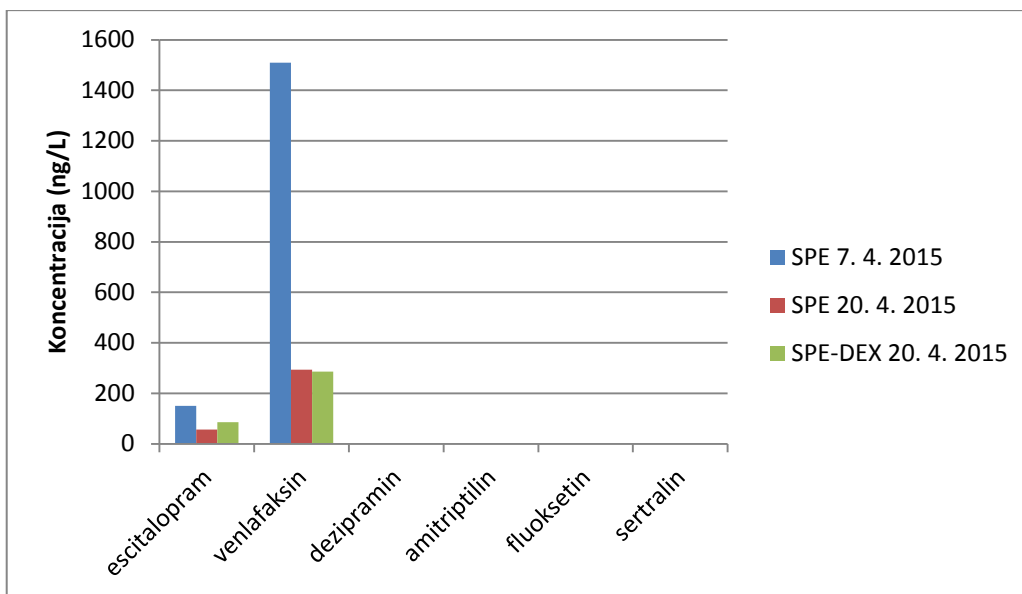
Dva časovno ločena vzorca odpadnih voda, zajetih na iztoku komunalne ČN vasi iz obrobja Ljubljane, smo ekstrahirali z metodo SPE. Enega od teh vzorcev smo ekstrahirali tudi z metodo SPE-DEX. Za določitev koncentracij antidepresivov v odpadnih vodah smo uporabili metodo standardnega dodatka. Z linearno regresijo smo določili premico za vsak izbrani antidepresiv ter z ekstrapolacijo izračunali koncentracije. V tabeli 28 so podani tudi determinacijski koeficienti, ki so pomembni za določitev linearnosti metode standardnega dodatka.

Determinacijski koeficienti so bili pri SPE za oba vzorca  $R^2 > 0,99$ . V primerjavi z SPE-DEX so bili  $R^2$  pri SPE metodi nekoliko višji, vendar te razlike so izjemno majhne. Na slikah 16 in 17 lahko vidimo, da je metoda standardnega dodatka pri SPE in SPE-DEX linearna in zelo učinkovita za izračun koncentracij. S pomočjo teh premic (Sliki 16 in 17) smo z ekstrapolacijo izračunali koncentracije v vzorcih odpadnih voda. V obeh vzorcih, ekstrahiranih z metodo SPE, nismo določili dezipramina, amitriptilina, fluoksetina in sertralina, koncentracija venlafaksina pa je bila višja od koncentracije escitaloprama. Vzorec odvzet 20. 4. 2015 smo ekstrahirali z obema metodama. V obeh primerih smo določili, da se v odpadni vodi nahajata escitalopram in venlafaksin v zelo podobnih koncentracijah (56,9 in 86,1 ng/L za ESC in 293,6 in 286,2 ng/L za VEN). V vzorcu, ekstrahiranim z SPE-DEX, smo zaznali tudi dezipramin in sertralin, vendar sta bila pod mejo določitve, amitriptilina in fluoksetina pa nismo določili. Grafični prikaz koncentracij antidepresivov v različnih vzorcih je predstavljen na sliki 15.

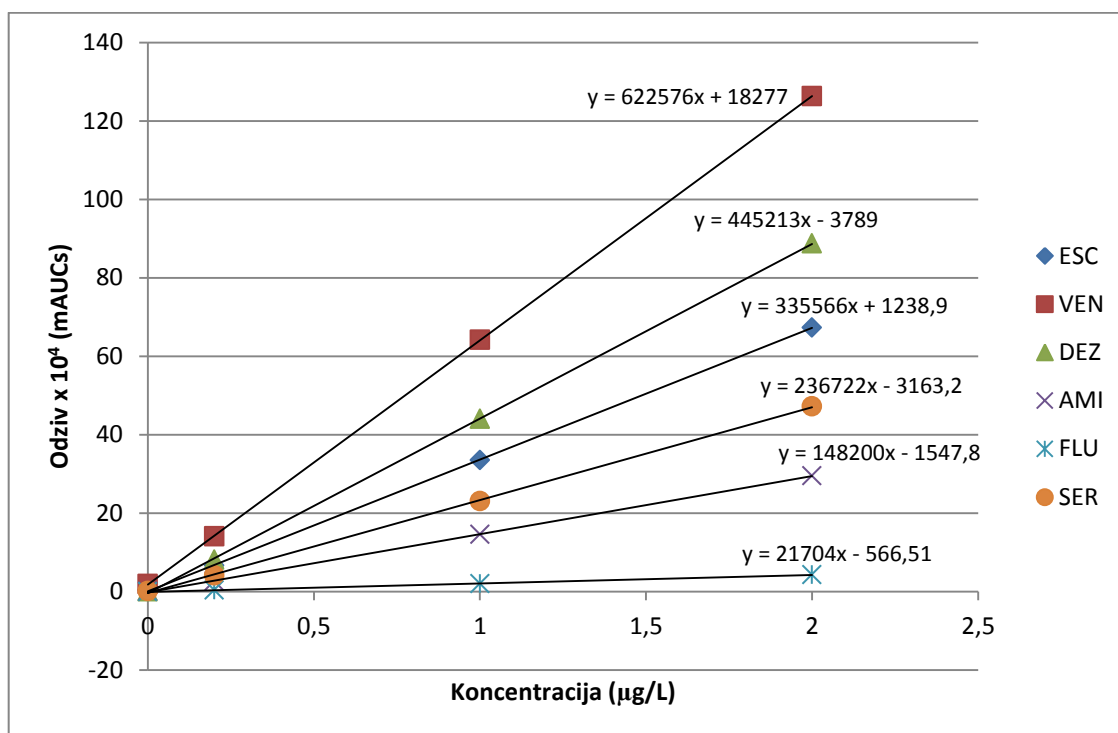
**Tabela 28: Primerjava koncentracij in determinacijskih koeficientov standardnega dodatka za posamezne antidepresive**

		ESC	VEN	DEZ	AMI	FLU	SER
<b>SPE</b>	$R^2$	0,9995	0,9988	0,9979	0,9990	0,9984	0,9977
(7. 4. 2015)	Koncentracija (ng/L)	150,6	1509,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>SPE</b>	$R^2$	1,0000	1,0000	0,9999	0,9999	0,9985	0,9997
(20. 4. 2015)	Koncentracija (ng/L)	56,9	293,6	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
<b>SPE-DEX</b>	$R^2$	0,9950	0,9934	0,9928	0,9910	0,9958	0,9883
(20. 4. 2015)	Koncentracija (ng/L)	86,1	286,2	< LOQ	n.d.	n.d.	< LOQ

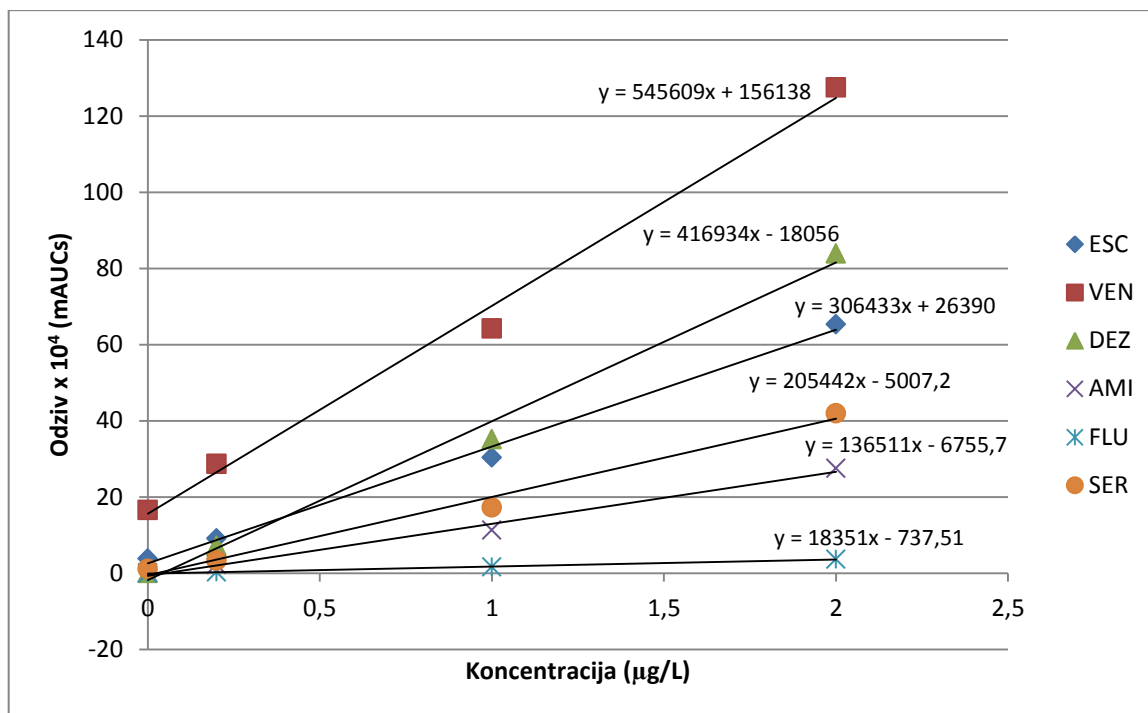
LOQ – meja določitve; n.d. – nedoločeno



Slika 15: Primerjava koncentracij antidepresivov v različnih vzorcih, ekstrahiranih z dvema metodama



Slika 16: Linearnost metode standardnega dodatka (metoda SPE)



Slika 17: Linearnost metode standardnega dodatka (metoda SPE-DEX)

#### 4.5 PRIMERJAVA KONCENTRACIJ ANTIDEPRESIVOV V ODPADNIH VODAH MED SLOVENIJO IN OSTALIMI DRŽAVAMI

V odpadni vodi na iztoku komunalne ČN vasi iz obrobja Ljubljane nismo določili dezipramina, amitriptilina in fluoksetina, sertralin smo določili le v enem primeru, medtem ko smo ugotovili, da sta escitalopram in venlafaksin prisotna. Naše izračunane podatke smo primerjali s podatki za koncentracije v odpadnih vodah na iztokih ČN v tabeli 1, da bi lahko vsaj okvirno ugotovili, s katerimi državami lahko Slovenijo primerjamo. Dezipramin so določevali na iztoku ČN na Poljskem, vendar ga niso določili. Amitriptilin je prisoten na iztokih ČN v ZDA, Kanadi in tudi v Evropi, v našem vzorcu pa ga nismo določili. Prav tako nismo določili fluoksetina, vendar glede na podatke v tabeli 1, je v iztokih prisoten v ZDA, Kanadi in v nekaterih evropskih državah. Sertralin se v podobnem koncentracijskem območju kot v Sloveniji nahaja tudi v ZDA (33 – 87 ng/L), Kanadi (5,1 – 12 ng/L), v Evropi pa so podobne koncentracije določili na Norveškem (3,7 – 14,6 ng/L) ter Češkem (3 ng/L) (15, 20, 23, 25, 27, 33). Tudi escitalopram se v podobnih koncentracijah, kot smo jih določili v naših vzorcih, nahaja v Evropi (Norveška, Češka, Avstrija, Portugalska). V naših vzorcih se od vseh preiskovanih antidepresivov venlafaksin nahaja v najvišji koncentraciji, kar velja tudi za ostale evropske države, kot tudi za Kanado in ZDA, koncentracije pa so med sabo primerljive (Tabela 1).

## 5 SKLEP

V magistrski nalogi smo se osredotočili na izbiro in optimizacijo postopka ekstrakcije antidepressivov iz odpadnih vod. Odločili smo se, da preverimo tri metode ekstrakcije, in sicer LLE, SPE in SPE-DEX.

Pri LLE smo začeli od samega začetka, saj metoda ni bila predhodno razvita. Ugotovili smo, da je najbolj primerno topilo za ekstrakcijo DCM. Najboljše izkoristke smo dobili, če smo vodnemu vzorcu pH uravnali na 3 ter ekstrakcijo izvajali 1 h, zaporedna ekstrakcija pa še pripomore k višji učinkovitosti. Najbolje je to opaziti pri venlafaksinu, saj se je izkoristek povečal 6-krat, pri amitriptilinu pa približno 3-krat. Pri ostalih antidepressivih pa se je izkoristek povečal okrog 2-krat. Za uporabo določanja prisotnosti antidepressivov v vodi bi bila potrebna dodatna optimizacija, saj so bili izkoristki relativno slabi (do 40 %). Tudi ponovljivost ni bila dobra, saj je večina vrednosti RSD v rangi do 40 % in le malo znotraj sprejemljive vrednosti.

Metodi SPE in SPE-DEX sta bili predhodno razviti in uporabljeni v laboratorijih na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko. Tam so ju raziskovalci razvili na vzorcih, pripravljenih v ultračisti vodi, z znanimi koncentracijami analitov, in ju nato uporabili na vzorcih odpadnih voda. Metodi so razvili z manjšim naborom analitov iz različnih farmakoloških skupin, mi pa smo ju dodatno optimizirali za izbrane antidepressive. Najpomembnejšo izboljšavo smo dosegli izborom najustrežnejših topil, s katerimi smo dosegli visoke izkoristke, za izračun koncentracij izbranih antidepressivov v odpadnih vodah pa smo vpeljali metodo standardnega dodatka. Metoda standardnega dodatka nam omogoča merjenje zelo nizkih koncentracij, hkrati naredimo kalibracijo in izključimo vpliv matriksa. Z validacijo metode z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin antidepressivov v prečiščeni vodi smo potrdili linearnost metode SPE v območju 0,01 - 1  $\mu\text{g/L}$  ter ponovljivost na koncentraciji 1  $\mu\text{g/L}$ . Učinkovitost postopka priprave je bila med 62,8 % in 96,4 %, izračunane vrednosti za ME pa kažejo, da matriks ni značilno vplival na odziv signalov pri analizi. V dveh vzorcih odpadnih voda, zajetih na iztoku komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane, smo določevali koncentracijo antidepressivov in ugotovili, da sta bil v obeh časovno ločenih vzorcih prisotna le escitalopram in venlafaksin. Z validacijo metode z ekstrahiranimi vzorci standardnih raztopin antidepressivov v prečiščeni vodi smo potrdili linearnost metode SPE-DEX v območju 0,01 - 1  $\mu\text{g/L}$  ter

ponovljivost na koncentraciji 1  $\mu\text{g/L}$ . Najboljše rezultate smo dobili s 50 mM pufrom, ki smo ga umerili na pH 3. Učinkovitost postopka priprave je bila med 71,8 % in 89,9 %, izračunane vrednosti za ME pa kažejo, da matriks ni značilno vplival na odziv signalov pri analizi. Z metodo SPE-DEX smo ekstrahirali vzorec odpadne vode, zajete na iztoku komunalne čistilne naprave vasi iz obrobja Ljubljane, in v njem določili le escitalopram in venlafaksin, dezipramin in sertralin pa sta bila pod mejo določitve.

Metoda SPE-DEX, kot najbolj primerna za ekstrakcijo antidepresivov iz odpadnih vod, ima številne prednosti pred ostalimi obravnavanimi metodami. Med njimi lahko izpostavimo manjšo verjetnost zamašitev kartuše zaradi prisotnosti trdnih delcev v vzorcu in večjo možnost avtomatizacije z manjšo časovno obremenitvijo operaterja.



## LITERATURA

1. Anderluh M: Pregled zdravilnih učinkovin za zdravljenje depresije, *Farmaceutski vestnik*, 2010; 61: 66-72.
2. <http://www.nimh.nih.gov/health/publications/depression/completeindex.shtml> (dostop: 8. 6. 2015).
3. Rang HP, Dale MM, Rihter JM, Flower RJ: *Rang and Dale's Pharmacology*, 6th ed., Elsevir, Philadelphia, 2007: 557-587.
4. <http://www.cbz.si> (dostop: 9. 6. 2015).
5. <http://www.drugs.com/cdi/desipramine.html> (dostop: 9. 6. 2015).
6. <https://en.wikipedia.org/wiki/Desipramine> (dostop: 22. 6. 2015).
7. Calisto V, Esteves VI: Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 2009; 77: 1257-1274.
8. Desbrow C, Routledge EJ, Brighty GC, Sumpter JP and Waldock M: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 1. Chemical Fractionation and in Vitro Biological Screening. *Environmental Science & Technology* 1998; 32: 1549-1558.
9. Routledge EJ, Sheahan D, Desbrow C, Brighty GC, Waldock M and Sumpter JP: Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluent. 2. In Vivo Responses in Trout and Roach. *Environmental Science & Technology* 1998; 32: 1559-1565.
10. Golovko O, Kumar V, Fedorova G, Randak T, Grabic R: Seasonal changes in antibiotics, antidepressants/psychiatric drugs, antihistamines and lipid regulators in a wastewater treatment plant. *Chemosphere* 2014; 111: 418-426.
11. Petrović M, Škrbić B, Živančev J, Ferrando-Climent L, Barcelo D: Determination of 81 pharmaceutical drugs by high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry with hybrid triple quadrupole-linear ion trap in different types of water in Serbia. *Science of The Total Environment* 2014; 468-469: 415-428.
12. Salgado R, Marques R, Noronha JP, Mexia JT, Carvalho G, Oehmen A, Reis MAM: Assessing the diurnal variability of pharmaceutical and personal care products in a full-scale activated sludge plant. *Environmental Pollution* 2011; 159: 2359-2367.
13. Santos LH, Araújo AN, Fachini A, Pena A, Delerue-Matos C, Montenegro MC: Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Journal of Hazardous Materials* 2010; 175: 45-95.

14. Silva LJ, Pereira AM, Meisel LM, Lino CM, Pena A: A one-year follow-up analysis of antidepressants in Portuguese wastewaters: Occurrence and fate, seasonal influence, and risk assessment. *Science of The Total Environment* 2014; 490: 279-287.
15. Schultz MM, Furlong ET: Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Analytical Chemistry* 2008; 80: 1756-1762.
16. Silva LJ, Lino CM, Meisel LM, Pena A: Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Science of The Total Environment* 2012; 437: 185-195.
17. MacLeod SL, Sudhir P, Wong CS: Stereoisomer analysis of wastewater-derived  $\beta$ -blockers, selective serotonin re-uptake inhibitors, and salbutamol by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2007; 1170: 23-33.
18. Lajeunesse A, Gagnon C, and Sauvé S: Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 2008; 80: 5325-5333.
19. Metcalfe CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM: Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2010; 29: 79-89.
20. Lajeunesse A, Smyth SA, Barclay K, Sauvé S, Gagnon C: Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Research* 2012; 46: 5600-5612.
21. Nagarnaik P, Batt A, Boulanger B: Source characterization of nervous system active pharmaceutical ingredients in healthcare facility wastewaters. *Journal of Environmental Management* 2011; 92: 872-877.
22. Batt AL, Kostich MS, Lazorchak JM: Analysis of Ecologically Relevant Pharmaceuticals in Wastewater and Surface Water Using Selective Solid-Phase Extraction and UPLC–MS/MS. *Analytical Chemistry* 2008; 80: 5021-5030.
23. Schultz MM, Furlong ET, Kolpin DW, Werner SL, Schoenfuss HL, Barber LB, Blazer VS, Norris DO, Vajda AM: Antidepressant Pharmaceuticals in Two U.S. Effluent-

Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. *Environmental Science & Technology* 2010; 44: 1918–1925.

24. Barnes KK, Kolpin DW, Furlong ET, Zaugg SD, Meyer MT, Barber LB: A national reconnaissance of pharmaceuticals and other organic wastewater contaminants in the United States — I) Groundwater. *Science of The Total Environment* 2008; 402: 192-200.

25. Benotti MJ, Trenholm RA, Vanderford BJ, Holady JC, Stanford BD, Snyder SA: Pharmaceuticals and Endocrine Disrupting Compounds in U.S. Drinking Water. *Environmental Science & Technology* 2009; 43: 597-603.

26. Snyder SA: Occurrence, treatment, and toxicological relevance of EDCs and pharmaceuticals in water. *Ozone: Science & Engineering* 2008; 30: 65–69.

27. Vasskog T, Berger U, Samuelsen PJ, Kallenborn R, Jensen E: Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *Journal of Chromatography A* 2006; 1115: 187-195.

28. Vasskog T, Anderssen T, Pedersen-Bjergaard S, Kallenborn R, Jensen E: Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *Journal of Chromatography A* 2008; 1185: 194-205.

29. Himmelsbach M, Buchberger W, Klampfl CW: Determination of antidepressants in surface and waste water samples by capillary electrophoresis with electrospray ionization mass spectrometric detection after preconcentration using off-line solid-phase extraction. *Electrophoresis* 2006; 27: 1220–1226.

30. Baker DR, Kasprzyk-Hordern B: Multi-residue analysis of drugs of abuse in wastewater and surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography–positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 2011; 1218: 1620-1631.

31. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ: The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Research* 2008; 42: 3498-3518.

32. Togola A, Budzinski H: Multi-residue analysis of pharmaceutical compounds in aqueous samples. *Journal of Chromatography A* 2008; 1177: 150-158.

33. Gros M, Petrović M, and Barceló D: Tracing Pharmaceutical Residues of Different Therapeutic Classes in Environmental Waters by Using Liquid

Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Automated Library Searching. *Analytical Chemistry* 2009; 81: 898-912.

34. Gómez MJ, Malato O, Ferrer I, Agüera A, Fernández-Alba AR: Solid-phase extraction followed by liquid chromatography– time-of-flight–mass spectrometry to evaluate pharmaceuticals in effluents. A pilot monitoring study. *Journal of Environmental Monitoring* 2007; 9: 718-29.

35. González Alonso S, Catalá M, Maroto RR, Gil JL, de Miguel AG, Valcárcel Y: Pollution by psychoactive pharmaceuticals in the Rivers of Madrid metropolitan area (Spain). *Environment International* 2010; 36: 195-201.

36. Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F: Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research* 2011; 45: 1432-1442.

37. Valcárcel Y, González Alonso S, Rodríguez-Gil JL, Gil A, Catalá M: Detection of pharmaceutically active compounds in the rivers and tap water of the Madrid Region (Spain) and potential ecotoxicological risk. *Chemosphere* 2011; 84: 1336-1348.

38. Giebułtowitz J, Nałęcz-Jawecki G: Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula and Utrata rivers and in tap water in Warsaw (Poland) *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2014; 104: 103-109.

39. Fick J, Söderström H, Lindberg RH, Phan C, Tysklind M, Larsson DG: Contamination of surface, ground, and drinking water from pharmaceutical production. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2009; 28: 2522–2527.

40. Daughton CG, Ternes TA: Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change?. *Environmental Health Perspectives* 1999; 107: 907-938.

41. DeLorenzo ME, Fleming J: Individual and Mixture Effects of Selected Pharmaceuticals and Personal Care Products on the Marine Phytoplankton Species *Dunaliella tertiolecta*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 2008; 54: 203-210.

42. Johnson DJ, Sanderson H, Brain RA, Wilson CJ, Solomon KR: Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 2007; 67: 128-139.

43. Silva LJ, Pereira AM, Meisel LM, Lino CM, Pena A: Reviewing the serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) footprint in the aquatic biota: Uptake, bioaccumulation and ecotoxicology. *Environmental Pollution* 2015; 197: 127-143.
44. Weinberger J 2nd, Klaper R: Environmental concentrations of the selective serotonin reuptake inhibitor fluoxetine impact specific behaviors involved in reproduction, feeding and predator avoidance in the fish *Pimephales promelas* (fathead minnow). *Aquatic Toxicology* 2014; 151: 77-83.
45. Stanley JK, Ramirez AJ, Chambliss CK, Brooks BW: Enantiospecific sublethal effects of the antidepressant fluoxetine to a model aquatic vertebrate and invertebrate. *Chemosphere* 2007; 69: 9-16.
46. Gaworecki KM, Klaine SJ: Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure. *Aquatic Toxicology* 2008; 88: 207-213.
47. Kania B, Gralak M and Wielgosz M: Four-Week Fluoxetine (SSRI) Exposure Diminishes Aggressive Behaviour of Male Siamese Fighting Fish (*Betta splendens*). *Journal of Behavioral and Brain Science* 2012; 2: 185-190.
48. Rodrigues AP, Santos LH, Ramalhosa MJ, Delerue-Matos C, Guimarães L: Sertraline accumulation and effects in the estuarine decapod *Carcinus maenas*: Importance of the history of exposure to chemical stress. *Journal of Hazardous Materials* 2015; 283: 350-358.
49. Hedgespeth ML, Nilsson PA, Berglund O: Ecological implications of altered fish foraging after exposure to an antidepressant pharmaceutical. *Aquatic Toxicology* 2014; 151: 84-87.
50. Bossus MC, Guler YZ, Short SJ, Morrison ER, Ford AT: Behavioural and transcriptional changes in the amphipod *Echinogammarus marinus* exposed to two antidepressants, fluoxetine and sertraline. *Aquatic Toxicology* 2014; 151: 46-56.
51. Kellner M, Porseryd T, Porsch-Hällström I, Hansen SH, Olsén KH: Environmentally relevant concentrations of citalopram partially inhibit feeding in the three-spine stickleback (*Gasterosteus aculeatus*). *Aquatic Toxicology* 2015; 158: 165-170.
52. Olsén KH, Ask K, Olsén H, Porsch-Hällström I, Hallgren S: Effects of the SSRI citalopram on behaviours connected to stress and reproduction in Endler guppy, *Poecilia wingei*. *Aquatic Toxicology* 2014; 148: 113-121.

53. Bisesi JH Jr, Bridges W, Klaine SJ: Reprint of: Effects of the antidepressant venlafaxine on fish brain serotonin and predation behavior. *Aquatic Toxicology* 2014; 151: 88-96.
54. Fong PP, Bury TB, Dworkin-Brodsky AD, Jasion CM, Kell RC: The antidepressants venlafaxine ("Effexor") and fluoxetine ("Prozac") produce different effects on locomotion in two species of marine snail, the oyster drill (*Urosalpinx cinerea*) and the starsnail (*Lithopoma americanum*). *Marine Environmental Research* 2015; 103: 89-94.
55. Yang M, Qiu W, Chen J, Zhan J, Pan C, Lei X, Wu M: Growth inhibition and coordinated physiological regulation of zebrafish (*Danio rerio*) embryos upon sublethal exposure to antidepressant amitriptyline. *Aquatic Toxicology* 2014; 151: 68-76.
56. Lajeunesse A, Gagnon C, Gagné F, Louis S, Čejka P, Sauvé S: Distribution of antidepressants and their metabolites in brook trout exposed to municipal wastewaters before and after ozone treatment – Evidence of biological effects. *Chemosphere* 2011; 83: 564-571.
57. Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD and Lewis RJ: Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005; 24: 464-469.
58. Brodin T, Fick J, Jonsson M, Klaminder J: Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations. *Science* 2013; 339: 814, 815.
59. Kataoka H: New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. *Trends in Analytical Chemistry* 2003; 22: 232-244.
60. Humar M, Šmid Korbar A, Obreza A: Farmaceutski terminološki slovar, Založba ZRC, Ljubljana, 2011: 67.
61. Mutavdžić Pavlović D, Babić S, Horvat AJ, Kaštelan-Macan M: Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *Trends in Analytical Chemistry* 2007; 26: 1062-1075.
62. <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (dostop: 2. 7. 2015).
63. Brošura SPE-DEX<sup>®</sup> 4790, Automated Extraction System, Horizon Technology, 2015. Dostopna na spletnem naslovu: [http://www.horizontechinc.com/PDF/Product%20Brochures/B0051508\\_01\\_SPE-DEX\\_4790\\_brochure.pdf](http://www.horizontechinc.com/PDF/Product%20Brochures/B0051508_01_SPE-DEX_4790_brochure.pdf) (dostop: 2. 7. 2015).

64. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen: Introduction to pharmaceutical chemical analysis, John Wiley & Sons, Chichester, West Sussex, 2012: 279-287, 319, 321.
65. Food and Drug Administration: FDA guidance for industry: bioanalytical method validation. Rockville, MD: US Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research 1 2001: 124 – 129.
66. Brodnjak Vončina D, Industrijska analiza, Univerza v Mariboru, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor, 2007: 59 – 61. [http://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/industrijska\\_analiza\\_gradivo.pdf](http://www.fkkt.um.si/egradiva/fajli/industrijska_analiza_gradivo.pdf) (dostop: 24. 7. 2015).
67. Yuan S, Jiang X, Xia X, Zhang H, Zheng S: Detection, occurrence and fate of 22 psychiatric pharmaceuticals in psychiatric hospital and municipal wastewater treatment plants in Beijing, China. *Chemosphere* 2013; 90: 2520-2525.
68. Behera SK, Kim HW, Oh JE, Park HS: Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater treatment plants of the largest industrial city of Korea. *Science of The Total Environment* 2011; 409: 4351-4360.
69. Chen HW, Liang CH, Wu ZM, Chang EE, Lin TF, Chiang PC, Wang GS: Occurrence and assessment of treatment efficiency of nonylphenol, octylphenol and bisphenol-A in drinking water in Taiwan. *Science of The Total Environment* 2013; 449: 20-28.
70. Ebitson M: Determining Endocrine Disrupting Hormones in Drinking Water and Wastewater Utilizing Solid Phase Extraction (SPE). *Proceedings of the Water Environment Federation* 2010; 2010: 6242-6247.