

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA BRCAR

**PREUČEVANJE KINETIKE FOTORAZGRADNJE
SERTRALINA V VODI**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

TJAŠA BRCAR

**PREUČEVANJE KINETIKE FOTORAZGRADNJE
SERTRALINA V VODI**

**A STUDY OF PHOTODEGRADATION KINETICS OF SERTRALINE
IN THE WATER**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Institutu Jožef Stefan pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja in somentorstvom doc. dr. Tine Kosjek. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Institutu Jožef Stefan in na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Rada bi se zahvalila doc. dr. Tini Kosjek za vso pomoč in usmerjanje pri opravljanju eksperimentalnega dela v laboratoriju ter za nasvete pri pisanju magistrske naloge. Prav tako bi se rada zahvalila doc. dr. Juriju Trontlju za nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Obema se zahvaljujem tudi za prijaznost in dosegljivost skozi celoten čas izdelave magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi staršem, bratu, fantu in prijateljem za koristne nasvete, potrpežljivost in podporo v vseh letih študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko/magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja in somentorstvom doc. dr. Tine Kosjek.

Ljubljana, 2015

Tjaša Brcar

Predsednik komisije:izr. prof. dr. Mitja Kos

Član komisije: doc. dr. Janez Mravljak

KAZALO

KAZALO SLIK.....	IV
POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1 UVOD	1
1.1 SELEKTIVNI ZAVIRALCI PRIVZEMA SEROTONINA.....	1
1.1.1 Nastanek depresij	1
1.1.2 Zdravljenje depresij.....	2
1.1.3 Sertralin	3
1.1.4 Predpisovanje antidepresivov v Sloveniji	3
1.2 SERTRALIN V OKOLJU	4
1.3 FOTORAZGRADNJA OSTANKOV ZDRAVIL.....	6
1.3.1 Fotorazgradnja v okolju	6
1.3.2 Fotorazgradnja v fotokemičnem reaktorju	7
1.4 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE HITROSTI FOTORAZGRADNJE	7
1.4.1 Priprava vzorca.....	7
1.4.2 Identifikacija in kvantifikacija	11
2 NAMEN DELA.....	16
3 MATERIALI IN METODE	18
3.1 MATERIALI	18
3.1.1 Standardi.....	18
3.1.2 Topila in reagenti	18
3.2 METODE.....	19
3.2.1 Aparature in pribor	19
3.2.2 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)	19
3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)	20
4 EKSPERIMENTALNI DEL	21
4.1 PRIPRAVA RAZTOPIN	21
4.1.1 Priprava raztopin standardov	21
4.1.2 Priprava raztopin za indirektno fotolizo.....	21
4.1.3 Priprava raztopin za validacijo metode	22

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

4.1.4	Priprava raztopin za obsevanje v fotokemičnem reaktorju	23
4.1.5	Priprava raztopin za obsevanje na sončni svetlobi.....	25
4.2	PRIPRAVA PUFRA.....	26
4.2	FILTRACIJA	26
4.3	EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU.....	26
4.4	DERIVATIZACIJA.....	27
4.5	SHRANJEVANJE RAZTOPIN	27
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	28
5.1	DOLOČITEV KONCENTRACIJSKEGA OBMOČJA RAZTOPIN PRI EKSPERIMENTIH FOTOLIZE.....	28
5.2	RAZLAGA MASNIH SPEKTROV	29
5.3	KROMATOGRAM HPLC-UV	32
5.4	DELNA VALIDACIJA METOD	34
5.4.1	Izkoristek ekstrakcije na trdnem nosilcu.....	34
5.4.2	Območje linearnosti	34
5.4.3	Ponovljivost.....	36
5.4.4	Meja kvantifikacije.....	38
5.5	OPTIMIZACIJA DERIVATIZACIJE.....	40
5.6	IZBIRA VODNEGA HLADILNIKA	41
5.7	HITROST FOTORAZGRADNJE V FOTOKEMIČNEM REAKTORJU.....	42
5.7.1	Direktna fotoliza.....	45
5.7.2	Vpliv nitratnih ionov	46
5.7.3	Vpliv karbonatnih ionov.....	47
5.7.4	Vpliv fosfatnih ionov	50
5.7.5	Vpliv singletnega kisika.....	51
5.8	OBSEVANJE NA SONČNI SVETLOBI.....	53
6	SKLEP.....	56
7	VIRI IN LITERATURA	57
	PRILOGE	61

KAZALO SLIK

Slika 1: Strukturna formula sertralina	3
Slika 2: Fotokemični reaktor s hladilnikom	7
Slika 3: Prikaz stopenj postopka ekstrakcije na trdnem nosilcu	9
Slika 4: Shematski prikaz HPLC analizne metode	12
Slika 5: Shematski prikaz sklopljene tehnike GC-MS	14
Slika 6: Masni spekter acetiliranega sertralinijevega klorida	30
Slika 7: Masni spekter acetiliranega SERD3	30
Slika 8: Masni spekter acetiliranega paroksetinijevega maleata	31
Slika 9: Rezultat analize z analizno metodo HPLC-UV	32
Slika 10: Prekrita kromatograma vzorca pri direktni fotolizi	33
Slika 11: Prekrita kromatograma pri fotolizi, inducirani z nitratnimi in karbonatnimi ioni	33
Slika 12: Emisijski spekter UV-žarnice v fotokemičnem reaktorju	42

POVZETEK

Zaradi vse večje uporabe zdravil pridejo v okolje večje količine zdravilnih učinkovin, njihovih metabolitov ter njihovih transformacijskih produktov. Iz okolja se zaradi svoje kemijske stabilnosti odstranjujejo počasi. Pomemben način odstranjevanja zdravilnih učinkovin iz površinskih voda so s soncem inducirane reakcije fotorazgradnje. Zaradi njihovega kontinuiranega vstopanja v okolje in počasne razgradnje lahko pride do kopičenja teh snovi v okolju. Njihova prisotnost v okolju pa ima lahko škodljive učinke na mnoga živa bitja, predvsem vodne organizme.

Cilj našega dela je bil določiti hitrost fotorazgradnje antidepressiva sertralina v vodnih raztopinah. Določili smo hitrost direktne fotolize in preučili vpliv nitratnih, fosfatnih ter karbonatnih ionov, ki so prisotni v površinskih vodah. Preučili smo tudi vpliv singletnega kisika, ki se tvori v površinskih vodah preko raztopljenih organskih snovi. Kot katalizator pretvorbe iz tripletnega v singletni kisik smo uporabili barvilo Rose bengal.

Vzorci smo v različnih vodnih raztopinah obsevali v fotokemičnem reaktorju, jih ekstrahirali s postopkom ekstrakcije na trdnem nosilcu in derivatizirali. Nato smo jih analizirali s plinsko kromatografijo, sklopljeno z masno spektrometrijo, ali tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV-detekcijo. Ugotovili smo, da dodatek nitratnih in karbonatnih ionov ter prisotnost singletnega kisika pospešijo hitrost razgradnje sertralina v vodni raztopini, dodatek fosfatnih ionov pa na hitrost ne vpliva. Hitrost razgradnje pri uporabi višjih koncentracij sertralina ob dodatku enakih koncentracij nitratnih in karbonatnih ionov se zmanjša.

Na koncu smo enako pripravljene raztopine sertralina ob dodatkih zgoraj naštetih ionov izpostavili sončni svetlobi. Ugotovili smo, da je razgradnja pod vplivom sončne svetlobe počasnejša kot razgradnja v fotokemičnem reaktorju. Razpolovni čas sertralina pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju je bil pri dodatku 1 mM koncentracije nitratnih in 0,5 mM koncentracije karbonatnih ionov 1,93 ure, pri obsevanju na sončni svetlobi pa 6,42 ure. Ugotovili smo tudi, da fotorazgradnja v vodi iz reke Gradaščice (razpolovni čas 23,1 ure) poteka hitreje kot v ultra čisti MILLI-Q vodi (razpolovni čas 28,9 ure), vendar počasneje kot razgradnja ob dodatku nitratnih in karbonatnih ionov.

Ključne besede: sertralin, fotokemični reaktor, direktna fotoliza, indirektna fotoliza, ekstrakcija na trdnem nosilcu

ABSTRACT

Due to increasing drug usage, large amounts of pharmaceutical drugs, their metabolites and their transformation products enter the environment. They are removed slowly from the environment because of their substantial chemical stability. An important way of removing pharmaceutical drugs from surface waters is through sun-induced reactions of photodegradation. Given the continuous entrance and slow degradation of these substances, they can accumulate and possibly exert harmful effects on many living beings, especially on aquatic organisms.

The goal of our work was to determine the speed of photodegradation of the antidepressant sertraline in aqueous solutions. We determined the rate of direct photolysis and examined the influence of nitrate, phosphate and carbonate ions, which are present in surface waters. By subjecting samples to Rose bengal, we also studied the influence of singlet oxygen, which is formed in the surface water through the dissolved organic substances.

The samples were subjected to irradiation in different aqueous solutions in a photochemical reactor and extracted by a solid phase extraction procedure. Then they were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry, whereas the higher concentration samples were directly measured by high performance liquid chromatography with UV detection. We have found that the addition of nitrate and carbonate ions and the presence of singlet oxygen accelerate the degradation rate of sertraline, whereas no such effect has been observed from the phosphate ions. When using higher concentrations of sertraline under the same experimental conditions, the degradation rate is reduced.

Finally, we exposed the sertraline test solutions also to the actual sunlight. The observed degradation rate under the influence of sunlight was found to be slower than degradation in the photochemical reactor. The half-life of sertraline when irradiated in a photochemical reactor and with the addition of 1 mM concentrations of nitrate and 0,5 mM concentration of carbonate ions was 1,93 h, whereas when it was irradiated with the sunlight, the half-life was 6,42 h. Additionally, it was also found that photodegradation in surface water obtained from the river Gradaščica occurs faster (half-life 28,9 h) than in the ultra-pure MILLI-Q water (half-life 23,1 h), but slower than the degradation in presence of environmentally relevant concentrations of nitrate and carbonate ions in pure water.

Key words: sertraline, photochemical reactor, direct photolysis, indirect photolysis, solid phase extraction

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC	površina pod kromatografskim vrhom
CDOM	raztopljene organske snovi (ang. »colored dissolved organic matter«)
DDD	definirani dnevni odmerek
ECD	detektor na zajetje elektronov
FFA	furfuril alkohol
FID	plamensko ionizacijski detektor
GC	plinska kromatografija
GC-MS	plinska kromatografija z masno spektrometrijo
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
HPLC-UV	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti z UV-detekcijo
IS	interni standard
LLE	ekstrakcija tekoče-tekoče
<i>m/z</i>	razmerje mase in naboja
MAOI	zaviralci monoaminske oksidaze
MAP	monoaminski prenašalci
MS	masni spektrometer
p. a.	pro analysi
RB	Rose bengal
SERD3	devteriran sertralin
SIM	snemanje izbranih masnih fragmentov
SPE	ekstrakcija na trdnem nosilcu
SSRI	selektivni zaviralci privzema serotonina
TCA	triciklični antidepresivi
TCD	toplotno prevodni detektor
UV	ultravijolično

1 UVOD

1.1 SELEKTIVNI ZAVIRALCI PRIVZEMA SEROTONINA

Depresija je najpogostejša duševna motnja, ki lahko nastopi v različnih oblikah, od mile do zelo hude (1). Pričakujemo lahko, da bo do leta 2020 depresija druga najresnejša bolezen na svetu (2). Za depresijo je značilno depresivno razpoloženje, ki ga bolnik občuti kot stisko, apatijo, pesimizem, občutek krivde, zmanjšano samopodobo, neodločnost ter izgubo motivacije. Poleg tega pa so pogoste tudi telesne motnje, ki se kažejo kot motnje spanja, izguba apetita, zmanjšan libido, upočasnitev misli in delovanja (1). Poznamo več tipov depresivnih motenj: huda depresija, distimija, bipolarna motnja, sezonska motnja razpoloženja, prilagoditvena motnja z depresivnim razpoloženjem ter poporodna depresija. Depresija močno vpliva na bolnika, moti njegove funkcije, mu povzroča bolečino in trpljenje, vendar je ena najbolj ozdravljivih duševnih bolezni. Pomembno je, da izboljšamo prepoznavanje in zdravljenje depresije, saj s tem omogočimo boljše in prijetnejše življenje bolnika in njegovih bližnjih (3).

1.1.1 Nastanek depresij

Depresija nastane kot posledica kombinacije genetskih, okoljskih, biokemičnih ter psiholoških dejavnikov. Njen nastanek opisuje več hipotez: monoaminska hipoteza, hipoteza neurotransmiterskih receptorjev, nevroplastična hipoteza ter hipoteza o vplivu stresa, kortizola in hipotalamus-hipofiza-adrenalne osi (4). Najstarejša je monoaminska hipoteza oziroma hipoteza monoaminskega pomanjkanja, ki pravi, da je depresija posledica funkcionalnega pomanjkanja monoaminskih prenašalcev, predvsem serotonina in noradrenalina, na določenih mestih v možganih. Glede na hipotezo neurotransmiterskih receptorjev pa se depresija razvije zaradi povečanega števila serotoninergičnih in noradrenergičnih receptorjev, ki so lahko posledica prilagoditve na znižane koncentracije MAP v sinapsi. Nevroplastična hipoteza opisuje učinek delovanja antidepressivov preko vpliva na prepisovalne dejavnike in s tem na intracelularno signalizacijo, hipoteza o vplivu stresa, kortizola in hipotalamus-hipofiza-adrenalne osi pa pripisuje nastanek depresije povišanemu nivoju kortikotropina (4).

1.1.2 Zdravljenje depresij

V preteklosti so depresijo zdravili z amfetaminsko stimulacijo, ki je bila pogosto neučinkovita ter je povzročila povečano aktivnost in energijo bolnika, ter z elektrokonvulzivno terapijo. V poznih petdesetih letih prejšnjega stoletja so bila na voljo prva antidepresivna zdravila iz skupine tricikličnih antidepresivov (TCA) in zaviralcev monoaminske oksidaze (MAOI). Ta zdravila so imela antiholinergične, antihistaminergične in kardiotoksične stranske učinke. Kasneje so izboljšali varnost, toleranco ter selektivnost in tako uvedli nove generacije antidepresivov (3). Danes imamo na voljo številne učinkovine za zdravljenje depresije, ki jih glede na mehanizem delovanja razdelimo v več skupin (4). Najpogosteje predpisana zdravila za zdravljenje depresije so iz skupine selektivnih zaviralcev privzema serotonina (SSRI): sertralin, paroksetin, fluoksetin, citalopram ter fluvoksamin. Te učinkovine selektivno preprečijo vezavo serotonina na serotoninski prenašalec, saj se najverjetneje vežejo na isto vezavno mesto kot serotonin. S tem onemogočijo njegov ponovni privzem v presinaptično celico in povečajo njegovo koncentracijo v sinaptični špranji (1). Povišana koncentracija serotonina aktivira tako postsinaptične kot tudi presinaptične receptorje, zato ne pride takoj do povečanega prenosa signala v postsinaptični nevron. Učinek se izrazi šele po nekaj tednih, ko nevroni znižajo občutljivost presinaptičnih receptorjev. Takrat se ojači prenos signala v postsinaptični nevron (4).

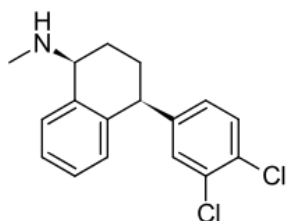
Serotonin je živčni prenašalec, ki regulira številne fiziološke procese. Samo 10 % serotonina se nahaja v centralnem živčnem sistemu, kjer modulira osnovne življenjske procese, kot so spanje, spolnost, apetit, spomin, razpoloženje, senzorno zaznavanje, zaznavanje bolečine, endokrine funkcije in obnašanje. Drugje po telesu pa serotonin regulira delovanje gladkih mišic v črevesju in v kardiovaskularnem sistemu, poveča agregacijo krvnih ploščic po poškodbi endotelija ter povzroči vazokonstrikcijo (5).

SSRI so zdravila izbora za zdravljenje hude depresije, panične motnje, obsesivno kompulzivne motnje, socialne fobije, posttraumatske stresne motnje ter bulimije. Indicirani so tudi pri distimiji in generalizirani anksiozni motnji, revmatičnih obolenjih ter migrenskih glavobolih (3).

SSRI selektivno delujejo na serotoninski prenašalec z minimalno ali celo brez aktivnosti na noradrenalinske in dopaminske receptorje (3). Zaradi selektivnosti imajo manj antiholinergičnih in antimuskarinskih stranskih učinkov, so manj sedativni in manj nevarni pri predoziranju (1).

1.1.3 Sertralin

Sertralin oziroma (1*S*,4*S*)-4-(3,4-diklorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-*N*-metil-1-naftalenamin (slika 1) je močan inhibitor ponovnega privzema serotonina druge generacije z antidepressivnimi lastnostmi (6). Molekula sertralina ima dva kiralna centra. Za zdravljenje se uporablja samo *S,S*-(+)-diastereoizomer, saj so ostali diastereoizomeri šibkejši inhibitorji ponovnega privzema serotonina (3). Uporablja se za zdravljenje depresije, paničnih motenj, socialne fobije, posttravmatske stresne motnje ter obsesivno-kompulzivnih motenj (6). Neželeni učinki so odvisni od odmerka in med zdravljenjem pogosto izginejo ali oslabijo. Najpogostejši so nespečnost, omotica, zaspanost, glavobol, driska, siljenje na bruhanje, suha usta, nezmožnost ejakulacije ter utrujenost (7).



Slika 1: Strukturna formula sertralina

Sertralin se po peroralni aplikaciji počasi, a dobro absorbira iz prebavnega trakta, prisotnost hrane ne vpliva na absorpcijo. Metabolizem prvega prehoda je pri sertralinu obsežen, biološka uporabnost po peroralni aplikaciji je 20–36 % (3). V krvnem obtoku je močno vezan na plazemske beljakovine (98 %) (7). Razpolovni čas je 24 ur, pri starejših bolnikih se lahko podaljša do 36 ur. Ravnotežne koncentracije v plazmi so po večkratnem odmerjanju linearno povezane z odmerkom (3).

Sertralin se primarno metabolizira s CYP3A4 v črevesju in jetrih. Glavni metabolit je *N*-demetiliran sertralin, ki je 5- do 10-krat šibkejši kot sertralin. Nadaljnji metabolizem poteka preko oksidativne deaminacije, obročne hidroksilacije in glukuronidne konjugacije. Sertralin in konjugirani metaboliti se izločajo v urin in blato (3). Manj kot 0,2 % sertralina se izloči v urin v nespremenjeni obliki (7).

1.1.4 Predpisovanje antidepressivov v Sloveniji

Antidepressivi so med najbolj predpisovanimi zdravili na svetu. Njihova uporaba narašča zaradi večje ozaveščenosti ljudi o psihiatričnih boleznih. Po raziskavah Eurobarometra iz leta 2010 se je z antidepressivi zdravilo 7 % prebivalcev Evropske unije (2).

Tjaša Brcar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Predpisovanje in uporaba antidepresivov se v zadnjih letih močno povečuje tudi v Sloveniji. Poraba antidepresivov, merjena v definiranih dnevni odmerkih (DDD) na tisoč prebivalcev na dan, je od leta 2001, ko je znašala 15,46 DDD/1000 prebivalcev/dan, do leta 2013, ko je znašala 53,17 DDD/1000 prebivalcev/dan, narasla za več kot 3-krat. Za več kot trikratno vrednost se je v tem času povečala tudi uporaba antidepresivov iz skupine SSRI. Prav tako se povečuje uporaba zdravil, ki kot zdravilno učinkovino vsebujejo sertralin. Leta 2001 je znašala poraba zdravil s sertralinom 4,03 DDD/1000 prebivalcev/dan, leta 2013 pa kar 13,37 DDD/1000 prebivalcev/dan (8). Leta 2012 so bila zdravila s sertralinom na 24. mestu najpogosteje predpisanih zdravil v Sloveniji, leta 2013 pa na 20. mestu. Zanimiv je tudi podatek, da se poraba vseh zdravil, merjena v DDD, v zadnjih petih letih povečuje povprečno za 2,8 % letno, poraba zdravil s sertralinom pa kar za 5,4 % (9).

Pri zdravljenju s sertralinom je začetni odmerek 25 ali 50 mg sertralina enkrat na dan. Dnevni odmerek se ob neučinkovitosti zdravljenja lahko postopno povečuje po 50 mg na teden. Največji dovoljeni dnevni odmerek je 200 mg sertralina. V Sloveniji je sertralin na voljo v obliki 50 mg in 100 mg filmsko obloženih tablet (7).

1.2 SERTRALIN V OKOLJU

Zdravilne učinkovine postajajo vedno bolj zaskrbljujoči onesnaževalci okolja. Njihova količina v okolju je odvisna od njihovih fizikalnih in kemijskih lastnosti (polarnost, faktor akumulacije in bioakumulacije, hlapnost, porazdelitveni koeficient, topnost), od njihovega vnosa (odvisen od porabe in načina odlaganja zdravil) in razgradnje (predvsem mikrobiološka in fotorazgradnja) v okolju (2).

Po zaužitju se zdravilne učinkovine normalno izločajo iz organizma kot kombinacija različnih metabolitov skupaj z nespremenjeno starševsko spojino (10). Ostanke zdravilnih učinkovin, ki se nahajajo v okolju, izvirajo iz humane ter veterinarske uporabe, iz izpustov iz industrije in iz gospodinjskih odpadkov kot posledica nepravilnega shranjevanja in odlaganja neporabljenih in neuporabnih zdravil. V okolje pridejo zaradi nezadostnega odstranjevanja v čistilnih napravah (11). Zdravilne učinkovine so potencialno bolj trdovratne kot ostali organski onesnaževalci, saj so zasnovane tako, da proizvedejo specifičen farmakološki odziv. Da dosežejo specifično mesto delovanja, morajo imeti določeno kemijsko stabilnost. Kasneje se ta stabilnost lahko odraža v nezadostnem odstranjevanju v čistilnih napravah ter omejeni razgradnji v okolju. Namesto dokončne

Tjaša Brcar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

mineralizacije nastanejo le manjše strukturne spremembe, s tem se tvorijo transformacijski produkti (12).

Vsesplošna uporaba antidepresivov ter njihova kemijska stabilnost v okolju vodita do detekcije nizkih koncentracij antidepresivov v številnih odplakah iz čistilnih naprav, površinskih vodah, podtalnici, sedimentih in pitnih vodah (12). V spodnjih preglednicah (preglednica 1 in preglednica 2) so zbrane koncentracije sertralina v odpadnih in površinskih vodah po svetu.

Preglednica 1: Koncentracije sertralina v odpadnih vodah (pritoki in odtoki čistilnih naprav)

	Pritok [ng/L]	Odtok [ng/L]
Kanada, 2008 (13)	6–6,1	5,5–5,8
Kanada, 2010 (14)	14–34	
Norveška, 2008 (15)	8,4–19,8	3,7–14,6
ZDA, 2008 (16)	57–87	

Preglednica 2: Koncentracije sertralina v površinskih vodah

	Koncentracije v površinskih vodah [ng/L]
Kanada, 2010 (14)	6–17
Španija, 2011 (17)	11
ZDA, 2007 (18)	1,1–34,9
ZDA, 2008 (19)	33–49
ZDA, 2010 (20)	<0,5–37,5

Te koncentracije so mnogo nižje od koncentracij, ki so potrebne za farmakološki učinek pri ljudeh. Neželeni učinki zaradi zaužitja antidepresivov s pitno vodo so tako pri ljudeh neznatni (11). Zavedati se moramo, da zdravilne učinkovine v okolju ne nastopajo posamezno, ampak kot zmes metabolitov, transformacijskih produktov ter ostalih učinkovin, ki lahko delujejo sinergistično. S tem se lahko povečajo toksični učinki posameznih spojin. Poleg tega pa lahko dolgotrajna izpostavljenost nizkim koncentracijam učinkovin povzroči akutno ali kronično toksičnost netarčnim vodnim organizmom (12). SSRI modulirajo in oponašajo učinke živčnega prenašalca serotonina, ki regulira veliko fizioloških sistemov tudi pri ribah, mehkužcih ter praživalih. Učinkovine, ki posnemajo delovanje sertralina, imajo pogosto škodljive učinke na vodne organizme že v koncentracijah v sledovih. SSRI zavirajo reprodukcijo, povzročajo nenormalnosti v razvoju zarodka, zakasnen fiziološki razvoj ter spolno zrelost, zmanjšajo agresivnost ter zavirajo hranjenje (2).

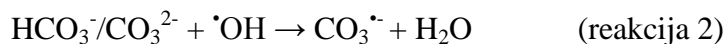
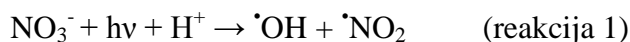
SSRI imajo tako kot ostali antidepresivi tudi bioakumulacijski potencial. Brooks in sodelavci (21) so leta 2005 preučevali količino sertralina, fluoksetina in njunih presnovkov

norfluoksetina in desmetilsertralina v ribah iz reke Pecan Creek, v katero se steka voda iz čistilne naprave. Največje koncentracije so našli v možganih in jetrih rib, nižje pa v mišicah. Koncentracije metabolita desmetilsertralina (0,69–15,6 ng/g) so bile višje kot koncentracije sertralina (0,34–4,7 ng/g) (21).

1.3 FOTORAZGRADNJA OSTANKOV ZDRAVIL

1.3.1 Fotorazgradnja v okolju

Na akumulacijo zdravilnih učinkovin v okolju vpliva več procesov, poleg njihovih fizikalno-kemičnih lastnosti tudi načini vstopanja in razgradnja teh spojin v okolju. Pomemben način razgradnje zdravilnih učinkovin v površinskih vodah predstavljajo s soncem inducirane reakcije fotorazgradnje, ki jih delimo na reakcije direktne in indirektne fotolize. Direktna fotoliza pomeni direktno absorpcijo sončne svetlobe ter spremembo starševske spojine v enega ali več novih produktov (22). Indirektna fotoliza vključuje indirektno absorpcijo sončne energije, ki je posredovana z reaktivnimi spojinami, kot so nitrati, nitriti, železo, vodikov peroksid in raztopljene organske snovi (CDOM, ang. »colored dissolved organic matter«). Te spojine interagirajo s svetlobo in tvorijo reaktivne zvrsti. Najpogostejše reaktivne zvrsti, ki nastanejo s fotokemično reakcijo, so hidroksilni radikal ($\cdot\text{OH}$), karbonatni radikal ($\text{CO}_3^{\cdot-}$), singletni kisik ($^1\text{O}_2$) ter tripletna stanja CDOM. Pri obsevanju CDOM nastanejo $^1\text{O}_2$, $\cdot\text{OH}$ ter tripletna stanja CDOM. $\cdot\text{OH}$ nastane tudi pri obsevanju nitratov in nitritov (reakcija 1). $\text{CO}_3^{\cdot-}$ pa nastane pri reakciji med $\cdot\text{OH}$ in hidrogenkarbonatnimi ali karbonatnimi ioni (reakcija 2) ter pri oksidaciji karbonatnega iona s tripletnim stanjem CDOM. Reaktivne zvrsti, ki nastanejo s fotokemičnimi reakcijami, nato pospešijo razgradnjo starševske spojine (23).



Skupaj z direktno fotolizo so reakcije indirektne fotolize vključene v odstranjevanje ksenobiotikov iz površinskih voda, včasih pa lahko povzročijo nastanek škodljivih intermediatov (23).

Fotorazgradnja je odvisna od intenzitete sevanja, globine in osvetljenosti vodotoka, zemljepisne širine ter letnega časa. Na hitrost fotorazgradnje ksenobiotikov v vodi vplivata

tudi koncentracija ksenobiotika in koncentracija drugih spojin, ki se prav tako oksidirajo pod vplivom sončne svetlobe (2). Intenziteta in hitrost indirektna fotolize sta močno odvisni od sestave vode, v njej raztopljenega kisika, organskega ogljika, nitratov, nitritov ter kovin (22). Glavni problem pri določanju kinetike in poti fototransformacije zdravilnih učinkovin je težka poustvaritev okoljskih pogojev v laboratoriju. Rezultate, dobljene v laboratoriju, zato težko prenesemo v dejanske razmere v okolju (24).

1.3.2 Fotorazgradnja v fotokemičnem reaktorju

Fotokemične reakcije dajo informacije o reakcijski kinetiki ter o poteh, lastnostih in življenjski dobi intermediatov. Spreminjanje parametrov reakcije (različne temperature, koncentracije topljencev) omogoča boljše razumevanje reakcijskih mehanizmov. Na voljo so različni fotokemični reaktorji, med najbolj učinkovitimi in popularnimi so tisti s hladilnikom (slika 2), pri katerih je luč popolnoma obkrožena z raztopino, ki jo obsevamo (25). Luč se nahaja v hladilniku z dvojno steno iz kvarčnega ali borosilikatnega stekla. Med stenama teče voda, ki hladi raztopino in tako preprečuje pregrevanje žarnice ter segrevanje raztopine. UV-sevanje, ki ga oddaja luč, je nevarno za oči in kožo, zato se je pri delu potrebno ustrezno zaščititi (26).



Slika 2: Fotokemični reaktor s hladilnikom

1.4 ANALIZNE METODE ZA DOLOČANJE HITROSTI FOTORAZGRADNJE

1.4.1 Priprava vzorca

Analizni postopek je sestavljen iz vzorčenja, priprave vzorcev, analize ter obdelave dobljenih podatkov (27). Veliko vzorcev ima zelo kompleksno sestavo in jih ni mogoče direktno analizirati s kromatografskimi ali spektroskopskimi metodami (28). Take vzorce

je treba pred analizo pripraviti. Namen priprave vzorca je ločitev analita od komponent matriksa, ki bi lahko motile analizo, koncentriranje vzorca, stabilizacija tarčnega analita in prenos vzorca iz okoljskega matriksa v primerno obliko za analizo (29). Priprava vzorca je ponavadi korak, ki zahteva največ časa, včasih tudi do 80 % celotnega časa analiznega postopka. Najpogostejši postopki priprave vzorca so raztapljanje, filtracija, ekstrakcija, koncentriranje, separacija, centrifugiranje ter derivatiziranje (27).

EKSTRAKCIJA IN KONCENTRIRANJE

Danes sta najpogostejši in široko sprejeti tehniki za ekstrakcijo organskih spojin iz vodnega matriksa ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE) in ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) (30). LLE temelji na porazdelitvi analita med vodno in organsko fazo (29). Pri tej metodi porabimo veliko topil in časa, včasih je potrebno vzorec koncentrirati z evaporacijo topil. Med postopkom lahko pride do nastanka emulzij.

Alternativna tehnika je SPE, ki se pogosto uporablja za pripravo vzorcev bioloških tekočin (plazma, serum, urin), pa tudi vzorcev vod iz okolja ali odpadnih vod. Največkrat se uporablja za ekstrakcijo analitov iz vodne raztopine, lahko pa se uporabi tudi za nevodne raztopine vzorcev (28). SPE je zelo uporabna tehnika, ki ima več prednosti pred LLE:

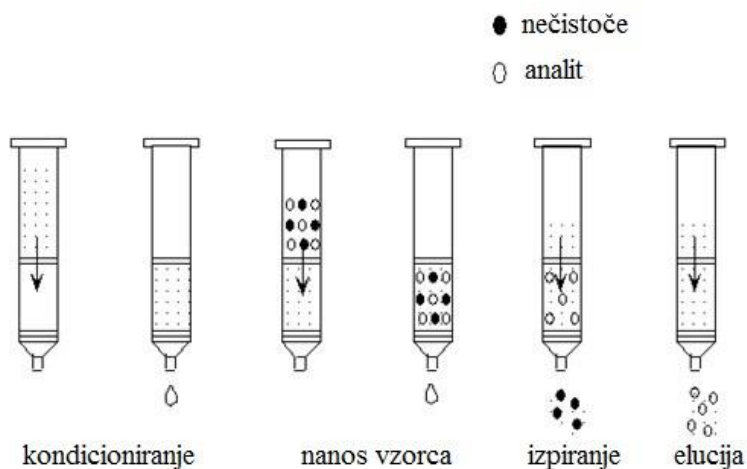
- manjša poraba in količina zavrženih topil (bolj okolju prijazna tehnika);
- krajši čas (manj stopenj);
- večja čistost ekstrakta;
- kvantitativnost ekstrakcije;
- enostavna izvedba;
- možnost avtomatizacije (27);
- večja selektivnost in preciznost;
- ni dodatnega koraka za koncentriranje vzorca;
- večja varnost;
- boljši izkoristki;
- ni težav z nastankom emulzije in
- ni navzkrižne kontaminacije (32).

Analit se pri tem tipu ekstrakcije selektivno porazdeljuje med trdno fazo – sorbentom ter tekočo mobilno fazo. Analit mora imeti večjo afiniteto za trdno fazo kot za matriks raztopine (29). SPE poteka na koloni, ki vsebuje delce stacionarne faze (SF), velikosti 40-50 μm , delci so lahko pri določenih vrstah ekstrakcije tudi večji. Na dnu in na vrhu teh delcev je polietilenski filter. Kolone se med seboj razlikujejo glede na maso sorbenta v

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

kolonah, volumen in vrsto SF. Na voljo je širok spekter SF, vsem pa je osnova silicijev dioksid ali delci organskih polimerov. Na te delce so pritrjene funkcionalne skupine, ki predstavljajo aktivne dele SF. Za šibko polarne analite se uporablja reverznofazna ekstrakcija, pri kateri ločevanje temelji na hidrofobnih interakcijah. Za analite, ki imajo ionske skupine (kisline, baze), lahko uporabimo ionsko izmenjalno ekstrakcijo, ki temelji na interakcijah med ionsko skupino SF ter ionsko skupino analita. Za izolacijo polarnih analitov iz nevodnih medijev pa se uporablja normalnofazna ekstrakcija, kjer so pomembne polarne interakcije (28).

Postopek ekstrakcije na trdnem nosilcu poteka v štirih stopnjah (slika 3). Najprej moramo kolono kondicionirati, s tem jo pripravimo za uporabo. Naslednji korak je nanos vzorca, pri tem se analit zadrži na trdni fazi zaradi različnih tipov interakcij. Nato sledi spiranje, ki je namenjeno izpiranju šibkeje vezanih komponent matriksa, analit pa ostaja še vedno vezan na trdnem nosilcu. S tem korakom očistimo vzorec in eliminiramo potencialne nečistoče pri analizi. Zadnji korak je elucija, kjer z eluentom prekinemo interakcije med analitom in SF ter sprostimo analit s kolone. Na dnu kolone zberemo končno raztopino – eluat, ki predstavlja očiščen in koncentriran vzorec (28).



Slika 3: Prikaz stopenj postopka ekstrakcije na trdnem nosilcu (33)

Schultz in Furlong (18) sta pri ekstrakciji SSRI uporabila reverznofazni polimerni sorbent Oasis HLB in ugotovila, da je bolj učinkovit kot kationsko izmenjevalni ter reverznofazni C₁₈ sorbenti, saj je bil izkoristek ekstrakcije pri uporabi prvega večji (18).

Oasis HLB je hidrofilen-lipofilen kopolimer *N*-vinilpirolidona in divinilbenzena. Omogoča dobro retencijo polarnih in nepolarnih analitov, primeren je za kisle, bazične in nevtralne analite. Hidrofilni *N*-vinilpirolidon poveča močljivost polimera, lipofilna komponenta divinilbenzen pa omogoči reverznofazno retencijo, nujno za zadrževanje analita (29).

DODATEK INTERNEGA STANDARDA

Med postopkom priprave vzorca pride velikokrat do izgub vzorca oziroma analita, del tega se lahko tudi razgradi. Vpliv izgub pri delu in variacij pri injiciranju na končni rezultat lahko zmanjšamo z dodatkom znane koncentracije internega standarda (IS) vzorcu pred pripravo. IS je spojina, ki v originalnem vzorcu ni prisotna. Ima podobne fizikalne in kemijske lastnosti kot analit in se zato med pripravo vzorca obnaša podobno. Instrumentalna analiza mora biti dovolj selektivna, da loči med IS in analitom (34). Odziva IS in analita morata biti podobna, zato moramo uporabiti koncentracijo, pri kateri je višina ali površina odziva podobna kot pri analitu. Najprimernejše spojine so izotopi analita, ki v naravi niso prisotni (28). IS vedno dodajamo v enaki koncentraciji, s spreminjanjem koncentracije analita pa se spreminja razmerje med odzivom analita in IS. Pri vrednotenju rezultatov upoštevamo razmerje med odzivom analita in IS, ki je pri določeni koncentraciji analita enako ne glede na izgube med delom ali variacije pri injiciranju (34).

DERIVATIZACIJA

Plinska kromatografija (GC) spojin, ki vsebujejo karboksilne, hidroksilne in aminoskupine, je težavna zaradi njihovih fizikalno-kemičnih lastnosti, kot so nizka hlapnost, visoka polarost ter termična nestabilnost. Nekatere spojine, ki so sicer dovolj hlapne, pa so nagnjene k adsorpciji in razgradnji na koloni ali pa povzročijo nastanek repa pri kromatografskem vrhu (35). Najpogostejša rešitev za to je derivatizacija, ki predstavlja spremembo strukture analita in s tem tvorbo bolj hlapne ali termično bolj stabilne spojine. Derivatizacija pri GC tipično vključuje zamenjavo ene ali več polarnih skupin analita (alkoholna, amino skupina) z manj polarnimi (34). Čeprav predstavlja derivatizacija dodaten korak pri pripravi vzorca, uporabo dodatnih reagentov in postopkov, ima velik pomen, saj z njo izboljšamo separacijo in detekcijo analita (35). Z zmanjšanjem interakcij med spojino in kolono zmanjšamo adsorpcijo na kolono in preprečimo pojav širokih kromatografskih vrhov ali repov. S preprečevanjem interakcij med spojinami ali med spojinami in kolono izboljšamo ločljivost in zmanjšamo prekrivanje vrhov (36). Z derivatizacijo izboljšamo tudi obnašanje analita na različnih detektorjih ter mejo zaznavnosti (35). Najpogosteje uporabljani tipi derivatizacije so alkiliranje, siliranje ter aciliranje (36).

Plinska kromatografija aminov je težavna, saj so amini močno polarni in imajo bazične lastnosti. Veliko aminov je sicer lahko hlapnih, vendar imajo tendenco po adsorpciji in

razgradnji na koloni ter povzročijo nastanek repa pri odzivu zaradi polarne NH skupine in neveznega elektronskega para na dušiku. Derivatizacija zmanjša polarnost ter izboljša hlapnost, stabilnost, separacijo in detekcijo. Pri aminih poznamo več postopkov derivatizacije: acetiliranje, siliranje, tvorba Schiffovih baz, tvorba karbamata ter tvorba amidov. Eden najbolj popularnih derivatizacijskih postopkov za amine je aciliranje. Pri tej reakciji pride do zamenjave protona (iz -OH, -SH, -NH) z acilno skupino, pri čemer nastanejo estri, tioestri in amidi. Reakcija poteče zlahka, pod milimi pogoji. Glavni tipi reagentov so: kislinski anhidridi, acil halidi in reaktivni acilni derivati. Pri uporabi acil halidov ali kislinskih anhidridov je reakcijski medij kisel, kar lahko uniči kolono, ki se ne sme uporabljati za kisle raztopine. Zato dodamo bazično spojino – piridin ali trimetilamin, ki delujeta kot akceptorja kislinskih stranskih produktov ter kot katalizatorja reakcije (35).

1.4.2 Identifikacija in kvantifikacija

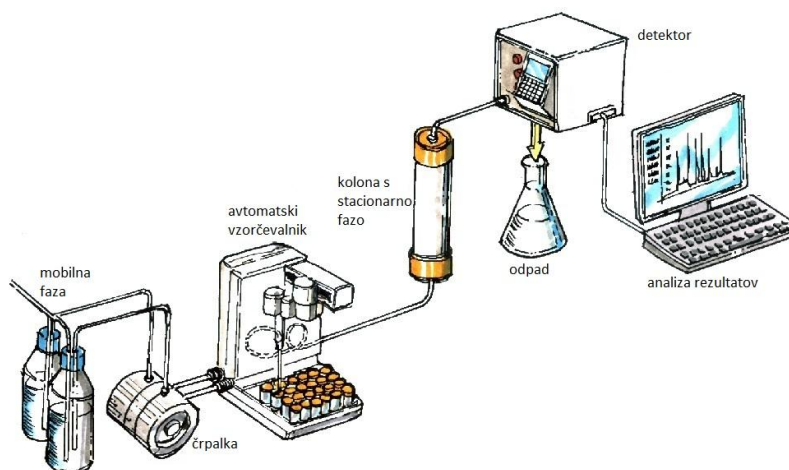
KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je separacijska metoda, s katero ločimo želeni analit od interferenc (matriksa) in ostalih spojin v vzorcu. Osnova vseh kromatografskih tehnik je razlika v porazdeljevanju posamezne spojine med dvema nemešajočima se fazama – mobilno in SF. Spojine se ločijo zaradi razlik v fizikalnih lastnostih ali zaradi različnih kemijskih interakcij z mobilno ali s SF. SF je fiksirana v koloni ali na trdni površini. Vzorec nanesemo na eno stran SF. Mobilna faza potuje skozi SF in s sabo nosi vzorec. Na koncu kolone se spojine ločeno eluirajo. Tista, ki se najmanj porazdeljuje v SF, prispe skozi kolono najhitreje. Eluate identificiramo in kvantificiramo z detektorjem, ki je lahko splošen ali specifičen za iskan analit. Rezultat kromatografske analize podamo kot kromatogram, pri katerem posamezen kromatografski vrh predstavlja posamezno spojino. Površina pod krivuljo posameznega vrha (AUC) je sorazmerna s koncentracijo posamezne spojine, zato lahko s kromatografijo kvantitativno določimo količino iskanih spojin. Kromatografske tehnike ločimo glede na vrsto mobilne faze na tekočinsko in plinsko kromatografijo (37). Najpogosteje uporabljana tehnika tekočinske kromatografije je tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC), kjer se delci SF nahajajo v koloni. Pri tankoplastni tekočinski kromatografiji pa so delci SF nanešeni na ploščici. Pri tekočinski kromatografiji poznamo še dve vrsti: ionsko kromatografijo, kjer se ioni v vzorce ločijo glede na naboj, osnovo za ločevanje predstavljajo ionske interakcije med analiti (ioni) in nasprotno nabitimi ionskimi deli SF, in gelsko izključitveno

kromatografijo, kjer se delci ločijo na podlagi molekulske velikosti (učinek sita, ne gre za interakcije s SF) (28).

TEKOČINSKA KROMATOGRAFIJA Z UV-DETEKCIJO

Pri tekočinski kromatografiji je mobilna faza tekočina, ki potuje skozi kolono, v kateri so porozni delci z veliko površino in aktivnimi skupinami na površini. Poznamo več vrst tekočinske kromatografije, najpomembnejša med njimi pa je HPLC, ki je najpogosteje uporabljena tehnika za analizo farmacevtskih pripravkov, hrane ter bioloških tekočin (slika 4). Pri HPLC črpalka črpa mobilno fazo skozi kolono s konstanto hitrostjo, ponavadi med 0,5 in 2,0 mL/min. Tipične kolone, ki se uporabljajo pri HPLC analizi, so dolge 5–25 cm, polnjene z delci velikosti 2–5 μm . Volumen injiciranja je velikosti 1–100 μL . Raztopina se injicira pod visokim pritiskom direktno v tekočo mobilno fazo tik pred začetkom kolone (28).



Slika 4: Shematski prikaz HPLC analize metode (38)

Glede na polarost SF in mobilne faze ločimo normalno- in reverznofazno kromatografijo. Pri normalnofazni kromatografiji so HPLC kolone polarne, mobilne faze pa relativno nepolarne. Danes najpogosteje uporabljamo reverznofazno kromatografijo, pri kateri so kolone hidrofobne (C_{18}), mobilne faze pa so vodne v kombinacijah z organskimi modifikatorji. Na reverznofaznih kolonah se dlje časa zadržujejo hidrofobni analiti. Skozi kolono najkasneje pridejo velike, nepolarne molekule. Pogosto uporabljamo gradient sestave mobilne faze za ločitev zmesi, na primer gradient pufer/metanol (37).

Pri HPLC imamo na voljo več različnih detektorjev: masni, UV, fluorescenčni, elektrokemični, detektor na spremembo lomnega količnika ter kombinacije detektorjev (28). UV-detekcija je nedestruktivna tehnika. Temelji na absorpciji UV-svetlobe. Odziv dajejo tiste substance, ki absorbirajo sevanje enake valovne dolžine, kot je vir svetlobe.

Tjaša Brcar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Veliko analitov oz. strukturnih fragmentov absorbira svetlobo, med njimi tudi aromatski obroči, karbonili, brom, jod ter žveplo. UV-detektorji so neselektivni in relativno občutljivi, lahko jih uporabimo tudi pri gradientni eluciji. Detektor je sestavljen iz majhne tekoče pretočne celice, skozi katero teče eluent. Skozi celico sveti UV-svetloba, ki pride do fotodetektorja. Celica je ponavadi iz kvarčnega stekla, ki je UV transparenten. Mobilna faza je izbrana tako, da pri izbrani valovni dolžini absorbira malo ali nič svetlobe. Poznamo dva načina UV-detekcije: direktno in indirektno. Pri direktni UV-detekciji eluent absorbira zelo malo ali nič svetlobe. Ko je v eluentu analit, le-ta absorbira določeno količino svetlobe in skozi celico pride manj svetlobe na fotodetektor. Zmanjšanje svetlobe je sorazmerno s koncentracijo, molarno absorptivnostjo in dolžino (37). Absorbirana svetloba je po Beerovem zakonu proporcionalna koncentraciji analita v mobilni fazi, dolžini poti sevanja skozi pretočno celico in absorptivnosti substance (28). Indirektno UV-detekcijo uporabimo, kadar analit ne vsebuje kromofora. V tem primeru ima ozadje visok odziv, saj eluent vsebuje kromofor. Ko pride skozi detektor analit, vidimo negativen odziv, brez kromoforov (37).

PLINSKA KROMATOGRAFIJA Z MASNO SPEKTROMETRIČNO DETEKCIJO

GC je separacijska tehnika, ki se uporablja za analizo hlapnih spojin ali spojin, ki jih lahko pretvorimo v hlapne (28). Kromatografski sistem predstavlja plinski kromatograf, ki je sestavljen iz 4 komponent. Prva je vir plina, ki dostavlja mobilno fazo. Vsebuje regulatorje pritiska za kontrolirano dostavo plina. Drugi del je sistem za injiciranje (zanka ali port), ki omogoča nanos analita ter njegovo uparitev. Za njim se nahaja kolona, ki vsebuje SF in je segreti na točno določeno temperaturo. Zadnji del plinskega kromatografa je detektor (34). Mobilno fazo predstavlja inertni plin (dušik, helij, vodik), ki potuje skozi ogreto kolono (28). Čistost mobilne faze je zelo pomembna, saj bi zaradi prisotnosti vode, kisika ter raznih organskih substanc lahko prišlo do kontaminacije ali uničenja kolone, pa tudi do slabše občutljivosti na detektorju (34).

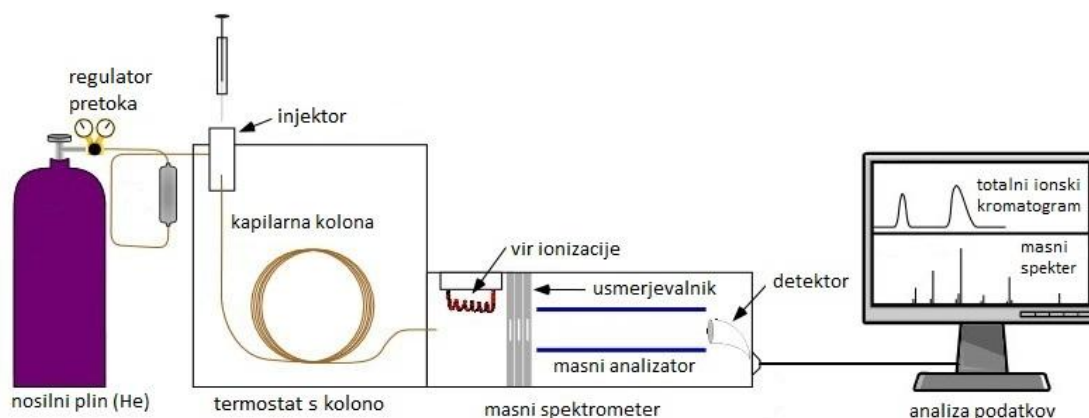
V koloni je SF, ki je lahko nanešena na notranjo površino kolone ali kot obloga delcev v koloni (28). Polnjene kolone vsebujejo majhne delce, prekrute s SF. Imajo veliko površino, zato lahko nanje naneseemo veliko vzorca, vendar so manj učinkovite kot kapilarne kolone. Pri kapilarnem tipu kolon pa je SF nanešena na notranji površini. Odlikuje jih večja učinkovitost in resolucija, kot posledica pa nižja meja detekcije ter hitrejša ločba, zato jih tudi pogosteje uporabljamo (34).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Vzorec se injicira v ogrevan injektor na začetku kolone, kjer se analit upari (28). Volumen injiciranja je ponavadi 0,5–10 μL . Poznamo dva načina injiciranja. Pri načinu »split« se uparjen vzorec razdeli in samo del vzorca potuje iz injektorja naprej v kolono, pri načinu »splitless« pa se v kolono injicira celoten vzorec. Temperatura injektorja mora biti optimizirana za vsak analit posebej. Biti mora dovolj visoka za takojšnjo evaporacijo, vendar ne sme biti previsoka, saj s tem povečamo tveganje za razgradnjo analitov. Začetna temperatura v koloni je nižja od temperature na injektorju. Večina GC analiz se izvaja s temperaturnim programiranjem, kar pomeni, da med kromatografskim procesom temperatura kolone narašča glede na določen temperaturni program, ki je za vsak analit drugačen. Detektor ima višjo temperaturo, saj s tem preprečimo kondenzacijo analita na njem (28).

Pri plinski kromatografiji je retencijski čas odvisen od hlapnosti spojine, temperaturnega programa segrevanja kolone ter interakcije spojine s kolono. Mobilna faza pa ne vpliva na zadrževanje spojin na koloni, saj je uporabljeni plin inerten (34).

Pri plinski kromatografiji imamo na voljo več različnih detektorjev: plamensko ionizacijski detektor (FID), toplotno prevodni detektor (TCD) ter detektor na zajetje elektronov (ECD). Namesto enostavnih detektorjev, kot so FID, TCD ter ECD, lahko GC metodo sklopimo z metodo masne spektrometrije (MS). Tako dobimo sklopljeno tehniko plinske kromatografije in masne spektrometrije (GC-MS), ki jo prikazuje spodnja slika (slika 5). Rezultat analize ni več kromatogram, temveč masni spekter (28).



Slika 5: Shematski prikaz sklopljene tehnike GC-MS (39)

MS omogoča kvantifikacijo ter poda tudi strukturne informacije o spojini (28). GC-MS je močno orodje za merjenje in identifikacijo analitov. Analiti izstopijo iz kolone v plinastem stanju, potujejo skozi ionski izvor, ki jih v primeru elektronske ionizacije obstreljuje s snopom elektronov z energijo 70 eV. Pri tem se vezi cepijo na ponovljiv način, nastanejo

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

molekulski ioni, od njih nekateri razpadejo na manjše delce – fragmente. Molekulski in fragmentni ioni se ločijo glede na razmerje mase in naboja (m/z) (34). Masni spekter predstavlja relativno intenziteto ionov kot funkcijo m/z in je za določeno spojino zelo karakterističen (prstni odtis spojine). Neznane spojine identificiramo s primerjavo dobljenega spektra s spektri iz GC-MS knjižnic, saj se ista spojina vedno cepi na enak, ponovljiv način (28).

Pri analizi z masnim spektrometrom imamo dve možnosti meritve. Lahko ga uporabimo kot splošni detektor – snemanje celotnega spektra (ang. »full scan mode«), ki detektira vse ione v definiranem območju m/z , ki so prisotni v vzorcu. Ta način analize je uporaben, kadar identificiramo analit. Drugi način je snemanje izbranih masnih fragmentov (SIM, ang. »selected ion monitoring«), ki detektira samo vnaprej izbrane m/z . Uporabimo ga, kadar vnaprej vemo, katero spojino analiziramo in kateri ioni bodo nastali. Prednost tega načina je v 100- do 1000-krat nižji meji detekcije in kvantifikacije (34).

GC se lahko uporablja za kvalitativno in kvantitativno analizo. Kvalitativne informacije predstavljajo identifikacijo substance. Identifikacija pri ostalih prej naštetih vrstah detekcije temelji na primerjavi retencijskega časa med standardom in analitom v vzorcu. Bolj natančno pa identificiramo spojino z uporabo MS kot detektorja, saj je masni spekter unikaten za posamezno spojino. Pri kvantitativni analizi najprej določimo umeritveno premico, nato pa iz območja pod krivuljo s pomočjo enačbe umeritvene premice določimo koncentracijo analita v vzorcu. Za določitev umeritvene krivulje lahko uporabimo tudi dodatke internih ali eksternih standardov (37).

S plinsko kromatografijo ne moremo ločiti velikih polarnih molekul, kot so peptidi, proteini, nukleotidi, polisaharidi in ostale biološke molekule, za te je primernejši način ločbe s tekočinsko kromatografijo (28).

2 NAMEN DELA

Zdravilne učinkovine postajajo vedno bolj zaskrbljujoči onesnaževalci okolja. Ostanki zdravilnih učinkovin konstantno vstopajo v okolje zaradi uporabe v humani in veterinarski medicini ter iz industrijskih in gospodinskih odpadkov. Uporaba vseh zdravil se z leti povečuje, v zadnjem času pa se še posebej intenzivno povečuje predpisovanje in uporaba zdravil z delovanjem na centralno živčevje, med njimi tudi antidepresivov, kot je sertralin. Zaradi tega se povečujejo tudi njihove koncentracije v okolju, predvsem v odpadnih in površinskih vodah. Pomemben del razgradnje teh spojin iz okolja poteka preko reakcij fotorazgradnje, ki jih delimo na direktno in indirektno fotolizo. Kinetika ter hitrost teh reakcij za sertralin še nista povsem raziskani. Zato je bil cilj magistrske naloge raziskati in določiti hitrost fotorazgradnje antidepresiva sertralin pod vplivom sončne svetlobe.

Hitrost direktne fotorazgradnje bomo določili tako, da bomo v ultra čisto MILLI-Q vodo dodali znano količino sertralina in raztopino obsevali v fotokemičnem reaktorju različno dolgo. Po obsevanju bomo dodali IS, da bomo lahko kvantitativno določili količino sertralina v raztopini. Vzorce bomo po različno dolgih obsevanjih skoncentrirali s postopkom SPE. Po ekstrakciji bomo vzorce derivatizirali in s tem omogočili analizo z GC-MS. Rezultati analize nam bodo podali zmanjševanje koncentracije sertralina v odvisnosti od časa obsevanja.

Za določitev hitrosti indirektno fotolize sertralina bomo ponovili zgoraj opisan postopek, raztopinam pa bomo pred obsevanjem dodali različne anorganske snovi, ki so prisotne v površinskih vodah in lahko pospešijo fotolizo. Najprej bomo določili hitrost fotorazgradnje v raztopini z dodanimi nitratnimi ioni. Pri nadaljnjih vzorcih bomo uporabljali vedno enako količino nitratnih ionov, ki jim bomo dodali še različne koncentracije karbonatnih ali fosfatnih ionov. S tem bomo določili vpliv posameznih ionov, ki so naravno prisotni v vodi. Z dodatkom barvila Rose bengal (RB) bomo določili še vpliv $^1\text{O}_2$ na hitrost fotorazgradnje. Tem vzorcem bomo dodali še furfural alkohol (FFA), ki ima vlogo lovilca reaktivnih kisikovih zvrsti.

Vse kombinacije raztopin bomo obsevali še pri višji koncentraciji sertralina, da bomo lahko ugotovili vpliv različne koncentracije analita na hitrost njegove fotorazgradnje. Vzorce z višjo koncentracijo sertralina bomo analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti z UV detekcijo (HPLC-UV). Pri tem priprava vzorca s SPE in derivatizacija

Tjaša Brcar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

ne bosta potrebni. Oba analizna postopka bomo tudi validirali. Določili bomo območje linearnosti, ponovljivost postopka ter mejo kvantifikacije.

Na koncu bomo raztopine sertralina brez in z dodatkom modifikatorjev fotolize izpostavili še sončni svetlobi. Znano količino sertralina bomo dodali tudi vodi iz reke in ugotovili, kako hitro dejansko poteka fotorazgradnja v rekah pod vplivom sončne svetlobe.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

3.1.1 Standardi

Za pripravo standardne raztopine smo uporabili sertralinijev klorid (Krka, Novo mesto, Slovenija).

Kot IS smo uporabili:

deuteriran sertralinijev klorid (Sigma-Aldrich, Gillingham, Velika Britanija) in paroksetinjev maleat ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Gillingham, Velika Britanija).

3.1.2 Topila in reagenti

Pri pripravi vzorcev smo uporabljali naslednje spojine:

- natrijev nitrat (99 %, Acros Organics, Geel, Belgija);
- natrijev hidrogenkarbonat (99,5 %, Acros Organics, Geel, Belgija);
- natrijev dihidrogen fosfat (pro analysi (p. a.), MERCK, Darmstadt, Nemčija);
- dinatrijev hidrogenfosfat (MERCK, Darmstadt, Nemčija);
- Rose bengal (Alfa Aesar, Karlsruhe, Nemčija);
- furfuralni alkohol (98 %, Acros Organics, Geel, Belgija) in
- trietilamin ($> 99\%$, Sigma-Aldrich, Belgija).

Pri delu smo uporabili naslednja topila:

- acetonitril (p. a., J.T. Baker, Deventer, Nizozemska);
- etilacetat (p. a., J.T. Baker, Deventer, Nizozemska);
- metanol (p. a., J.T. Baker, Deventer, Nizozemska);
- diklorometan (p. a., J.T. Baker, Deventer, Nizozemska) in
- metanol (p. a., MERCK, Darmstadt, Nemčija) za čiščenje cevk.

Pri pripravi pufra smo uporabili naslednji spojini:

- natrijev hidroksid (p. a., AppliChem, Darmstadt, Nemčija) in
- dinatrijev hidrogenfosfat (MERCK, Darmstadt, Nemčija).

Za derivatizacijo smo uporabili naslednji spojini:

- acetanhidrid ($> 98\%$, Acros Organic, Geel, Belgija) in
- piridin (99,5 %, Sigma-Aldrich, Gillingham, Velika Britanija).

Vzorce, ki smo jih obsevali, smo pripravljali v MILLI-Q vodi (18,2 M Ω cm, T = 25 °C; Millipore).

3.2 METODE

3.2.1 Aparature in pribor

Pri delu smo uporabljali naslednje aparature in pribor:

- avtomatske pipete Gilson (20–200 μL , 100–1000 μL , 1–5 mL);
- analitsko tehtnico Mettler Toledo AT201;
- stresalnika Vibromix in Vibromix 10;
- magnetno mešalo Rotamix 560 mm;
- pH meter Wissenschaftlich-Technische Werkstätten (Weilheim, Nemčija), pH 330;
- sušilnik za preprihanje z dušikom Evaporator system Glas-Col in
- celulozno nitratni filter z velikostjo por 0,45 μm (Sartorius, Göttingen, Nemčija).

Obsevanje smo izvajali v fotokemičnem reaktorju Immersion well photochemical reactor (model 3010; 125 watt; MPE – srednji pritisk, Photochemical Reactors LTD, Berkshire, Anglija), pri obsevanju smo uporabljali hladilnika iz kvarčnega in borosilikatnega stekla.

Za ekstrakcijo na trdnem nosilcu smo uporabili nosilce Oasis HLB (Waters, Irska) z volumnom 3 mL, maso sorbenta 60 mg ter velikostjo delcev sorbenta 30 μm . Nosilce smo namestili na SPE kadičko (Agilent Technologies). Pri delu smo uporabljali še vakuumsko črpalko Milipore.

3.2.2 Plinska kromatografija z masno spektrometrijo (GC-MS)

Analizo smo izvedli z GC-MS aparatom HP 6890 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Nemčija) s kapilarno kolono DB-5 ms, dolžine 30 m in z notranjim premerom 0,25 mm ter z velikostjo delcev 0,25 μm .

Pogoji analize:

- nosilni plin: helij;
- pretok: 1 mL/min;
- hitrost nosilnega plina: 37 cm/s;
- temperatura injektorja: 270°C;
- način injiciranja: splitless;
- volumen injiciranja: 1 μL ;
- temperatura vmesnika: 250°C.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Temperaturni program

Spodnja preglednica (preglednica 3) prikazuje temperaturni program pri analizi z analizno metodo GC-MS. Celotna analiza je trajala 18 minut.

Preglednica 3: Temperaturni program pri analizi GC-MS

Začetna temperatura	Hitrost naraščanja	Končna temperatura	Trajanje
100 °C		100 °C	2 min
100 °C	20 °C/min	300 °C	10 min
300 °C		300 °C	6 min

Ionizacija pri masno selektivni detekciji je potekala z elektroni (EI) z energijo 70 eV. Pri kvantifikaciji smo uporabljali način SIM z razmerjem med maso in nabojem (m/z) = 347, 349, 350, 352, 234 in 371. Odziva pri m/z = 347 in m/z = 349 sta predstavljala odziv sertralina, pri m/z = 350 in m/z = 352 pa odziv IS devteriranega sertralina (SERD3). Pri m/z = 350 je del odziva predstavljal tudi naš analit sertralin. Odzive IS paroksetinijevega maleata pa smo določali pri m/z = 234 in m/z = 371.

3.2.3 Tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (HPLC)

Analizo smo izvedli s HPLC aparatom Agilent 1100 DAD s kolono Phenomenex Kinetex, dolžine 50 mm in z notranjim premerom 2,1 mm, z reverznofazno stacionarno fazo C₁₈ na delcih premera 2,6 μm, s predkolono C₁₈ (Phenomenex).

Pogoji analize so bili:

- temperatura: 50 °C;
- mobilna faza: pretok 1 mL/min, izokratsko 23 % B; mobilna faza A: 0,085 % H₃PO₄ v MILLI-Q vodi, mobilna faza B: 100 % acetonitril;
- tlak: 285 bar;
- volumen injiciranja: 25 μL;
- detekcija: 210 nm, hitrost zajema (peakwidth 0,5 s);
- čas analize: 4 min.

4 EKSPERIMENTALNI DEL

4.1 PRIPRAVA RAZTOPIN

4.1.1 Priprava raztopin standardov

Pripravili smo 10 mL standardne raztopine sertralinijevega klorida s koncentracijo 186 mg/L (0,54 mM) v acetonitrilu. To standardno raztopino smo uporabljali pri delu v fotokemičnem reaktorju ter za validacijo analiznega postopka pred analizo z GC-MS. Za delo z višjimi koncentracijami sertralina, ki smo jih potem analizirali s HPLC-UV metodo, smo pripravili raztopino sertralina z višjo koncentracijo, in sicer 20 mL raztopine sertralinijevega klorida s koncentracijo 406 mg/L (1,18 mM). Za pripravo raztopin, ki smo jih izpostavili sončni svetlobi, smo morali ponovno pripraviti novo standardno raztopino sertralina. Tokrat smo pripravili 10 mL raztopine sertralinijevega klorida s koncentracijo 753 mg/L (2,20 mM).

IS SERD3 smo imeli na voljo v obliki že pripravljene metanolne raztopine s koncentracijo 100 µg/mL (0,29 mM). Pred dodajanjem vzorcu smo raztopino IS razredčili z metanolom do koncentracije 10 µg/mL (0,029 mM). Pripravili smo še 20 mL standardne raztopine IS paroksetinijevega maleata s koncentracijo 100 mg/L (0,22 mM) v metanolu.

Vse raztopine smo po pripravi in pred vsako uporabo vorteksirali 10 sekund, da so se dobro premešale. Iz pripravljenih standardnih raztopin smo nato odpipetirali volumne, ki smo jih potrebovali pri pripravi vzorca.

4.1.2 Priprava raztopin za indirektno fotolizo

Pripravili smo naslednje raztopine modifikatorjev fotolize:

- 100 mL 4,40 M raztopine natrijevega nitrata v MILLI-Q vodi;
- 200 mL 0,76 M raztopine natrijevega hidrogenkarbonata v MILLI-Q vodi;
- 200 mL 0,38 M raztopine fosfatnih ionov (raztopino smo pripravili iz natrijevega dihidrogenfosfata monohidrata in dinatrijevega hidrogenfosfata dihidrata) v MILLI-Q vodi in
- 100 mL raztopine RB v MILLI-Q vodi.

Vse raztopine smo po pripravi mešali na stresalniku 20 minut pri 300 obratih na minuto.

FFA je pri sobnih pogojih tekočina z gostoto 1,128 g/cm³ in molsko maso 98,10 g/mol. Za pripravo vzorcev za obsevanje smo odpipetirali ustrezen volumen FFA.

4.1.3 Priprava raztopin za validacijo metode

VALIDACIJA ANALIZNE METODE GC-MS

Za določitev izkoristka ekstrakcije smo pripravili dve seriji vzorcev. Prvo serijo je predstavljalo pet 200 mL vzorcev z 0,146 μM koncentracijo sertralina v MILLI-Q vodi. Vzorcem smo dodali 1,5 mL pufra (pH = 11,3) in jih ekstrahirali. Po ekstrakciji smo dodali IS SERD3 ter derivatizirali in analizirali na GC-MS. Drugo serijo vzorcev smo pripravili tako, da smo v tri vialo odpipetirali enake količine sertralina in IS SERD3, kot smo jih pri prvi seriji odpipetirali v 200 mL vzorčke. Raztopine smo derivatizirali in analizirali z GC-MS.

Za določitev območja linearnosti smo pripravili sedem vzorcev z različnimi koncentracijami sertralina: 5, 10, 20, 30, 40, 50 in 60 $\mu\text{g/L}$ (0,0146, 0,0292, 0,0584, 0,0875, 0,116, 0,146 in 0,175 μM). Vzorce smo pripravili v MILLI-Q vodi v ustrezno označenih stekleničkah. V vsako stekleničko smo dodali še IS SERD3 ter IS paroksetinijev maleat. Koncentracija IS SERD3 v vzorcu je bila 5 $\mu\text{g/L}$ (0,0145 μM), koncentracija IS paroksetinijevega maleata pa 50 $\mu\text{g/L}$ (0,112 μM). Dodali smo še 1,5 mL fosfatnega pufra ter začeli z ekstrakcijo, ki sta ji sledili derivatizacija ter analiza z GC-MS.

Za določitev ponovljivosti injiciranja smo pripravili vzorec z 0,146 μM koncentracijo sertralina in ga trikrat zaporedoma injicirali. Za določitev ponovljivosti ekstrakcije smo pripravili pet 200 mL raztopin z 0,146 μM koncentracijo sertralina. Vseh pet vzorcev smo ekstrahirali, derivatizirali in analizirali. Za določitev ponovljivosti celotnega postopka pa smo petkrat pripravili začetno raztopino z 0,146 μM koncentracijo sertralina ter jo obsevali v fotokemičnem reaktorju pol ure. Iz vsake raztopine smo po obsevanju odlili dva alikvota po 200 mL. Vseh deset 200 mL vzorcev smo ekstrahirali, derivatizirali in analizirali z GC-MS analizno metodo.

VALIDACIJA ANALIZNE METODE HPLC-UV

Za določitev območja linearnosti smo pripravili raztopine s koncentracijami sertralina 0,1, 0,5, 0,75, 1, 3 ter 5 mg/L (0,292, 1,46, 2,19, 2,92, 8,75 in 14,59 μM). Raztopine smo nato analizirali s HPLC-UV analizno metodo.

Za določitev ponovljivosti injiciranja smo petkrat injicirali že pripravljen vzorec s 14,59 μM koncentracijo. Za ponovljivost postopka priprave vzorca po obsevanju smo pripravili 4 vzorce z 2,92 μM koncentracijo sertralina ter jih analizirali s HPLC-UV analizno metodo.

4.1.4 Priprava raztopin za obsevanje v fotokemičnem reaktorju

Raztopine za obsevanje smo pripravili v fotokemičnem reaktorju v 760 mL MILLI-Q vode. Za preučevanje hitrosti razgradnje pri direktni fotolizi smo pripravili raztopino sertralina z 0,146 μM koncentracijo in jo nato mešali na magnetnem mešalu 10 minut pri hitrosti mešanja 400 obratov na minuto. Ta vzorec je predstavljal začetno raztopino ob času 0. Naslednje vzorce smo pripravili na enak način ter jih po 10 minutnem mešanju na magnetnem mešalu obsevali 30, 60, 120, 180, 240 in 300 minut. Za vsak interval obsevanja smo pripravili novo raztopino. Med obsevanjem smo raztopino ves čas mešali z magnetnim mešalom pri hitrosti 400 obratov na minuto, da bi tako preprečili temperaturne in koncentracijske gradiente. Po končanem obsevanju smo iz reaktorja odlili dva alikvota po 200 mL v označene stekleničke, preostanek raztopine pa smo zavrgli. Raztopinam v stekleničkah smo dodali 1,5 mL fosfatnega pufru ter 100 μL SERD3 ali 100 μL paroksetinijevega maleata. Nato smo vzorce ekstrahirali, derivatizirali ter analizirali z GC-MS.

Pri preučevanju hitrosti razgradnje z indirektno fotolizo smo poleg sertralina na začetku dodali še različne druge spojine, kot prikazuje spodnja preglednica (preglednica 4).

Raztopine za obsevanje pred analizo s HPLC-UV so imele višjo začetno koncentracijo sertralina, in sicer 2,92 μM . Potem smo zopet dodajali različne kombinacije drugih modifikatorjev fotolize (preglednica 4).

Po dodatku spodaj navedenih modifikatorjev fotolize smo vsako raztopino 10 minut mešali na magnetnem mešalu pri hitrosti mešanja 400 obratov na minuto. Po mešanju smo odvzeli prvi vzorec, ki je predstavljal raztopino ob času 0. V plastične posodice smo odpipetirali 5 mL raztopine. Od teh 5 mL smo 1 mL vsakega vzorca prenesli v vialo za nadaljnjo analizo transformacijskih produktov, 4 mL pa smo pustili v posodici za HPLC-UV analizo. Začetno raztopino, iz katere smo odvzeli 5 mL vzorca, smo nato obsevali določen čas in po vsakem časovnem intervalu odvzeli 5 mL ter ponovno obsevali isto raztopino do naslednje časovne točke, v kateri smo odvzeli nov vzorec. Raztopine smo ves čas obsevanja mešali z magnetnim mešalom pri hitrosti 400 obratov na minuto.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica 4: Prikaz različnih raztopin analita ter modifikatorjev fotolize in časov obsevanja posameznih vzorcev

Eksperiment	dodatek SER	dodatek NaNO ₃	dodatek NaHCO ₃	dodatek Na ₂ HPO ₄ in NaH ₂ PO ₄	dodatek RB	dodatek FFA	časi obsevanja (minute)
1.	0,146 μM	/	/	/	/	/	0, 30, 60, 120, 180, 240, 300
2.	0,146 μM	1 mM	/	/	/	/	0, 30, 60, 90, 120, 180, 300
3.	0,146 μM	1 mM	0,5 mM	/	/	/	0, 15, 30, 60, 90, 120, 150
4.	0,146 μM	1 mM	1 mM	/	/	/	0, 15, 30, 60, 90, 120, 150
5.	0,146 μM	1 mM	10 mM	/	/	/	0, 15, 30, 60, 90, 120, 150
6.	0,146 μM	1 mM	/	0,5 mM	/	/	60
7.	0,146 μM	1 mM	/	1 mM	/	/	60
8.	0,146 μM	1 mM	/	10 mM	/	/	60
9.	0,146 μM	/	/	/	10 μM	0,1 mM	0, 30, 60, 90, 120, 150, 180
10.	2,92 μM	/	/	/	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360, 420
11.	2,92 μM	1 mM	/	/	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300
12.	2,92 μM	1 mM	0,5 mM	/	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300
13.	2,92 μM	1 mM	1 mM	/	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300
14.	2,92 μM	1 mM	10 mM	/	/	/	0, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 180
15.	2,92 μM	1 mM	/	0,5 mM	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300
16.	2,92 μM	1 mM	/	10 mM	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300
17.	2,92 μM	/	/	/	10 μM	0,1 mM	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240
18.	8,76 μM	/	/	/	10 μM	0,1 mM	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240

4.1.5 Priprava raztopin za obsevanje na sončni svetlobi

Raztopine smo pripravili v steklenicah iz kvarčnega stekla, ki dobro prepuščajo sončno svetlobo. Volumni pripravljenih raztopin so bili 1160 mL. Pripravili smo naslednje raztopine z dodatki modifikatorjev fotolize, ki so navedene v spodnji preglednici (preglednica 5). Vzeli smo tudi vzorec vode iz potoka Gradaščica, da bi videli, kako hitro se razgrajuje sertralin v naravnem okolju (površinskih vodah).

Preglednica 5: Prikaz kombinacij dodanih modifikatorjev fotolize in časov izpostavljanja posameznih vzorcev sončni svetlobi

	dodatek SER	dodatek NaNO ₃	dodatek NaHCO ₃	dodatek RB	dodatek FFA	medij	časi obsevanja (dnevi)
1.	0,146 µM	/	/	/	/	MILLI-Q voda	0,1,2
2.	0,146 µM	1 mM	/	/	/	MILLI-Q voda	0,1,2
3.	0,146 µM	1 mM	0,5 mM	/	/	MILLI-Q voda	0,1,2
4.	0,146 µM	1 mM	1 mM	/	/	MILLI-Q voda	0,1,2
5.	0,146 µM	1 mM	10 mM	/	/	MILLI-Q voda	0,1,2
6.	0,146 µM	/	/	10 µM	0,1 mM	MILLI-Q voda	0,1,2
7.	0,146 µM	/	/	/	/	voda iz reke*	0,1,2

*Gradaščica, 4. julij 2014, trenutni vzorec

Pripravljene raztopine smo mešali na stresalniku 30 minut pri hitrosti mešanja 200 obratov na minuto. Nato smo iz vsake steklenice odlili dva alikvota po 200 mL v označene steklenice. Ti vzorci so predstavljali začetno koncentracijo sertralina v raztopinah. Raztopine smo nato izpostavili sončni svetlobi v času od 5. do 6. julija (23,4 ure sončne svetlobe) v kraju Vrh pri Šentrupertu na Dolenjskem. Iz vsake steklenice smo prvi večer (po 9,8 urnem obsevanju) odlili 200 mL raztopine v označene manjše stekleničke, preostale raztopine pa smo naslednji dan ponovno izpostavili sončni svetlobi. Tudi drugi

dan (po skupno 23,4 ure obsevanja) smo iz vsake steklenice odlili 200 mL raztopine v označene manjše stekleničke. 200 mL vzorčkom smo dodali 1,5 mL fosfatnega pufru, 100 μ L SERD3 ter 100 μ L paroksetinijevega maleata. Vzorce, pri katerih je bila medij voda iz reke, smo pred ekstrakcijo filtrirali s pomočjo presesalne buče in črpalke skozi celulozno nitratni filter z velikostjo por 0,45 μ m. Vse vzorce smo nato ekstrahirali, derivatizirali ter analizirali z GC-MS.

4.2 PRIPRAVA PUFRA

V raziskovalni skupini IJS so ugotovili, da je največji izkoristek ekstrakcije sertralina pri alkalnem pH-ju medija (v območju pH 11,0–11,8), zato smo pripravili pufer, ki ima pH znotraj omenjenih vrednosti. Odločili smo se za pripravo fosfatnega pufru. Fosforna kislina ima naslednje vrednosti konstant disociacije: $pK_{a1} = 2,15$; $pK_{a2} = 7,20$ in $pK_{a3} = 12,4$. Pufer smo pripravili iz natrijevega hidroksida (NaOH) in dinatrijevega hidrogenfosfata (Na_2HPO_4). Natehtali smo 0,644 g NaOH in ga raztopili v 20 mL vode ter 8,11 g Na_2HPO_4 in ga raztopili v 100 mL vode. Postopoma smo s kapalko dodajali raztopino NaOH v raztopino Na_2HPO_4 in vmes merili pH vrednost nastale raztopine. Ko smo dodali vso raztopino NaOH, je bil pH raztopine 11,4, kar je ustrezalo našim zahtevam (pH 11,0–11,8). Določiti smo morali še, kolikšen volumen pufru moramo dodati 200 mL vzorcem v stekleničkah, da bo pH vzorca v zelenem območju. Dodajali smo majhne količine pufru, mešali in merili pH raztopine. Ugotovili smo, da zadošča dodatek 1,5 mL pufru. Ob tem dodatku je bil pH naših vzorcev 11,3.

4.2 FILTRACIJA

Okoljske vzorce moramo pred ekstrakcijo na trdnem nosilcu filtrirati, drugače lahko komponente matriksa zamašijo ekstrakcijske nosilce. Vzorce, v katerih je bila medij voda iz reke, smo pred ekstrakcijo na trdnem nosilcu prefiltrirali skozi nitratni celulozni filter z velikostjo por 0,45 μ m. Vzorce smo prefiltrirali s pomočjo presesalne buče in vakuumske črpalke.

4.3 EKSTRAKCIJA NA TRDNEM NOSILCU

Pred ekstrakcijo smo vsakemu vzorcju dodali znano koncentracijo IS SERD3 in paroksetinijevega maleata ter 1,5 mL fosfatnega pufru.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Pri postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu smo najprej kondicionirali kolono. Kolona je bila Oasis HLB, polnjena s hidrofilno-lipofilnim komopolimerom *N*-vinilpirolidona in divinilbenzena. Zmes diklorometana in acetonitrila v razmerju 1:1 smo nalili do vrha nosilca ter pustili 5 minut. Nato smo tekočino spustili skozi, nalili metanol, počakali, da se je nosilec izpraznil, ter nalili vodo s pufrom, ki je bila medij naše raztopine.

Na nosilce smo namestili teflonske cevke, skozi katere smo s pomočjo vakuuma črpali raztopine vzorcev skozi sorbent. Hitrost pretoka smo uravnali na približno 1,7 mL/min (1 kapljica na 2 sekundi). Čas ekstrakcije za 200 mL vzorec je bil tako približno 2 uri. Ko je vsa raztopina vzorca stekla skozi kolono, smo odstranili cevko, zlili vodo iz kadičke, jo obrisali in vzorce sušili pri maksimalnem tlaku najmanj pol ure oziroma toliko časa, da je sorbent postal sipek.

Sertralin smo eluirali z raztopino acetonitrila in diklorometana v razmerju 1:1 z dodatkom 2 % baze trietilamina. Volumen zmesi za eluiranje je bil 3 x 0,6 mL za vsako kolono. Prvih 0,6 mL smo pustili na koloni približno 4 minute. Eluate smo zbrali v označene viale.

4.4 DERIVATIZACIJA

Eluate smo do suhega posušili v sušilniku s prepihanjem z dušikom in segrevanjem pri 40 °C. Nato smo dodali 15 µL acetanhidrida ter 5 µL piridina, vorteksirali 10 sekund ter pustili na sobni temperaturi eno uro. Po eni uri smo zopet posušili do suhega s prepihanjem z dušikom pri 40 °C, nato smo dodali 0,5 mL etilacetata ter ponovno vorteksirali 10 sekund. Tako pripravljene vzorce so bili primerni za nadaljnjo analizo na GC-MS.

4.5 SHRANJEVANJE RAZTOPIN

Večino pripravljenih standardnih raztopin smo shranjevali v hladilniku pri 4 °C. V hladilniku smo do analize shranjevali tudi raztopine po obsevanju (200 mL v stekleničkah po odlitju iz fotokemičnega reaktorja). V zamrzovalniku pri - 20 °C smo shranjevali standardne raztopine SERD3, eluate po SPE in derivatizirane vzorce pred analizo na GC-MS ter raztopine po obsevanju pri višjih koncentracijah (4 mL v posodicah in 1 mL v vialah za določitev transformacijskih produktov). Pri sobni temperaturi smo shranjevali fosfatni puffer, saj je bila koncentracija fosfatnih ionov pri sobni temperaturi blizu meje topnosti in bi v hladilniku prišlo do kristalizacije.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 DOLOČITEV KONCENTRACIJSKEGA OBMOČJA RAZTOPIN PRI EKSPERIMENTIH FOTOLIZE

Pred začetkom dela smo morali določiti, kakšne koncentracije spojin (analita, IS, reagentov in modifikatorjev fotolize) bomo pri našem raziskovalnem delu uporabili.

Za začetno koncentracijo sertralina pri obsevanju pred analizo z GC-MS smo izbrali 0,146 μM koncentracijo. Uporabljena koncentracija je približno tisočkrat višja od koncentracij, ki so jih različni raziskovalci določili v površinskih in odpadnih vodah. Tako visoko koncentracijo smo izbrali zato, ker smo želeli spremljati razgradnjo sertralina do vsaj 80 % odstranitve. Z izbrano metodo in 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina smo tako lahko kvantitativno določili, kdaj je bilo prisotnih le še 20 % začetne spojine. V drugem delu našega raziskovalnega dela, ko smo vzorce analizirali z analizno metodo HPLC-UV, smo povežali uporabljen koncentracijo sertralina na 2,92 μM , dodatki ostalih spojin pa so ostali enaki.

Koncentracija IS SERD3 je bila 0,0289 μM . Pri določitvi te koncentracije smo naredili kompromis med ceno IS in odzivom, zato je izbrana koncentracija nekoliko nižja.

Uporabljena koncentracija drugega IS, paroksetinijevega maleata, je bila 0,225 μM . To koncentracijo smo izbrali na podlagi meritev AUC pri različnih koncentracijah v območju do 0,225 μM . Pri 0,225 μM koncentraciji sta bili površini pod krivuljo sertralina in paroksetina najbolj podobni.

Vpliv nitratnih ionov na hitrost fotorazgradnje sertralina so v raziskovalni skupini IJS že določali. Pri tem so uporabili 1 mM koncentracijo nitratnih ionov. Zaradi lažje primerjave rezultatov smo tudi mi uporabili enako koncentracijo nitratnih ionov. Uporabljene koncentracije so nekoliko višje od koncentracij nitratnih ionov, ki so bile določene v površinskih vodah. Huang in sodelavci (22) so leta 2000 določali koncentracije nitratnih ionov v površinskih vodah, kjer so dobljene vrednosti znašale od 0,003 do 0,3 mM (22).

Pri izbiri koncentracij ostalih modifikatorjev fotolize, ki smo jih dodajali raztopini pred obsevanjem, smo si pomagali s člankom Vione s sodelavci, ki opisuje modeliranje fotokemične razgradnje ibuprofena v površinskih vodah (40).

Za preučevanje vpliva dodatka karbonatnih ionov pri fotorazgradnji, pospešeni z nitratom, so Vione in sodelavci (40) uporabili naslednje koncentracije karbonatnih ionov: 2 mM, 4 mM, 8 mM ter 10 mM (40). Mi smo pri delu uporabili 3 različne koncentracije

karbonatnih ionov v enakem območju kot avtorji zgoraj navedenega članka. Pripravili smo raztopine za obsevanje z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM, 1 mM ali 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov. Uporabljene koncentracije so v enakem koncentracijskem območju kot koncentracije karbonatnih ionov v površinskih vodah. Huang in sodelavci (22) so leta 2000 določali količino karbonatnih ionov v rekah in ugotovili, da se skupna količina karbonatnih in bikarbonatnih ionov giblje od 22,1 ppm do 273 ppm, kar predstavlja 0,37 mM do 4,55 mM koncentracijo ionov (22).

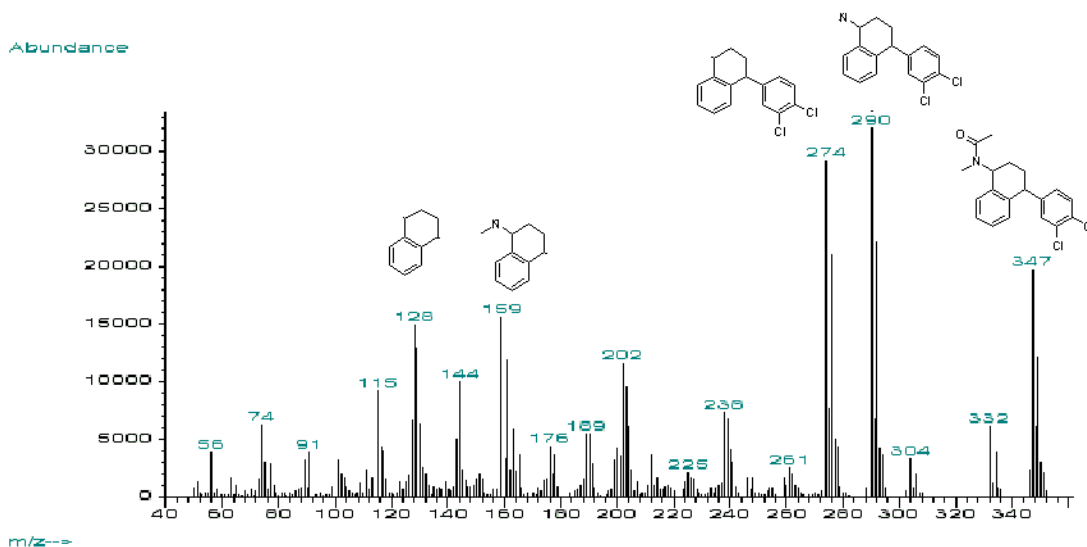
Za preučevanje vpliva dodatka fosfatnih ionov pri fotorazgradnji, pospešeni z nitratom, so Vione in sodelavci (40) uporabili koncentraciji fosfatnih ionov 6 mM in 10 mM (40). Mi smo pri delu uporabili 3 različne koncentracije dodatkov v enakem območju kot avtorji zgoraj navedenega članka. Pripravili smo raztopine z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM, 1 mM ali 10 mM koncentracijo fosfatnih ionov. Te koncentracije so bistveno višje od koncentracij, ki so prisotne v površinskih vodah. Leta 2000 so Hudson in sodelavci (41) določili koncentracije fosfatov v jezerih v Severni Ameriki v območju od 0,058 do 4,5 μM (41).

Vione in sodelavci (40) so preučevali tudi vpliv $^1\text{O}_2$ na hitrost fotorazgradnje ibuprofena. $^1\text{O}_2$ nastaja iz tripletnega kisika, kot katalizator pri pretvorbi ob svetlobi so uporabili barvilo RB. Preučevali so vpliv koncentracije ibuprofena na hitrost njegove razgradnje ob konstantni koncentraciji barvila RB (10 μM) in FFA (0,1 mM). Uporabili so različne koncentracije ibuprofena v območju do 10 μM (40). Mi smo preučevali vpliv dodatka sertralina na hitrost njegove fotorazgradnje, pospešene s $^1\text{O}_2$. Za prvi dve koncentraciji smo uporabili enaki količini sertralina kot pri ostalih poskusih. Prva je bila 0,146 μM , druga 2,92 μM . Dodatno smo pripravili še raztopino z 8,75 μM koncentracijo sertralina. Koncentraciji barvila RB in FFA, ki smo ju uporabili, pa sta bili enaki kot v članku (40).

5.2 RAZLAGA MASNIH SPEKTROV

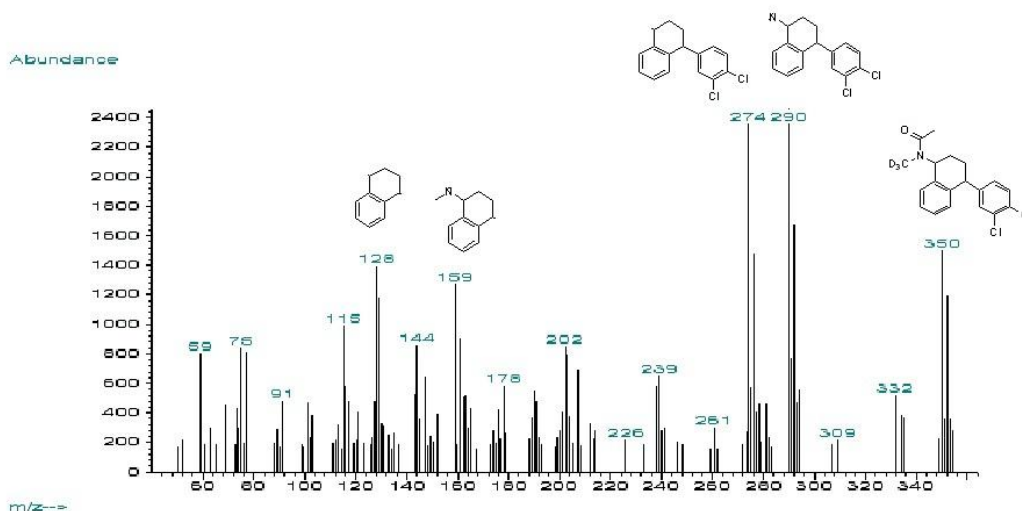
V masnem spektru acetiliranega sertralinijevega klorida (slika 6) vidimo izrazit molekulski ion pri $m/z = 347$. Zraven molekulskega iona se nahajajo še izotopski ioni, ki nastanejo zaradi naravnega izotopa klorovega atoma v sertralinu. Najizrazitejši je pri $m/z = 349$. Manjši izotopski ion vidimo tudi pri $m/z = 351$. Masni spekter ima bazni ion pri $m/z = 290$, kar ustreza odcepu metilne in etilaldehidne skupine z dušika. Poleg teh so izraziti še fragmentni ioni pri $m/z = 274$, $m/z = 159$ ter $m/z = 128$.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



Slika 6: Masni spekter acetiliranega sertralinijevega klorida

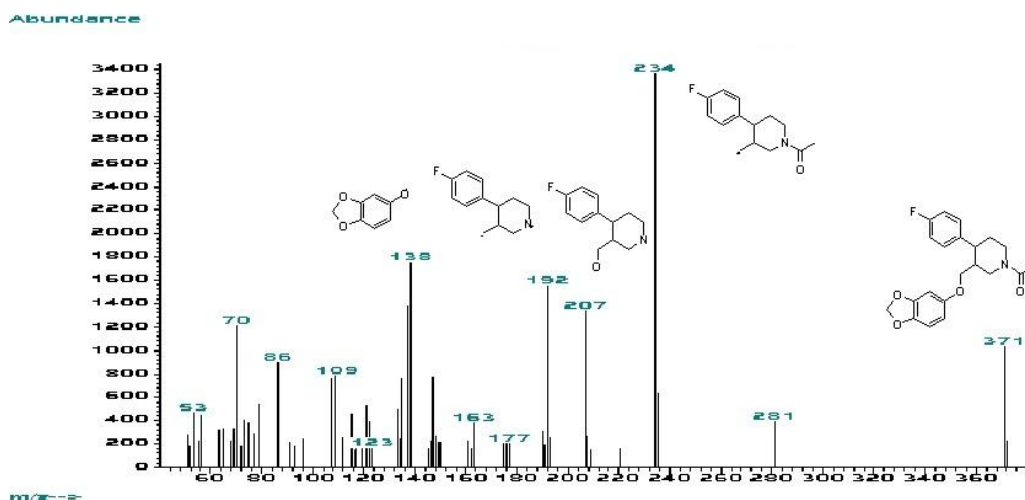
V masnem spektru IS acetiliranega SERD3 (slika 7) vidimo izrazit molekulski ion pri $m/z = 350$. Zraven molekulskega iona se nahajajo še izotopski ioni, ki nastanejo zaradi naravnega izotopa klorovega atoma v sertralinu. Najizrazitejši je pri $m/z = 352$. Spekter ima bazni ion pri $m/z = 290$, kar ustreza odcepu devterirane metilne in etilaldehidne skupine z dušika. Poleg teh so izraziti še enaki fragmentni ioni kot pri spektru acetiliranega sertralinijevega klorida, in sicer pri $m/z = 274$, $m/z = 128$ ter $m/z = 159$.



Slika 7: Masni spekter acetiliranega SERD3

V masnem spektru IS paroksetinijevega maleata (slika 8) se molekulski ion nahaja pri $m/z = 371$. Spekter ima bazni ion pri $m/z = 234$, kar ustreza odcepu aromatskega etra. Poleg teh so izraziti še fragmentni ioni pri $m/z = 207$, $m/z = 192$ ter $m/z = 138$.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



Slika 8: Masni spekter acetiliranega paroksetinjevega maleata

Pri nadaljnji analizi smo kot odziv metode uporabili razmerje med površinami kromatografskih vrhov. Pri vzorcih, ki smo jim kot IS dodali SERD3, smo uporabili razmerje med površino pod krivuljo molekulskega iona acetiliranega sertralinijevega klorida z $m/z = 347$ ter površino pod krivuljo acetiliranega SERD3 z $m/z = 350$. Ostali fragmentni ioni so enaki pri obeh spojinah ($m/z = 274$, $m/z = 290$, $m/z = 207$ ter $m/z = 159$), zato jih nismo mogli uporabiti pri kvantifikaciji. Pri uporabi IS paroksetina pa smo pri analizi uporabili razmerje površin pod krivuljo molekulskega iona sertralinijevega klorida ($m/z = 347$) ter baznega iona iz masnega spektra paroksetina ($m/z = 234$).

V masnih spektrih sertralinijevega klorida in SERD3 vidimo, da imata obe spojini v spektru ione z $m/z = 350$. Pri sertralinijevem kloridu ta ion predstavlja izotopski ion molekulskega iona z $m/z = 347$. Odziv je pri sertralinijevem kloridu relativno majhen, vendar je imel pri našem delu velik pomen. Uporabljena koncentracija sertralina je bila desetkrat višja od koncentracije IS, zato je odziv sertralina predstavljal velik delež odziva IS SERD3 pri $m/z = 350$. Da bi izničili vpliv koncentracije sertralina na površino pod krivuljo pri odzivu IS ($m/z = 350$), smo poskušali določiti, kakšen delež odziva $m/z = 347$ ima sertralin pri $m/z = 350$. Rastopino sertralina smo 6-krat injicirali v GC-MS in določili razmerje med površinama pod kromatografskima vrhovoma pri $m/z = 350$ in $m/z = 347$ ($AUC(350)/AUC(347)$), kot prikazuje spodnja preglednica (preglednica 6).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica 6: Izračun vpliva izotopskega iona acetiliranega sertralinijevega klorida na površino pod krivuljo pri $m/z = 350$

	AUC (347)	AUC (350)	AUC (350)/ AUC (347)
1	637749	93193	0,146
2	673092	96414	0,143
3	577108	84467	0,146
4	723484	105558	0,146
5	520871	75409	0,145
6	524096	76327	0,146
Povprečna vrednost			0,145

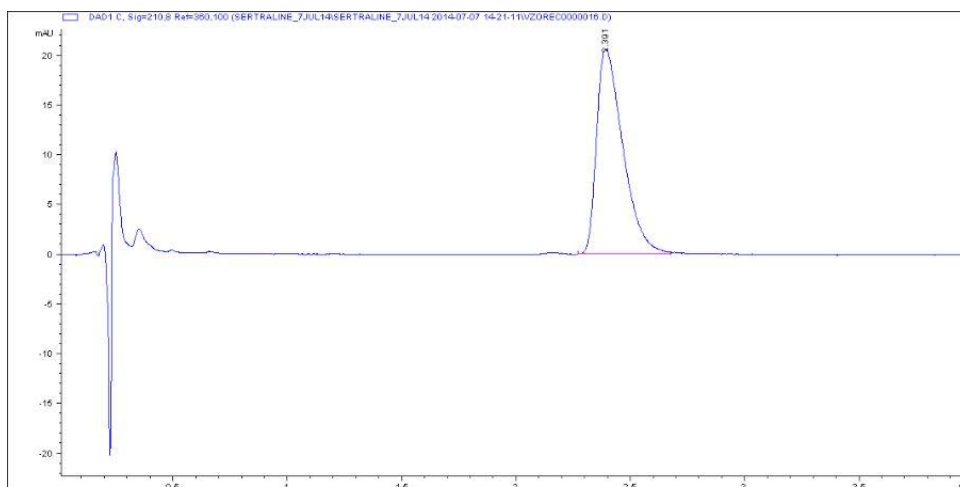
Vidimo, da je odziv izotopskega iona sertralinijevega klorida pri $m/z = 350$ predstavljal povprečno 14,5 % odziva molekulskega iona sertralinijevega klorida pri $m/z = 347$. To smo upoštevali pri nadaljnjih rezultatih analiz. Po spodnji enačbi smo izračunali, kakšno AUC je pri $m/z = 350$ predstavljal odziv sertralina in to vrednost odšteli od skupne vrednosti.

$$AUC_{serd3} = AUC_{350} - 0,145 * AUC_{347}$$

Tako smo dobili vrednost, ki je predstavljala površino pod krivuljo IS SERD3.

5.3 KROMATOGRAM HPLC-UV

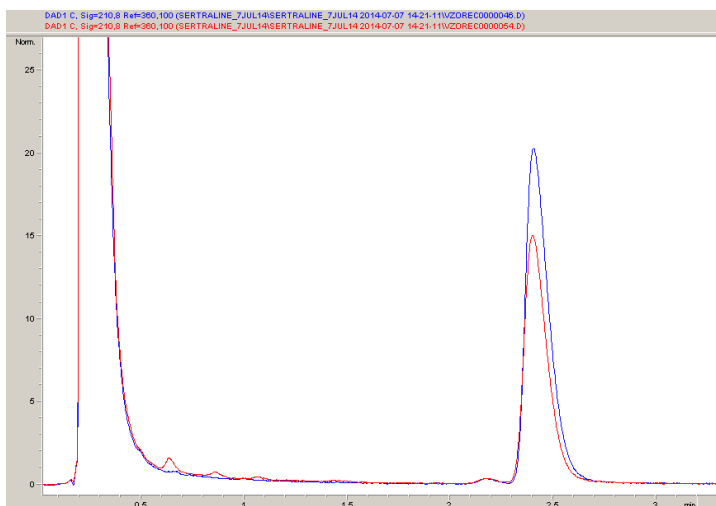
Pri analizi z analizno metodo HPLC-UV smo kot rezultat dobili kromatogram, kot je prikazan na spodnji sliki (slika 9). Vidimo, da kromatografski vrh pri retencijskem času 2,5 min predstavlja naš analit sertralin, fronta topila pa je pri času 0,23 min. Kromatogram prikazuje odziv po injiciranju standardne raztopine sertralina s koncentracijo 2,92 μM .



Slika 9: Rezultat analize z analizno metodo HPLC-UV

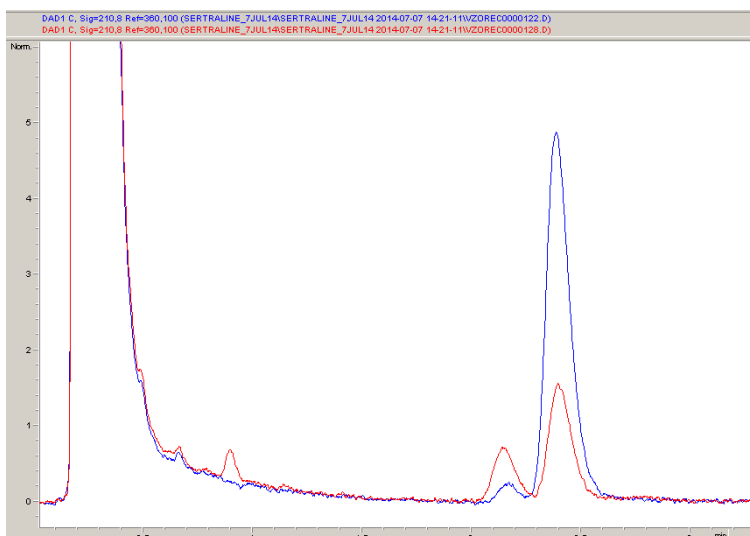
Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Slika 10 prikazuje prekrita kromatograma vzorca z 2,92 mM koncentracijo sertralina (direktna fotoliza) pred obsevanjem (modra črta) in po 360 minutah obsevanja (rdeča črta) v fotokemičnem reaktorju. Vidimo, da se je del sertralina razgradil, saj je AUC sertralina po 6 urah nižja. Odzivi pri retencijskem času med 0,5 in 1,2 min predstavljajo razgradne produkte sertralina, saj se ti odzivi pojavijo šele po obsevanju.



Slika 10: Prekrita kromatograma vzorca pri direktni fotolizi

Slika 11 prikazuje prekrita kromatograma vzorca z 2,92 mM koncentracijo sertralina, 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov pred obsevanjem (modra črta) in po 120 minutah obsevanja (rdeča črta). V tem primeru se je sertralin razgradil hitreje, nastala je tudi večja količina razgradnih produktov sertralina, ki smo jih zopet detektirali pri retencijskih časih med 0,5 in 1,2 min. Po obsevanju se je povečal tudi odziv pri retencijskem času 2,1 minute, zato lahko sklepamo, da tudi ta odziv pripada razpadnemu produktu.



Slika 11: Prekrita kromatograma pri fotolizi, inducirani z nitratnimi in karbonatnimi ioni

5.4 DELNA VALIDACIJA METOD

5.4.1 Izkoristek ekstrakcije na trdnem nosilcu

Izkoristek ekstrakcije na trdnem nosilcu smo določili tako, da smo pripravili dve seriji raztopin sertralina. Prvo serijo so predstavljali trije alikvoti po 200 mL raztopine sertralina s koncentracijo 0,146 μM , ki smo jih pred derivatizacijo ekstrahirali na trdnem nosilcu. Drugo serijo so predstavljali trije alikvoti v vialah, kamor smo odpipetirali enako količino sertralina, kakor v 200 mL raztopine iz prve serije. Pri 100 % izkoristku ekstrakcije bi morali biti odzivi pod krivuljami obeh serij primerljivi.

Rezultati izkoristka ekstrakcije na trdnem nosilcu so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 7).

Preglednica 7: Izračun izkoristka ekstrakcije

Povprečje AUC (SPE)	192879
Povprečje AUC (100 %)	274414
Izkoristek ekstrakcije:	70,3 %

5.4.2 Območje linearnosti

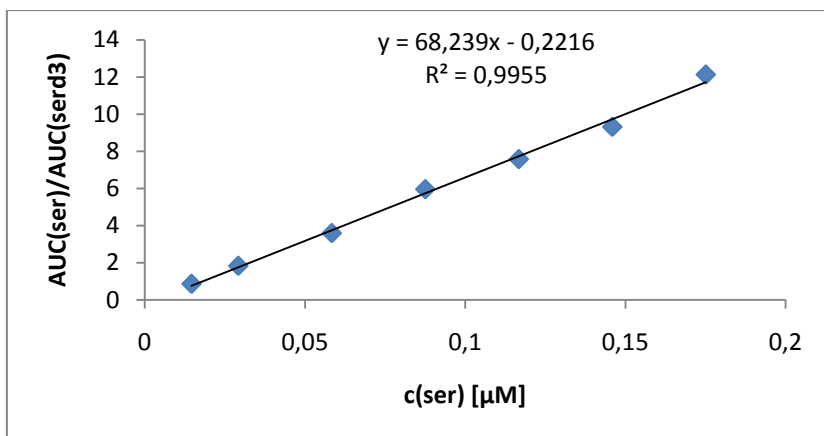
Linearnost je sposobnost analiznega postopka, da je odziv znotraj danega območja linearno odvisen od koncentracije analita v vzorcu. Metoda, ki jo uporabljamo, mora biti linearna v območju pričakovanih koncentracij, ki jih bomo merili. Odzive ovrednotimo kot funkcijo koncentracije analita. Z izračunom regresijske premice dobimo korelacijski koeficient (R^2) (28). Linearnost analizne metode smo določili za celotno območje analiznega postopka.

GC-MS ANALIZNA METODA

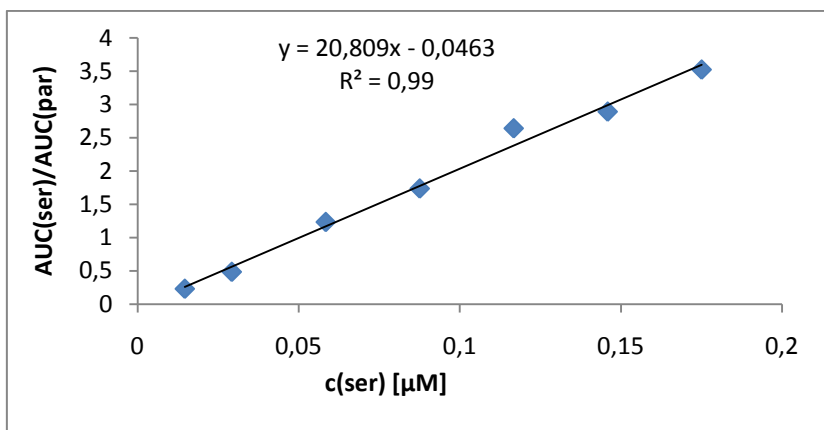
Pri analizi z GC-MS smo uporabljali IS za zmanjšanje vpliva napak med pripravo vzorca, zato smo linearnost ovrednotili kot razmerje površin pod krivuljama sertralina in IS v odvisnosti od razmerja koncentracije sertralina in IS. Umeritveno premico smo določili za vsak IS posebej.

Spodnja grafa prikazujeta umeritveni premici pri uporabi IS SERD3 (graf 1) in IS paroksetinjevega maleata (graf 2).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



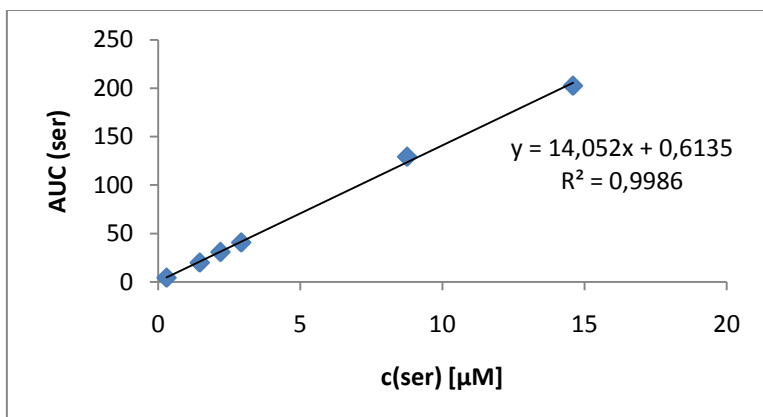
Graf 1: Umeritvena krivulja pri uporabi IS SERD3



Graf 2: Umeritvena krivulja pri uporabi IS paroksetinijevega maleata

HPLC – UV ANALIZNA METODA

Pri analizi s HPLC-UV smo vzorce iz fotokemičnega reaktorja lahko direktno analizirali. S tem smo se izognili postopku priprave vzorca (ekstrakciji in derivatizaciji), zato tudi nismo uporabili IS. Linearnost metode smo ovrednotili kot površine pod krivuljo v odvisnosti od koncentracije sertralina v vzorcu. Spodnji graf (graf 3) prikazuje linearnost odzivov pri HPLC-UV analizi metodi.



Graf 3: Umeritvena krivulja pri analizi s HPLC-UV metodo

5.4.3 Ponovljivost

Ponovljivost je eden izmed nivojev vrednotenja natančnosti. Natančnost izraža ujemanje rezultatov pri večkratni, ponavljajoči se analizi homogenega vzorca. Običajno jo izrazimo s standardnim odklonom ali relativnim standardnim odklonom od povprečne vrednosti serije meritev. Natančnost vrednotimo na treh nivojih. Ponovljivost predstavlja natančnost pri enakih delovnih pogojih v kratkem časovnem obdobju, rigidnost izraža variacije znotraj laboratorija (različni dnevi, osebje, oprema), reproducibilnost pa izraža natančnost med laboratoriji. (28)

GC-MS ANALIZNA METODA

Pri analizi na GC-MS smo določili ponovljivost injiciranja vzorcev, ponovljivost ekstrakcije na trdnem nosilcu ter ponovljivost celotnega postopka, ki je predstavljal pripravo raztopin, obsevanje, ekstrakcijo, derivatizacijo ter analizo na GC-MS.

Ponovljivost injiciranja pri analizi vzorcev z GC-MS smo določili tako, da smo trikrat injicirali isto raztopino in primerjali rezultate – razmerje med površinama pod kromatografskima vrhovoma za sertralin in IS. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 8).

Preglednica 8: Ponovljivost injiciranja pri analizni metodi GC-MS

	AUC (SER)	AUC (SER D3)	AUC (SER) / AUC (SER D3)	Povprečna vrednost = 14,10 S =0,53 RSD (%) = 3,74
1.	529655	112978	14,64	
2.	648254	140021	14,08	
3.	570840	124786	13,59	

Ponovljivost ekstrakcije smo določili tako, da smo pripravili pet 200 mL raztopin z enako koncentracijo sertralina. Vse vzorce smo ekstrahirali, derivatizirali in analizirali z GC-MS. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 9).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica 9: Ponovljivost postopka ekstrakcije na trdnem nosilcu

	AUC (SER)	AUC (SER D3)	AUC (SER) / AUC (SER D3)	
1.	201387	17095	11,78	Povprečna vrednost = 11,7 S =0,34 RSD (%) =2,92
2.	216766	19580	11,07	
3.	266386	22836	11,67	
4.	264556	22497	11,76	
5.	237344	19839	11,96	

Ponovljivost celotnega postopka (obsevanje, ekstrakcija, injiciranje) pri analizi z GC-MS smo določili tako, da smo petkrat pripravili 760 mL raztopine sertralina z enako koncentracijo, jo obsevali v fotokemičnem reaktorju enako dolgo. Po obsevanju smo od vsake raztopine odlili dva alikvota po 200 mL, te vzorce smo nato ekstrahirali in analizirali z GC-MS. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 10).

Preglednica 10: Ponovljivost celotnega analznega postopka: obsevanje, ekstrakcija, derivatizacija in analiza z GC-MS

	AUC (SER)	AUC (SER D3)	AUC (SER) / AUC (SER D3)	AUC (PAR)	AUC (SER) / AUC (PAR)
1.	248020	25816	9,61	23571	1,53
2.	287098	32201	8,92	25946	1,18
3.	301819	29400	10,27	27849	1,25
4.	347929	34687	10,03	30337	1,66
5.	294904	26071	11,31	23951	1,49
6.	258150	24713	10,45	21208	1,48
7.	271940	25313	10,74	23636	1,69
8.	243304	18546	13,12	19651	1,56
9.	245625	21762	11,29	21678	1,58
10.	276950	24508	11,30	23557	1,50
Povprečna vrednost			10,7	1,49	
S			1,16	0,161	
RSD (%)			10,7	10,9	

Tjaša Brcar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Pričakovano so standardni odkloni največji pri ponovljivosti celotnega postopka, tam je ponovljivost najmanjša. Več stopenj v analiznem postopku pomeni več možnosti napak, kar lahko povzroči večje odstopanje med rezultati in manjšo ponovljivost.

HPLC-UV ANALIZNA METODA

Ponovljivost injiciranja pri analizi metodi HPLC-UV smo določili tako, da smo petkrat injicirali isti vzorec s 14,6 μM koncentracijo sertralina. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 11).

Preglednica 11: Ponovljivost injiciranja pri HPLC-UV metodi

Vzorec	AUC	
1	206	
2	206	Povprečna vrednost: 203
3	204	S = 3,38
4	200	RSD (%) = 1,67
5	198	

Ponovljivost celotnega postopka (priprava vzorca in injiciranje) pri uporabi analizne metode HPLC-UV smo določili tako, da smo pripravili 4 vzorce z 2,92 μM koncentracijo sertralina. Vsak vzorec smo dvakrat injicirali na HPLC kolono. Rezultati so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 12).

Preglednica 12: Ponovljivost celotnega analiznega postopka: priprava vzorca in analiza s HPLC-UV

Vzorec	1. injiciranje (AUC)	2. injiciranje (AUC)	Povprečje obeh injiciranj (AUC)	
1	40,9	40,6	40,8	povprečna vrednost: 41,0
2	43,1	43,1	43,1	S= 1,95
3	38,6	38,2	38,4	RSD (%) = 4,75
4	41,6	41,5	41,5	

5.4.4 Meja kvantifikacije

Meja kvantifikacije je najnižja koncentracija analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno določimo z določeno natančnostjo in ponovljivostjo (28). Mi smo določili mejo določitve kot tisto koncentracijo, pri kateri je napaka pri umeritveni krivulji med izračunano in pravo vrednostjo manjša od 5 %.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

GC-MS ANALIZNA METODA – IS SERD3

Preglednica 13 prikazuje določitev meje kvantifikacije pri uporabi IS SERD3.

Preglednica 13: Določitev meje kvantifikacije pri uporabi IS SERD3

prava koncentracija [μM]	izračunana koncentracija [μM]	napaka (%)
0,0146	0,0159	8,94
0,0292	0,0301	3,22
0,0584	0,0559	4,17
0,0875	0,0905	3,41
0,117	0,114	2,12
0,146	0,140	4,23
0,175	0,181	3,35

Meja kvantifikacije pri uporabi SERD3 kot IS je pri koncentraciji sertralina 0,0292 μM .

GC-MS ANALIZNA METODA – IS paroksetinijev maleat

Spodnja preglednica (preglednica 14) prikazuje določitev meje kvantifikacije pri uporabi IS paroksetinijevega maleata.

Preglednica 14: Določitev meje kvantifikacije pri uporabi IS paroksetinijevega maleata

prava koncentracija [μM]	izračunana koncentracija [μM]	napaka (%)
0,0146	0,0132	9,56
0,0292	0,0254	12,9
0,0584	0,0614	5,27
0,0875	0,0856	2,17
0,117	0,129	10,6*
0,146	0,141	3,24
0,175	0,172	2,01

*napačna meritev, ki je pri določitvi meje kvantifikacije nismo upoštevali

Meja kvantifikacije pri uporabi SERD3 kot IS je pri koncentraciji sertralina 0,0875 μM .

HPLC-UV ANALIZNA METODA

preglednica 15 prikazuje določitev meje kvantifikacije pri HPLC-UV analizni metodi.

Preglednica 15: Določitev meje kvantifikacije pri HPLC-UV analizni metodi

prava koncentracija [μM]	izračunana koncentracija [μM]	napaka (%)
0,292	0,273	6,60
1,46	1,38	5,33
2,19	2,16	1,28
2,92	2,86	2,03
8,75	9,16	4,60
14,6	14,4	1,47

Meja kvantifikacije pri HPLC-UV analizni metodi je pri koncentraciji sertralina 2,19 μM .

5.5 OPTIMIZACIJA DERIVATIZACIJE

Pred začetkom obsevanja raztopin ter validacijo smo sertralin poskusili derivatizirati z različnimi dodatki acetanhidrida in piridina ter z ali brez dodatka etilacetata. Cilj optimizacije derivatizacije je bil izboljšanje izkoristka derivatizacije. V 4 vialo odpipetirali 25 μL raztopine sertralina z 0,54 mM koncentracijo.

Derivatizacijo smo izvedli z naslednjimi kombinacijami derivatizacijskih sredstev: 15 μL acetanhidrida in 5 μL piridina, 30 μL acetanhidrida in 10 μL piridina, 15 μL acetanhidrida in 5 μL piridina z dodatkom 0,5 mL etilacetata ter 30 μL acetanhidrida in 10 μL piridina z dodatkom 0,5 mL etilacetata. Po dodatku vseh napisanih spojin smo vsako vialo vorteksirali 10 sekund, pustili stati eno uro pri sobni temperaturi, posušili vzorec do suhega ter dodali 0,5 mL etilacetata in analizirali z GC-MS. Rezultati površin pod krivuljo za molekulski ion $m/z = 347$ in njegov izotopski ion $m/z = 349$ so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 16).

Preglednica 16: Učinkovitost derivatizacije pri uporabi različnih količin derivatizacijskih sredstev

Kombinacija derivatizacijskih sredstev	AUC (m/z 347)	AUC (m/z 349)
15 μL acetanhidrida 5 μL piridina	98372	63740
30 μL acetanhidrida 10 μL piridina	72428	47298
15 μL acetanhidrida 5 μL piridina 0,5 mL etilacetata	92693	61200
30 μL acetanhidrida 10 μL piridina 0,5 mL etilacetata	90446	60742

Iz zgornje preglednice vidimo, da je odziv največji pri derivatizaciji s 15 μL acetanhidrida in 5 μL piridina, čeprav večjih razlik med odzivi ni bilo, znatno manjši je le odziv pri derivatizaciji s 30 μL acetanhidrida in 10 μL piridina. Odločili smo se, da bomo za derivatizacijo uporabili prvo kombinacijo derivatizacijskih sredstev, saj je bil tam odziv najboljši, poleg tega pa je bila poraba derivatizacijskih sredstev najmanjša.

5.6 IZBIRA VODNEGA HLADILNIKA

Pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju smo uporabljali dva hladilnika. Skozi hladilnik je tekla hladna voda (s temperaturo približno 15 °C) in tako smo preprečili toplotno razgradnjo komponent v vzorcu ter pregrevanje žarnice. Po vsakem obsevanju smo hladilnik zamenjali, uporabljenega pa smo v tem času očistili. Rezultati, ki smo jih dobili po prvi analizi, so prikazani v spodnji preglednici (preglednica 17).

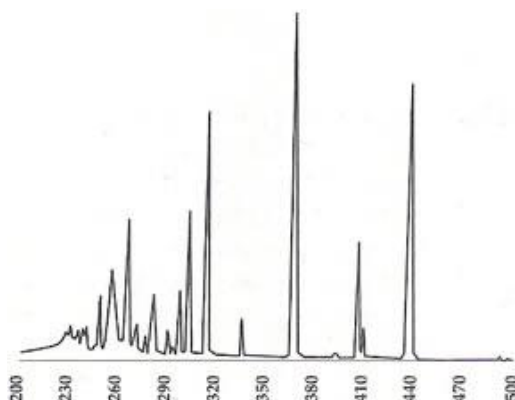
Preglednica 17: Rezultati analize prvih vzorcev po obsevanju (direktna fotoliza)

Čas obsevanja	AUC ($m/z = 347$)	AUC ($m/z = 350$)	c (ser)
0 minut	434102	94379	70,5
	577620	133653	59,3
30 minut		8174	0
		7385	0
60 minut		8527	0
		6941	0
120 minut	321332	80123	49,2
	311310	78521	48,0
180 minut		33203	0
		31301	0
240 minut	490531	133641	40,5
	475679	117229	50,6
300 minut		26006	0
		26481	0

Najprej smo pomislili, da so rezultati posledica napak pri ekstrakciji, saj je bil tudi odziv IS ($m/z = 350$) pri ponesrečenih vzorcih zelo nizek. Ko smo rezultate podrobneje preučili, smo ugotovili, da napaka najverjetneje izvira iz postopka obsevanja, saj so rezultati dveh paralel zelo podobni, med paralelami pa se zelo razlikujejo. Vzrok za nižji odziv pri $m/z = 350$ bi lahko bila tudi izguba oz. razgradnja sertralina, saj predstavlja odziv sertralina velik delež površine pod krivuljo pri $m/z = 350$. Na koncu smo ugotovili, da so rezultati taki zaradi uporabe dveh različnih vrst hladilnika. Po pomoti smo uporabljali en hladilnik iz kvarčnega in enega iz borosilikatnega stekla.

Dobljeni rezultati so pokazali, da je razgradnja sertralina pri uporabi kvarčnega hladilnika mnogo hitrejša, saj sertralina po polurnem obsevanju nismo več detektirali. Po enournem obsevanju z uporabo hladilnika iz borosilikatnega stekla pa je bilo v vzorcu prisotne še približno 75 % začetne koncentracije sertralina.

Svetloba iz žarnice prehaja do obsevane raztopine skozi vodni hladilnik, zato je izbira stekla za vodni hladilnik zelo pomembna. Kvarčno steklo prepušča celoten spekter svetlobe (slika 12), vključno z $\lambda = 254$ nm, kjer je absorpcija običajno največja, borosilikatno pa samo valovne dolžine, večje od 300 nm. K razgradnji sertralina in tudi večine drugih organskih in aromatskih spojin bolj prispevajo valovne dolžine, manjše od 300 nm, ki jih borosilikatno steklo ne prepušča, zato je pri uporabi slednjega razgradnja mnogo počasnejša. Odločili smo se, da bomo pri nadaljnjih obsevanjih uporabljali hladilnike iz borosilikatnega stekla, saj je bila razgradnja počasnejša in je bolj posnemala spekter sončne svetlobe in smo jo zato lažje ovrednotili.



Slika 12: Emisijski spekter UV-žarnice v fotokemičnem reaktorju (26)

5.7 HITROST FOTORAZGRADNJE V FOTOKEMIČNEM REAKTORJU

V preglednici 18 so prikazane hitrosti razgradnje sertralina v fotokemičnem reaktorju pri različnih začetnih koncentracijah sertralina ter ob dodatku različnih koncentracij modifikatorjev fotolize. Rezultate hitrosti smo predstavili tudi grafično. Graf 4 prikazuje hitrosti razgradnje sertralina ob različnih dodatkih modifikatorjev fotorazgradnje v raztopini z začetno koncentracijo sertralina $0,146 \mu\text{M}$, graf 5 pa v raztopini z začetno koncentracijo sertralina $2,92 \mu\text{M}$. V preglednici 19 so prikazani razpolovni časi razgradnje

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

sertralina pri različnih začetnih koncentracijah sertralina ter ob dodatku različnih koncentracij modifikatorjev fotolize.

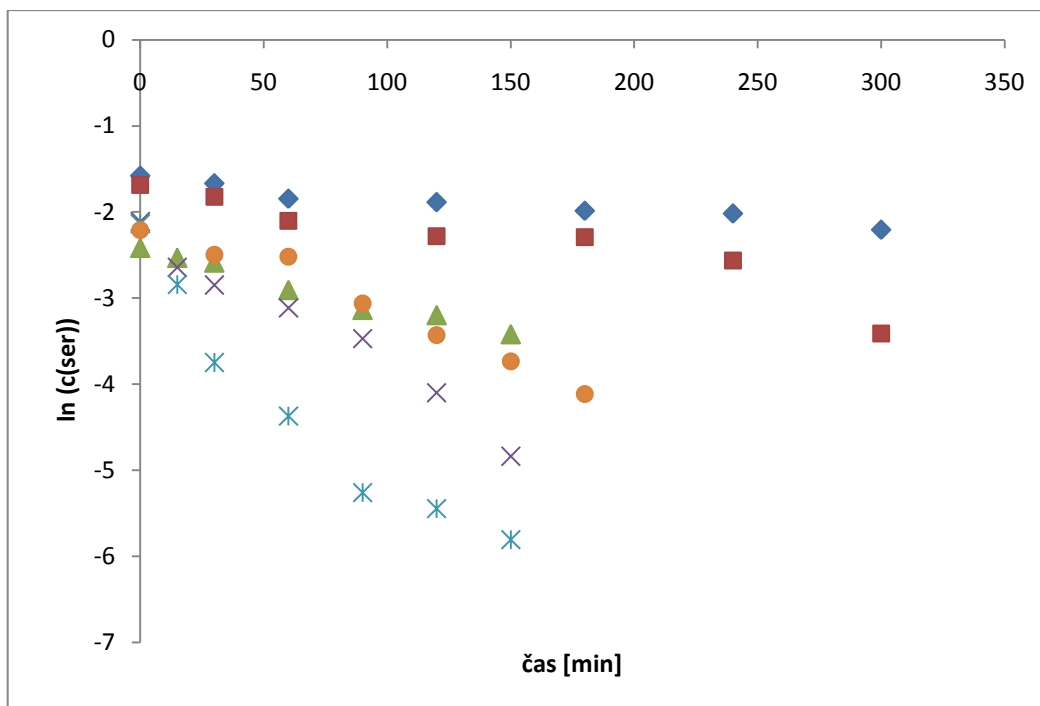
Preglednica 18: Konstante hitrosti razgradnje sertralina za različne začetne koncentracije sertralina in različne kombinacije in koncentracije dodanih modifikatorjev fotolize

	Sertralin 0,146 μM	Sertralin 2,92 μM
Direktna fotoliza	0,001 min^{-1}	0,000 min^{-1}
Dodatek 1 mM nitrata	0,005 min^{-1}	0,001 min^{-1}
Dodatek 1 mM nitrata in 0,5 mM karbonata	0,006 min^{-1}	0,002 min^{-1}
Dodatek 1 mM nitrata in 1 mM karbonata	0,016 min^{-1}	0,005 min^{-1}
Dodatek 1 mM nitrata in 10 mM karbonata	0,023 min^{-1}	0,011 min^{-1}
Dodatek 1 mM nitrata in 0,5 mM fosfata	analize nismo izvedli	0,001 min^{-1}
Dodatek 1 mM nitrata in 10 mM fosfata	analize nismo izvedli	0,001 min^{-1}
Dodatek barvila RB	0,010 min^{-1}	0,017 min^{-1}

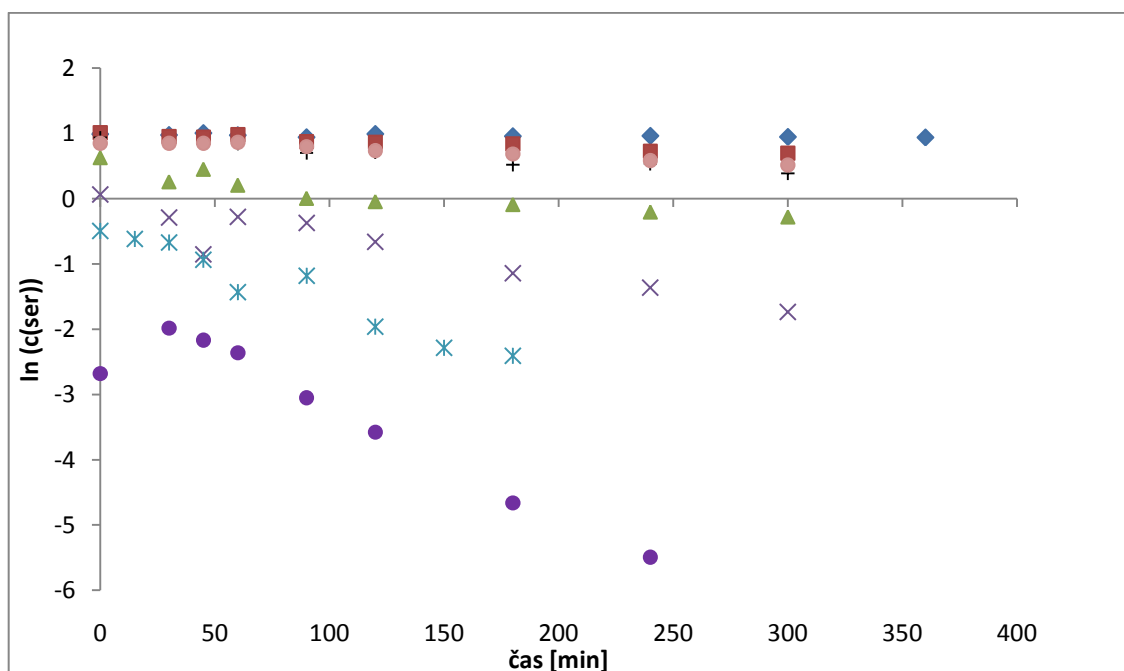
Preglednica 19: Razpolovni časi razgradnje sertralina ob dodatku različnih modifikatorjev fotolize

	Sertralin 0,146 μM	Sertralin 2,92 μM
Direktna fotoliza	11,6 ure	/
Dodatek 1 mM nitrata	2,32 ure	11,6 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 0,5 mM karbonata	1,93 ure	5,78 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 1 mM karbonata	0,717 ure	2,32 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 10 mM karbonata	0,501 ure	1,05 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 0,5 mM fosfata	analize nismo izvedli	11,6 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 10 mM fosfata	analize nismo izvedli	11,6 ure
Dodatek barvila RB	1,16 ure	0,680 ure

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



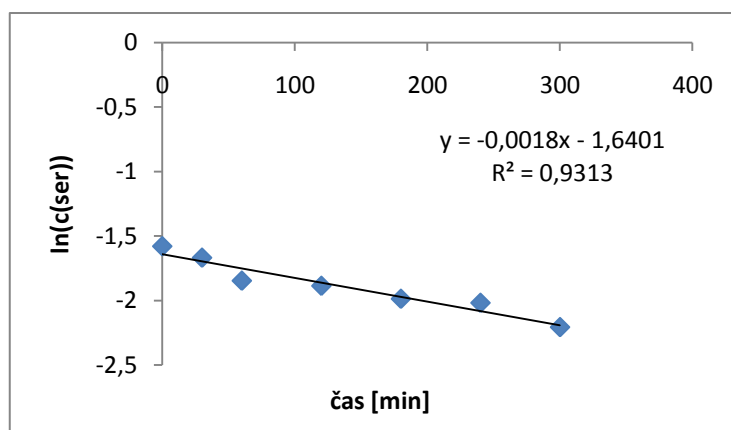
Graf 4: Rezultati analize fotorazgradnje sertralina pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju pri začetni koncentraciji sertralina $0,146 \mu\text{M}$ ◆ = direktna fotaliza ■ = 1 mM koncentracija nitratnih ionov ▲ = 1 mM koncentracija nitratnih in $0,5 \text{ mM}$ koncentracija karbonatnih ionov × = 1 mM koncentracija nitratnih in 1 mM koncentracija karbonatnih ionov * = 1 mM koncentracija nitratnih in 10 mM koncentracija karbonatnih ionov ● = $10 \mu\text{M}$ koncentracija RB in $0,1 \text{ mM}$ koncentracija FFA



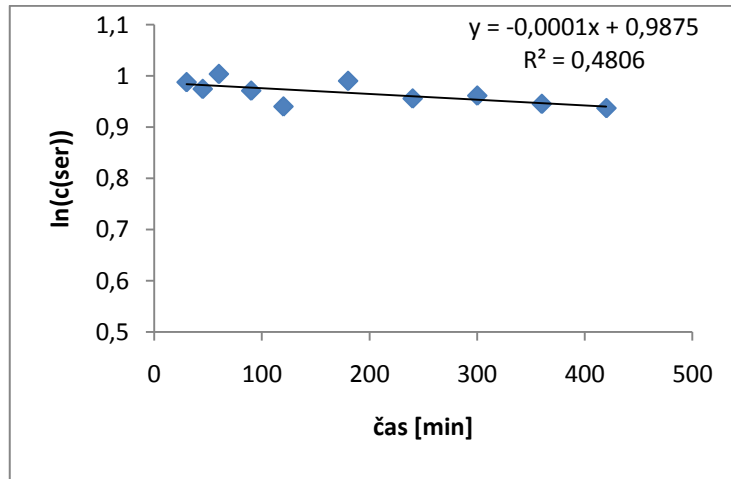
Graf 5: Rezultati analize fotorazgradnje sertralina pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju pri začetni koncentraciji sertralina $2,92 \mu\text{M}$ ◆ = direktna fotaliza ■ = 1 mM koncentracija nitratnih ionov ▲ = 1 mM koncentracija nitratnih in $0,5 \text{ mM}$ koncentracija karbonatnih ionov × = 1 mM koncentracija nitratnih in 1 mM koncentracija karbonatnih ionov * = 1 mM koncentracija nitratnih in 10 mM koncentracija karbonatnih ionov + = 1 mM koncentracija nitratnih in $0,5 \text{ mM}$ koncentracija fosfatnih ionov ● = 1 mM koncentracija nitratnih in 10 mM koncentracija fosfatnih ionov ● = $10 \mu\text{M}$ koncentracija RB in $0,1 \text{ mM}$ koncentracija FFA

5.7.1 Direktna fotoliza

Najprej smo določili hitrost razgradnje sertralina v vodnem mediju brez dodatka ostalih modifikatorjev fotolize. Fotorazgradnja je potekala samo po procesu direktne fotolize. Hitrost razgradnje smo določili v vzorcih z začetno koncentracijo $0,146 \mu\text{M}$, te vzorce smo nato analizirali z analizno metodo GC-MS. Kasneje smo določili še kinetiko razgradnje sertralina v vodni raztopini z $2,92 \mu\text{M}$ začetno koncentracijo. Te vzorce pa smo analizirali z analizno metodo HPLC-UV. Spodnja grafa prikazujeta hitrost direktne fotolize sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina $0,146 \mu\text{M}$ (graf 6) in $2,92 \mu\text{M}$ (graf 7).



Graf 6: Hitrost fotorazgradnje sertralina z začetno koncentracijo $0,146 \mu\text{M}$ v vodni raztopini (direktna fotoliza)

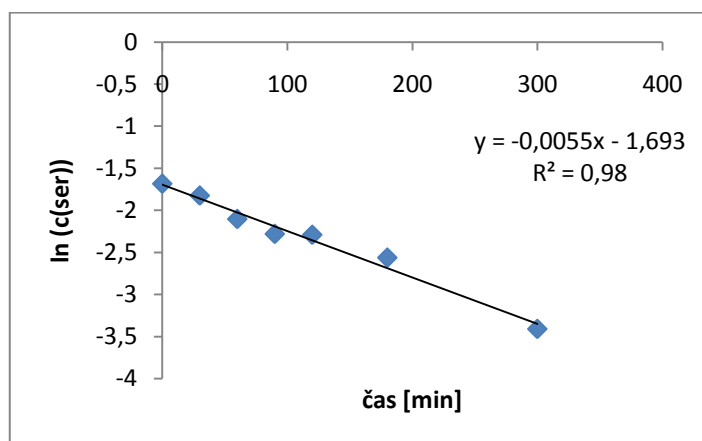


Graf 7: Hitrost fotorazgradnje sertralina z začetno koncentracijo $2,92 \mu\text{M}$ v vodni raztopini (direktna fotoliza)

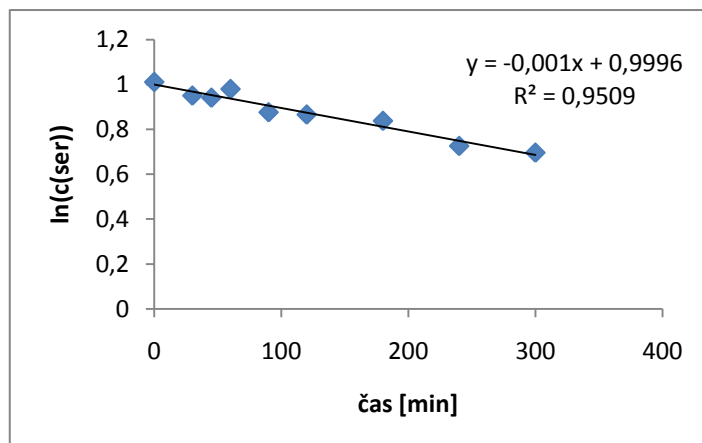
Konstanta razgradnje sertralina pri začetni koncentraciji $0,146 \mu\text{M}$ je $0,001/\text{min}$. Pri začetni koncentraciji sertralina $2,92 \mu\text{M}$ pa je konstanta $< 0,0005/\text{min}$. Na grafu 7 vidimo, da so razlike med meritvami zelo majhne, saj je bila razgradnja zelo počasna. Ker se vse točke nahajajo v zelo majhnem območju vrednosti, vsako odstopanje točke od regresijske premice močno vpliva na korelacijski koeficient, zato je ta tukaj precej nižji kot pri ostalih eksperimentih.

5.7.2 Vpliv nitratnih ionov

Kinetiko fotorazgradnje sertralina ob dodatku 1 mM koncentracije nitratnih ionov smo prav tako določili za vzorce z začetno koncentracijo sertralina 0,146 μM ter za vzorce z začetno koncentracijo 2,92 μM . Spodnja grafa prikazujeta hitrost razgradnje sertralina v vodni raztopini ob dodatku 1 mM nitratnih ionov z začetno koncentracijo sertralina 0,146 μM (graf 8) in 2,92 μM (graf 9).

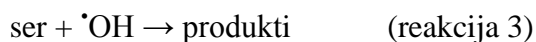
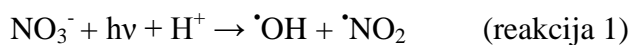


Graf 8: Hitrost razgradnje sertralina v vodni raztopini z začetno koncentracijo sertralina 0,146 μM ob dodatku nitratnih ionov



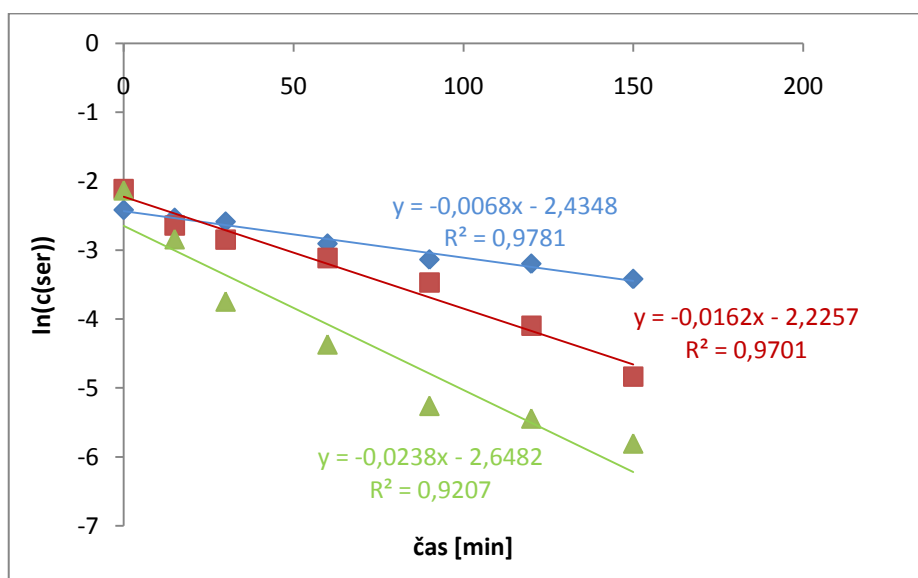
Graf 9: Hitrost razgradnje sertralina v vodni raztopini z začetno koncentracijo sertralina 2,92 μM ob dodatku nitratnih ionov

Ugotovili smo, da dodatek nitratnih ionov pospeši hitrost fotorazgradnje sertralina. Poleg procesov direktne fotolize potekajo ob dodatku nitratnih ionov tudi reakcije indirektna fotolize. Pod vplivom sončne svetlobe nastane iz nitratnih ionov $\cdot\text{OH}$, ki je zelo reaktiven (reakcija 1). $\cdot\text{OH}$ nato reagira s sertralinom in pospeši hitrost njegove razgradnje (reakcija 3).



5.7.3 Vpliv karbonatnih ionov

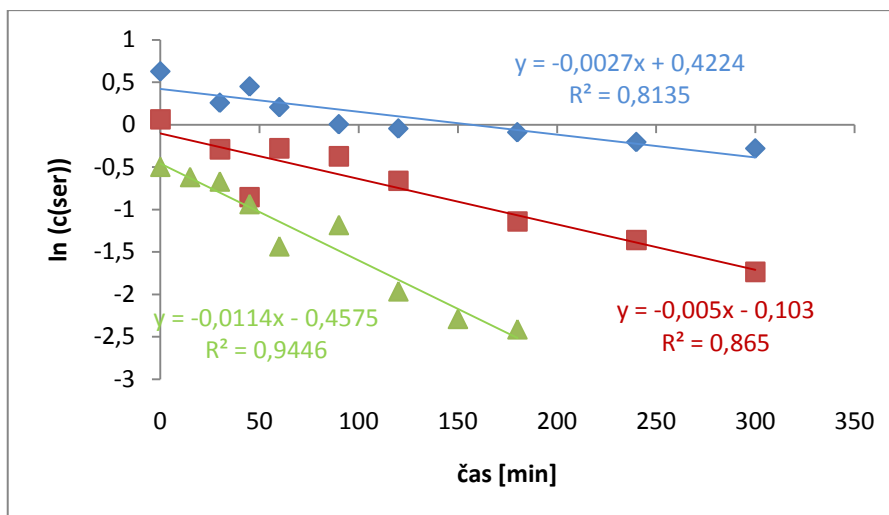
Z dodatkom različnih koncentracij karbonatnih ionov smo preučevali njihov vpliv na fototransformacijo, inducirano z nitratom. Najprej smo preverili vpliv dodane količine karbonatnih ionov na hitrost razgradnje sertralina in vzorce z izbranimi koncentracijami obsevali enako dolgo (1 uro). Ugotovili smo, da dodatek karbonatnih ionov pospeši hitrost z nitratom inducirane fotorazgradnje, saj se je z večanjem koncentracije karbonatnih ionov povečevala hitrost razgradnje sertralina. Obsevanje smo nato izvedli v vseh predvidenih časovnih točkah in tako določili konstanto hitrost razgradnje sertralina za posamezne dodatke karbonatnih ionov. Dobljeni rezultati so prikazani na spodnjem grafu (graf 10).



Graf 10: Hitrosti razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 0,146 μM , 1 mM koncentracijo nitratnih ter različnimi koncentracijami karbonatnih ionov \blacklozenge = 0,5 mM koncentracija karbonatnih ionov \blacksquare = 1 mM koncentracija karbonatnih ionov \blacktriangle = 10 mM koncentracija karbonatnih ionov

Kasneje smo s HPLC-UV analizo metodo določili še vpliv dodatka enake količine karbonatnih ionov na hitrost z nitratom pospešene fotorazgradnje sertralina pri 2,92 μM koncentraciji sertralina. Rezultati so prikazani na spodnjem grafu (graf 11).

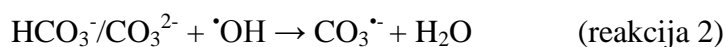
Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



Graf 11: Hitrosti razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 2,92 µM, 1 mM koncentracijo nitratnih ter različnimi koncentracijami karbonatnih ionov \blacklozenge = 0,5 mM koncentracija karbonatnih ionov \blacksquare = 1 mM koncentracija karbonatnih ionov \blacktriangle = 10 mM koncentracija karbonatnih ionov

Tudi pri preučevanju kinetike pri višji začetni koncentraciji sertralina smo ugotovili, da dodatek karbonatnih ionov pospeši hitrost razgradnje. Konstante razgradnje so pri tej koncentraciji sertralina sicer nižje v primerjavi s konstantami razgradnje pri 0,146 µM koncentraciji sertralina, koncentracije dodanih nitratnih in karbonatnih ionov pa so ostale enake.

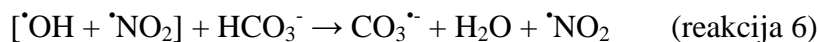
Pri reakciji nastane zaradi nitratne fotolize $\cdot\text{OH}$, ki je zelo reaktivna zvrst (reakcija 1). $\cdot\text{OH}$ reagira s sertralinom in inducira njegovo razgradnjo (reakcija 3). Ob dodatku karbonatnih ionov pa poteka tekmovanje za reakcijo s $\cdot\text{OH}$ med sertralinom in karbonatnimi ioni. Pri reakciji med karbonatnimi ioni ter $\cdot\text{OH}$ nastane karbonatni radikal $\text{CO}_3^{\cdot-}$ (reakcija 2), ki lahko ravno tako povzroči fototransformacijo sertralina (reakcija 4), vendar je manj reaktiven kot $\cdot\text{OH}$.



Pričakovali bi, da dodatek karbonatnih ionov zaradi reakcije s $\cdot\text{OH}$ in tvorbe manj reaktivnih zvrsti upočasni fotorazgradnjo sertralina. Vendar so Vione in sodelavci (42) ugotovili, da je hitrost tvorbe $\cdot\text{OH}$ in $\text{CO}_3^{\cdot-}$ pri obsevanju z dodatkom nitratnih in karbonatnih ionov večja od tvorbe $\cdot\text{OH}$ pri obsevanju raztopine z dodatkom enake količine nitratnih ionov. Možna razlaga za to je, da se $\cdot\text{OH}$ in $\cdot\text{NO}_2$, ki nastaneta pri fotolizi z nitratom, rekombinirata v topilu, preden difundirata v raztopino (reakcija 5). S $\cdot\text{OH}$ v kletki lahko reagirajo karbonatni ioni (reakcija 6), sertralin pa ne more. Karbonatni ioni z

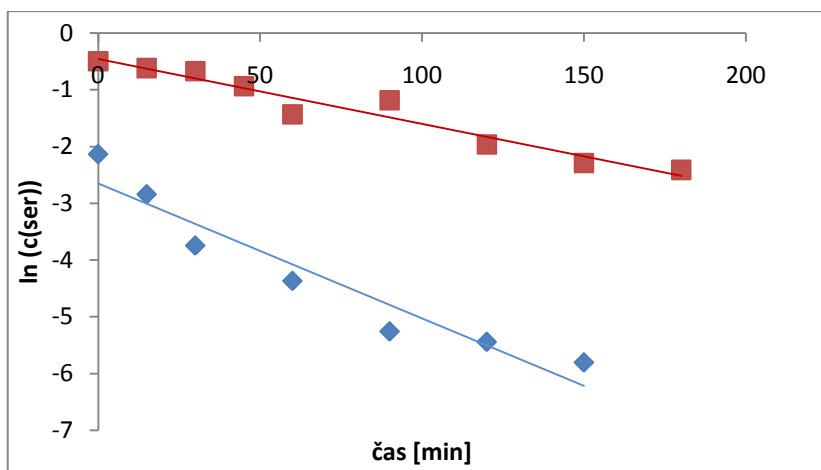
Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

reakcijo s $\cdot\text{OH}$ inhibirajo njegovo rekombinacijo z $\cdot\text{NO}_2$ in pospešijo nastanek reaktivnih zvrsti pri nitratni fotolizi (42).



Dodatek bikarbonatnih ionov torej inducira produkcijo večje količine manj reaktivnih zvrsti in pospeši fototransformacijo naše spojine – sertralina. Ta trditev velja za spojine, ki tudi v naravi reagirajo s karbonatnimi radikali. Pri tistih spojinah, ki s karbonatnimi radikali ne reagirajo, pa bi dodatek karbonatnih ionov zaradi kompeticijske reakcije karbonatnih ionov s $\cdot\text{OH}$ upočasnil hitrost fotorazgradnje (42).

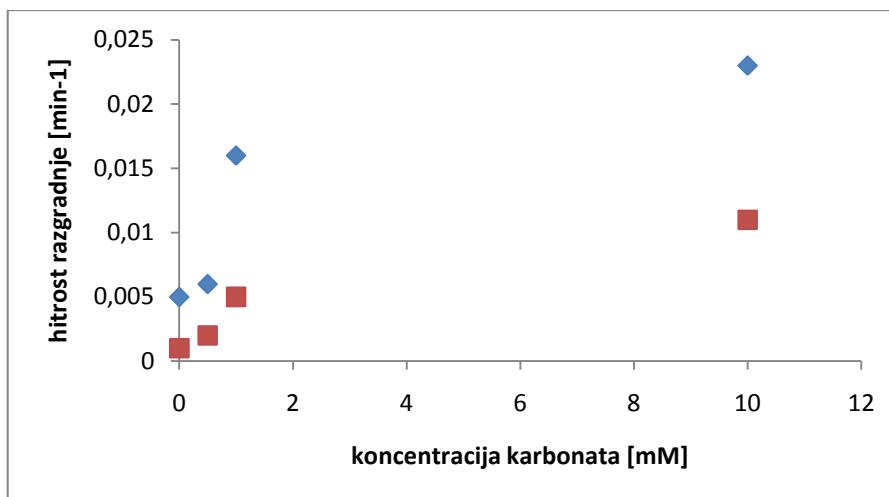
Spodnji graf (graf 12) prikazuje hitrosti razgradnje sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ter 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri začetnih koncentracijah sertralina 0,146 μM in 2,92 μM . Vidimo, da poteka razgradnja hitreje v raztopini z nižjo začetno koncentracijo sertralina.



Graf 12: Primerjava hitrosti razgradnje sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov in z različnima začetnima koncentracijama sertralina
◆ = začetna koncentracija sertralina 0,146 μM , ■ = začetna koncentracija sertralina 2,92 μM

Na grafu 13 je predstavljena še odvisnost konstante hitrosti razgradnje od dodane koncentracije karbonatnih ionov v raztopinah z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov ter z začetnima koncentracijama sertralina 0,146 μM in 2,92 μM , kjer je jasno razvidno naraščanje hitrosti fotolize s koncentracijo karbonata v raztopini.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

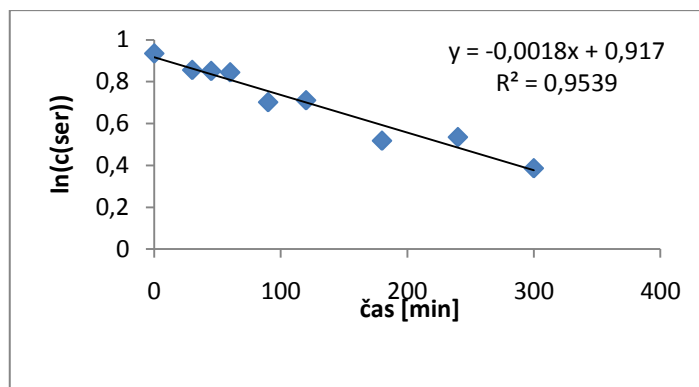


Graf 13: Hitrost razgradnje sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov v odvisnosti od koncentracije karbonatnih ionov \blacklozenj = začetna koncentracija sertralina 0,146 μM , \blacksquare = začetna koncentracija sertralina 2,92 μM

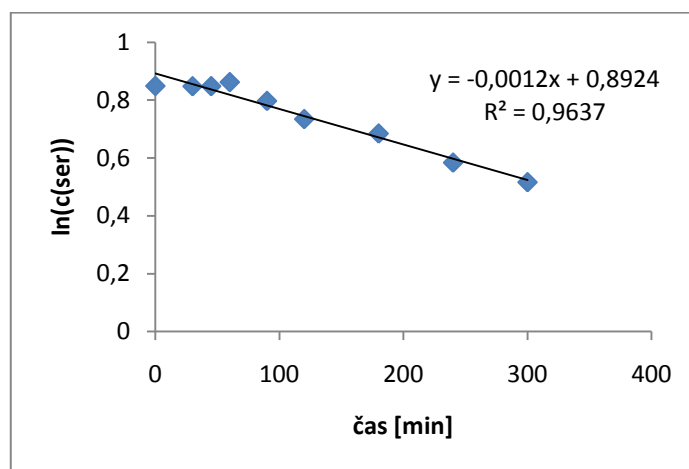
5.7.4 Vpliv fosfatnih ionov

Preverili smo tudi vpliv dodatka različnih koncentracij fosfatnih ionov na hitrost fotorazgradnje sertralina. Enako kot pri preučevanju vpliva različnih dodatkov karbonatnih ionov smo tudi tu najprej obsevali raztopine z različnimi koncentracijami fosfatnih ionov enako dolgo (1 uro). Ugotovili smo, da dodatek fosfatnih ionov ne vpliva na hitrost razgradnje, inducirane z nitratnimi ioni. Delež razgrajenega sertralina je bil po enakem času obsevanja ob dodatkih različnih količin fosfatnih ionov enak. Zato raztopin z dodatki fosfatnih ionov ni bilo smiselno obsevati v drugih časovnih intervalih. Vpliv fosfatnih ionov na fotorazgradnjo sertralina smo tako preučili samo pri višji koncentraciji sertralina in s HPLC-UV analizo metodo. Hitrost razgradnje smo določili samo za najmanjšo in največjo uporabljeno koncentracijo fosfatnih ionov. Spodnja grafa prikazujeta hitrost razgradnje sertralina v raztopini z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina, z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov in 0,5 mM koncentracijo fosfatnih ionov (graf 14) oziroma 10 mM koncentracijo fosfatnih ionov (graf 15).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



Graf 14: Hitrost razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 2,92 µM in ob dodatku 1 mM nitratnih ter 0,5 mM fosfatnih ionov



Graf 15: Hitrost razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 2,92 µM in ob dodatku 1 mM nitratnih ter 10 mM fosfatnih ionov

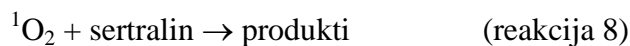
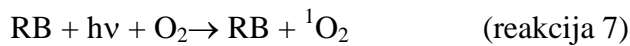
Z določevanjem vpliva različnih koncentracij fosfatnih ionov na kinetiko fotorazgradnje sertralina smo potrdili domneve, ki smo jih postavili pri obsevanju in meritvah z analizo metodo GC-MS. Ugotovili smo, da dodatek fosfatnih ionov ne vpliva na hitrost fotorazgradnje sertralina, inducirane z nitratom. Konstanti hitrosti razgradnje sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov in 0,5 mM koncentracijo fosfatnih ionov oziroma 10 mM koncentracijo fosfatnih ionov sta enaki konstanti razgradnje v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov brez dodatka fosfatnih ionov. Iz tega lahko sklepamo, da tudi reakcija s fosfatnimi ioni v vodnem okolju ni pomembna pri razgradnji sertralina.

5.7.5 Vpliv singletnega kisika

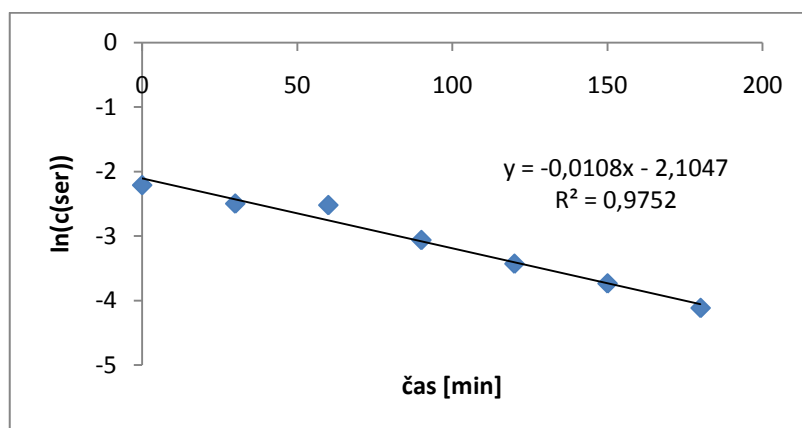
RB je fotosenzibilizator, ki na svetlobi katalizira pretvorbo tripletnega kisika v $^1\text{O}_2$ (reakcija 7). $^1\text{O}_2$ nato pospeši fotorazgradnjo sertralina (reakcija 8). Dodali smo tudi FFA, ki reagira z nastalim $^1\text{O}_2$ (s konstanto $1,2 \times 10^8/\text{Ms}$). S tem zavira fotorazgradnjo, inducirano z barvilom RB. Hitrost razgradnje sertralina je funkcija njegove začetne

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

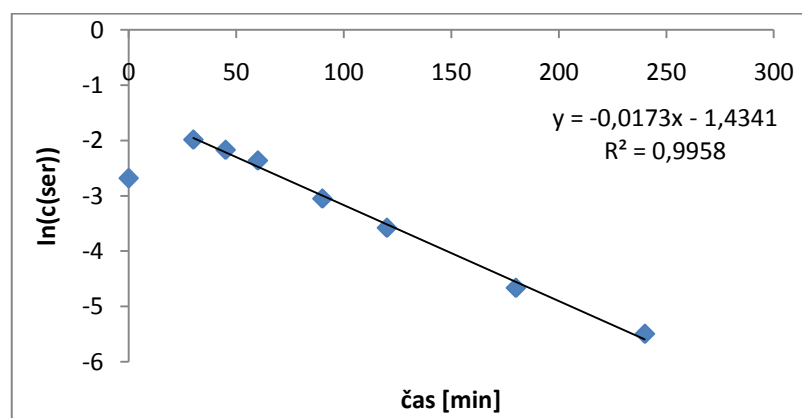
koncentracije pri obsevanju z 10 μM RB, uporabljenim kot katalizatorjem za nastanek $^1\text{O}_2$. Reakcija med sertralinom in $^1\text{O}_2$ je kompeticija s toplotno deaktivacijo $^1\text{O}_2$ (reakcija 9) (24).



Spodnji grafi (graf 16, graf 17 in graf 18) prikazujejo hitrosti razgradnje sertralina v raztopinah z različnimi začetnimi koncentracijami sertralina in z 10 μM koncentracijo RB ter 0,1 mM koncentracijo FFA.

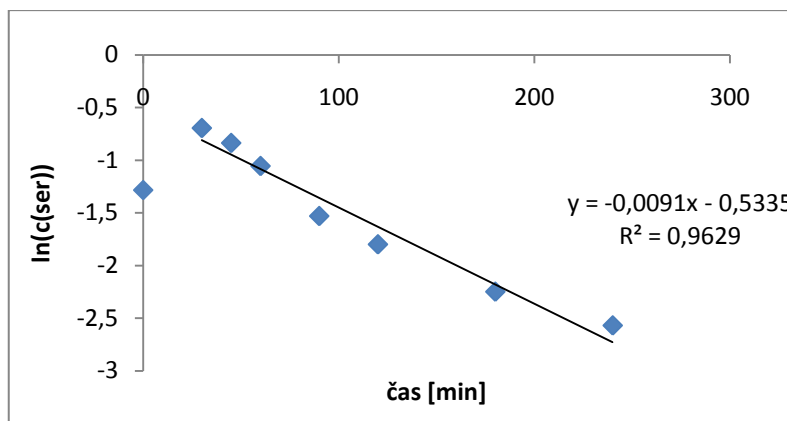


Graf 16: Hitrost razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 0,146 μM



Graf 17: Hitrost razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 2,92 μM

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi



Graf 18: Hitrost razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 8,75 μM

Na grafih, ki predstavljata hitrost razgradnje sertralina pri začetnih koncentracijah 2,92 μM in 8,75 μM pri analizi s HPLC-UV analizno metodo, točki ob času 0 močno odstopata, zato smo ju pri izračunu konstante razpada izpustili.

Ugotovili smo, da dodatek RB in FFA v izbranih koncentracijah pospeši fotorazgradnjo, saj je bila hitrost razgradnje hitrejša kot hitrost direktne fotolize.

5.8 OBSEVANJE NA SONČNI SVETLOBI

Določili smo še hitrost razgradnje sertralina pod vplivom sončne svetlobe. Vzorce v steklenicah iz kvarčnega stekla smo izpostavili sončni svetlobi v kraju Vrh pri Šentrupertu na Dolenjskem 5. in 6. julija 2014. Poiskali smo podatke o sončnem sevanju za omenjena dneva. Na voljo so bili le podatki za Novo mesto, ki je 20 km oddaljeno od Vrha pri Šentrupertu. Ker sta bila oba dneva malo oblačna, je verjetno prišlo do manjših odstopanj med močjo sončnega obsevanja v Novem mestu in močjo na Vrhu pri Šentrupertu. Za naše raziskave ta odstopanja niso pomembna, saj smo želeli le primerjati hitrost razgradnje v fotokemičnem reaktorju in na sončni svetlobi.

Trajanje sončnega obsevanja 5.7.2014 je bilo 9,8 ure, 6.7.2014 pa 13,6 ure. Čas trajanja sončnega obsevanja se beleži takrat, ko moč presega 120 W/m^2 . Dobili smo tudi polurne podatke sončnega sevanja (43).

Pri izpostavitvi vzorcev sončni svetlobi smo vzorce analizirali po dveh različno dolgih intervalih obsevanja, torej poleg časa 0 po enem dnevu (9,8 sončne ure) ter po dveh dneh (23,4 sončne ure) izpostavljenosti sončnemu sevanju (43). Temperatura vzorcev je bila med $20 \text{ }^\circ\text{C}$ (zjutraj) in $49,3 \text{ }^\circ\text{C}$.

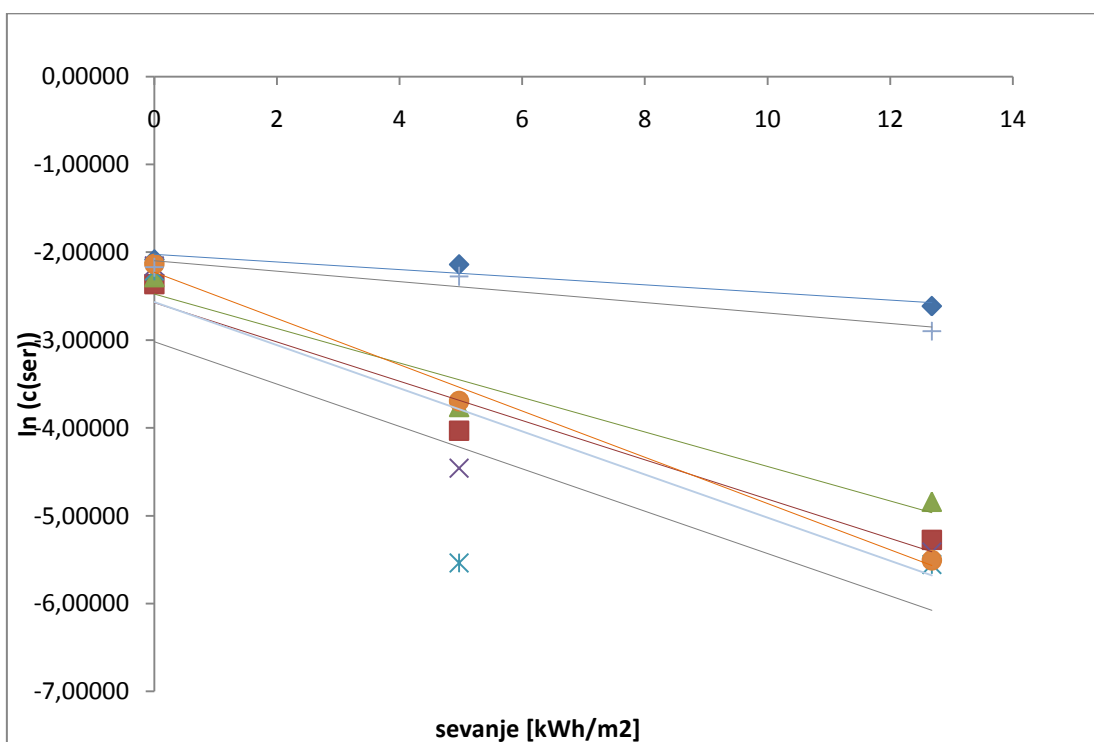
Spodnja preglednica (preglednica 20) prikazuje konstante hitrosti ter razpolovne čase razpada sertralina pri obsevanju na sončni svetlobi. Začetna koncentracija sertralina je bila

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

0,146 μM , dodajali smo različne modifikatorje fotalize. Rezultate hitrosti fotorazgradnje smo predstavili še grafično (graf 19).

Preglednica 20: Konstante hitrosti razgradnje sertralina in razpolovni časi v raztopinah z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v različnih vodnih raztopinah in pri izpostavitvi sončni svetlobi

	Konstanta hitrosti razgradnje	Razpolovni čas
Direktna fotaliza	0,0004 min^{-1}	28,9 ure
Dodatek 1 mM nitrata	0,0020 min^{-1}	5,78 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 0,5 mM karbonata	0,0018 min^{-1}	6,42 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 1 mM karbonata	0,0022 min^{-1}	5,25 ure
Dodatek 1 mM nitrata in 10 mM karbonata	0,0022 min^{-1}	5,25 ure
Dodatek barvila RB	0,0024 min^{-1}	4,82 ure
Medij = voda iz reke	0,0005 min^{-1}	23,1 ure



Graf 19: Rezultati analize hitrosti razgradnje sertralina v raztopini z začetno koncentracijo sertralina 0,146 μM in z dodatki različnih modifikatorjev fotalize ter po izpostavljanju sončni svetlobi
 ◆ = direktna fotaliza ■ = 1 mM koncentracija nitratnih ionov ▲ = 1 mM koncentracija nitratnih in 0,5 mM koncentracija karbonatnih ionov × = 1 mM koncentracija nitratnih in 1 mM koncentracija karbonatnih ionov * = 1 mM koncentracija nitratnih in 10 mM koncentracija karbonatnih ionov ● = 10 μM koncentracija RB in 0,1 mM koncentracija FFA + = medij - voda iz reke

Z rezultati, ki smo jih dobili po obsevanju na sončni svetlobi, smo ugotovili, da poteka fotorazgradnja v naravi pod vplivom sončne svetlobe mnogo počasneje kot v fotokemičnem reaktorju.

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Z rezultati analize vzorcev, pri katerih je bila medij voda iz reke, smo ugotovili, da je razgradnja tam potekala hitreje kot direktna fotoliza, vendar počasneje kot razgradnja ob dodatku 1 mM nitratnih ionov in najnižje dodane koncentracije karbonatnih ionov (0,5 mM). Eden izmed razlogov za take rezultate bi lahko bil ta, da je bila koncentracija nitratnih in karbonatnih ionov v reki nižja od tiste koncentracije, ki smo jo vzorcem dodali mi. Druga možna razlaga za nižjo hitrost razgradnje v vodi iz reke pa je vpliv matriksa. V vodi so namreč prisotni tudi lovilci reaktivnih zvrsti. Tiste spojine, ki so boljši reducenti kot sertralin, se pod vplivom sončne svetlobe oksidirajo hitreje kot naš analit. S tem zaščitijo sertralin pred oksidacijo. Za potrditev ali ovržbo naših hipotez bi morali podrobneje analizirati sestavo vode iz reke, ki smo jo uporabili (koncentracija nitratnih in karbonatnih spojin, vsebnost kisika, določitev ostalih spojin, ki bi lahko vplivale na hitrost razgradnje).

6 SKLEP

Pri raziskovalnem delu za magistrsko nalogo smo prišli do naslednjih ugotovitev.

- Pri eksperimentih moramo uporabljati hladilnik iz borosilikatnega stekla, ki ne prepušča svetlobe z valovno dolžina $\lambda < 300$ nm, sicer je razgradnja prehitra in ne posnema dovolj tiste na sončni svetlobi.
- Dodatek nitratnih in karbonatnih ionov pospeši fotorazgradnjo sertralina.
- Dodatek fosfatnih ionov nima vpliva na hitrost razgradnje.
- Dodatek barvila RB pospeši fotorazgradnjo sertralina.
- Razgradnja poteka hitreje pri nižji začetni koncentraciji sertralina. Razpolovni čas v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov je bil v raztopini z 0,146 μ M začetno koncentracijo 30,1 min, v raztopini z 2,92 μ M začetno koncentracijo sertralina pa 63,1 min.
- Fotorazgradnja pod vplivom sončne svetlobe poteka počasneje kot v fotokemičnem reaktorju. Razpolovni čas v raztopini z 0,146 μ M začetno koncentracijo sertralina ter 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov je bil pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju 30,1 min, pri izpostavitvi sončni svetlobi pa 315 min.
- Razgradnja v reki poteka hitreje kot direktna fotoliza v ultra čisti MILLI-Q vodi, vendar počasneje kot v naši raztopini z najnižjo koncentracijo dodanih nitratnih in fosfatnih ionov. Razpolovni čas sertralina v ultra čisti MILLI-Q vodi ob izpostavljenosti sončni svetlobi je 28,9 ure, razpolovni čas sertralina v vodi iz reke Gradaščice je 23,1 ure, razpolovni čas sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM koncentracijo karbonatnih ionov pa je 6,42 ure.

Hitrost razgradnje pod vplivom sončne svetlobe smo določili samo okvirno, saj smo imeli rezultate za samo dva različno dolga intervala obsevanja. Zanimivo bi bilo bolj natančno določiti hitrost razgradnje pod vplivom svetlobe in potem dobljene rezultate primerjati s tistimi, ki smo jih dobili pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju. Rezultati hitrosti razgradnje v vodi iz reke in pri obsevanju na sončni svetlobi so najbolj podobni hitrosti razgradnje sertralina v površinskih vodah. Vseeno pa verjetno ne bi nikoli mogli natančno določiti dejanske hitrosti razgradnje sertralina v površinskih vodah, ker je zelo težko poustvariti povsem enake pogoje, kot so v naravnih vodah.

7 VIRI IN LITERATURA

- 1) Rang HP, Dale MM, Rihter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology, 6th ed., Elsevier, Philadelphia, 2007: 557–574.
- 2) Silva LJG, Lino CM, Meisel LM, Pena A: Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Science of the Total Environment* 2014; 37: 185–195.
- 3) Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW: Foye's principles of medicinal chemistry, 6th ed., Wolters Kluwer, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 547–600.
- 4) Anderluh M: Pregled zdravilnih učinkovin za zdravljenje depresije. *Farmacevtski vestnik* 2010; 61: 66–72.
- 5) Watson DG: *Pharmaceutical Chemistry*, Elsevier, Edinburgh, 2011: 366–369.
- 6) Li H, Sumarah MW, Topp E: Persistence and dissipation pathways of the antidepressant sertraline in agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 2013; 452–453: 296–301.
- 7) <http://www.cbz.si> (obiskano 25.1.2015).
- 8) <http://www.zzzs.si> (obiskano 25.1.2015).
- 9) <http://www.stat.si> (obiskano 25.1.2015).
- 10) Kosjek T, Heath E: Applications of mass spectrometry to identifying pharmaceutical transformation products in water treatment. *Trends in Analytical Chemistry* 2008; 27: 807–820.
- 11) Calisto V, Esteves VI: Psychiatric pharmaceuticals in the environment. *Chemosphere* 2009; 77: 1257–1274.
- 12) Kosjek T, Heath E: Tools for evaluating selective serotonin re-uptake inhibitor residues as environmental contaminants. *Trends in Analytical Chemistry* 2010; 29: 832–847.
- 13) Lajeunesse A, Gagnon C, Sauve 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. *Anal Chem* 2008; 80: 5325–33.
- 14) Metcalfe C, Chu S, Judt C, Li H, Oakes KD, Servos MR, Andrews DM: Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

- exposure in an urban watershed. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2010; 29: 79–89.
- 15) Vasskog T, Anderssen T, Predersen-Bjergaard S, Kallenborn R, Jensen E: Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsberg and in Norway. *Journal of Chromatography A* 2008; 1185: 194–205.
- 16) 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. *Anal Chem* 2008; 80: 5021–30.
- 17) Huerta-Fontela M, Galceran MT, Ventura F: Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Research* 2011; 45: 1432–42.
- 18) http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.abstractDetail/abstract/1755/report/F (obiskano 31.5.2015).
- 19) Schultz MM, Furlong ET: Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals and Their Select Degradates in Aquatic Matrixes by LC/ESI/MS/MS. *Anal. Chem.* 2008; 45: 1756–1762.
- 20) 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. *Environ Sci Technol* 2010; 44: 1918–25.
- 21) Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RL: Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2005; 24: 464–469.
- 22) Huang J, Mabura SA: Steady-state concentrations of carbonate radicals in field waters. *Environmental Toxicology and Chemistry* 2000; 19: 2181–2188.
- 23) Laurentiis ED, Chiron S, Kouras-Hadef S, Richard C, Minella M, MAurino V, Minero C, Vione D: Photochemical fate of Carbamazepine in surface Freshwaters: Laboratory Measures and Modeling. *Environmental Science & Technology* 2012; 46: 8164–8173.
- 24) Sur B, Laurentiis ED, Minella M, Maurino V, Minero C, Vione D: Photochemical transformation of anionic 2-nitro4-chlorophenol in surface waters: Laboratory and model assessment of the degradation kinetics, and comparison with field data. *Science of the Environment* 2012; 426: 296–303.
- 25) <http://www.photochemicalreactors.co.uk/details.htmv> (obiskano 14. 10. 2014).

- 26) Immersion Well Photochemical Reactors, Instruction Manual, 1992.
- 27) Moldoveanu SC, David V: Sample preparation in chromatography, Elsevier, Amsterdam, 2002.
- 28) Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis, Wiley (A John Wiley & Sons Ltd.), West Sussex, 2012.
- 29) Buszewski B, Szultka M: Past, Present, and Future of Solid Phase Extraxction: A Review. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 2012;42: 198–213.
- 30) Robles-Molina H, Gilbert-Lopez B, Garcia-Reyes JF, Molina-Diaz A: Comparative evaluation of liquid-liquid extraction, solid-phase extraction and solid-phase microextraction for the gas chromatography-mass spectrometry determination of multiclass priority organic contaminants in wastewater. *Talanta* 2013; 117: 382–391.
- 31) Kebbekus BB, Mitra S: Environmental Chemical Analysis 1st edition, Champman & Hall, Newark, 1998.
- 32) <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (obiskano 14. 10. 2014).
- 33) <https://ufl.instructure.com/courses/313181/pages/partitioning-extractions-solid-phase-extraction-sequence> (obiskano 31.1.2015).
- 34) Hage DS, Carr JD: Analytical Chemistry and Quantitative Analysis, Pearson Education, New Jersey, 2011.
- 35) Farajzadeh MA, Nouri N, Khorram P: Derivatization and microekstraktion methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *Trends in Analytical Chemistry* 2014; 55: 14–23.
- 36) Orata F: Derivatization reactions and reagents for Gas Chromatography analysis; *Advanced Gas Chromatography – Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications*. InTech, 2012, 83–108.
- 37) McMahon G: Analytical Instrumentation A Guide to Laboratory, Portable and Miniaturized Instruments, 1st edition, Wiley, West Sussex, 2007.
- 38) http://hiq.lindegas.com/international/web/lg/spg/like35lgspg.nsf/docbyalias/anal_hplc (obiskano 5.11.2014).
- 39) <http://texassodiumazidepoisoning.blogspot.com/2013/01/methods-for-gc-ms.html> (obiskano 5.11.2014).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

- 40) Vione D, Maddigapu PR, Laurentiis ED, Minella M, Pazzi M, Maurino V, Minero C, Kouras S, Richard C: Modelling the photochemical fate of ibuprofen in surface waters. *Water research* 2011; 45: 6725–6736.
- 41) Hudson JJ, Taylor WD, Schindler DW: Phosphate concentrations in lakes. *Nature*, 2010; 406: 54–56.
- 42) Vione D, Khanra S, Cucu M S, Maddigapu PR, Das R, Arsene C, Olariu RI, Maurina V, Minero C: Inhibition vs. Enhancement of the nitrate-induced phototransformation of organic substrates by the OH scavengers bicarbonate and carbonate. *Water Research* 2009; 43: 4718–4728.
- 43) Meritve ARSO (meteorologija, oddelek za kakovost podatkov in arhiv - osebna komunikacija).

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

PRILOGE

Priloga I: Preglednice z rezultati meritev vzorcev po obsevanju v fotokemičnem reaktorju (0,146 μM začetna koncentracija sertralina)

Preglednica I.a: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v MILLI-Q vodi pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju

čas [min]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/AUC(SER3D)
0	434102	295371	94379	33591	31434	13,8
	400481	275210	86744	28351	28674	14,0
	162705	100978	35725	11752	12133	13,4
	363191	253109	78265	25040	25602	14,2
30	309858	204293	68656	22018	23727	13,1
	414833	286498	92662	28741	32511	12,8
	217389	147387	49522	15663	18001	12,1
	426431	294909	95162	33885	33330	12,8
60	164129	102712	36862	11916	13063	12,6
	222376	155080	55588	17589	23343	9,53
	310872	215671	71943	22257	26867	11,6
120	321332	229634	80123	28936	33530	9,58
	311310	221992	78521	28042	33381	9,33
	357240	245804	85700	26744	33900	10,5
	208604	148364	51594	17682	21346	9,77
180	327018	220439	76034	26952	28616	11,4
	224098	159081	55922	17701	23428	9,57
	113606	80326	29509	10309	13036	8,71
240	490531	342713	133641	49624	62514	7,85
	475679	337058	117229	45888	48256	9,86
300	285683	181005	76491	31353	35067	8,15
	199342	125408	59842	27102	30937	6,44

Preglednica I.b: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju

čas [min]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/AUC(SER3D)
0	259737	163829	58549	20572	20887	12,4
	214971	138023	48438	18176	17267	12,5
30	101784	72066	23913	8652	9154	11,1
	121313	79264	29214	10716	11624	10,4
60	137647	101100	35429	12981	15470	8,90
	161618	117825	45562	16494	22127	7,30

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

90	82615	53422	24741	11235	12762	6,47
	163274	104572	46909	20704	23234	7,03
120	103869	70236	29902	12488	14841	7,00
	52521	36345	15881	7206	8265	6,35
180	71387	49078	23503	10695	13152	5,43
	64886	42934	23377	11980	13969	4,65
300	22503	14315	15531	7414	12268	1,83
	28805	19043	17101	11096	12924	2,23

Preglednica I.c: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju

čas [min]	AUC(347)	AUC(349)	AUC(234)	AUC(371)	AUC(SER)/ AUC(PAR)
0	471940	294313	267836	86591	1,76
	449194	282472	241140	74594	1,86
15	360765	220264	223614	58728	1,61
	384564	230984	239323	68474	1,61
30	354731	217441	230421	71199	1,54
	350383	214148	233203	67315	1,50
60	194045	115387	183931	58965	1,05
	185078	91619	163626	44427	1,13
90	168528	102759	185484	52176	0,909
	158129	102890	195539	53517	0,809
120	111256	65606	135443	37350	0,821
	163120	96255	206681	56391	0,789
150	92606	56271	147854	39615	0,626
	87823	52641	135875	41417	0,646

Preglednica I.d: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 1 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju

čas[min]	AUC(347)	AUC(349)	AUC(234)	AUC(371)	AUC(SER)/ AUC(PAR)
0	398581	248203	159062	52039	2,51
	340627	216844	130066	39860	2,62
15	231866	146910	137372	43712	1,69
	234933	143542	172550	52722	1,36
30	278334	176036	220860	68209	1,26
	216589	137285	174120	51132	1,24
60	112430	74731	108103	32315	1,04

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

	162422	93170	180542	59063	0,900
90	122838	81984	221288	64157	0,555
	38725	24064	46538	14821	0,832
120	53889	29532	128471	38139	0,419
	75895	46909	209017	64614	0,363
150	42737	24354	172631	51107	0,248
	24674	16004	141345	42405	0,175

Preglednica I.e: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri obsevanju v fotokemičnem reaktorju

čas [min]	AUC(347)	AUC(349)	AUC(234)	AUC(371)	AUC(SER)/ AUC(PAR)
0	342622	207592	122575	35490	2,80
	370815	228957	182344	55238	2,03
15	250432	162349	197769	58970	1,27
	336083	209851	315481	80991	1,07
30	151538	93867	326698	82503	0,464
	163142	107537	383392	101031	0,426
60	31223	18975	133523	39191	0,234
	38572	25309	191986	57104	0,201
90	6667	4310	122986	36343	0,0542
	8803	5477	125807	36896	0,0700
120	7252	5128	183298	54677	0,0396
	25523	16247	528571	130000	0,0483
150	8342	5524	461401	143852	0,0181
	10814	6460	713941	224672	0,0181

Preglednica I.f: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 10 μM koncentracijo RB in 0,1 mM koncentracijo FFA

čas [min]	AUC (347)	AUC (350)	AUC IS (350)	AUC(SER)/ AUC(SERD3)
0	76558	23288	12187	6,28
	108447	28847	13122	8,26
30	77680	25166	13902	5,59
	81138	27299	15534	5,22
60	137855	42526	22537	6,12
	98316	36418	22162	4,44
90	28034	13460	9395	2,98
	30850	14855	10382	2,97
120	15130	9780	7586	1,99
	18486	11955	9275	1,99
150	14426	13086	10994	1,31

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

180	18918	15278	12535	1,51
	19179	22929	20148	0,952
	19359	25926	23119	0,837

Priloga II: Preglednice z rezultati meritev vzorcev po obsevanju v fotokemičnem reaktorju (2,92 μM začetna koncentracija sertralina)

Preglednica II.a: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v MILLI-Q vodi

čas [min]	AUC(SER)
0	38,3
30	37,8
45	38,9
60	37,7
90	36,6
120	38,4
180	37,2
240	37,4
300	36,8
360	36,5
420	5,47

Preglednica II.b: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov

čas [min]	AUC(SER)
0	39,2
30	37,0
45	36,6
60	38,0
90	34,4
120	34,0
180	33,1
240	29,6
300	28,8

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica II.c: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM koncentracijo karbonatnih ionov

čas [min]	AUC(SER)
0	27,0
30	18,8
45	22,7
60	17,9
90	14,7
120	14,0
180	13,5
240	12,1
300	11,2

Preglednica II.d: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 1 mM koncentracijo karbonatnih ionov

čas [min]	AUC(SER)
0	15,6
30	11,1
45	6,59
60	11,2
90	10,3
120	7,86
180	5,10
240	4,21
300	3,09

Preglednica II.e: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo karbonatnih ionov

čas [min]	AUC(SER)
0	9,17
15	8,19
30	7,80
45	6,12
60	3,96
90	4,92
120	2,59
150	2,04
180	1,87

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica II.f: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM koncentracijo fosfatnih ionov

čas [min]	AUC(SER)
0	36,1
30	33,4
45	33,5
60	33,3
90	29,0
120	29,2
180	24,2
240	24,6
300	21,3

Preglednica II.g: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 10 mM koncentracijo fosfatnih ionov

čas [min]	AUC(SER)
0	33,4
30	33,4
45	33,4
60	33,9
90	31,8
120	29,9
180	28,5
240	25,8
300	24,2

Preglednica II.h: Rezultati meritev serije vzorcev z 2,92 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 10 μM koncentracijo RB in 0,1 mM koncentracijo FFA

čas [min]	AUC(SER)
0	3,42
30	6,25
45	5,30
60	4,47
90	2,56
120	1,76
180	1,00
240	0,782

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica II.i: Rezultati meritev serije vzorcev z 8,75 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 10 μM koncentracijo RB in 0,1 mM koncentracijo FFA

čas [min]	AUC(SER)
0	12,0
30	21,1
45	18,4
60	14,9
90	9,49
120	7,40
180	4,94
240	3,75

Priloga III Preglednice z rezultati meritev vzorcev po obsevanju na sončni svetlobi (0,146 μM začetna koncentracija sertralina)

Preglednica III.a: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v MILLI-Q vodi pri obsevanju na sončni svetlobi

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/AUC(SER3D)
0	169328	107367	45359	17682	20806	8,14
	173442	119896	45789	17749	20640	8,40
4,97	173531	115191	47382	18767	22220	7,81
12,68	89988	64760	31853	12817	18805	4,79

Preglednica III.b: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih ionov pri obsevanju na sončni svetlobi

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/AUC(SER3D)
0	226287	157788	69330	27315	36518	6,20
	225643	158246	69056	26945	36338	6,21
4,97	24122	18657	27861	17469	24363	0,990
12,68	4415	7211	35034	23234	34394	0,128

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica III.c: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 0,5 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri obsevanju na sončni svetlobi

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/ AUC(SER3D)
0	226144	159071	65456	27835	32665	6,92
	194231	129422	57905	21301	29742	6,53
4,97	47107	37317	41387	24196	34556	1,36
12,68	12563	13332	41629	26177	39807	0,316
	10616	11510	34789	22822	33250	0,319

Preglednica III.d: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 1 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri obsevanju na sončni svetlobi

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/ AUC(SER3D)
0	221322	154724	61034	24949	28942	7,65
	236609	154962	65069	25132	30761	7,69
4,97	20867	18717	39745	24786	36720	0,568
12,68	2042	4724	26473	17752	26177	0,0780
	2377	5034	27381	18715	27036	0,0879

Preglednica III.e: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 1 mM koncentracijo nitratnih in 1 mM koncentracijo karbonatnih ionov pri obsevanju na sončni svetlobi

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/ AUC(SER3D)
0	200878	153414	59268	23699	30141	6,67
	217830	152192	59479	22693	27894	7,81
4,97	1354	5154	32253	21158	32057	0,0422
	1660	5580	31901	21106	31660	0,0524
12,68	1061	4056	25104	15430	24950	0,0425

Tjaša Brčar:
Preučevanje kinetike fotorazgradnje sertralina v vodi

Preglednica III.f: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v raztopini z 10 μM koncentracijo RB in 0,1 mM koncentracijo FFA pri obsevanju na sončni svetlobi

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/ AUC(SER3D)
0	46145	33045	12815	4730	6124	7,54
	64391	43583	17199	6887	7862	8,19
4,97	9304	6704	7659	4357	6310	1,48
12,68	528	1734	9197	6572	9120	0,0579
	598	2188	11080	7899	10993	0,0544

Preglednica III.g: Rezultati meritev serije vzorcev z 0,146 μM začetno koncentracijo sertralina v vodi iz reke

sevanje [kWh/m ²]	AUC (347)	AUC (349)	AUC (350)	AUC (352)	AUC IS (350)	AUC(SER)/ AUC(SER3D)
0	110641	64500	30681	13463	14638	7,56
	116557	66749	34042	14531	17141	6,80
4,97	34227	22823	14208	6399	9245	3,70
12,68	76883	53346	33889	16410	22741	3,38