

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KRAJNC

**POSNEMANJE FOTORAZGRADNJE SERTRALINA V VODNEM  
OKOLJU**

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA KRAJNC

**POSNEMANJE FOTORAZGRADNJE SERTRALINA V VODNEM  
OKOLJU**

**SIMULATING THE PHOTODEGRADATION OF SERTRALINE IN  
THE AQUATIC ENVIRONMENT**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Odseku za znanosti o okolju Instituta Jožef Stefan in na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom doc. dr. Tine Kosjek.

### **Zahvala**

Iskreno se zahvaljujem doc. dr. Tini Kosjek za prijaznost, pomoč in usmerjanje pri opravljanju eksperimentalnega dela v laboratoriju in pisaju magistrske naloge. Prav tako bi se rada zahvalila izr. prof. dr. Robertu Roškarju za nasvete in strokovno pomoč pri pisaju naloge.

Posebna zahvala gre mojima staršema, sestri Maruši in fantu Andražu za razumevanje, potrpežljivost in podporo tekom celotnega študija.

### **Izjava**

Ijavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelala pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja in somentorstvom doc. dr. Tine Kosjek.

Predsednik komisije: prof. dr. Danijel Kikelj

Članica komisije: asist. dr. Urša Pečar Fonović

Ljubljana, oktober 2015

**VSEBINA**

POVZETEK .....	V
ABSTRACT .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV.....	VIII
 1 UVOD .....	1
1.1 SELEKTIVNI ZAVIRALCI PONOVNEGA PRIVZEMA SEROTONINA .....	1
1.1.1 Sertralin.....	1
1.2 FOTORAZGRADNJA.....	2
1.2.1 Fotorazgradnja v okolju .....	2
1.2.2 Fotorazgradnja SSRI .....	4
1.2.3 Aparature za posnemanje fotorazgradnje v okolju.....	7
1.3 DOLOČANJE ANALITOV V OKOLJSKIH VZORCIH.....	9
1.3.1 Priprava vzorca .....	9
1.3.1.1 Ekstrakcija na trdni fazi.....	9
1.3.2 Instrumentalna analiza .....	12
1.3.2.1 Plinska kromatografija .....	12
1.3.2.2 Tekočinska kromatografija.....	14
 2 NAMEN DELA.....	16
 3 MATERIALI IN METODE.....	17
3.1 MATERIALI.....	17
3.1.1 Kemikalije.....	17
3.1.2 Pribor in aparature.....	17
3.2 METODE DELA.....	19
3.2.1 Priprava raztopin.....	19
3.2.1.1 Priprava raztopine standarda SER .....	19
3.2.1.2 Priprava raztopine internih standardov.....	20
3.2.1.3 Priprava raztopine natrijevega nitrata.....	20
3.2.1.4 Priprava raztopine 2-propanola .....	20
3.2.1.5 Priprava raztopin s pH 10 in pH 12 .....	20
3.2.2 Postopek priprave vzorca za merjenje koncentracij SER v vodi z GC-MSD .....	20
3.2.2.1 Fotorazgradnja.....	20
3.2.2.2 SPE .....	22
3.2.2.3 Derivativacija .....	23
3.2.2.4 Analiza z GC-MSD .....	23
3.2.3 Postopek priprave vzorca za merjenje koncentracij SER v vodi s HPLC-UV .....	24
3.2.3.1 Fotorazgradnja.....	24
3.2.3.2 Analiza s HPLC-UV.....	25

3.2.4 Vrednotenje analizne metode za merjenje koncentracije SER v vodi.....	25
3.2.4.1 GC-MSD .....	25
3.2.4.1.1 Linearnost metode ter meja zaznavnosti in določitve .....	25
3.2.4.1.2 Ponovljivost priprave vzorca in ponovljivost injiciranja.....	26
3.2.4.2 HPLC-UV .....	26
3.2.4.2.1 Linearnost metode ter meja zaznavnosti in določitve .....	26
3.2.4.2.2 Ponovljivost postopka in injiciranja .....	27
<b>4 REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>28</b>
4.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA ZA ANALIZO Z GC-MSD .....	28
4.1.1 Analiza z GC-MSD.....	30
4.1.2 Optimizacija postopka SPE.....	34
4.1.2.1 Izbira pH topila in topila za elucijo .....	34
4.1.2.2 Izbira ustrezne kolone SPE .....	35
4.2 ANALIZA S HPLC-UV.....	36
4.3 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE.....	36
4.3.1 GC-MSD .....	36
4.3.1.1 Linearnost, območje in točnost metode .....	37
4.3.1.2 Ponovljivost analizne metode in ponovljivost injiciranja .....	39
4.3.1.3 Meja zaznavnosti in meja določitve .....	40
4.3.2 HPLC-UV .....	41
4.3.2.1 Selektivnost metode .....	41
4.3.2.2 Linearnost, območje in točnost metode .....	42
4.3.2.3 Ponovljivost metode in ponovljivost injiciranja .....	43
4.3.2.4 Meja zaznavnosti in meja določitve .....	43
4.4 FOTORAZGRADNJA SERTRALINA .....	44
4.4.1 Izbira pogojev za fotorazgradnjo .....	44
4.4.1.1 Natrijev nitrat .....	44
4.4.1.2 2-propanol .....	45
4.4.1.3 Čas obsevanja.....	45
4.4.2 Rezultati fotorazgradnje SER.....	46
4.4.3 Primerjava hitrosti fotorazgradnje SER pri direktni in indirektni fotorazgradnji .....	49
4.4.4 Primerjava hitrosti fotorazgradnje med dvema različnima izhodnima koncentracijama SER .....	50
<b>5 ZAKLJUČEK.....</b>	<b>51</b>
<b>6 LITERATURA.....</b>	<b>53</b>

## KAZALO SLIK

Slika 1: Kemijska struktura SER, povzeto po (4) .....	2
Slika 2: Identificirani produkti fotorazgradnje FLU, povzeto po (5).....	5
Slika 3: Identificirani produkti fotorazgradnje CIT, povzeto po (8).....	6
Slika 4: Izomerizacija fluvoksamina, povzeto po (5). .....	6
Slika 5: Identificirani produkti fotorazgradnje PAR, povzeto po (10). .....	6
Slika 6: Zgradba UV reaktorja, povzeto po (13). .....	7
Slika 7: Vrste reakcijskih bučk, povzeto po (13).....	8
Slika 8: Emisijski spekter srednjetlačne svetilke, povzeto po (14).....	9
Slika 9: Shema sistema za SPE, povzeto po (16). .....	10
Slika 10: Shema stopenj SPE, povzeto po (17). .....	11
Slika 11: Kemijski strukturni MSTFA (levo) (24) in MTBSTFA (desno) (25). .....	14
Slika 12: Shematski prikaz analiznega postopka za merjenje fotorazgradnje SER v vodi. ....	19
Slika 13: Aparatura za UV-obsevanje. .....	21
Slika 14: Aparatura za SPE. .....	22
Slika 15: Sušenje ekstraktov z dušikom. .....	23
Slika 16: Acetiliranje SER.....	29
Slika 17: Sililiranje SER z MSTFA.....	29
Slika 18: Sililiranje SER z MTBSTFA.....	29
Slika 19: Primerjava stabilnosti derivatov SER z MTBSFA in acetanhidridom pri 100 °C.....	30
Slika 20: Celotni ionski kromatogram SER-Ac, SER-D <sub>3</sub> -Ac in PAR-Ac. ....	31
Slika 21: Masni spekter SER-Ac, skupaj s strukturami fragmentov. .....	32
Slika 22: Masni spekter SER-D <sub>3</sub> -Ac, skupaj s strukturami fragmentov. ....	33
Slika 23: Masni spekter PAR-Ac, skupaj s strukturami fragmentov. ....	33
Slika 24: Primerjava izkoristkov elucije z različnimi topili.....	34
Slika 25: Absorpcijski spekter SER.....	36
Slika 26: Umeritvena krivulja za GC-MSD glede na SER-D <sub>3</sub> . ....	38
Slika 27: Umeritvena krivulja za GC-MSD glede na PAR. ....	38
Slika 28: Kromatogram vzorca topila.....	42
Slika 29: Kromatogram vzorca SER. ....	42
Slika 30: Umeritvena krivulja metode HPLC-UV.....	42
Slika 31: HPLC-UV analiza vzorca, ki vsebuje SER, NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> in 2-propanol, izpostavljenega različnim časom obsevanja. ....	46
Slika 32: Upad koncentracije SER v odvisnosti od časa obsevanja pri nižji izhodni koncentraciji (10 µg/L).47	47
Slika 33: Upad koncentracije SER v odvisnosti od časa obsevanja pri višji izhodni koncentraciji (1 mg/L). 47	47
Slika 34: Primerjava konstant indirektne fotorazgradnje SER v odvisnosti od koncentracije 2-propanola (koncentracija NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> je 1 mmol/L). ....	50

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Priprava raztopin za UV-obsevanje pri uporabi metode GC-MSD .....	22
Preglednica II: Priprava raztopin za UV-obsevanje pri uporabi metode HPLC-UV.....	25
Preglednica III: Priprava raztopin za vrednotenje analizne metode (GC-MS).....	26
Preglednica IV: Priprava raztopin za vrednotenje analizne metode (HPLC-UV).....	27
Preglednica V Odzivi SER pri različnih temperaturah acetiliranja.....	30
Preglednica VI: Primerjava lastnosti kolon Oasis® HLB (30, 31) in Strata-X-CW (32).....	35
Preglednica VII: Vrednotenje analizne metode za merjenje koncentracije SER v vodi z GC-MSD.....	41
Preglednica VIII: Validacija določanja SER v vodi s HPLC-UV.....	43
Preglednica IX: Vpliv koncentracije NaNO <sub>3</sub> na razgradnjo SER.....	45
Preglednica X: Konstante fotorazgradnje SER (k) pri nižji izhodni koncentraciji SER (10 µg/L).....	48
Preglednica XI: Konstante fotorazgradnje SER (k) pri višji izhodni koncentraciji SER (1 mg/L) .....	48
Preglednica XII: Razpolovni časi SER pri različnih pogojih fotorazgradnje.....	48

## POVZETEK

Zaradi naraščanja predpisovanja in porabe zdravil je čedalje bolj prisotno onesnaževanje okolja z zdravilnimi učinkovinami. Ostanki zdravil so znani onesnaževalci vodnega okolja, vendar kljub temu njihovo kroženje in učinek na organizme in ljudi še niso razjasnjeni. Med ostanke zdravil prištevamo zdravilne učinkovine, njihove metabolite in produkte transformacije. Slednji nastanejo med mikrobiološko ali abiotiko (fotokemično) razgradnjo zdravilnih učinkovin ali metabolitov v okolju ali med čiščenjem odpadnih vod.

Namen našega dela je bil posnemati pogoje razgradnje sertralina (SER) v vodnem okolju, saj v literaturi ni objavljenih študij glede kroženja in transformacije SER. Najprej smo optimizirali in razvili analizni metodi, ju ovrednotili in dokazali, da sta ustrezni za merjenje koncentracije SER v vodnih vzorcih v koncentracijskih območjih od 0,5 do 50 µg/L oziroma od 0,1 do 2 mg/L. Nižje izhodne koncentracije SER smo merili s plinskim kromatografom z masno spektrometrično detekcijo, kjer smo SER iz obsevanega vzorca izolirali z ekstrakcijo na trdni fazi ter ga derivativirali. Višje izhodne koncentracije SER v vzorcih smo merili neposredno s tekočinskim kromatografom visoke ločljivosti.

Izvajali smo direktno in indirektno fotorazgradnjo SER. Pri direktni smo obsevali z UV-svetlobo vodno raztopino SER, indirektna pa je vključevala dodatek sekundarnih komponent, ki preko tvorjenja radikalov povzročijo razgradnjo SER. Ker so v okolju prisotni številni dejavniki, z indirektno fotorazgradnjo bolje posnemamo naravne pogoje, katerim se najbolje približamo z uporabo srednje tlačne živosrebrne svetilke in z dodatkom nitrata in 2-propanola. Ugotovili smo, da lahko potek razgradnje SER v prisotnosti UV sevanja najbolje opišemo z reakcijo psevdo 1. reda. Pri višji izhodni koncentraciji SER (1 mg/L) so bile hitrosti fotorazgradnje za en velikostni razred manjše kot pri nižji izhodni koncentraciji (10 µg/L), tako pri direktni kot tudi pri indirektni fotorazgradnji. Pri obeh izhodnih koncentracijah se je SER najpočasneje razgradil pri direktni fotorazgradnji, najhitreje pa ob prisotnosti natrijevega nitrata, saj ta močno pospeši razgradnjo zaradi tvorjenja hidroksilnih radikalov. Ob dodatku 2-propanola smo ugotovili trend zmanjšanja hitrosti fotorazgradnje z naraščajočo koncentracijo 2-propanola. Ta zavira fotorazgradnjo SER, saj deluje kot lovilec teh radikalov. Dobljeni rezultati predstavljajo primerna izhodišča za nadaljnje študije fotorazgradnje SER, tudi v smeri kasnejše identifikacije nastalih transformacijskih produktov SER.

## ABSTRACT

Nowadays, the amount of prescribed drugs is growing and consequently the environmental pollution caused by active substances is increased. Residual drugs are known contaminants of the aquatic environment, but their circulation and effects on organisms and people are still not clarified. Drug residues are active substances, their metabolites and transformation products. The latter can occur at microbial or abiotic (photochemical) degradation of the active substances or their metabolites in the environment or in the wastewater treatment.

The purpose of our work was to simulate the conditions of SER photodegradation in the aquatic environment, because there is a lack of published studies of the SER fate and transformation. Firstly, we have developed and optimized two analytical methods, which were afterwards evaluated and proved to be suitable for measuring SER concentration in water samples in concentration ranges from 0.5 to 50 µg/L and from 0.1 to 2 mg/L. Lower output SER concentrations were measured after sample pre-concentration with solid phase extraction and derivatization by gas chromatography with mass spectrometry and higher output SER concentrations were measured directly by high performance liquid chromatography.

We carried out direct and indirect photodegradation of SER. At direct conditions only aqueous SER samples were irradiated while at indirect conditions, secondary components were added, which through the formation of free radicals caused degradation of the SER. Regarding many factors present in the environment, the indirect photodegradation better simulate the natural conditions. We approached these conditions through the use of mercury lamp and by the addition of nitrate and 2-propanol. We found that the photodegradation of SER is best described by pseudo 1st order kinetics. At a higher output concentration of SER (1 mg/L) degradation rates were one order of magnitude smaller than at a lower output concentration of SER (10 µg/L) at direct and indirect conditions. At both output concentrations the lowest rate constant was at direct photodegradation and the highest rate constant was in the presence of sodium nitrate, because it significantly accelerated the degradation due to the formation of hydroxyl radicals. Addition of 2-propanol showed a trend toward rate decreasing with increasing concentration of 2-propanol. It acted as a free radicals scavenger and inhibited photodegradation of SER. The

obtained results represent a suitable starting point for further studies of SER photodegradation, also toward the identification of SER transformation products.

**Ključne besede:** sertralin, fotorazgradnja, ekstrakcija na trdni fazi, plinska kromatografija z masno spektrometrijo, tekočinska kromatografija z UV-detektorjem

**Key words:** sertraline, photodegradation, solid phase extraction, gas chromatography with mass spectrometric detection, liquid chromatography with UV-detection

## SEZNAM OKRAJŠAV

CIT	citalopram
CV	koeficient variacije
FLU	fluoksetin
FLX	fluoksamin
GC-MSD	plinska kromatografija z masno spektrometrično detekcijo (angl. <b>Gas Chromatography with Mass Spectrometry Detection</b> )
GLC	plinsko-tekočinska kromatografija (angl. <b>Gas-Liquid Chromatography</b> )
GSC	plinsko-trdna kromatografija (angl. <b>Gas-Solid Chromatography</b> )
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. <b>High Performance Liquid Chromatography</b> )
HPLC-UV	tekočinska kromatografija z UV spektrofotometrično detekcijo (angl. <b>High Performance Liquid Chromatography with UV detection</b> )
IS	interni standard
LOD	meja zaznavnosti (angl. <b>Limit Of Detection</b> )
LOQ	meja določitve (angl. <b>Limit Of Quantification</b> )
MSTFA	N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid
MTBSTFA	N-(terc-butildimetilsilil)-N-metilfluoroacetamid
PAR	paroksetin
PAR-Ac	acetiliran paroksetin
SER	sertralin
SER-Ac	acetiliran sertralin
SER-D <sub>3</sub>	devteriran sertralin
SER-D <sub>3</sub> -Ac	acetiliran devteriran sertralin
SIM	spremljanje izbranega iona (angl. <b>Selective Ion Monitoring</b> )
SPE	ekstrakcija na trdni fazi (angl. <b>Solid Phase Extraction</b> )
SSRI	selektivni zaviralci ponovnega privzema serotoninu (angl. <b>Selective Serotonin Re-uptake Inhibitor</b> )
t <sub>1/2</sub>	razpolovni čas
TIC	celotni ionski kromatogram ( <b>Total Ion Chromatogram</b> )

## 1 UVOD

V današnjem času je vedno bolj prisotno onesnaževanje okolja z zdravilnimi učinkovinami. Količina predpisanih zdravil je vedno večja, v okolje pa prehajajo z urinom ali fecesom ter kot odpadna zdravila preko čistilnih naprav. Iz organizma se izločijo v nespremenjeni obliki ali kot metaboliti. Ker je večina metabolitov polarnih, se ti ne zadržijo v aktivnem blatu v procesu čiščenja odplak, ampak s prečiščeno odpadno vodo vstopijo v okolje. Posledica je stalna kontaminacija površinskih in podzemnih vod. V okolju ali med čiščenjem odpadnih voda lahko z različnimi procesi nastanejo produkti transformacije, ki imajo lahko toksične učinke na ljudi in okoljske organizme (1).

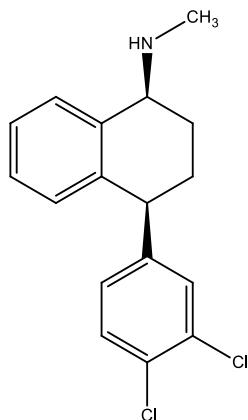
### 1.1 SELEKTIVNI ZAVIRALCI PONOVOVNEGA PRIVZEMA SEROTONINA

V zadnjih letih je predpisovanje antidepresivov močno poraslo. Leta 2012 so bili v Sloveniji najpogosteje predpisani antidepresivi iz skupine selektivnih zaviralcev ponovnega privzema serotonina (SSRI) (2). SSRI zavirajo ponovni privzem serotonina, kar vodi do povečane koncentracije tega nevrotransmiterja v sinaptični špranji in posledično k večji postsinaptični nevronski aktivnosti. Uporablja se za zdravljenje depresij, anksioznosti in nekaterih osebnostnih motenj (obsesivno-kompulzivne motnje, panične motnje). Za bistveno izboljšanje razpoloženja je potrebno jemanje vsaj 2 tedna, za maksimalen učinek pa do 12 tednov (3). SSRI se jemljejo skozi daljše obdobje in posledično kontinuirano vstopajo v okolje, kar pomeni, da so vodni organizmi kronično izpostavljeni ostankom zdravil (učinkovinam, metabolitom in produktom transformacije) (1). SSRI imajo manj neželenih učinkov kot triciklični antidepresivi in zaviralci monoaminske oksidaze. Najpogostejši so glavobol, znojenje, slabost, bruhanje, driska, utrujenost, spolna disfunkcija, spremembra telesne mase ter motnje spanja (nespečnost, zaspanost). Predstavniki SSRI-jev so fluoksetin (FLU), citalopram (CIT), escitalopram, fluvoksamin (FLX), paroksetin (PAR) in sertralin (SER) (3).

#### 1.1.1 Sertralin

Sertralin ((1-S,*cis*)-4-(3,4-diklorofenil)-1,2,3,4-tetrahidro-N-metil-1-naftalenamin) je selektivni zaviralec ponovnega privzema serotonina in spada med antidepresive (slika 1).

Nahaja se v obliki belega praška, je težko topen v vodi in izopropanolu ter dobro topen v etanolu (4). SER je šibka baza, njegov pKa znaša 9,47 (5).



**Slika 1:** Kemijska struktura SER, povzeto po (4).

Po zaužitju pride v telesu do nastanka različnih metabolitov. V prvi stopnji metabolizma SER pride do N-demetilacije, nastane norsertralin, ki je farmakološko manj aktiven kot SER. Nadalje pride do oksidativne deaminacije, hidroksilacije ali konjugacije z glukuronidi ali sulfati, sledi izločanje z urinom ali fecesom (4). V urin se izloči le 0,2 % nespremenjenega SER (6).

Tako SSRI kot ostale zdravilne učinkovine v komunalne odpadne vode v največji meri prehajajo z izločki ljudi ali s splakovanjem neuporabljenih oz. starih zdravil v straniščno školjko. Zdravilne učinkovine in njihovi metaboliti v okolje vstopajo z odplakami ali odpadnim blatom iz čistilnih naprav. To so lahko odplake iz farmacevtske industrije, odplake iz zdravstvenih ustanov, kot so bolnišnice, domovi za ostarele, ali pa gre za komunalne odplake iz naselij (6). V okolju lahko pride do razgradnje zdravilnih učinkovin s pomočjo sončne svetlobe ali mikrobiološke razgradnje v zemlji. Nastalim produktom pravimo transformacijski produkti. Ti niso nujno strukturno enaki metabolitom, ki nastanejo v človeškem telesu (5).

## 1.2 FOTORAZGRADNJA

### 1.2.1 Fotorazgradnja v okolju

Onesnažila so v naravnem okolju podvržena raznim vplivom, ki pospešujejo ali zavirajo njihovo razgradnjo. Ti vplivi so lahko fizikalni procesi (mešanje, raztopljanje, izhlapevanje,obarjanje in sedimentacija, vezava na delce) ter mikrobiološka in kemična

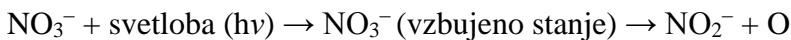
razgradnja, kamor uvrščamo tudi fotokemično razgradnjo. Potekajo lahko v zraku, vodi in v prsti. Mikrobiološka in fotokemična razgradnja največkrat potekata sočasno in sta med seboj kompetitivni. Pri tem se lahko organske spojine pretvorijo v manj toksične spojine, lahko pa se toksičnost spojin s pretvorbo tudi poveča (7). V naravnih vodah je izvor svetlobe za fotokemične reakcije sonce.

Fotokemične reakcije delimo na primarne (direktne) in sekundarne (indirektne). Pri primarnih reakcijah molekula po absorpciji svetlobe ponovno odda energijo in preide nazaj v osnovno stanje ali pa se razgradi. Pri sekundarnih pa vzbujena molekula odda energijo drugi molekuli, ki nato kemično reagira. Sekundarne reakcije so v naravnem okolju pomembne, saj na ta način potekajo reakcije s spojinami, ki v vidnem delu spektra slabo absorbirajo. V zgornjih vodnih plasteh je intenziteta svetlobe največja, zato tam potekajo najintenzivnejši fotokemični procesi (7).

Najpomembnejši absorberji svetlobe, ki lahko povzročijo indirektno fotorazgradnjo organskih onesnaževalcev, so kromofori, prisotni v raztopljeni organski materiji (8). Najpomembnejše poti, ki lahko vodijo do transformacije organskih snovi kot posledica vzbujenega stanja neznanega kromofora v naravni vodi ali zemlji, potekajo preko singletnega kisika ( $^1\text{O}_2$ ) in nastanka radikalov.

Najbolj pomemben akceptor vzbujenih neznanih kromoforov je molekularni kisik v osnovnem stanju (tripletni kisik,  $^3\text{O}_2$ ), ki se pretvori v prvo vzbujeno stanje (singletni kisik,  $^1\text{O}_2$ ), ta pa potem lahko kemično reagira z določenimi organskimi onesnaževalci. Kemične reakcije vzbujenih neznanih kromoforov z molekularnim kisikom ali organskimi snovmi lahko vodijo do tvorbe reaktivnih zvrsti, ki lahko reagirajo z organskimi onesnaževalci. Reakcije s tripletnim kisikom tvorijo peroksi radikale ( $\text{ROO}^\cdot$ ), superoksidni anion ( $\text{O}_2^-$ ) pa nastane s prenosom elektrona na tripletni kisik. Pri teh kemičnih reakcijah nastanejo tudi vodikov peroksid in hidroksilni radikali ( $\text{HO}^\cdot$ ). Singletni kisik, hidroksilni radikal in peroksi radikal so elektrofili, ki se lahko obnašajo kot oksidanti. Singletni kisik je v naravnih vodah prisoten v nizkih koncentracijah, zato je kot fotooksidant pomemben le za nekaj zelo reaktivnih vrst organskih spojin (spojine z elektroni bogato dvojno vezjo, spojine s funkcionalno skupino, ki se zlahka oksidira – sulfidi, anilini in fenoli). Peroksi radikali reagirajo s spojinami, ki so bolj podvržene oksidaciji (alkilni fenoli, aromatski amini, tiofenoli in imini).

Obstaja več možnih mehanizmov nastanka hidroksilnih radikalov v površinskih vodah (fotorazgradnja nitrata, nitrita, vodikovega peroksida, iz reakcij vodikovega peroksida z železom – Fentonova reakcija). V tipičnih sladkih vodah, kjer je koncentracija nitrata visoka, je fotorazgradnja nitrata prevladujoč proces pri nastanku hidroksilnih radikalov. Spodaj so prikazane kemične reakcije, ki potečejo pri fotorazgradnji nitrata.



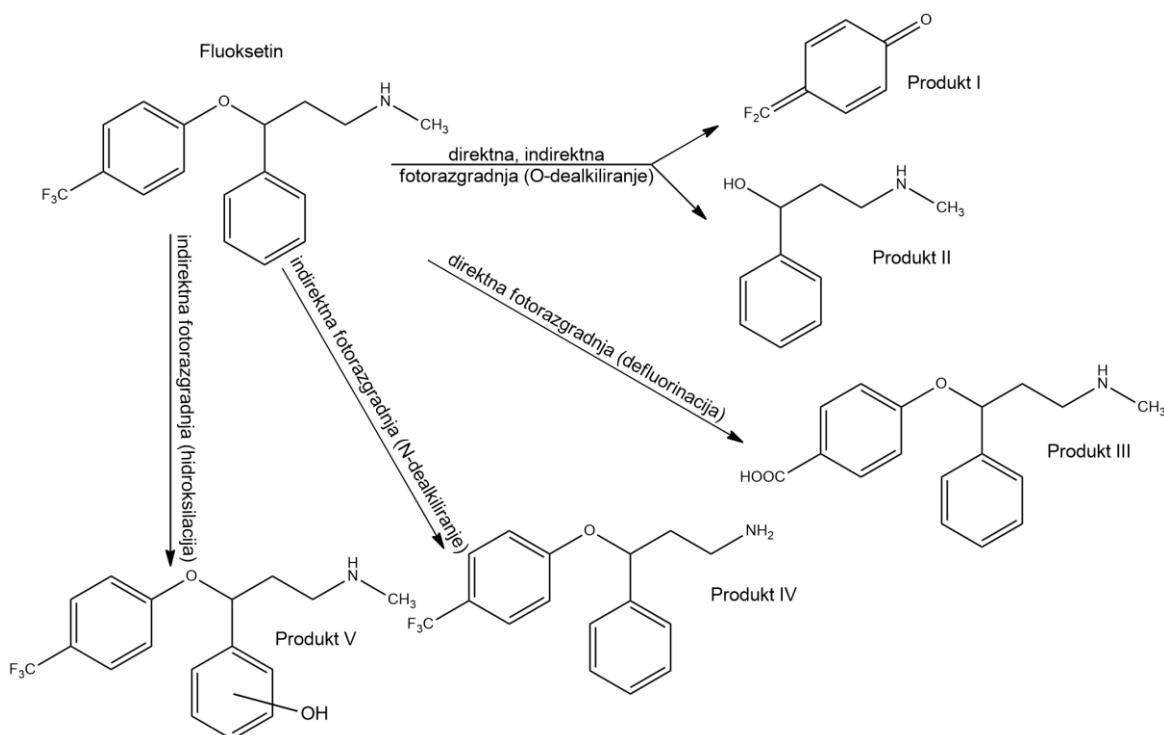
Usoda atomskega kisika (O), ki je v nevzbujenem stanju, je verjetno reakcija s tripletnim kisikom do ozona, ta pa potem hitro tvori reakcije z nitritom ( $\text{NO}_2^-$ ) ali razpade do hidroksilnega radikala. V vodah z malo organskimi snovmi in veliko vsebnostjo karbonata lahko bikarbonat in karbonat postaneta zelo pomembna lovilca hidroksilnih radikalov (8).

### 1.2.2 Fotorazgradnja SSRI

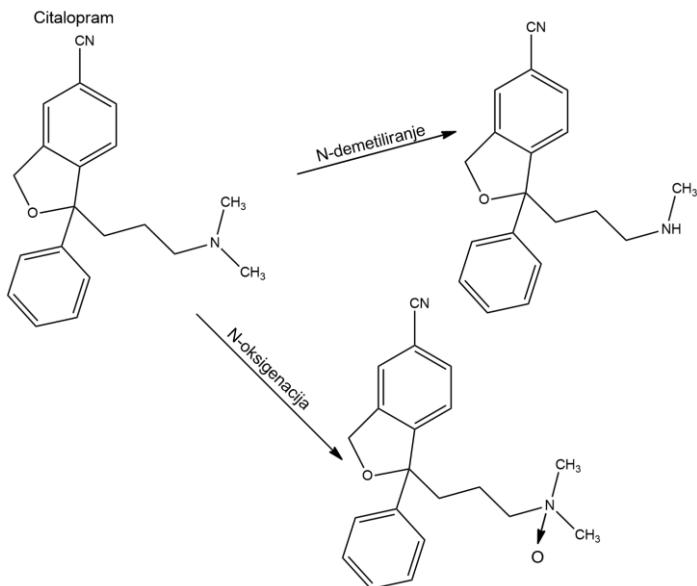
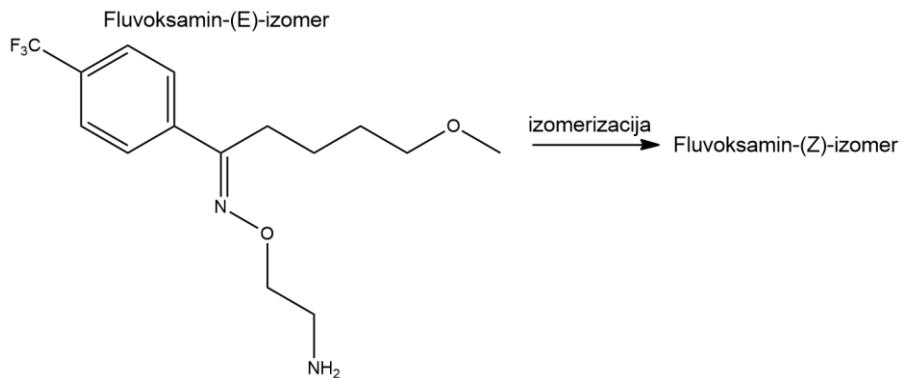
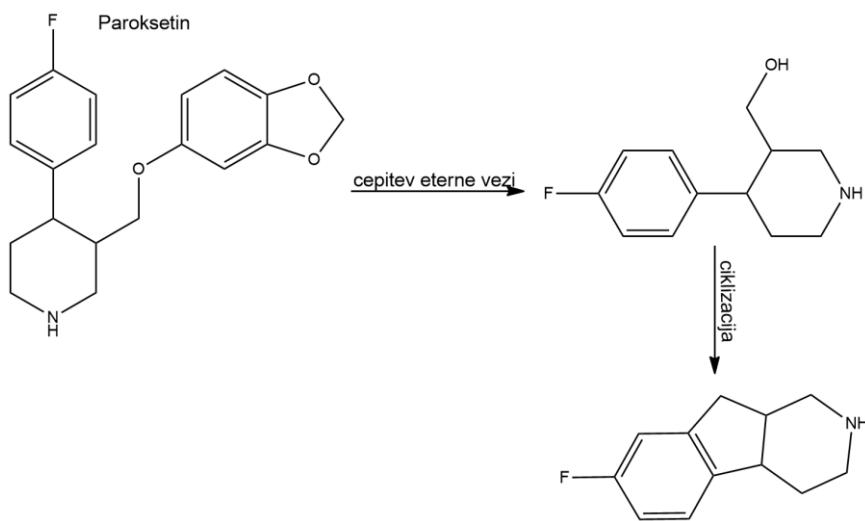
SSRI-ji posnemajo učinke nevrotransmiterja serotonin. Ker le-ta regulira številne fiziološke procese pri ribah, mehkužcih in praživalih, lahko zdravilne učinkovine, ki posnemajo njegovo delovanje, že v sledovih povzročijo škodljive posledice na teh in drugih vodnih organizmih. Fotorazgradnja je pomembna pot razgradnje SSRI (6). Kwon in Armbrust sta raziskovala usodo in obstojnost FLU v laboratorijskih razmerah (7). Študije so pokazale, da je FLU odporen na fotorazgradnjo, hidrolizo in mikrobiološko razgradnjo in da hitro preide iz vodne faze zaradi adsorpcije na sedimente. Rezultat tega je, da se FLU v procesu čiščenja odpadne vode ne razgradi in je vezan na sedimente spuščen v vodno okolje. Na sliki 2 so prikazani identificirani fotoprodukti, ki so nastali pri direktni in indirektni fotorazgradnji v laboratorijskih razmerah. Pri direktni fotorazgradnji je razgradnja potekala po dveh mehanizmih: defluorinacija (produkt III) in O-dealkiliranje (produkta I in II). Pri indirektni fotorazgradnji je prišlo do N-dealkiliranje, kjer so identificirali produkt norfluoksetin (produkt IV) ter hidroksilacije (produkt V) in O-dealkiliranja (produkta I in II).

V nasprotju z raziskavami o FLU, obstaja manj študij glede usode in transformacije v okolju za ostale SSRI. Kwon in Armbrust sta raziskovala tudi hidrolizo in fotorazgradnjo CIT, FLX in PAR. CIT je hidrolitsko stabilen pri pH območju med 5 in 9, fotolitsko pa pri pH 5 in 7 (8). Pri pH 9 se pod vplivom svetlobe zmerno razgradi. Glavni produkti (slika 3)

nastanejo z N-demetiliranjem, ostali pa z N-oksiogenacijo (citalopram-N-oksid). FLX je na trgu na voljo kot (E)-oksim (9). Pod vplivom sončne svetlobe poteče izomerizacija in nastane produkt, ki je (Z)-oksim (slika 4). Podobno kot FLU, FLX in CIT, je tudi PAR hidrolitsko stabilen, pod vplivom svetlobe pa se hitro razgradi (10). Identificirana sta bila dva produkta, ki sta nastala s cepitvijo eterne vezi in kasneje ciklizacijo v petčlenski obroč (slika 5). Zanimivo je dejstvo, da so vsi transformacijski produkti N-demetiliranja FLU in CIT tudi metaboliti (5). Večina N-demetiliranih produktov ohrani svojo farmakološko aktivnost, vendar so ponavadi šibkejši kot osnovne učinkovine. Pri CIT poteče tudi N-oksiogenacija. Pri metabolizmu FLX poteče oksidativna eliminacija  $-OCH_3$  skupine in pride do tvorbe neaktivne karboksilne kisline. Pri PAR se tvori neaktivnen kateholni intermedijat.



**Slika 2:** Identificirani produkti fotorazgradnje FLU, povzeto po (5).

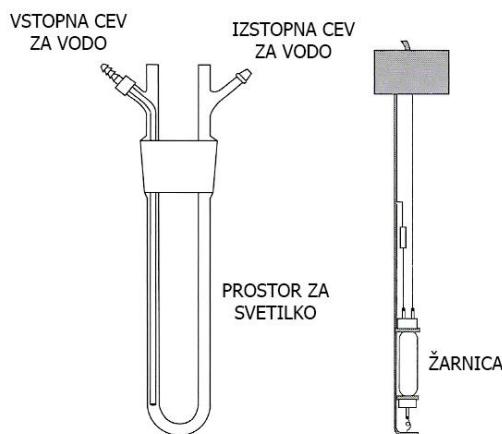
**Slika 3:** Identificirani produkti fotorazgradnje CIT, povzeto po (8).**Slika 4:** Izomerizacija fluvoksamina, povzeto po (5).**Slika 5:** Identificirani produkti fotorazgradnje PAR, povzeto po (10).

V začetni stopnji ovrednotenja pomembnosti SSRI kot okoljskih onesnaževalcev je treba oceniti tudi njihovo toksičnost in določiti potencialne učinke, ki jih lahko imajo na organizme (5). Tudi v koncentracijah v sledovih lahko SSRI-ji vplivajo na biološko aktivnost vodnih organizmov, kot so zmanjšanje reprodukcije, nepravilnosti v razvoju zarodka, zakasnitve v fiziološkem razvoju in spolni dozorelosti (6). Poleg učinkovin bi lahko bili na podoben način problematični tudi njihovi metaboliti in transformacijski produkti.

### 1.2.3 Aparature za posnemanje fotorazgradnje v okolju

Raztopine vzorcev so obsevane z ultravijolično in/ali vidno svetlobo, ki jo oddaja žarnica, nameščena v hlajenem UV-fotokemičnem reaktorju z dvojno steno. Učinkovitost takšnega tipa reaktorja je zelo velika, saj je žarnica obdana z reakcijsko raztopino. V uporabi sta dve velikosti UV-reaktorjev z ustrezno reakcijsko bučko ter nizko ali srednje tlačno živosrebrno svetilko z močjo od 6 do 400 W (14).

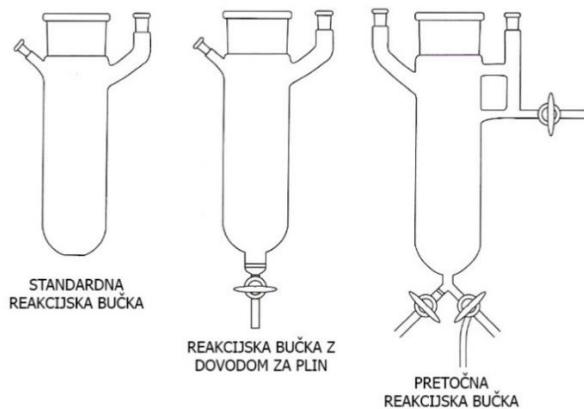
**UV-reaktor** (slika 6) ima dvojno steno, narejeno iz kremenovega ali borosilikatnega stekla, kamor vstavimo žarnico. Vstopne in izstopne cevi so namenjene vodnemu hlajenju. Vstopna cev z majhnim premerom se razteza do dna krožnega prostora in tako omogoča pretok hladilne tekočine z dna navzgor. Da se izognemo prekomernemu segrevanju obsevane raztopine pri uporabi srednje tlačne svetilke, je potreben dovolj velik pretok vode ali hladilne tekočine.



Slika 6: Zgradba UV reaktorja, povzeto po (13).

**Reakcijska bučka** je narejena iz borosilikatnega stekla. Ima več odprtin, v glavno damo UV-reaktor, manjše pa služijo za povratni hladilnik in vzorčenje. Ločimo tri vrste

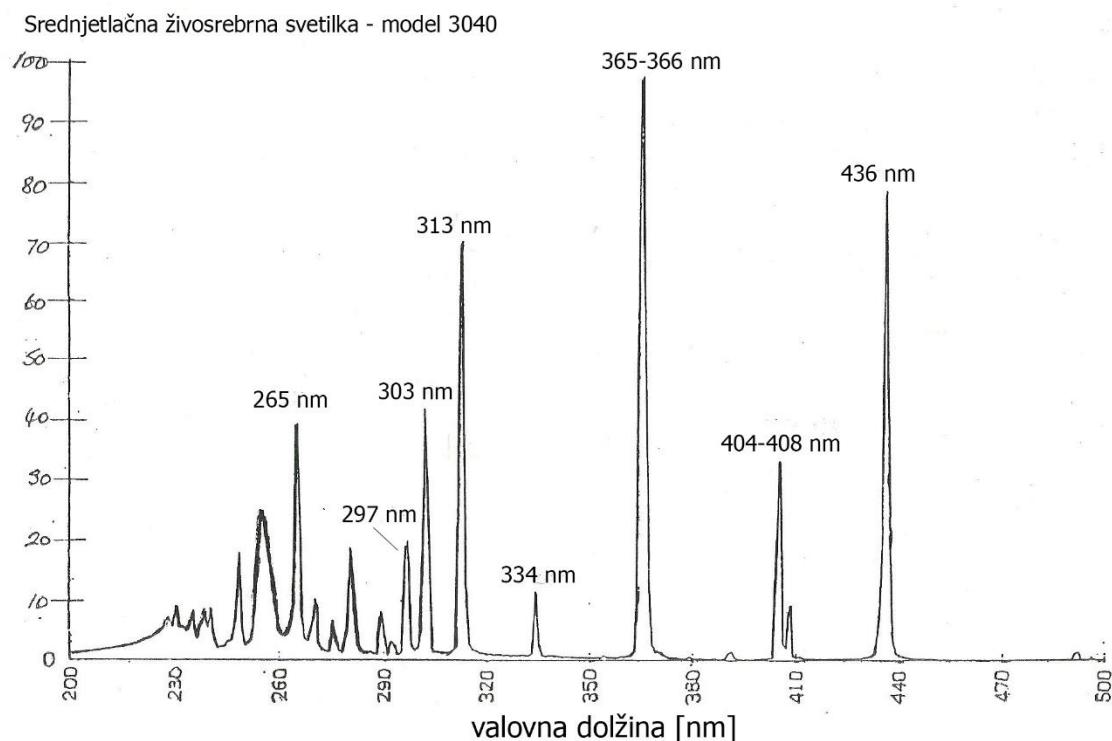
reakcijskih bučk (slika 7). Standardna bučka ima ravno dno za magnetno mešalo ter poševno in navpično odprtino. Bučka z dovodom za plin je zelo podobna standardni, ima še dodatno sintrano stekleno ploščico in zaporni ventil. Količino kisika, ki je prisotna pri fotokemijski reakciji, odpravimo ali nadzorujemo z vnašanjem inertnega plina (dušik ali argon).



**Slika 7:** Vrste reakcijskih bučk, povzeto po (13).

Tretja vrsta so pretočne reakcijske bučke, ki imajo dve navpični odprtini na vrhu ter dve poševni odprtini na dnu bučke. Ena izmed spodnjih ima zaporni ventil za dovod plina, druga pa trosmerni zaporni ventil. Tlačna črpalka pripomore h kroženju raztopine po bučki. Kisik odpravimo z vpihanjem inertnega plina.

**Svetilka za obsevanje** je lahko nizko- ali srednjetlačna živosrebrna svetilka, za večje UV-reaktorje se lahko uporablja tudi fosforna svetilka. Nizkotlačna svetilka z močjo 6 ali 16 W oddaja 90 % svojega sevanja pri 254 nm, srednjetlačna svetilka z močjo 125 ali 400 W pretežno pri 365–366 nm, v manjših količinah pa v ultravijoličnem območju pri 265, 297, 303, 313 in 334 nm in v vidnem območju pri 404–408, 436, 546 in 577–579 nm. Na sliki 8 je prikazan emisijski spekter srednje tlačne svetilke do 500 nm. Na x-osi je valovna dolžina sevane svetlobe v nm, na y-osi pa odstotek oddanega sevanja (14).



**Slika 8:** Emisijski spekter srednjetlačne svetilke, povzeto po (14).

Nizkotlačna svetilka se uporablja za čiščenje odpadnih vod in predvsem za čiščenje pitne vode, srednjetlačno svetilko pa uporabljamo za posnemanje fotorazgradnje pod vplivom sončne svetlobe.

## 1.3 DOLOČANJE ANALITOV V OKOLJSKIH VZORCIH

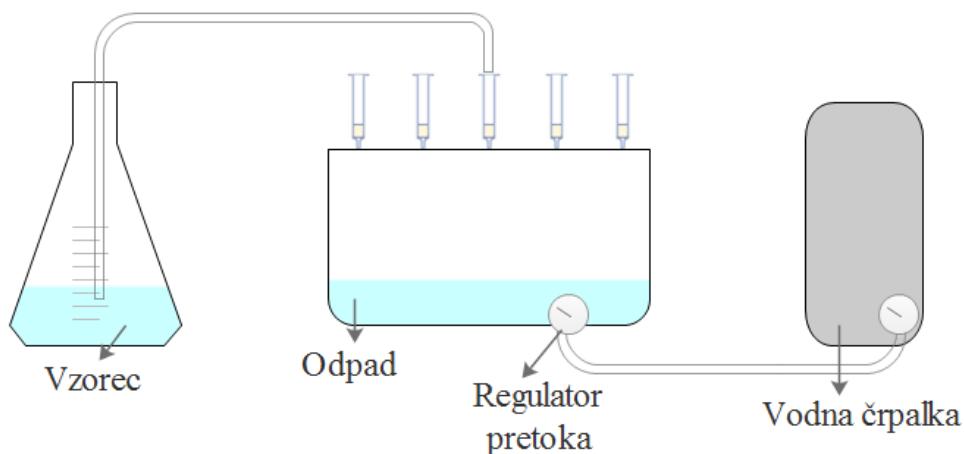
### 1.3.1 Priprava vzorca

#### 1.3.1.1 Ekstrakcija na trdni fazi

Ker večina instrumentov ni neposredno združljiva s sestavo vzorca, je potrebna predpriprava vzorca, da izoliramo in koncentriramo želeni analit ter odstranimo moteče komponente. V preteklosti je bila najbolj pogosto uporabljena ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE), vendar ima ta metoda mnogo omejitev. Postopek je zelo zamuden, posebno pri analizi večjega števila vzorcev. Slabost je tudi poraba velikih količin strupenih organskih topil zaradi relativno velikega volumna vzorca. Ta predstavljajo veliko breme za okolje. Potrebna so tudi organska topila visoke čistosti (ultra čista topila), poleg tega lahko pride do nastanka emulzij. Da bi odpravili ali vsaj zmanjšali te pomanjkljivosti, so v 70. letih prejšnjega stoletja razvili ekstrakcijo na trdni fazi (SPE). Ta je skrajšala čas, zmanjšala potreben volumen vzorcev, zmanjšala porabo topil ter preprečila nastanek emulzij.

SPE je danes dobro uveljavljena tehnika in se zaradi svojih prednosti pred drugimi postopki za pripravo vzorcev uporablja za analize številnih skupin analitov v različnih vrstah matrikov. Zaradi možnosti predhodnega koncentriranja velikih volumnov vzorcev se SPE uporablja za določitev organskih onesnaževal v vzorcih vod iz okolja, čedalje več pa tudi kot metoda priprave vzorca v biomedicini, farmaciji in za prehranske vzorce (15).

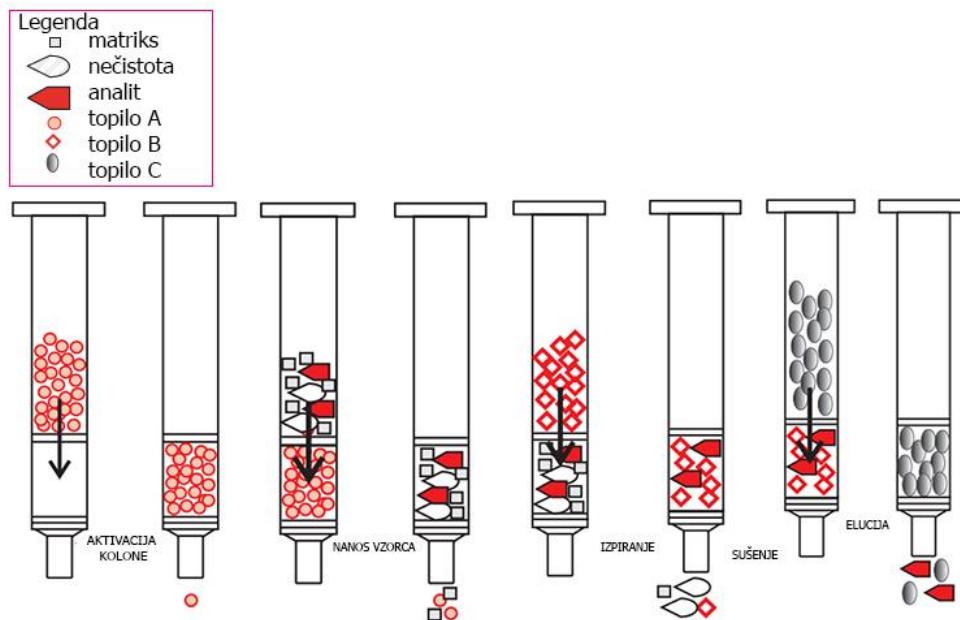
Osnova kolone SPE je adsorpcijsko sredstvo, ki je glede na naravo njegovih primarnih interakcij z analitom lahko normalno, reverznofazno in ionsko izmenjevalno SPE. Pri ekstrakciji z normalno fazo običajno ekstrahiramo polarni analit iz nepolarnega organskega topila. Sorbenti iz te skupine imajo anorgansko osnovo (silicijev dioksid, aluminijev oksid, magnezijev silikat). Ekstrakcija z reverzno fazo uporablja stacionarno fazo na osnovi nasičenih verig ogljikovodikov (npr. C<sub>18</sub> in C<sub>8</sub>) ali polimerov (npr. polistiren divinil benzen). Uporablja se za izolacijo srednje in manj polarnih organskih analitov iz vodnih vzorcev. Je relativno neselektivna ekstrakcija zaradi vezave širokega spektra nepolarnih spojin. Ionsko izmenjevalno SPE uporabljamo za ekstrakcijo analitov z nabojem iz vodnih ali organskih vzorcev z nizko ionsko močjo. Poznamo kationske (sulfonska ali karboksilna skupina) in anionske (različne amino skupine) sorbente, ki vežejo analite z nasprotnim nabojem (16).



**Slika 9:** Shema sistema za SPE, povzeto po (16).

Sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu za pripravo okoljskih vzorcev je prikazan na sliki 9. Sestavljen je iz vsebnika s preiskovanim vzorcem, kadičke s kolonami, ki vsebujejo sorbent SPE, posode, kamor odteka odpadni vzorec, ter vodne črpalke. Vsi našteti elementi so med sabo povezani s teflonsko cevjo. S pomočjo črpalke, ki ustvarja podtlak v kadički,

črpamo vzorec skozi polnilo SPE s hitrostjo, ki jo nadzorujemo z regulatorjem pretoka. SPE poteka v naslednjih korakih: aktivacija, nanos vzorca, spiranje, sušenje in elucija (slika 10).



**Slika 10:** Shema stopenj SPE, povzeto po (17).

V prvi stopnji izvedemo aktivacijo kolone, kjer kolono pred nanosom vzorca omočimo z metanolom, izopropanolom ali katerim drugim srednje polarnim organskim topilom. V tej stopnji odstranimo zrak iz kolone in aktiviramo funkcionalne skupine sorbenta tako, da se poveča površina za interakcije z analiti. Preostalo aktivacijsko topilo iz kolone odstranimo s topilom, ki ima podobno sestavo vzorec. Aktivaciji sledi takojšen nanos vzorca, saj se stacionarna faza praviloma ne sme posušiti, v nasprotnem primeru lahko pride do deaktivacije sorbenta, kar vpliva na sposobnost vezave analitov. Vzorec nanašamo skozi kolono s hitrostjo, ki zagotavlja zadostno vzpostavitev interakcij med stacionarno fazo in analitom. Nanosu vzorca sledi spiranje nevezanih in šibkeje vezanih nečistot/sestavin vzorca (16). Pred elucijo sorbente posušimo v vakuumu. S tem odstranimo še preostali vzorec in topilo za spiranje iz sorbenta. To daje bolj koncentriran končni ekstrakt s konstantno prostornino in sestavo ter zagotavlja boljšo ponovljivost in večji izkoristek. Sušenje je še posebej pomembno pri uporabi elucijskih topil, ki se ne mešajo z vodo (etilacetat, heksan, diklorometan ...). V nasprotnem primeru bi preostala voda na sorbentu preprečila pravilno elucijo, kar bi se kazalo v slabši ponovljivosti (18). Zadnja stopnja je elucija, ki prekine vezi med analitom in stacionarno fazo. Pomembna je izbira ustreznega

topila in določitev volumna topila za elucijo. Le-ta mora biti dovolj velik, da kvantitativno sprosti vezan analit, in obenem čim manjši, da se izboljša meja zaznavnosti in občutljivost analizne metode (12).

### 1.3.2 Instrumentalna analiza

#### 1.3.2.1 Plinska kromatografija

Plinska kromatografija je ena izmed najbolj razširjenih metod za kvalitativno in kvantitativno analizo spojin. Ločevanje temelji na porazdeljevanju molekule med mobilno in stacionarno fazo. Pred kromatografskim ločevanjem se vzorec upari in injicira na kromatografsko kolono, kjer je stacionarna faza. Elucija poteka s tokom inertne plinske mobilne faze in se kontrolira s temperaturnim programom segrevanja in pretokom nosilnega plina. Mobilna faza ne sme reagirati z molekulami analita.

Glede na stacionarno fazo delimo plinsko kromatografijo na plinsko-tekočinsko kromatografijo (GLC) in plinsko-trdno kromatografijo (GSC). GLC se uporablja na vseh področjih znanosti, zato se njeno ime pogosto skrajša kar na plinska kromatografija (GC). Temelji na porazdeljevanju analita med mobilno plinsko fazo in tekočo fazo, ki je imobilizirana na površini inertnega trdnega nosilca. GSC vsebuje trdno stacionarno fazo, kjer pride do zadržanja analitov zaradi adsorpcije. Uporaba je omejena, ker zaradi nelinearnosti adsorpcijskega procesa nastanejo repi pri kromatografskih vrhovih (19).

Komponente plinskega kromatografa so nosilni plin, injektor, kolona in detektor. Nosilni plin mora biti kemično inerten. Najpogosteje so ti plini dušik, helij, argon in ogljikov dioksid (20). V injektorju se vzorec upari, preden nadaljuje pot skozi kromatografsko kolono (19). Poznamo 2 tipa kolon: kapilarne in polnjene kolone. Polnjene kolone vsebujejo inerten, trden nosilni material, ki je prevlečen s tekočo stacionarno fazo. Polnjene kolone so zamenjale kapilarne, ki so tanjše, premer znaša le nekaj desetin milimetra. Kapilarne kolone so bolj učinkovite kot polnjene. Pri polnjenih kolonah mora biti volumen vzorca, ki ga injiciramo, od 0,1 do 20  $\mu\text{L}$ , medtem ko pri kapilarnih kolonah injiciramo le okoli 1  $\mu\text{L}$  vzorca. Pri kapilarnih kolonah se uporabljata injiciranji »split« in »splitless« (20). Pri injiciranju »split« se vzorec razdeli na dva dela in le del vzorca nadaljuje pot v kromatografsko kolono, nanos »splitless« pa pomeni, da vzorec po odparitvi topila v celoti nadaljuje pot v kromatografsko kolono (16). Slednji je primeren, kadar je vzorec količinsko omejen ali za vzorce z nizko koncentracijo analitov (21). Idealni

detektor mora imeti primerno občutljivost, stabilnost in ponovljivost. Pomembno je tudi, da ne povzroči razpada vzorca ter da ima podoben odziv na vse analite ali pa selektiven odziv na eno vrsto analitov. Najpogosteje uporabljeni detektorji so plamensko ionizacijski detektor (FID), toplotno prevodni detektor (TCD) in detektor na zajetje elektronov (ECD) (19). Plinski kromatograf je lahko sklopljen z masnim spektrometrom (GC-MSD), ki omogoča tudi identifikacijo spojin, katere predhodno ločimo s plinsko kromatografijo. Z GC-MSD lahko med seboj ločimo tudi strukturno zelo podobne spojine v sledovih (16).

GC-MSD je metoda, ki loči ione v plinski fazi glede na maso in naboj iona ( $m/z$ ). Z dovajanjem energije molekulam vzorca, ki so v plinastem stanju, dobimo ionizirano spojino. Za ionizacijo organskih molekul uporabljamo energijo elektronov 70 eV. Molekuli dovedemo energijo na ta način, da trči z elektronom. Če je prenesena energija dovolj velika, se po elektronskem vzbujanju en elektron oddalji iz molekulske orbitale in dobimo radikalski kation, ki ga v masni spektrometriji imenujemo molekulski ion in ga označimo z  $M^{+}$  ali  $M^+$ . Pri masni spektrometriji izmerimo intenziteto ionov in določimo položaj na masni skali. Takšen zapis imenujemo masni spekter, ki nam posreduje masno število posamezne ionske zvrsti in intenziteto delnega curka posamezne ionske zvrsti. Vsak spekter je karakterističen za posamezno spojino (16).

V sistemu GC-MSD z enojnim kvadrupolom lahko detekcija mas ločenih ionov poteka na dva načina: »SIM« in »SCAN«. Pri načinu »SIM« merimo intenziteto izbranih ionov znanih analitov, medtem ko pri načinu »SCAN« snemamo celotno masno območje. Pri slednjem potrebujemo višje koncentracije spojin, vendar ta način omogoča identifikacijo še nepoznanih spojin na podlagi celotne fragmentacije spojine pri določenem retencijskem času (16). Način »SIM« je primarno namenjen določanju koncentracije analitov v vzorcu.

### • Derivatizacija

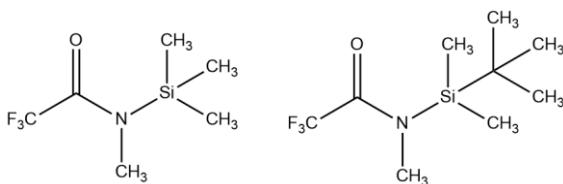
Spojin, ki so nehlapne in termično nestabilne, ne moremo neposredno analizirati z GC-MSD, zato jih predhodno derivatiziramo. Z derivatizacijo pretvorimo polarne reaktivne spojine v nepolarne in inertne derive, ki pri nižjih temperaturah in brez razpadanja preidejo v plinasto stanje (16).

Poznamo več vrst derivatizacije. Najbolj razširjene so alkiliranje, acetiliranje in sililiranje. Alkilirni reagenti zmanjšajo polarnost spojine s substitucijo labilnega vodika z alifatsko ali

alifatsko-aromatsko skupino (npr. benzil). Alkiliranje se najpogosteje uporablja za derivatizacijo spojin s kislim vodikom, kot so karboksilne kisline in fenoli, ki se pretvorijo v estre oziroma etre.

Pri reakciji acetiliranja se spojine z labilnim vodikom (alkoholi, merkaptani, amini) pretvorijo v estre, tioestre in amide. Prednost reakcije je, da poteče pri blagih pogojih. Pred injiciranjem v GC je potrebna dodatna stopnja čiščenja zaradi prisotnosti preostanka kisline (22). Kot acetilirni reagenti se uporabljajo anhidridi kislin, acil halidi in reaktivni acilni derivati (npr. acilimidazol in acilamid) (25).

Pri sililiranju pride do nukleofilne substitucije labilnega vodika iz kislin, alkoholov, tiolov, aminov, amidov, enolov, ketonov ali aldehydov s trimetilsililno skupino v prisotnosti dobro izstopajoče skupine. Reakcija mora potekati v odsotnosti vode, saj lahko že majhne količine vode privedejo do hidrolize nastalih derivatov. Stopnja čiščenja ni potrebna, zato lahko te derivate direktno injiciramo v GC. Za sililiranje najpogosteje uporabljamo trimetilklorosilan (TMCS), N-metil-N-(trimetilsilil)trifluoroacetamid (MSTFA), N-(tercbutil-dimetilsilil)-N-metilfluoroacetamid (MTBSTFA), N,O-bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamid (BSTFA) (22). Kemijski strukturi MSTFA in MTBSTFA sta prikazani na sliki 11.



**Slika 11:** Kemijski strukturi MSTFA (levo) (24) in MTBSTFA (desno) (25).

### 1.3.2.2 Tekočinska kromatografija

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC) temelji na porazdeljevanju med tekočo mobilno fazo in stacionarno fazo v koloni. Glede na mehanizem separacije HPLC poznamo adsorpcijsko, porazdelitveno, ionsko-izmenjevalno, izključitveno, afinitetno in kiralno kromatografijo. Zaradi visokih tlakov, ki so potrebni za doseganje zadovoljivih pretokov, je oprema precej bolj zapletena in dražja kot pri drugih vrstah kromatografije.

Komponente tekočinskega kromatografa so rezervoarji mobilne faze, razplinjevalec, črpalka, injektor, kolona in detektor. Vsak instrument HPLC ima enega ali več steklenih rezervoarjev za mobilno fazo. Razplinjevalec odstrani v mobilni fazi topne pline,

predhodno pa jo lahko prepihujemo z inertnim plinom, ki v mobilni fazi ni topen. Elucija je lahko izokratska, kjer uporabimo mobilno fazo s konstantno sestavo, in gradientna, kjer se sestava topila zvezno ali v korakih spreminja. Pri metodah HPLC se uporabljata dva tipa črpalk: brizgalna in recipročna črpalka. Največ se uporablja recipročna črpalka, katere prednosti so majhni notranji volumni (35 do 400  $\mu\text{L}$ ), doseganje visokih tlakov, hitra prilagoditev na gradientno elucijo in konstantni pretoki. Uporablajo se injektorji z zankami, ki omogočajo izbiro velikosti vzorca običajno od 1 do 100  $\mu\text{L}$ . Vzorec lahko injiciramo ročno ali pa z avtomatskim injektorjem. Dolžina analitske kolone je običajno od 5 do 25 cm, premer pa od 3 do 5 mm. Napolnjena je z delci stacionarne faze, katerih velikosti so največkrat 5  $\mu\text{m}$ . Z uporabo predkolone lahko podaljšamo življenjsko dobo analitske kolone, saj predkolona preprečuje, da nečistote dosežejo in kontaminirajo kolono. Stacionarna faza predkolone naj bi bila enaka kot v analitski koloni. Za boljšo ponovljivost meritve in kvaliteto ločbe je potrebna stalna kontrola temperature kolone. Najpogosteje uporabljeni detektorji so UV/VIS spektrofotometrični, fluorescenčni, elektrokemični (konduktometrični, amperometrični), masni detektor (19).

UV/VIS spektroskopija temelji na absorpciji ultravijolične in vidne svetlobe. Absorpcija je proces, kjer spojine selektivno sprejmejo točno določene frekvence elektromagnetnega sevanja. Ko atom, ion ali molekula absorbira fotone določenih valovnih dolžin, pridobi s tem njihovo energijo in preide iz osnovnega (stabilnega stanja z nižjo energijo) v vzbujeno stanje (nestabilno stanje z višjo energijo) (26). Odziv, ki je izmerjena absorbanca, je posledica absorpcije svetlobe in je premosorazmerna s koncentracijo analita v vzorcu (19).

## 2 NAMEN DELA

Zaradi naraščanja predpisovanja in porabe zdravil je čedalje bolj prisotno onesnaževanje okolja z zdravilnimi učinkovinami. Ostanki zdravil kontaminirajo vodno okolje, njihovo kroženje in učinek na organizme in ljudi pa še niso razjasnjeni. Med ostanke zdravil prištevamo zdravilne učinkovine, njihove metabolite in produkte transformacije. Slednji nastanejo med mikrobiološko in abiotsko (fotokemično) razgradnjo zdravilnih učinkovin/metabolitov v okolju ali med čiščenjem odpadnih vod.

Med antidepresivi so največkrat predpisana zdravila iz skupine SSRI, katerih pomembna pot razgradnje je ravno fotorazgradnja. Študije so pokazale, da je večina SSRI (FLU, CIT, FLX) odpornih na hidrolizo in fotorazgradnjo. Ker je najmanj študij objavljenih ravno glede usode in transformacije SER, bo namen magistrskega dela posnemati razgradnjo SER v vodnem okolju pod vplivom sončne svetlobe. Za ta namen bomo najprej optimizirali in razvili analizni metodi za merjenje koncentracije SER v vodi. Nižje izhodne koncentracije SER bomo analizirali z GC-MSD, višje pa s HPLC-UV. Za GC-MSD analizo bo potrebno dodatno optimizirati postopek koncentriranja vzorca s SPE (pH topila, kolona in topilo za elucijo). Ustreznost obeh analiznih metod bomo potrdili z vrednotenjem na standardnih raztopinah SER. Ovrednotili bomo linearnost, območje, točnost in ponovljivost metode ter ponovljivost injiciranja, mejo zaznavnosti in mejo določitve.

V nadaljevanju bomo izvajali študije direktne in indirektnе fotorazgradnje SER v vodi. UV-svetlubo bomo zagotovili s srednje tlačno živosrebrno svetilko. Pri indirektni fotorazgradnji želimo pogoje čim bolj približati pogojem, ki so v naravi, zato bomo določili vpliv natrijevega nitrata in različnih koncentracij 2-propanola na fotorazgradnjo SER. Cilj je določiti kinetiko fotorazgradnje SER pod različnimi pogoji in na osnovi ugotovljenih konstant fotorazgradnje narediti primerjavo med direktno in indirektno fotorazgradnjo ter med nižjimi ( $10 \mu\text{g/L}$ ) in višjimi ( $1 \text{ mg/L}$ ) izhodnimi koncentracijami SER.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Kemikalije

Reagenti in topila, ki smo jih pri delu uporabljali, so:

- 2-propanol: C<sub>3</sub>H<sub>7</sub>OH, Mr = 60,10 g/mol, 99,5 % (Sigma-Aldrich)
- acetanhidrid: C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>, Mr = 102,09 g/mol, min. 99 % (Sigma-Aldrich)
- acetonitril (FFA): CH<sub>3</sub>CN, Mr = 41,05 g/mol, min. 99,9 % (Sigma-Aldrich)
- acetonitril: CH<sub>3</sub>CN, Mr = 41,05 g/mol, min. 99,8 % (J. T. Baker)
- etilacetat: C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>, Mr = 88,11 g /mol, min. 99,6 % (J. T. Baker)
- metanol: CH<sub>3</sub>OH, Mr = 32,04 g/mol, min. 99,8 % (J. T. Baker)
- MSTFA: C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>F<sub>3</sub>NOSi, 97 % (Acros Organics)
- MTBSTFA: C<sub>9</sub>H<sub>18</sub>F<sub>3</sub>NOSi, Mr = 241,33 g/mol, 98 % (Acros Organics)
- natrijev nitrat: NaNO<sub>3</sub>, Mr = 84,99 g/mol, min. 99,0 % (Sigma-Aldrich)
- ortofosforna kislina (FFA): H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, Mr = 98,00 g/mol, 85 % (Merck)
- paroksetin maleat: C<sub>19</sub>H<sub>20</sub>FNO<sub>3</sub> · C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>O<sub>4</sub>, Mr = 445,44 g/mol, min. 98 % (Sigma-Aldrich)
- piridin: C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, Mr = 79,10 g/mol, min. 99,8 % (Sigma-Aldrich)
- sertralin hidroklorid: C<sub>17</sub>H<sub>17</sub>NCl<sub>2</sub> · HCl, Mr = 342,69 g/mol, min. 99,0 % (donacija farmacevtske industrije)
- sertralin-D<sub>3</sub> hidroklorid: C<sub>17</sub>D<sub>3</sub>H<sub>14</sub>NCl<sub>2</sub> · HCl, Mr = 345,69 g/mol, 100 µg/mL v metanolu (Sigma-Aldrich)
- ultra čista voda: upornost 18,2 MΩ cm (Inštitut Jožef Stefan)

##### 3.1.2 Pribor in aparature

Laboratorijski pribor, drugi materiali ter aparature, ki smo jih pri delu uporabljali, so:

- stekleni inventar: čaše, merilne bučke, merilni valji, steklene zbirne epruvete, viale, kapalka
- analitska tehnica, proizvajalec Mettler-Toledo (model AT201)
- Vortex, proizvajalec Domel d.o.o. (model Vibromix 10)
- Whatman® Panpeha™ pH indikator lističi, proizvajalec Sigma-Aldrich

- polavtomatske pipete (20–200 µL, 100–1000 µL, 1000–5000 µL) in nastavki, proizvajalec Gilson
- hladilnik in zamrzovalna omara, proizvajalec Gorenje
- injekcijska igla za derivatizacijo: 50 µL, proizvajalec Hamilton Company
- aparatura za prepihovanje z dušikom: Nitrogen Evaporator System, proizvajalec Glas-Col® in Mini-Vap Evaporator/Concentrator 6-Port, proizvajalec Supelco
- ostalo: spatula, aluminijasta folija, Parafilm M®, teflonske cevke

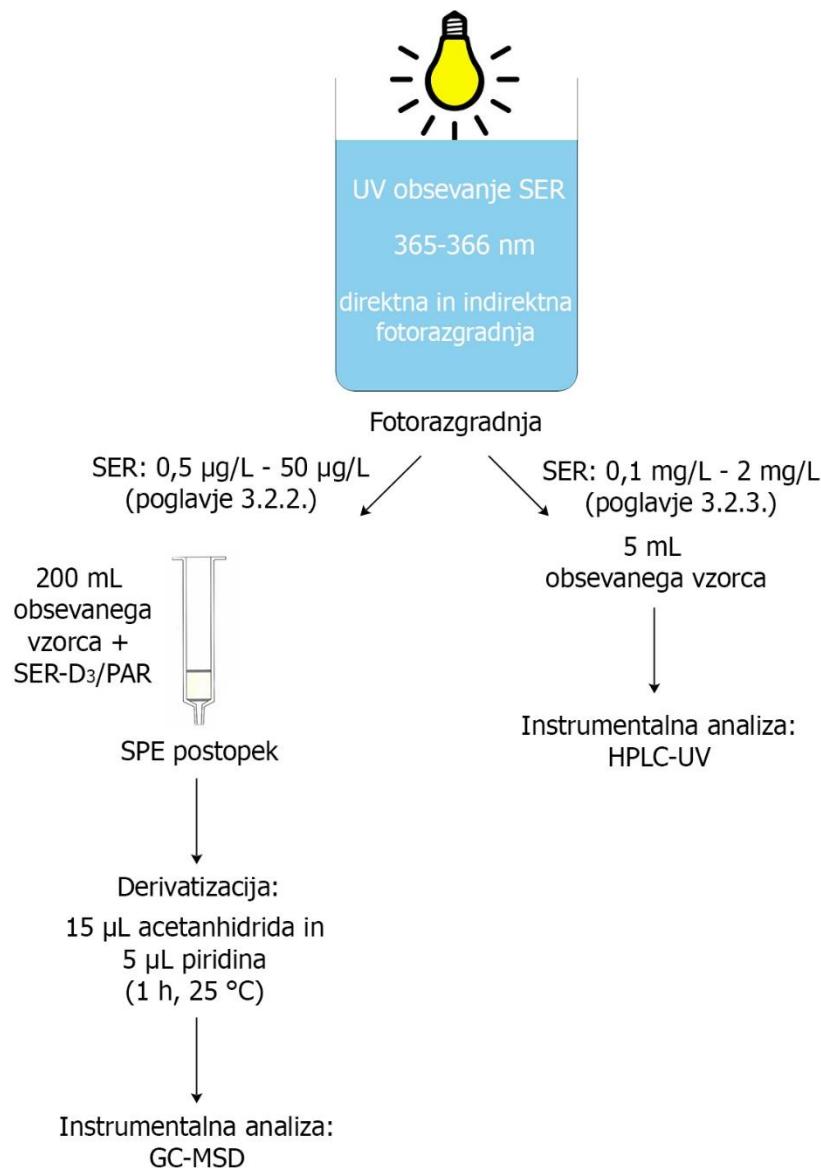
Pri ekstrakciji smo uporabljali nosilce Oasis® HLB 3 mL/60 mg proizvajalca Waters Corporation in Strata-X-CW 3 mL/60 mg proizvajalca Phenomenex, kadičko Vacuum Manifold Processing Station proizvajalca Agilent Technologies ter vakuumsko črpalko proizvajalca Millipore (220 V/50 Hz).

Pri UV-obsevanju smo uporabljali srednje tlačno živosrebrno svetilko proizvajalca Photochemical Reactors Ltd. (125 W, model 3010), UV-reaktor z dvojno steno iz kremenovega stekla, standardno reakcijsko bučko ter magnetno mešalo proizvajalca Domel, d. o. o. (model Rotamix SHP-10).

Vzorce smo analizirali z GC-MSD proizvajalca Hewlett-Packard (model HP 6890), kjer smo uporabili kolono DB-5MS proizvajalca Agilent Technologies in HPLC-UV proizvajalca Agilent Technologies (model Agilent 1100/1200 Series), kjer smo uporabili kolono Gemini C<sub>18</sub> proizvajalca Phenomenex.

### 3.2 METODE DELA

Analizna postopka za merjenje fotorazgradnje SER v vodi sta shematsko prikazana na sliki 12, podrobneje pa v nadaljnjih poglavjih.



**Slika 12:** Shematski prikaz analiznega postopka za merjenje fotorazgradnje SER v vodi.

#### 3.2.1 Priprava raztopin

##### 3.2.1.1 Priprava raztopine standarda SER

V 10-mililitrsko bučko smo natančno natehtali približno 1 mg SER (1,12 mg sertralin hidroklorida, kar ustreza 1 mg SER) in dopolnili do oznake z acetonitrilom. Tako smo

pripravili raztopino standarda s koncentracijo 100 µg/mL. Le-to smo ustrezeno redčili z acetonitrilom do koncentracij 10 µg/mL in 1 µg/mL.

### 3.2.1.2 Priprava raztopine internih standardov

Prvi interni standard (IS) je bila metanolna raztopina sertralin-D<sub>3</sub> (SER-D<sub>3</sub>) s koncentracijo 100 µg/mL. Raztopino smo 10-krat redčili z metanolom do koncentracije 10 µg/mL.

Za pripravo drugega IS smo v 10-mililitrsko bučko natančno natehtali približno 1 mg PAR (1,35 mg paroksetin maleata, kar ustreza 1 mg PAR) in dopolnili do oznake z acetonitrilom. Tako smo pripravili raztopino IS s koncentracijo 100 µg/mL. Le-to smo ustrezeno redčili z acetonitrilom do koncentracije 10 µg/mL.

### 3.2.1.3 Priprava raztopine natrijevega nitrata

V 200-mililitrsko merilno bučko smo natehtali 77 g NaNO<sub>3</sub> in dopolnili do oznake z ultra čisto vodo. Dobili smo raztopino s koncentracijo 4,54 mol/L.

### 3.2.1.4 Priprava raztopine 2-propanola

2-propanol z deklarirano koncentracijo 13,1 mol/L smo ustrezeno redčili do koncentracij 1,31 mol/L in 0,0131 mol/L z ultra čisto vodo.

### 3.2.1.5 Priprava raztopin s pH 10 in pH 12

Raztopini s pH 10 in 12 smo pripravili tako, da smo najprej natehtali 0,61 g NaOH in ga raztoplili v 50 mL ultra čiste vode. Dobili smo raztopino NaOH s koncentracijo 0,305 mol/L, ki smo jo nato po kapljicah dodajali v 500 mL ultra čiste vode, dokler nismo prišli do želene vrednosti pH. Vrednost pH smo preverjali s pH-lističi.

## 3.2.2 Postopek priprave vzorca za merjenje koncentracij SER v vodi z GC-MSD

### 3.2.2.1 Fotorazgradnja

Aparatura za obsevanje (slika 13) je bila sestavljena iz vsebnika z UV-žarnico z dvojno steno (za vodno hlajenje) iz kremenovega stekla, standardne reakcijske bučke, živosrebrne svetilke za obsevanje ter magnetnega mešala.



**Slika 13:** Aparatura za UV-obsevanje.

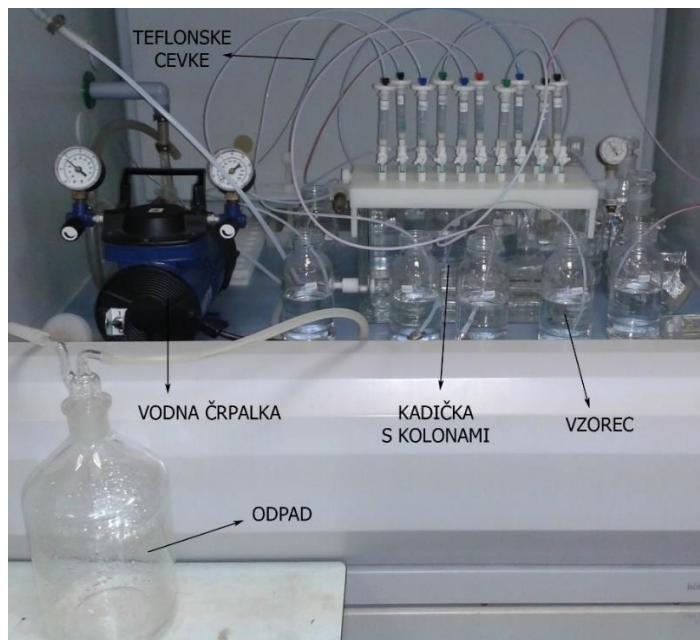
Uporabili smo srednje tlačno svetilko z močjo 125 W. Vsaj 15 minut pred začetkom obsevanja smo prižgali svetilko, saj potrebuje nekaj časa, da se segreje in začne emitirati svetlobo s polno močjo. V reakcijsko bučko smo nato nalili 760 mL ultra čiste vode ter dodali standardno raztopino SER, tako da je bila končna koncentracija 10 µg/L, raztopino natrijevega nitrata, da je bila končna koncentracija 1 mmol/L, in raztopino 2-propanola z različnimi končnimi koncentracijami (0,03 mmol/L, 0,003 mmol/L, 0,0003 mmol/L). V preglednici I so prikazani uporabljeni volumni in začetne koncentracije SER, NaNO<sub>3</sub> in 2-propanola (poglavlje 3.2.1.4) ter časi obsevanj pri posameznih raztopinah. Celoten sistem smo zavili v aluminijasto folijo zaradi nevarnosti UV-sevanja za oči in roke ter ga postavili na magnetno mešalo, kjer smo pustili, da se dobro premeša (približno 10 minut). Nato smo vzorce obsevali. Po obsevanju smo raztopino prelili v 200-mililitrske steklenice in jih shranili v hladilnik do analize (največ 1 dan).

**Preglednica I:** Priprava raztopin za UV-obsevanje pri uporabi metode GC-MSD.

Raztopina za obsevanje	Dodatek SER	Dodatek NaNO <sub>3</sub>	Dodatek 2-propanola	Časi obsevanja [min]
<b>10 µg/L SER</b>	76 µL 100 µg/mL	/	/	0, 30, 60, 120, 300
<b>10 µg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub></b>	76 µL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	/	0, 30, 45, 60
<b>10 µg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub> + 0,0003 mmol/L 2-propanola</b>	76 µL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	20 µL 0,0131 mol/L	0, 30, 45, 60, 90, 120
<b>10 µg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub> + 0,003 mmol/L 2-propanola</b>	76 µL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	200 µL 0,0131 mol/L	0, 30, 45, 60, 90
<b>10 µg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub> + 0,03 mmol/L 2-propanola</b>	76 µL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	20 µL 1,31 mol/L	0, 30, 45, 60, 90, 120

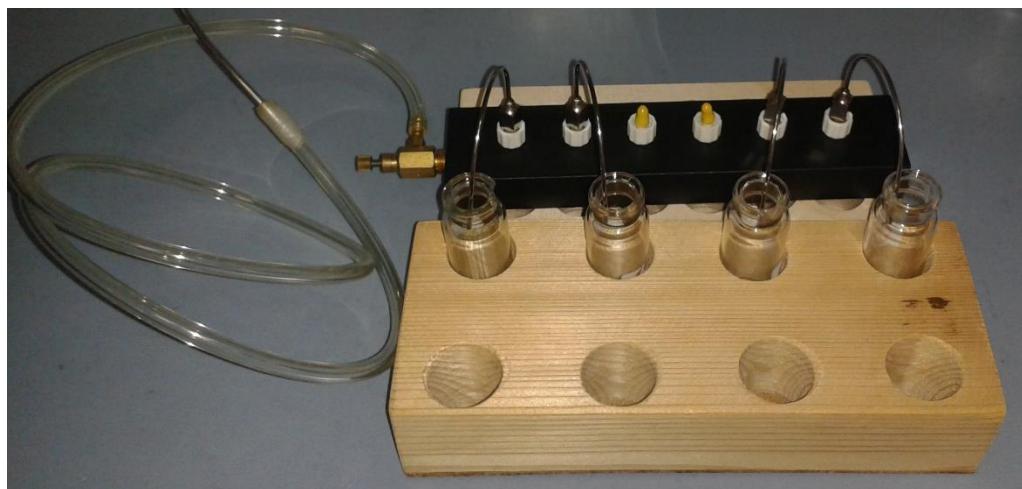
### 3.2.2.2 SPE

Aparatura za SPE (slika 14) je bila sestavljena iz kadičke s kolonami, vakuumske črpalke, teflonskih cevk, vsebnikov z obsevanimi vzorci in steklenice za odpad.



**Slika 14:** Aparatura za SPE.

Vzorcem po obsevanju smo pred ekstrakcijo dodali 100 µL IS SER-D<sub>3</sub> s koncentracijo 10 µg/mL. Vse eksperimente smo delali v 2 ponovitvah. Najprej smo izvedli aktivacijo kolon HLB z metanolom (napolnili smo kolono do vrha, približno 3 mL). Nato smo odstranili aktivacijsko topilo z ultra čisto vodo (približno 3 mL). Sledil je nanos vzorcev s pomočjo vodne črpalke. Hitrost kapljanja je bila 1–2 mL na minuto, tako da smo za 200 mL vzorca porabili približno 90–120 minut. Po nanosu smo z 2 mL ultra čiste vode sprali šibkeje vezane nečistote. Nato smo sistem priklopili na vakuum za 30 minut, s čimer smo posušili sorbent oziroma odstranili rezidualno vodo. Sledila je elucija z metanolom, trikrat po 1 mL. Zatem smo vzorce sušili v toku dušika do volumna približno 0,5 mL (slika 15) in jih kvantitativno prenesli iz steklenih zbirnih epruvet v steklene viale.



Slika 15: Sušenje ekstraktov z dušikom.

### 3.2.2.3 Derivatizacija

Ekstrakte vzorcev smo v steklenih vialah posušili z dušikom do suhega. Dodali smo derivatizacijsko sredstvo acetanhidrid (15 µL) in katalizator piridin (5 µL). Derivatizacija je potekala eno uro pri sobni temperaturi. Nato smo vzorce zopet posušili do suhega z dušikom in jih raztopili v 500 µL etilacetata.

### 3.2.2.4 Analiza z GC-MSD

Derivatizirane vzorce smo analizirali z GC-MSD. Pogoji meritev so bili:

- *temperatura injektorja: 270 °C*
- *nosilni plin: helij*
- *pretok nosilnega plina: 1 mL/min*

- *način injiciranja:* »splitless«
- *kolona:* DB-5MS (30 m × 0,25 mm; debelina filma 0,25 µm)
- *temperaturni program:* 100 °C do 2 min, 20 °C/min do 300 °C (do 12 min), 300 °C do 18 min
- *način snemanja za identifikacijo – »full scan« oziroma snemanje čez celotno območje:* 50–550 m/z
- *način snemanja za kvantifikacijo – »SIM« oziroma snemanje izbranih ionov:* SER-Ac:  $m/z = 347$  in  $349$ ; SER-D<sub>3</sub>-Ac:  $m/z = 350$  in  $352$ ; PAR-Ac:  $m/z = 234$  in  $371$
- *retencijski časi:* SER-Ac in SER-D<sub>3</sub>-Ac 14,2 min in PAR-Ac 15,6 min
- *čas analize:* 18 min

### 3.2.3 Postopek priprave vzorca za merjenje koncentracij SER v vodi s HPLC-UV

#### 3.2.3.1 Fotorazgradnja

UV-obsevanje vzorcev za analizo HPLC-UV je potekalo na enak način kot obsevanje za analizo GC-MS. V reakcijsko bučko smo nalili 760 mL ultra čiste vode ter dodali standardno raztopino SER višje koncentracije (1 mg/L) in iste koncentracije natrijevega nitrata in 2-propanola kot pri GC-MSD. V preglednici II so prikazani uporabljeni volumni in začetne koncentracije SER, NaNO<sub>3</sub> in 2-propanola ter časi obsevanj posameznih raztopin. Celoten sistem smo zavili v aluminijasto folijo in ga postavili na magnetno mešalo, kjer smo pustili, da se dobro premeša (približno 10 minut). Nato smo pričeli z obsevanjem. Ob vnaprej definiranih časih obsevanja smo vzorčili po 5 mL raztopine in jih shranili v plastične viale ter zamrznili na -20 °C do analize.

**Preglednica II:** Priprava raztopin za UV-obsevanje pri uporabi metode HPLC-UV.

Raztopina za obsevanje	Dodatek SER	Dodatek NaNO <sub>3</sub>	Dodatek 2-propanola	Časi obsevanja [min]
<b>1 mg/L SER</b>	7,6 mL 100 µg/mL	/	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 420, 480
<b>1 mg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub></b>	7,6 mL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	/	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180
<b>1 mg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub> + 0,0003 mmol/L 2-propanola</b>	7,6 mL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	20 µL 0,0131 mol/L	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180
<b>1 mg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub> + 0,003 mmol/L 2-propanola</b>	7,6 mL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	200 µL 0,0131 mol/L	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300
<b>1 mg/L SER + 1 mmol/L NaNO<sub>3</sub> + 0,03 mmol/L 2-propanola</b>	7,6 mL 100 µg/mL	167 µL 4,54 mol/L	20 µL 1,31 mol/L	0, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300

### 3.2.3.2 Analiza s HPLC-UV

Zamrznjene vzorce smo odtalili na sobno temperaturo in jih analizirali s tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti z UV-detekcijo. Pogoji meritev so bili:

- *kolona:* Gemini C<sub>18</sub> (100 mm × 4,6 mm; velikost delcev 3 µm)
- *temperatura kolone:* 40 °C
- *mobilna faza:* 0,1 % fosforne kisline + acetonitril
- *elucija:* izokratska (68 % 0,1 % fosforne kisline in 32 % acetonitril)
- *pretok mobilne faze:* 1 mL/min
- *volumen injiciranja:* 50 µL
- *valovna dolžina UV detekcije:* 210 nm
- *retencijski čas SER:* 3,75 min
- *čas analize:* 5 min

### 3.2.4 Vrednotenje analizne metode za merjenje koncentracije SER v vodi

#### 3.2.4.1 GC-MSD

##### 3.2.4.1.1 Linearnost metode ter meja zaznavnosti in določitve

Za izračun umeritvene krivulje, meje zaznavnosti in določitve ter vrednotenja linearnosti metode smo pripravili raztopine s šestimi različnimi končnimi koncentracijami SER. V 200

mL ultra čiste vode smo dali standardno raztopino SER, da smo dobili končne koncentracije SER 0,5 µg/L, 1 µg/L, 5 µg/L, 10 µg/L, 30 µg/L in 50 µg/L. Dodali smo še interna standarda PAR (končna koncentracija je bila 10 µg/L) in SER-D<sub>3</sub> (končna koncentracija je bila 5 µg/L). V preglednici III so prikazani uporabljeni volumni in začetne koncentracije SER, PAR in SER-D<sub>3</sub> pri pripravi raztopin. Pri vsaki koncentraciji posebej smo pripravili dva vzorca. Sledili sta ekstrakcija in derivatizacija, ki sta opisani v poglavju 3.2.2. Vsak vzorec smo injicirali enkrat.

#### *3.2.4.1.2 Ponovljivost priprave vzorca in ponovljivost injiciranja*

Za ugotavljanje ponovljivosti priprave vzorca smo izhajali iz raztopine s končno koncentracijo SER 10 µg/L (preglednica III), ki smo jo pripravili v 5 ponovitvah. V 200 mL ultra čiste vode smo po postopku 3.2.4.1.1 dali ustrezni volumen raztopin SER, SER-D<sub>3</sub> in PAR. Sledili sta ekstrakcija in derivatizacija po postopkih, opisanih v poglavju 3.2.2. Za ugotavljanje ponovljivosti metode smo injicirali vsak vzorec enkrat, za ugotavljanje ponovljivosti injiciranja pa smo posamezen vzorec injicirali trikrat.

**Preglednica III:** Priprava raztopin za vrednotenje analizne metode (GC-MS).

Končna koncentracija SER	Dodatek SER	Dodatek PAR	Dodatek SER-D <sub>3</sub>
<b>0,5 µg/L</b>	90 µL 1 µg/mL	20 µL 100 µg/mL	100 µL 10 µg/mL
<b>1 µg/L</b>	180 µL 1 µg/mL	20 µL 100 µg/mL	100 µL 10 µg/mL
<b>5 µg/L</b>	900 µL 1 µg/mL	20 µL 100 µg/mL	100 µL 10 µg/mL
<b>10 µg/L</b>	18 µL 100 µg/mL	20 µL 100 µg/mL	100 µL 10 µg/mL
<b>30 µg/L</b>	54 µL 100 µg/mL	20 µL 100 µg/mL	100 µL 10 µg/mL
<b>50 µg/L</b>	90 µL 100 µg/mL	20 µL 100 µg/mL	100 µL 10 µg/mL

#### 3.2.4.2 HPLC-UV

##### *3.2.4.2.1 Linearnost metode ter meja zaznavnosti in določitve*

Za izračun umeritvene krivulje, meje zaznavnosti in določitve ter vrednotenja linearnosti metode smo pripravili raztopine s šestimi različnimi končnimi koncentracijami SER. V plastične viale smo odpipetirali 5 mL ultra čiste vode in dodali ustrezne standardne raztopine SER, da so bile končne koncentracije med 0,1 mg/L in 2 mg/L. V preglednici IV

so prikazani uporabljeni volumni in začetne koncentracije SER pri pripravi raztopin. Vsako raztopino smo pripravili v dveh paralelah in jih shranili v zamrzovalnik na  $-20^{\circ}\text{C}$  do analize.

### 3.2.4.2.2 Ponovljivost postopka in injiciranja

Za ugotavljanje ponovljivosti smo izhajali iz raztopine s končno koncentracijo SER 1 mg/L, ki smo jo pripravili v 5 ponovitvah. V plastične viale smo odpipetirali 5 mL ultra čiste vode in dodali standardno raztopino SER s končno koncentracijo 1 mg/L. V preglednici IV so prikazani uporabljeni volumni in začetne koncentracije SER pri pripravi raztopin. Vzorce smo zamrznili do analize. Za ponovljivost metode smo injicirali vsak vzorec enkrat, za ponovljivost injiciranja pa smo posamezen vzorec injicirali trikrat.

**Preglednica IV:** Priprava raztopin za vrednotenje analizne metode (HPLC-UV).

Končna koncentracija SER	Dodatek SER
<b>0,1 mg/L</b>	60 $\mu\text{L}$ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>0,25 mg/L</b>	140 $\mu\text{L}$ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>0,5 mg/L</b>	27 $\mu\text{L}$ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>0,75 mg/L</b>	41 $\mu\text{L}$ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>1 mg/L</b>	55 $\mu\text{L}$ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$
<b>2 mg/L</b>	110 $\mu\text{L}$ 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$

## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

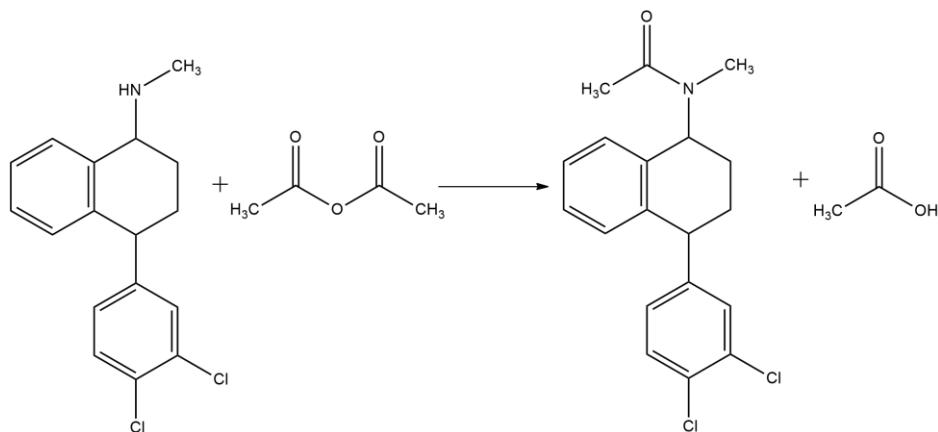
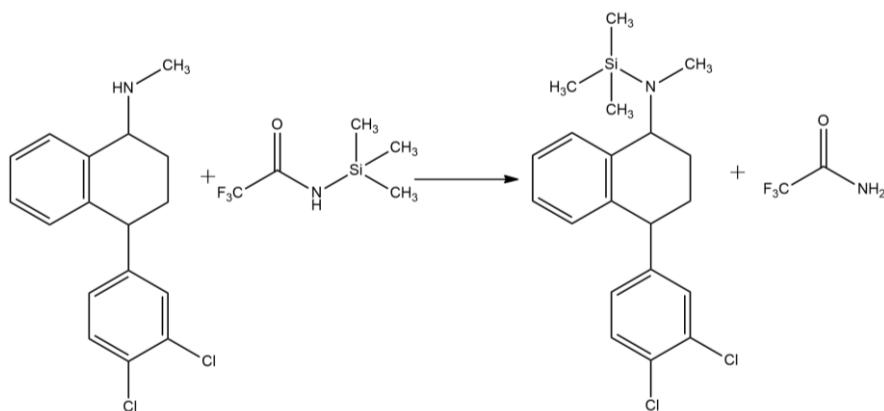
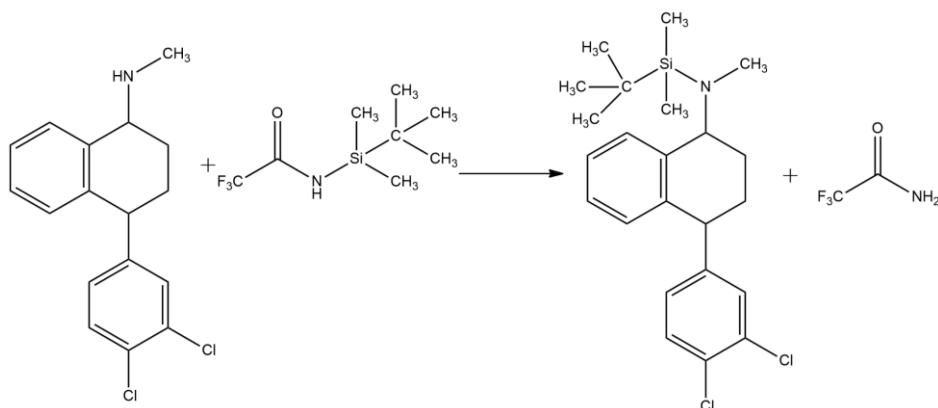
Namen našega magistrskega dela je bil proučevati fotorazgradnjo SER, ker le-ta v literaturi še ni bila opisana. Zato je bilo treba najprej razviti metodo za merjenje koncentracij SER, jo ovrednotiti in nato uporabiti pri študiju fotorazgradnje SER. Iz praktičnih razlogov smo za merjenje SER v vodi uporabili dve metodi, GC-MSD za nizke in HPLC-UV za visoke izhodne koncentracije SER v vzorcih.

### 4.1 OPTIMIZACIJA POSTOPKA ZA ANALIZO Z GC-MSD

Z GC-MSD smo spremljali fotorazgradnjo SER pri nižjih koncentracijah ( $10 \mu\text{g/L}$ ), kar je zahtevalo tudi koncentriranje vzorcev s SPE. Najprej smo določili nastavitev analize GC-MSD vključno s pogoji derivatizacije, kasneje pa smo razvili še postopek priprave vzorca za SPE.

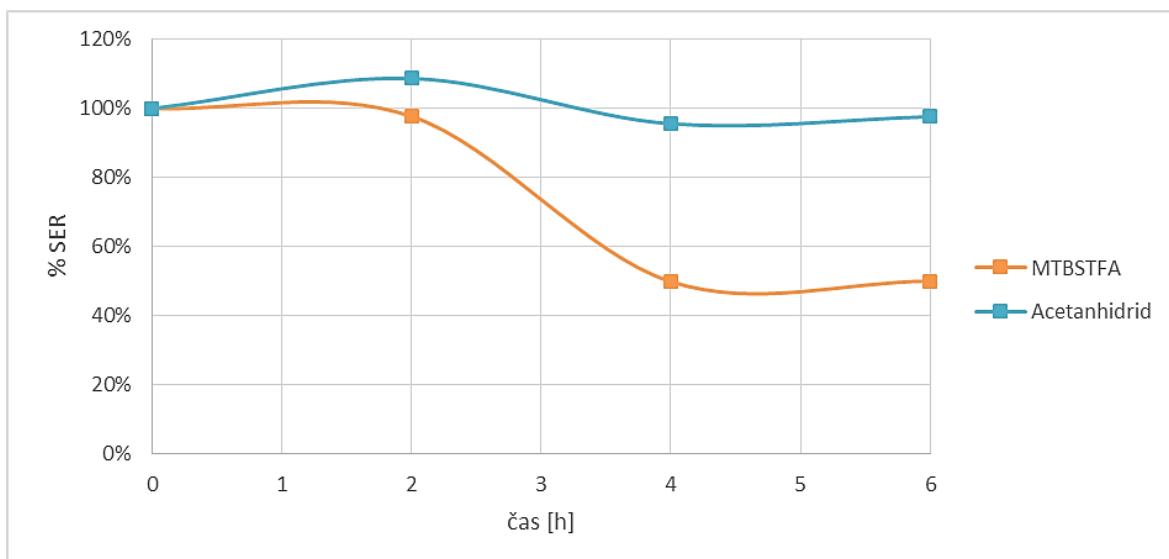
#### Optimizacija postopka derivatizacije sertralina

Derivatizacija je pomemben korak pri pripravi vzorca za analizo, saj z njo spremenimo nehlapne spojine v hlapne. Pri optimizaciji derivatizacije smo uporabili 3 pogoste derivatizacijske reagente: acetanhidrid, MTBSTFA in MSTFA. Eksperiment smo izvedli v steklenih vialah, kamor smo dali skupaj  $50 \mu\text{L}$  standardne raztopine SER in  $50 \mu\text{L}$  standardne raztopine PAR (interni standard), oboje z začetno koncentracijo  $100 \mu\text{g/mL}$ . Te smo posušili z dušikom do suhega in jim nato dodali derivatizacijsko sredstvo. Iz predhodnih izkušenj, ki so se izkazale za optimalne, smo pri acetiliranju uporabili  $15 \mu\text{L}$  acetanhidrida in  $5 \mu\text{L}$  katalizatorja piridina, pri sililiranju pa  $30 \mu\text{L}$  MTBSTFA oz. MSTFA in  $470 \mu\text{L}$  topila etilacetata. Pri acetiliranju smo vzorce še enkrat posušili do suhega, da smo odstranili ocetno kislino in jih nato raztopili v  $500 \mu\text{L}$  etilacetata zaradi poenotenja končnih volumnov vzorca in posledično enakih koncentracij SER v vseh derivatizacijskih raztopinah. Reakcije derivatizacije SER so prikazane na spodnjih slikah (slike 16–18).

**Slika 16:** Acetiliranje SER.**Slika 17:** Sililiranje SER z MSTFA.**Slika 18:** Sililiranje SER z MTBOSTFA.

Najprej smo izvedli derivatizacijo z vsemi tremi reagenti pri 80 °C, ki je trajala eno uro. Na osnovi teh rezultatov smo MSTFA izločili, saj je bila učinkovitost derivatizacije zelo nizka. Ker je stabilnost dobljenih derivatov zelo pomembna, smo v nadaljevanju naredili primerjavo stabilnosti SER z derivatizacijskima reagentoma MTBOSTFA in

acetanhidridom. Derivat z MTBSTFA se je izkazal kot zelo nestabilen, saj je razpadel na polovico že po štirih urah, kar pa ni primerno, če želimo vzorce shraniti in analizirati naslednji dan. Zaradi tega smo kot sredstvo za derivatizacijo izbrali acetanhidrid, kjer bistvenega razpada derivatizacijskega kompleksa po šestih urah ni bilo zaznati (slika 19).



**Slika 19:** Primerjava stabilnosti derivatov SER z MTBSFA in acetanhidridom pri 100 °C.

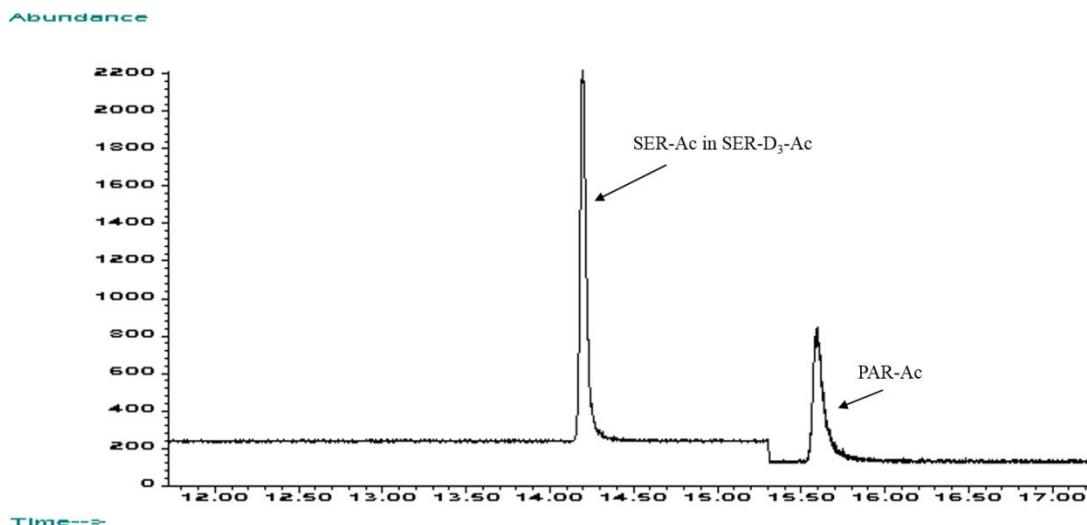
Da bi določili optimalno temperaturo derivatizacije, smo za 1 uro testirali reakcijo z acetanhidridom pri 25 °C, 45 °C in 60 °C. Derivatizacija je potekla v enaki meri pri vseh temperaturah, saj so bili odzivi SER-Ac primerljivi (preglednica V). Zato smo se odločili za temperaturo 25 °C, ker je izvedba derivatizacije najenostavnejša.

**Preglednica V** Odzivi SER pri različnih temperaturah acetiliranja.

	25 °C	45 °C	60 °C
Odziv SER-AC	8489	8156	6975

#### 4.1.1 Analiza z GC-MSD

Meritev na plinskem kromatografu z masnim detektorjem pri izbranih nastavitevah je trajala 18 minut. Retencijski čas derivatiziranega SER (SER-Ac) in derivatiziranega SER-D<sub>3</sub> (SER-D<sub>3</sub>-Ac) je bil 14,2 minut, derivatiziranega PAR (PAR-Ac) pa 15,6 minut. Primer celotnega ionskega kromatograma (TIC) je prikazan na sliki 20.

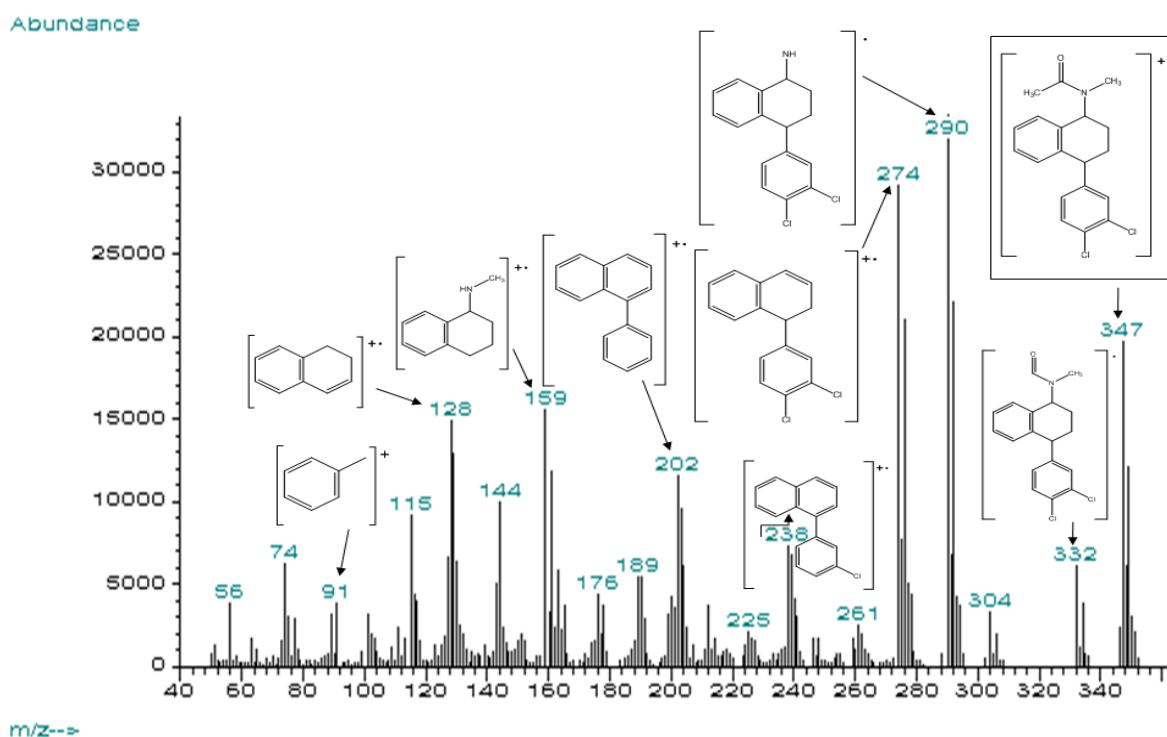


**Slika 20:** Celotni ionski kromatogram SER-Ac, SER-D<sub>3</sub>-Ac in PAR-Ac.

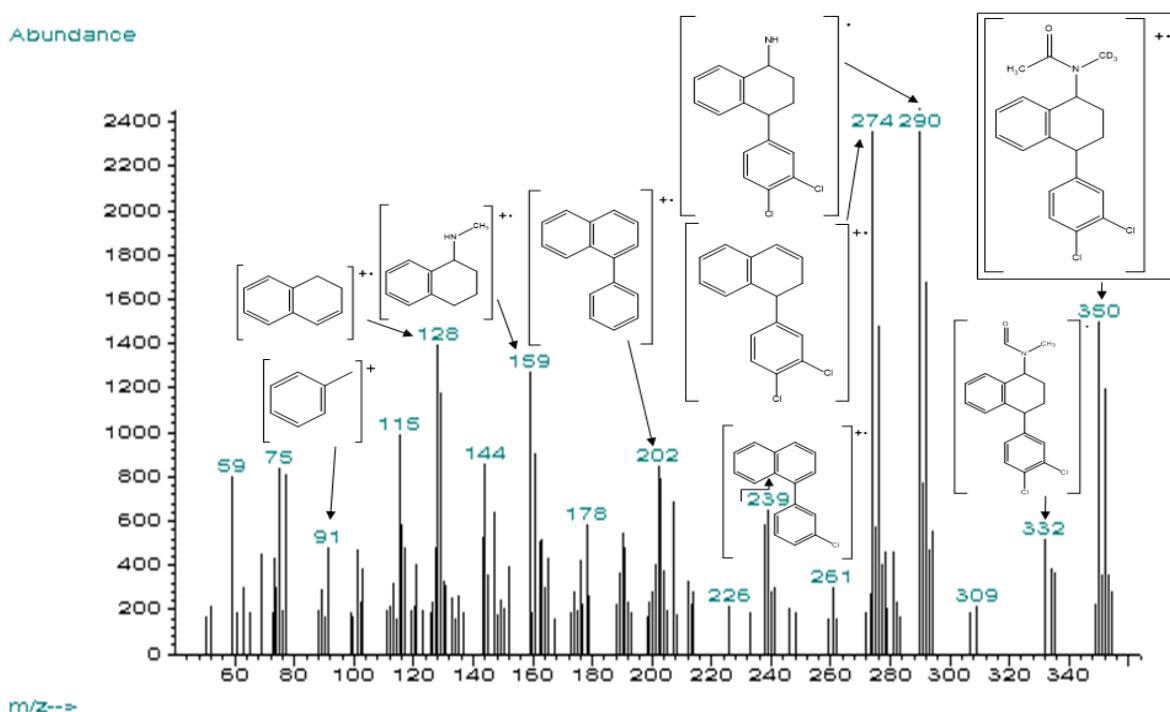
Pri GC-MSD je uporaba internega standarda (IS) izrednega pomena. IS se uporablja z namenom izboljšanja natančnosti kvantitativne analize. Strukturno mora biti podoben analitu, ampak signal, ki ga dobimo (masni fragment), se mora razlikovati od analitovega. Uporablja se tudi za korekcijo variabilnosti zaradi izgub analita med shranjevanjem in pripravo vzorca, saj vsak dejavnik, ki bi lahko vplival na analitske signale, v enaki meri vpliva tudi na signale IS (27). Do vrednotenja metode smo kot IS uporabljali PAR, pri študiju fotorazgradnje SER pa SER-D<sub>3</sub>. PAR smo prenehali uporabljati, saj se je izkazalo, da se pri postopkih priprave vzorca, analize in shranjevanja ne obnaša enako kot SER, zato ni primeren kot IS. Tudi rezultati pri vrednotenju metode so pokazali, da PAR ne ustreza kot IS (preglednica VII).

Pri optimizaciji MS detekcije smo za SER-Ac, SER-D<sub>3</sub>-Ac in PAR-Ac najprej posneli »full scan« masne spektre, kjer smo zajeli mase  $m/z$  50–550, s čimer smo želeli ugotoviti, kateri ioni so najizrazitejši. Za vsako spojino smo identificirali posamezne fragmente, ki so prikazani na slikah 21–23. Pri SER-Ac in SER-D<sub>3</sub>-Ac sta si spektra podobna, saj sta si spojini strukturno sorodni in imata zato podobne kromatografske lastnosti ter MS fragmentacijo. SER-D<sub>3</sub> je izotopsko označen SER, namesto vodikov na metilni skupini ima 3 devterije (28). V masnem spektru obeh spojin je viden razmik med vrhovi pri posameznem masnem ionu (2 enoti  $m/z$ ) in razmerje med višinami vrhov približno 3 : 2, kar je posledica prisotnosti 2 klorov v spojini. Klor se nahaja v obliki izotopov, najbolj stabilna sta Cl<sup>35</sup> in Cl<sup>37</sup>. Če so na spektru v območju iona trije vrhovi in je med njimi razmik za 2 enoti  $m/z$  ter razmerje med višinami vrhov 9 : 6 : 1, pomeni, da sta v takšni

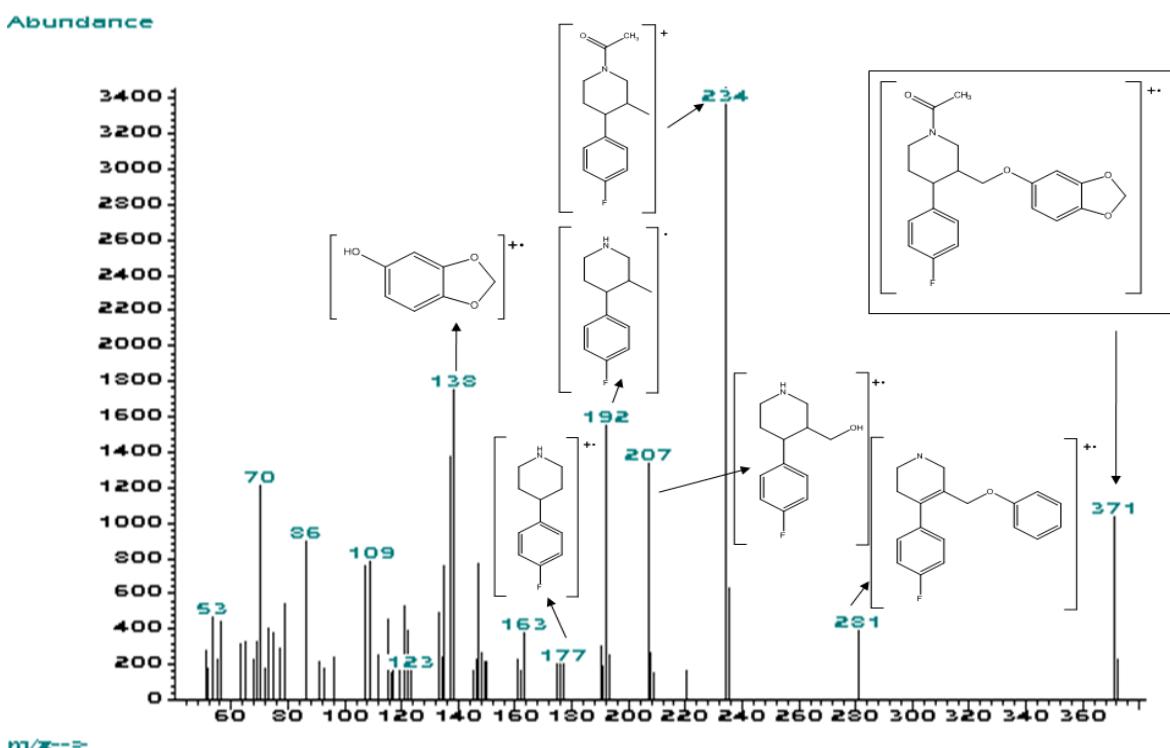
molekuli zelo verjetno prisotna dva klorja. Če sta vrhova dva in sta odmaknjena za 2 enoti  $m/z$  ter je razmerje med višinama vrhov 3 : 1, je prisoten samo en klor (29). Ker se masna spektra SER-Ac in SER-D<sub>3</sub>-Ac razlikujeta le pri masnem ionu spojin, smo si za SER-Ac izbrali  $m/z$  347 in 349, pri SER-D<sub>3</sub>-Ac pa 350 in 352, čeprav so prisotni še drugi intenzivnejši masni fragmenti (npr. 290/292 in 274/276). Vsi masni fragmenti, manjši od  $m/z$  347/349 za SER-Ac oziroma 350/352 za SER-D<sub>3</sub>-Ac, so identični, kar pomeni, da se je že takoj v začetku odcepila metilna skupina iz SER-Ac oz. -CD<sub>3</sub> iz SER-D<sub>3</sub>-Ac. Zato tudi SER-Ac in SER-D<sub>3</sub>-Ac ni več mogoče razlikovati. Pri PAR-Ac sta najizrazitejša  $m/z$  371 in 234. Za kvantitativno ovrednotenje smo uporabljali razmerje površine pod krivuljo SER-Ac pri  $m/z$  347 in SER-D<sub>3</sub>-Ac pri  $m/z$  350 (SER-Ac/SER-D<sub>3</sub>-Ac) oz. PAR pri  $m/z$  234 (SER-Ac/PAR-Ac).



Slika 21: Masni spekter SER-Ac, skupaj s strukturami fragmentov.



Slika 22: Masni spekter SER-D<sub>3</sub>-Ac, skupaj s strukturami fragmentov.



Slika 23: Masni spekter PAR-Ac, skupaj s strukturami fragmentov.

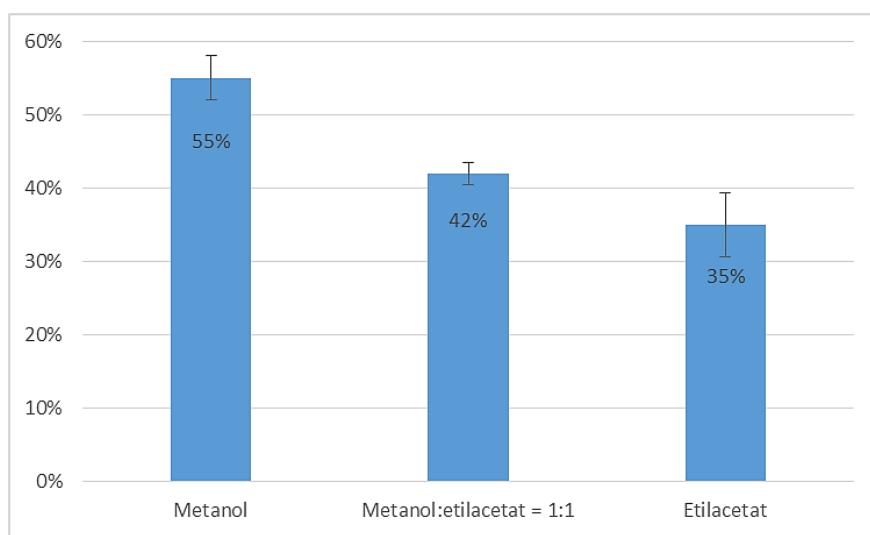
#### 4.1.2 Optimizacija postopka SPE

Da bi dosegli čim večji izkoristek SER pri koncentriranju vzorcev s SPE, smo preizkusili različne pH, topila za elucijo in sorbente.

##### 4.1.2.1 Izberite pH topila in topila za elucijo

Uporabili smo topila z različnimi pH, in sicer pH 10, 12 in nevtralno topilo (ultra čista voda). Izvedli smo postopek merjenja koncentracije SER v vodi, ki je opisan v poglavju 3.2.2. Vse eksperimente smo naredili v 2 ponovitvah. Pri pH 12 se je kolona SPE zamašila. Tvorila se je oborina in ekstrakcije nismo mogli dokončati. Glede na dobljene rezultate smo se odločili za nevtralno topilo, saj je bil izkoristek ekstrakcije 60 %, medtem ko je bil pri pH 10 le 25 %.

Za elucijo smo preizkusili 3 različna topila: metanol, etilacetat in zmes etilacetata in metanola v volumskem razmerju 1 : 1. Uporabili smo SER v ultra čisti vodi. Nadaljnji postopek je opisan v poglavju 3.2.2. Elucijo smo izvedli 3-krat po 1 mL topila, saj s tremi koraki z manjšim volumnom dosežemo večjo učinkovitost kot pa z enim korakom s 3 mL, še posebej, če prvi alikvot ostane na sorbentu. Ugotovili smo, da je najboljše topilo za elucijo metanol, saj nam je dal največji izkoristek, to je 54 %. Najslabši izkoristek smo dobili pri etilacetatu (slika 24). To je v skladu s pričakovanji, saj polarne učinkovine najbolje eluirajo polarna topila. Med izbranimi topili je najbolj polarno topilo metanol, nato zmes metanola in etilacetata in najmanj etilacetat (18).

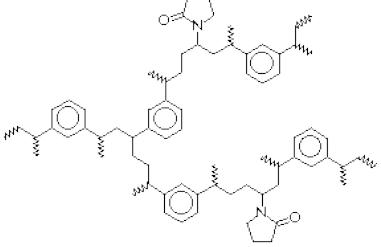
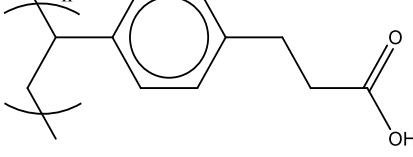


**Slika 24:** Primerjava izkoristkov elucije z različnimi topili.

#### 4.1.2.2 Izbira ustrezne kolone SPE

Preizkusili smo dve vrsti kolon: Oasis HLB in Strata-X-CW. Sorbent v kolonah Oasis HLB je neselektiven zaradi širokega spektra nabora spojin (kisle, bazične in nevtralne), medtem ko je sorbent Strata-X-CW primeren samo za baze. V preglednici VI so prikazane še ostale lastnosti obeh kolon. Temeljna razlika med njima je v vrsti interakcije, ki jo tvori sorbent z analitom. Stacionarna faza v koloni Oasis HLB tvori reverzno-fazne interakcije, kationski polimer v koloni Strata-X-CW pa ionske pare z analitom (30, 31, 32). Ker je SER šibka baza, njegov pKa znaša 9,47 (5), smo preverili možnost uporabe te selektivne kolone SPE.

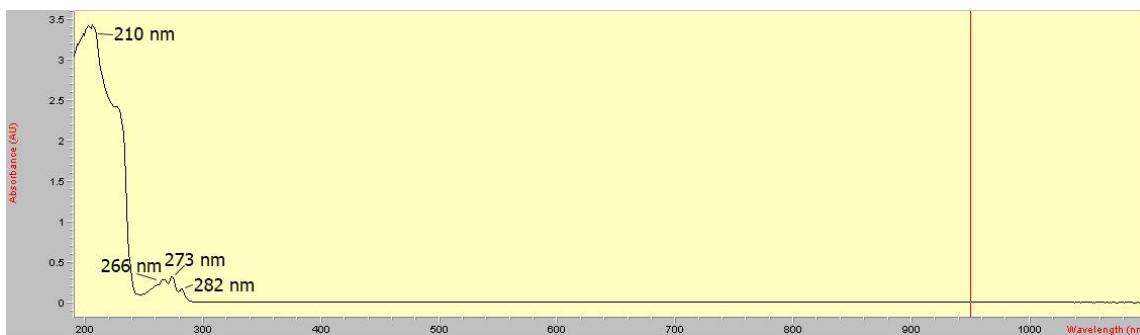
**Preglednica VI:** Primerjava lastnosti kolon Oasis® HLB (30, 31) in Strata-X-CW (32).

	Oasis® HLB	Strata™-X-CW
<b>Sorbent</b>	polimerni reverzno-fazni	polimerni šibko kationski
<b>Velikost delcev sorbenta [µm]</b>	30	25
<b>Specifična površina [m²/g]</b>	800	800
<b>Struktura polimera</b>		
<b>Tarčni analit</b>	kisle, bazične in nevtralne spojine	bazične spojine, zlasti močne baze

Izvedli smo postopek priprave vzorca z obema kolonama SPE, ki je opisan v poglavju 3.2.2. Rezultati so pokazali zelo slab izkoristek na koloni Strata-X-CW, odzivi SER so bili majhni, blizu meje določitve. Razlog temu je najverjetneje ta, da vsebujejo sorbent, ki je šibko kationski polimer, ta pa veže zlasti močne baze. Na osnovi rezultatov smo se odločili za kolono Oasis® HLB, kjer so odzivi SER občutno višji in torej dajejo višji izkoristek pri pripravi vzorca in posledično boljšo občutljivost metode.

## 4.2 ANALIZA S HPLC-UV

Metodo HPLC-UV smo privzeli iz laboratorija Katedre za biofarmacijo in farmakokinetiko Fakultete za farmacijo. Namesto detekcije pri 273 nm smo najprej želeli uporabiti valovno dolžino najvišjega absorpcijskega maksimuma. V ta namen smo posneli absorpcijski spekter SER (slika 25) in določili valovno dolžino njegove maksimalne absorpcije, ki je pri 210 nm. Ostali vrhovi so še pri 266, 273 in 282 nm. Za izbrano valovno dolžino UV-detekcije smo se odločili, ker smo pričakovali zelo nizke koncentracije SER v vzorcih.



**Slika 25:** Absorpcijski spekter SER.

Analiza s HPLC-UV je trajala 5 minut. Internega standarda nismo dodali, saj imata SER in SER-D<sub>3</sub> isti retencijski čas in sama metoda ni dovolj selektivna, da bi ju ločila. Poleg tega pri HPLC-UV nihanje odziva ni problematično v primerjavi z GC-MSD, kjer signal ni tako robusten in je zato potreben IS.

## 4.3 VREDNOTENJE ANALIZNE METODE

Validacija je dokumentiran postopek preizkušanja in potrjevanja, da analizna metoda z veliko gotovostjo daje rezultate, ki točno odražajo lastnosti preiskovanega vzorca oziroma da metoda ustrezna namenu. Najpogosteji validacijski parametri, ki jih določamo, so selektivnost, točnost, ponovljivost, meja zaznavnosti, meja določitve, linearost in območje (33).

### 4.3.1 GC-MSD

Zaradi potrebe po koncentriranju vzorca s SPE pred analizo z GC-MSD, smo ovrednotili celoten analizni postopek. Za merjenje koncentracije SER v vodi z GC-MSD smo ovrednotili linearnost, območje, točnost in ponovljivost metode ter ponovljivost injiciranja,

mejo zaznavnosti in mejo določitve. Pri vrednotenju smo uporabili oba IS, saj smo pri optimizaciji analitskega postopka uporabljali PAR, ker takrat še nismo imeli na voljo SER-D<sub>3</sub>, ki je težje komercialno dostopen.

#### 4.3.1.1 Linearnost, območje in točnost metode

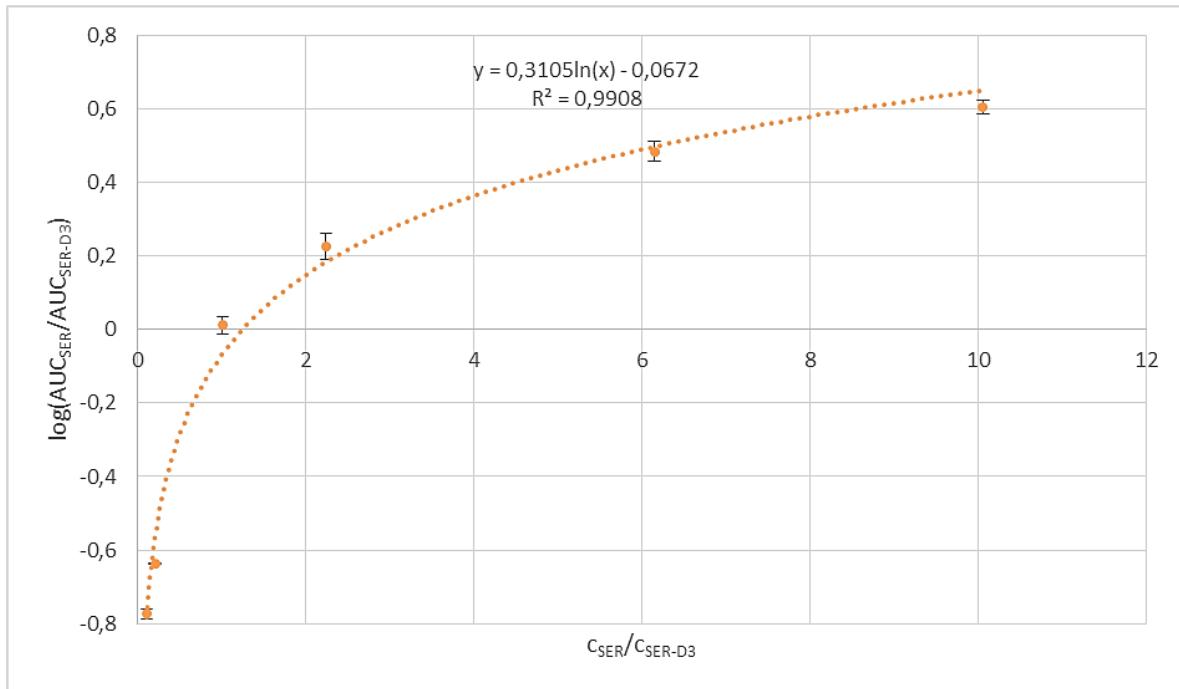
Linearnost je sposobnost analitskega postopka, da daje rezultate, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami sorazmerni količini analita v vzorcu. Določamo jo skozi celotno območje analiznega postopka pri vsaj 5 različnih koncentracijah (33). Najpogostejši statistični model, ki ga uporabimo, je linearna regresija, s katero dobimo umeritveno premico z enačbo  $y = bx + a$ , kjer je  $y$  odziv ali površina kromatografskega vrha,  $b$  naklon premice,  $x$  koncentracija analita in  $a$  odsek na ordinatni osi. Povezavo med vrednostima  $x$  in  $y$ , ki je merilo za linearnost, podamo s pomočjo determinacijskega koeficienta ( $R^2$ ), ki je pri popolni korelaciji enak 1 (34). Za ustrezno linearnost metode smo postavili mejo  $R^2 \geq 0,99$ .

Območje analiznega postopka je interval med najvišjo in najnižjo količino analita v vzorcu, za katerega so bile dokazane ustrezna točnost, natančnost in linearnost. To območje običajno določimo iz območja linearnosti (33).

Iz povprečnih vrednosti površin pod krivuljo SER-Ac/SER-D<sub>3</sub>-Ac in SER-Ac/PAR-Ac dveh paralel pri vsaki izmed koncentracij standardnih raztopin (preglednica III) po pripravi vzorca, opisani v poglavju 3.2.2, smo po metodi najmanjših kvadratov izračunali regresijsko premico ter določili pripadajoč  $R^2$ . Zaradi nasičenosti sistema pri višjih koncentracijah se je umeritveni krivulji z IS SER-D<sub>3</sub> najbolje prilegala logaritmična funkcija (slika 26). Enačba, ki smo jo dobili, je:

$$\log \frac{AUC(SER - Ac)}{AUC(SER - D3 - Ac)} = 0,3105 \ln \frac{c(SER)}{c(SER - D3)} - 0,0672 \quad (R^2 = 0,9908)$$

(Enačba 1)

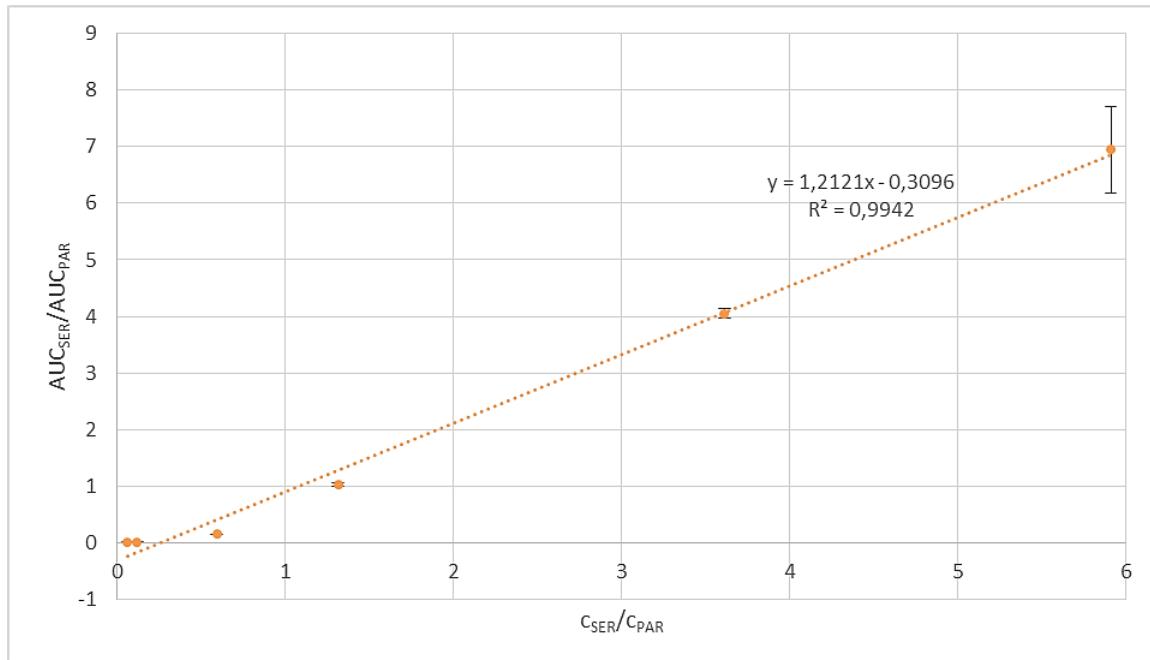


Slika 26: Umeritvena krivulja za GC-MSD glede na SER-D<sub>3</sub>.

Z upoštevanjem internega standarda PAR (slika 27) se je krivulji najbolj prilegala linearna funkcija. Enačba, ki smo jo dobili, je:

$$\frac{AUC(SER - Ac)}{AUC(PAR - Ac)} = 1,2121 \frac{c(SER)}{c(PAR)} - 0,3096 \quad (R^2 = 0,9942)$$

(Enačba 2)



Slika 27: Umeritvena krivulja za GC-MSD glede na PAR.

$R^2$  obeh umeritvenih krivulj je večji oz. enak 0,99, kar pomeni, da sta metodi z uporabo SER-D<sub>3</sub> in PAR linearni v območju koncentracije SER od 0,5 do 50 µg/L.

Znotraj območja linearnosti smo izračunali tudi točnost analizne metode. Točnost izraža ujemanje določene vrednosti s sprejeto pravo vrednostjo oz. s sprejeto referenčno vrednostjo (33). Iz umeritvene krivulje smo za vsako koncentracijsko točko umeritvene premice (preglednica III) posebej iz odziva izračunali koncentracijo SER, točnost pa podali kot razmerje med izračunano in dejansko koncentracijo SER. Kot rezultat smo podali povprečje na vseh koncentracijskih točkah. Za ustrezeno točnost smo kot mejo sprejemljivosti postavili  $100\% \pm 5\%$ . Povprečna točnost z upoštevanjem IS SER-D<sub>3</sub> znaša 101 %, z upoštevanjem PAR pa 173 %. Pri uporabi SER-D<sub>3</sub> je točnost ustrezena, pri PAR pa ustrezeno točnost dajejo višje koncentracije SER, od 5 do 50 µg/L.

#### 4.3.1.2 Ponovljivost analizne metode in ponovljivost injiciranja

Ponovljivost izraža stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz vzorca pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju (isto osebje, ista oprema). Izražamo jo kot standardni odklon ali relativni standardni odklon (koeficient variacije - CV) serije meritev (enačba 3). Določamo jo z merjenjem vsaj 3 različnih koncentracij v 3 ponovitvah ali naredimo vsaj 6 analiz pri 100-procentni tarčni koncentraciji. (33).

$$CV = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100\%$$

$\sigma$  = standardni odklon,  $\bar{x}$  = povprečna vrednost

(Enačba 3)

Ponovljivost metode in ponovljivost injiciranja smo ugotavljali za vzorce, opisane v poglavju 3.2.4.1.2. Izračunali smo povprečne vrednosti odzivov SER-Ac/SER-D<sub>3</sub>-Ac oz. SER-Ac/PAR-Ac ter po enačbi 3 pripadajoče CV. Za ustrezeno ponovljivost metode in injiciranja smo postavili mejo  $CV \leq 5\%$ . Z upoštevanjem IS SER-D<sub>3</sub> sta tako ponovljivost metode kot ponovljivost injiciranja enaki 5 %. Z upoštevanjem IS PAR pa je ponovljivost metode 16 % in injiciranja 7 %. Ponovljivost metode s PAR tako ni ustrezena, saj je  $CV > 5\%$ .

#### 4.3.1.3 Meja zaznavnosti in meja določitve

Meja zaznavnosti (LOD) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko v predpisanih eksperimentalnih pogojih zaznamo, vendar ne nujno tudi kvantitativno določimo (33). Izračunamo jo kot koncentracijo analita, kjer je kromatografski vrh enak trikratni vrednosti odklona sisanja signala slepih vzorcev ali odklona odsekov na ordinatni osi iz umeritvene krivulje (enačba 4). Pri izračunu uporabimo tudi naklon umeritvene krivulje (35).

$$LOD = \frac{3\sigma}{S}$$

$\sigma$  = standardni odklon, S = naklon umeritvene krivulje

(Enačba 4)

Meja določitve (LOQ) je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko v predpisanih eksperimentalnih pogojih kvantitativno ovrednotimo z ustrezeno točnostjo in natančnostjo. Izračunamo jo kot koncentracijo analita, kjer je kromatografski vrh enak desetkratni vrednosti odklona sisanja signala slepih vzorcev ali odklona odsekov na ordinatni osi iz umeritvene krivulje (enačba 5). Pri izračunu uporabimo tudi naklon umeritvene premice (33).

$$LOQ = \frac{10\sigma}{S}$$

$\sigma$  = standardni odklon, S = naklon umeritvene krivulje

(Enačba 5)

Mojo zaznavnosti in določitve metode smo izračunali po enačbah 4 in 5. Na osnovi umeritvenih krivulj smo določili odklone odsekov na ordinatni osi. Mojo zaznavnosti smo določili kot koncentracijo SER pri 3-kratni vrednosti standardnega odklona, mojo določitve pa kot koncentracijo pri 10-kratni vrednosti standardnega odklona. Pri upoštevanju internega standarda SER-D<sub>3</sub> je LOD 0,23 µg/L in LOQ 0,76 µg/L, pri upoštevanju PAR pa je LOD 0,96 µg/L in LOQ 3,20 µg/L. Občutljivost metode je relativno nizka in slabša v primeru, ko uporabimo PAR kot IS, saj je variabilnost IS tisti dejavnik, ki povzroči višjo LOD oz. LOQ.

V preglednici VII so sistematično zbrani vsi rezultati vrednotenja analizne metode.

**Preglednica VII:** Vrednotenje analizne metode za merjenje koncentracije SER v vodi z GC-MSD.

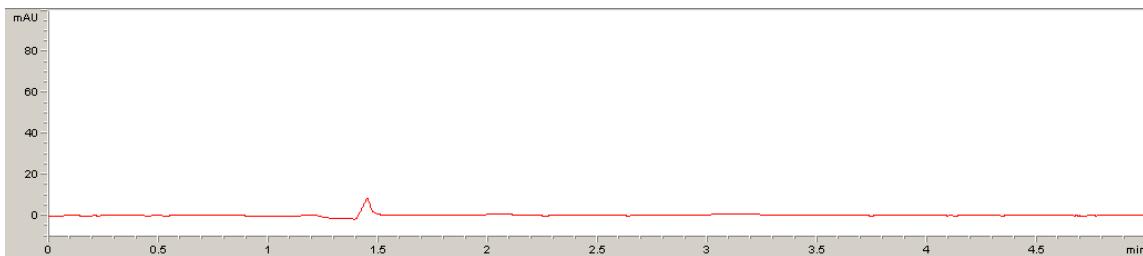
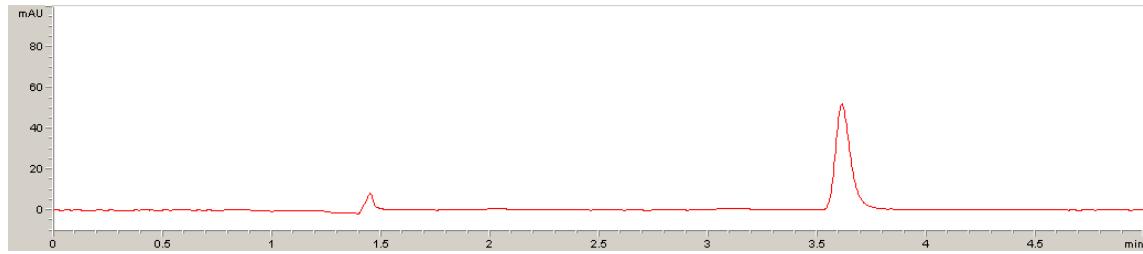
Območje koncentracije SER: 0,5 µg/L–50 µg/L	Interni standard SER-D <sub>3</sub>	Interni standard PAR	Kriterij
<b>Linearnost</b>	Ustreza $\log \frac{AUC(SER-Ac)}{AUC(SER-D_3-Ac)} = 0,3105 \ln \frac{c(SER)}{c(SER-D_3)} - 0,0672$ $(R^2 = 0,991)$	Ustreza $\frac{AUC(SER-Ac)}{AUC(PAR-Ac)} = 1,2121 \frac{c(SER)}{c(PAR)} - 0,3096$ $(R^2 = 0,994)$	$R^2 \geq 0,99$
<b>Točnost</b>	Ustreza 101 %	Ne ustreza 173 %	$100 \% \pm 5 \%$
<b>Ponovljivost metode</b>	Ustreza $CV = 5 \%$	Ne ustreza $CV = 16 \%$	$CV \leq 5 \%$
<b>Ponovljivost injiciranja</b>	Ustreza $CV = 5 \%$	Ne ustreza $CV = 7 \%$	$CV \leq 5 \%$
<b>LOD</b>	0,23 µg/L	0,96 µg/L	/
<b>LOQ</b>	0,76 µg/L	3,20 µg/L	/

### 4.3.2 HPLC-UV

Validacijski parametri, ki smo jih vrednotili, so bili selektivnost, linearost, območje, točnost in ponovljivost metode ter ponovljivost injiciranja, meja zaznavnosti in meja določitve.

#### 4.3.2.1 Selektivnost metode

Selektivnost je sposobnost metode, da nedvoumno določi analit v prisotnosti komponent, za katere lahko pričakujemo, da so prisotne v vzorcu (nečistote, razpadni produkti, matriks,...). Metoda je selektivna takrat, kadar so vrhovi na kromatogramu vzorca jasno ločeni oz. se ne prekrivajo (33). Pri vrednotenju selektivnosti smo posneli vzorca brez SER in s SER s koncentracijo 0,75 mg/L. Kromatogram vzorca topila je prikazan na sliki 28, kromatogram vzorca SER pa na sliki 29. Metoda je selektivna, saj sta oba vrhova vidno ločena. SER ima čas retencije 3,75 minut, topilo pa 1,45 minut.

**Slika 28:** Kromatogram vzorca topila.**Slika 29:** Kromatogram vzorca SER.

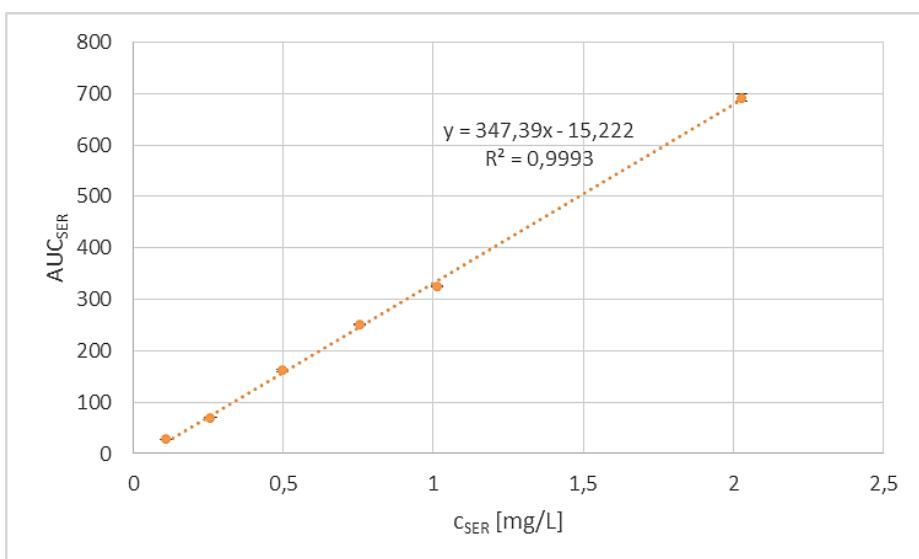
#### 4.3.2.2 Linearnost, območje in točnost metode

Iz povprečnih vrednosti površin pod krivuljo SER dveh paralel pri vsaki izmed koncentracij standardnih raztopin (preglednica IV) smo po metodi najmanjših kvadratov izračunali regresijsko premico ter določili pripadajoč  $R^2$ . Tudi v tem primeru smo za ustrezno linearnost metode postavili mejo  $R^2 \geq 0,99$ . Enačba, ki smo jo dobili, je:

$$AUC(SER) = 347,39c(SER) - 15,222 \quad (R^2 = 0,9993)$$

(Enačba 6)

Umeritvena krivulja je prikazana na sliki 30.

**Slika 30:** Umeritvena krivulja metode HPLC-UV.

$R^2$  je večji oz. enak 0,99, kar pomeni, da je metoda linearna v območju koncentracije SER od 0,1 do 2 mg/L.

Iz umeritvene krivulje smo za vsako koncentracijsko točko umeritvene premice (preglednica IV) posebej iz odziva izračunali koncentracijo SER, točnost pa podali kot razmerje med izračunano in dejansko koncentracijo SER. Kot rezultat smo podali povprečje na vseh koncentracijskih točkah. Za ustrezeno točnost smo kot mejo sprejemljivosti postavili  $100\% \pm 5\%$ . Povprečna točnost, ki je tudi ustrezena, znaša 101 %.

#### 4.3.2.3 Ponovljivost metode in ponovljivost injiciranja

Ponovljivost metode in injiciranja smo izračunali po enačbi 3. Določili smo povprečne vrednosti odzivov površin pod krivuljo SER in njihove standardne odklone za vzorce, opisane v poglavju 3.2.4.2.2. Za ustrezeno ponovljivost metode in ponovljivost injiciranja smo postavili mejo  $CV \leq 5\%$ . Ponovljivost metode je znašala 1,51 %, injiciranja pa 0,16 %. Oboje ustreza postavljeni meji  $CV \leq 5\%$ .

#### 4.3.2.4 Meja zaznavnosti in meja določitve

Meja zaznavnosti in določitve smo določili s pomočjo umeritvenih krivulj metode HPLC-UV na enak način, kot je opisano v poglavju 4.3.1.3. LOD je 5,9 µg/L, LOQ pa 19,6 µg/L.

V preglednici VIII so sistematično zbrani vsi rezultati validacije.

**Preglednica VIII:** Validacija določanja SER v vodi s HPLC-UV.

Območje koncentracije SER: 0,1 mg/L–2 mg/L	Vrednost parametrov	Kriterij
<b>Linearnost</b>	Ustreza: $AUC(SER) = 347,39c(SER) - 15,222$ ( $R^2 = 0,999$ )	$R^2 \geq 0,99$
<b>Točnost</b>	Ustreza: 101 %	$100\% \pm 5\%$
<b>Ponovljivost metode</b>	Ustreza: $CV = 1,51\%$	$CV \leq 5\%$
<b>Ponovljivost injiciranja</b>	Ustreza: $CV = 0,16\%$	$CV \leq 5\%$
<b>LOD</b>	5,9 µg/L	/
<b>LOQ</b>	19,6 µg/L	/

## 4.4 FOTORAZGRADNJA SERTRALINA

Po razvoju analiznega postopka priprave vzorca za merjenje koncentracij SER smo vzorce izpostavili UV-svetlobi. Izvedli smo direktno in indirektno fotorazgradnjo. Direktna fotorazgradnja pomeni obsevanje samega SER, indirektna fotorazgradnja pa vključuje dodatek sekundarnih komponent, ki potem preko tvorjenja radikalov povzročijo razgradnjo SER. Pri obsevanju smo skušali pogoje čim bolj približati pogojem, ki so prisotni v naravnem okolju. Sončno svetlobo smo posnemali z obsevanjem s srednje tlačno živosrebrno svetilko. Kot topilo smo uporabili ultra čisto vodo, saj smo se s tem izognili prisotnosti spojin, ki bi lahko vplivale na kinetiko razgradnje SER. Nato smo izbrali ustrezne pogoje za fotorazgradnjo in določili vpliv le-teh na razgradnjo SER. Sekundarni komponenti, ki smo ju dodali v raztopine SER in ki sodelujeta pri radikalskih reakcijah, sta natrijev nitrat in 2-propanol.

### 4.4.1 Izbira pogojev za fotorazgradnjo

#### 4.4.1.1 Natrijev nitrat

Ugotavljali smo vpliv različnih koncentracij  $\text{NO}_3^-$  na hitrost razgradnje SER. Najprej smo se zgledovali po članku, ki je bil objavljen v reviji Water Research (36), kjer so Vione in sodelavci posnemali fotorazgradnjo ibuprofena v naravi. Uporabili so  $\text{NaNO}_3$  s koncentracijo 10 mmol/L. Ker se je SER pri teh pogojih že v pol ure razgradil za 90 % (10 mmol  $\text{NO}_3^-$ , čas obsevanja 30 min, preglednica IX), smo se odločili izbrati nižje koncentracije  $\text{NO}_3^-$ . V literaturi smo našli naslednje okoljske koncentracije  $\text{NO}_3^-$ : v površinskih vodah v Kanadi so izmerili koncentracijo v območju 2–250  $\mu\text{mol/L}$  (37), po podatkih Agencije Republike Slovenije za okolje pa je bila v Sloveniji povprečna koncentracija  $\text{NO}_3^-$  v letu 2013 190  $\mu\text{mol/L}$  (38). Odločili smo se uporabiti koncentracijo 1 mmol/L, ki se je izkazala za optimalno pri opazovanju kinetike razgradnje, saj je pri teh pogojih ostala prisotna še skoraj polovica začetne koncentracije SER po 30 min (1 mmol  $\text{NO}_3^-$ , čas obsevanja 30 min, preglednica IX). Preverili smo še, če nitrat vpliva na samo razgradnjo SER brez obsevanja, torej ob času 0 minut (oz. 10 minut, če upoštevamo še čas mešanja). To smo naredili tako, da smo raztopino pripravili enako kot za obsevanje. V reakcijsko bučko smo poleg ultra čiste vode najprej dodali samo standardno raztopino SER s končno koncentracijo 10  $\mu\text{g/L}$  in mešali na magnetnem mešalu 10 minut (0 mmol  $\text{NO}_3^-$ , preglednica IX). Pri preverjanju vpliva nitrata je bil postopek enak, razlika je bila le v

dodatku  $\text{NaNO}_3$  s končno koncentracijo 1 mmol/L (1 mmol  $\text{NO}_3^-$ , čas obsevanja 0 min, preglednica IX). Ugotovili smo, da ima sam  $\text{NO}_3^-$  brez obsevanja zelo malo vpliva na razgradnjo SER, saj ga je razpadlo le 8 %. Pri direktni fotorazgradnji brez prisotnosti nitrata in obsevanja se SER ni razgradil, saj ni bilo prisotnih lovilcev radikalov. Vsi rezultati so zbrani v preglednici IX.

**Preglednica IX:** Vpliv koncentracije  $\text{NaNO}_3$  na razgradnjo SER.

Koncentracija $\text{NO}_3^-$ [mmol/L]	Čas obsevanja [min]	Razgradnja SER
10	30	90 %
1	30	48 %
0	0	0 %
1	0	8 %

#### 4.4.1.2 2-propanol

Koncentracije 2-propanola smo izbrali prav tako na osnovi vira 36. Vione s sodelavci je delal s koncentracijami 2-propanola v območju 0–0,3 mmol/L. Ker smo mi uporabili 10-krat manjšo koncentracijo nitrata kot v omenjenem članku, smo zato izbrali 10-krat manjšo koncentracijo 2-propanola (0,03 mmol/L). Dodatno smo preverjali še koncentraciji 0,003 mmol/L in 0,0003 mmol/L.

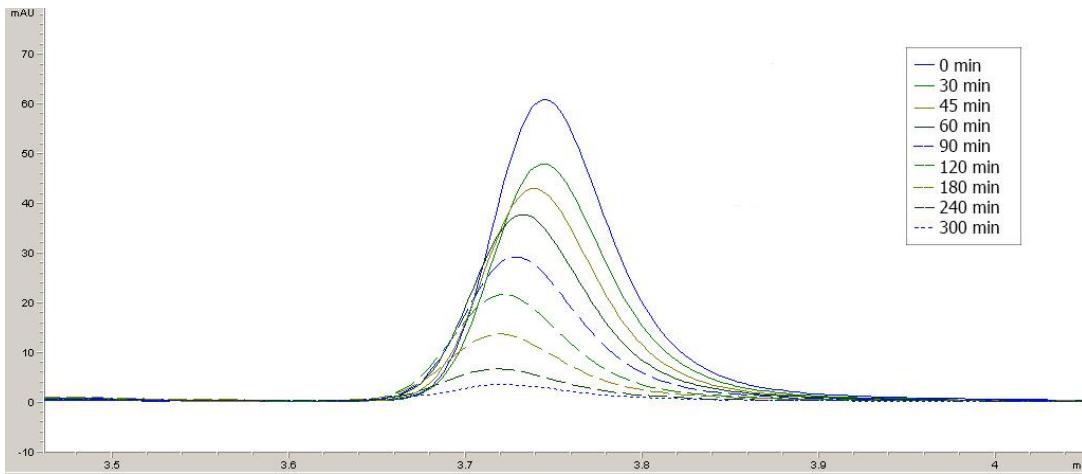
#### 4.4.1.3 Čas obsevanja

Čas obsevanja je bil odvisen od hitrosti razgradnje SER pod različnimi pogoji. Naš cilj je bil doseči obsežno razgradnjo SER v razumnem časovnem intervalu zato, da smo lahko izračunali kinetiko razgradnje. Čas obsevanja oz. intervale odvzema vzorca smo razporedili po izbrani časovni skali v odvisnosti od posameznega pogoja.

Pri direktni fotorazgradnji smo sklepali, da bo razgradnja zelo počasna, zato smo obsevali vzorce dlje časa (5 ur pri nižji koncentraciji in 8 ur pri višji). Ker sam nitrat razgradnjo pospešuje, smo takšno raztopino obsevali samo uro in pol pri nižji koncentraciji in 3 ure pri višji, kjer pa smo dodali še različne koncentracije 2-propanola, smo obsevali vsaj 2–5 ur (preglednici I in II).

Na sliki 31 je prikazano, kako s podaljšanjem časa obsevanja pada vsebnost SER v vzorcu. Analiza je prikazana za vzorec, kjer smo SER dodali 1 mM  $\text{NaNO}_3$  in 0,03 mM 2-

propanol. Razvidno je, da se v času 90 min vsebnost SER zniža na približno 50 %, v 5 urah pa dosežemo skoraj že popolno razgradnjo SER.



**Slika 31:** HPLC-UV analiza vzorca, ki vsebuje SER,  $\text{NO}_3^-$  in 2-propanol, izpostavljenega različnim časom obsevanja.

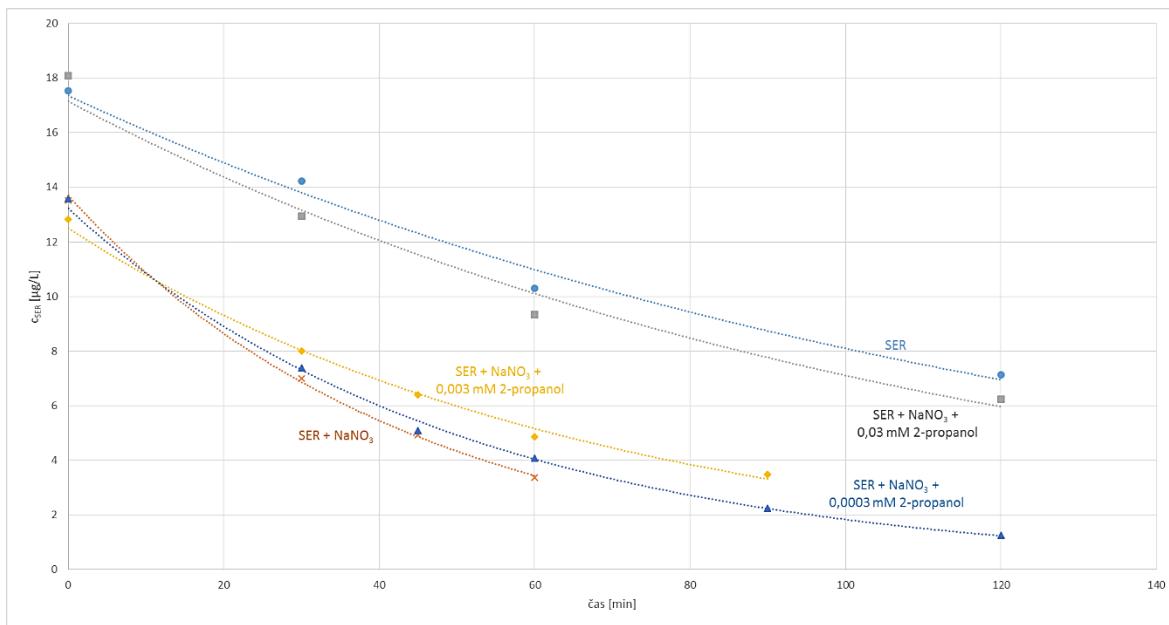
#### 4.4.2 Rezultati fotorazgradnje SER

Za vsak vzorec smo najprej iz odzivov SER-Ac/SER-D<sub>3</sub>-Ac za nižjo izhodno koncentracijo oz. samo SER za višjo izhodno koncentracijo iz umeritvenih krivulj (enačbi 1 in 6) izračunali koncentracijo SER. Nato smo naredili graf koncentracije SER v odvisnosti od časa obsevanja. Upad koncentracije SER v odvisnosti od časa obsevanja najbolje opisuje krivulja eksponentne regresije. Določili smo enačbo te krivulje in  $R^2$ . Tako smo ugotovili, da razgradnja SER pod vplivom UV-svetlobe poteka po psevdo 1. redu. Pri psevdru 1. redu sodelujeta vsaj dva reaktanta in gre dejansko za višji red reakcije. Vendar je v tem primeru koncentracija enega izmed reaktantov zelo visoka, drugega pa nizka, zato se red reakcije temu primerno zmanjša. Predvidevamo, da koncentracija prvega ostane med reakcijo konstantna, ker je njegova poraba majhna in je zato spremembu koncentracije zanemarljiva (19). V naših eksperimentih so v pribitku radikali in konstantni med fotorazgradnjo, koncentracija SER pa se s časom spreminja. Za 1. red velja (19):

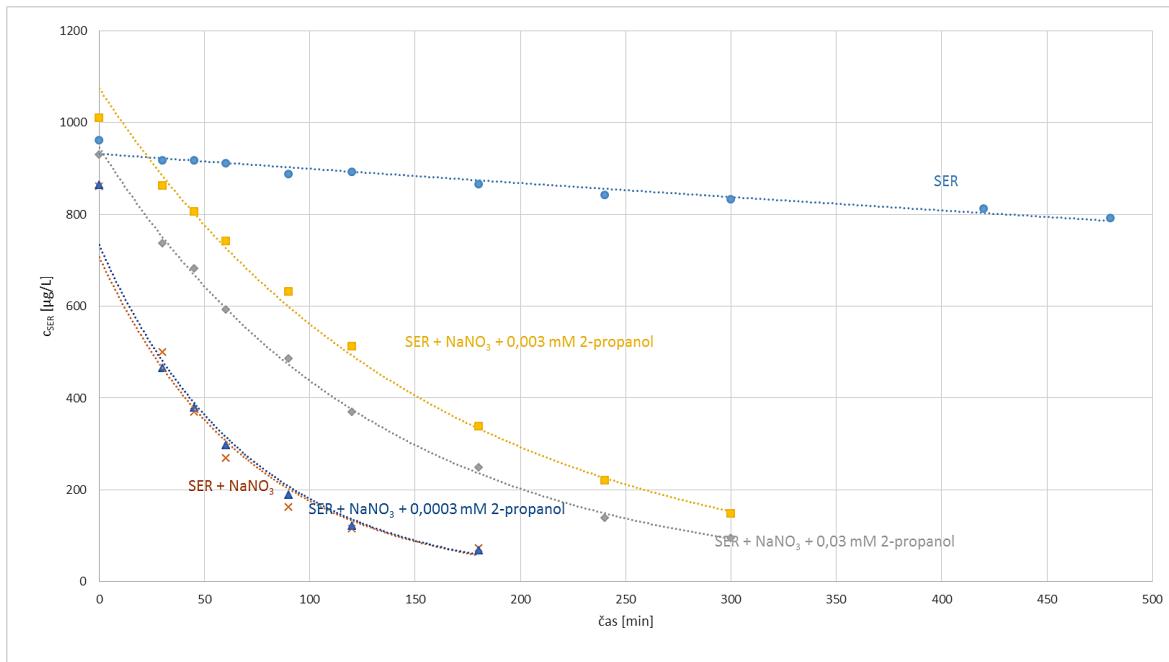
$$c = c_0 e^{-kt}$$

c = koncentracija ob času t,  $c_0$  = koncentracija na začetku, k = konstanta razpada, t = čas  
(Enačba 7)

Za lažjo predstavo sta prikazana grafa upada SER v odvisnosti od časa obsevanja pri direktni in indirektni fotorazgradnji, na sliki 32 za nižjo izhodno koncentracijo SER (10  $\mu\text{g}/\text{L}$ ) in na sliki 33 za višjo izhodno koncentracijo SER (1 mg/L).



**Slika 32:** Upad koncentracije SER v odvisnosti od časa obsevanja pri nižji izhodni koncentraciji ( $10 \mu\text{g/L}$ ).



**Slika 33:** Upad koncentracije SER v odvisnosti od časa obsevanja pri višji izhodni koncentraciji ( $1 \text{ mg/L}$ ).

V preglednici X so povzete enačbe 1. reda razgradnje SER pri nižji ( $10 \mu\text{g/L}$ ), v preglednici XI pa enačbe 1. reda razgradnje SER pri višji izhodni koncentraciji ( $1 \text{ mg/L}$ ), njihovi determinacijski koeficienti in konstante fotorazgradnje.

**Preglednica X:** Konstante fotorazgradnje SER (k) pri nižji izhodni koncentraciji SER (10 µg/L).

	<b>Enačba razgradnje</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>k [min<sup>-1</sup>]</b>
<b>SER</b>	$c = 17,352 e^{-0,008t}$	0,9879	0,008
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub></b>	$c = 13,698 e^{-0,023t}$	0,9990	0,023
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,0003 mM 2-propanol</b>	$c = 13,222 e^{-0,020t}$	0,9986	0,020
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,003 mM 2-propanol</b>	$c = 12,497 e^{-0,015t}$	0,9932	0,015
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,03 mM 2-propanol</b>	$c = 17,145 e^{-0,009t}$	0,9819	0,009

**Preglednica XI:** Konstante fotorazgradnje SER (k) pri višji izhodni koncentraciji SER (1 mg/L).

	<b>Enačba razgradnje</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>k [min<sup>-1</sup>]</b>
<b>SER</b>	$c = 932,2 e^{-0,0004t}$	0,9488	0,0004
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub></b>	$c = 707,4 e^{-0,0140t}$	0,9586	0,0140
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,0003 mM 2-propanol</b>	$c = 732,9 e^{-0,0140t}$	0,9830	0,0140
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,003 mM 2-propanol</b>	$c = 1074,8 e^{-0,0060t}$	0,9969	0,0060
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,03 mM 2-propanol</b>	$c = 946,2 e^{-0,0080t}$	0,9982	0,0080

Iz enačb razgradnje smo za vsak vzorec posebej izračunali, koliko časa bi bilo potrebno za 50 % razgradnjo SER ( $t_{1/2}$ ) (preglednica XII). Izračunali smo ga po veljavni enačbi 1. reda reakcije (iz enačbe 7):

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

(Enačba 8)

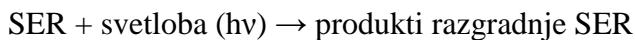
**Preglednica XII:** Razpolovni časi SER pri različnih pogojih fotorazgradnje.

	<b>10 µg/L SER t<sub>1/2</sub> [h]</b>	<b>1 mg/L SER t<sub>1/2</sub> [h]</b>
<b>SER</b>	1,4	28,9
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub></b>	0,5	0,8
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,0003 mM 2-propanol</b>	0,6	0,8
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,003 mM 2-propanol</b>	0,8	1,9
<b>SER + 1 mM NaNO<sub>3</sub> + 0,03 mM 2-propanol</b>	1,3	1,4

#### 4.4.3 Primerjava hitrosti fotorazgradnje SER pri direktni in indirektni fotorazgradnji

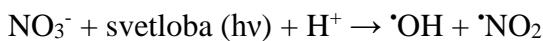
Pri direktni fotorazgradnji je razgradnja SER najpočasnejša, saj ni prisotnega nobenega pospeševalca razgradnje. Pri indirektni fotorazgradnji je konstanta razgradnje največja pri dodatku NaNO<sub>3</sub>, ki je vir hidroksilnih radikalov. Prisotnost 2-propanola zavira razgradnjo SER, in sicer večanje koncentracije 2-propanola bolj stabilizira SER (preglednici X in XI). Predvidevamo, da je 2-propanol lovilec radikalov, ki se tvorijo v prisotnosti nitrata. Razpolovni čas SER ob dodatku natrijevega nitrata in 2-propanola z najnižjo koncentracijo (0,0003 mmol/L) je podoben razpolovnemu času SER ob dodatku samega nitrata (preglednica XII). Sklepamo, da je v tem primeru koncentracija 2-propanola prenizka, da bi vplivala na radikalsko reakcijo in posledično na samo razgradnjo SER nima vpliva. Stabilizacijski učinek 2-propanola je bolj izrazit pri višjih koncentracijah. Pri nižji izhodni koncentraciji SER (10 µg/L) je hitrost razgradnje pri najvišji koncentraciji 2-propanola (0,03 mmol/L) celo primerljiva z direktno fototorazgradnjo (preglednica X).

Reakcija, ki poteče pri direktni fotorazgradnji, je naslednja:

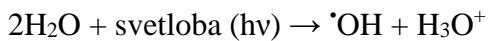


Predpostavljeni kemijski reakciji, ki potečejo pri indirektni fotorazgradnji, so prikazane spodaj (36).

- Dodatek nitrata:



- Dodatek 2-propanola:



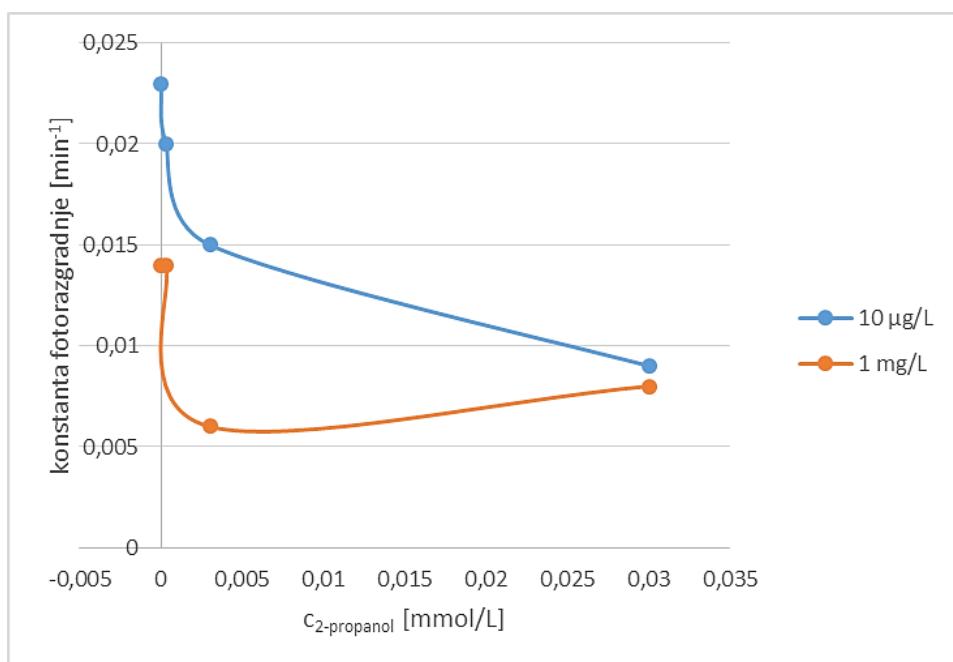
Poteče kompeticija 2-propanola s SER za ·OH:



Na osnovi dobljenih rezultatov naše študije lahko potrdimo predpostavljeni reakciji iz literature. Torej poteka indirektna fotorazgradnja SER po enakem mehanizmu.

#### 4.4.4 Primerjava hitrosti fotorazgradnje med dvema različnima izhodnima koncentracijama SER

Pri obeh izhodnih koncentracijah pri indirektni fotorazgradnji opazimo podoben trend hitrosti fotorazgradnje, in sicer višja kot je koncentracija 2-propanola, nižja je konstanta fotorazgradnje (slika 34). Iz rezultatov je tudi razvidno, da so pri višji izhodni koncentraciji SER (1 mg/L) konstante nižje. Do enake ugotovitve pridemo tudi pri direktni fotorazgradnji. Razpolovni čas SER je pri nižji izhodni koncentraciji 1,4 h, pri višji izhodni koncentraciji pa 28,9 h (preglednica XII). Pri 100-krat nižji izhodni koncentraciji SER je torej direktna fotorazgradnja SER približno 20-krat hitrejša.



**Slika 34:** Primerjava konstant indirektne fotorazgradnje SER v odvisnosti od koncentracije 2-propanola (koncentracija NO<sub>3</sub><sup>-</sup> je 1 mmol/L).

V naravi so koncentracije SER še nižje, kot smo jih uporabljali v okviru našega dela. V slovenskih površinskih vodah je koncentracija SER pod 2,5 ng/L, v odpadnih vodah pa so izmerili koncentracije od 16,7 do 38,8 ng/L (39). Glede na zaključke naše študije lahko torej pričakujemo v naravi obsežnejšo razgradnjo SER. Če upoštevamo še v naravnem okolju prisotne kontaminante (generatorji radikalov), je fotorazgradnja SER v okoljskih vodah še hitrejša.

## 5 ZAKLJUČEK

Koncentracijo SER v vodnih vzorcih smo merili z dvema analiznima metodama: GC-MSD in HPLC-UV. Obe metodi imata svoje prednosti in slabosti. Zaradi boljše občutljivosti smo za nižje koncentracije SER izbrali analizo z GC-MSD. Priprava vzorca za analizo je pri metodi HPLC-UV enostavnejša, saj lahko obsevane vzorce direktno analiziramo, medtem ko je pri GC-MSD potrebna priprava vzorca s SPE in derivatizacijo. Za analizo GC-MSD smo morali pogoje meritev predhodno optimizirati. Največjo učinkovitost postopka SPE so dali nevtralen pH (ultra čista voda), metanol kot topilo za elucijo in kolona Oasis® HLB. Najbolj primeren derivatizacijski reagent je bil acetanhidrid. Derivatizacijo smo izvajali 1 uro pri sobni temperaturi.

Obe metodi smo ovrednotili in potrdili njuno ustreznost za merjenje koncentracije SER pri eksperimentih posnemanja njegove fotorazgradnje v vodnem okolju. Z vrednotenjem analiznih metod na standardnih raztopinah SER smo potrdili ustreznost metode GC-MSD v koncentracijskem območju od 0,5 do 50 µg/L z uporabo SER-D<sub>3</sub> kot internega standarda (PAR ni bil ustrezen) in HPLC-UV v koncentracijskem območju od 0,1 do 2 mg/L. Potrdili smo, da sta metodi selektivni, linearni, točni in ponovljivi ter da imata ustrezno mejo določitve. Meja določitve metode GC-MSD je nižja kot pri metodi HPLC-UV, kar potrjuje boljšo občutljivost metode in njeno primernost uporabe pri študiju fotorazgradnje, ko imamo nizke izhodne koncentracije SER.

Izvajali smo direktno in indirektno fotorazgradnjo SER. Pogojem v naravi se najbolje približamo z uporabo srednje tlačne živosrebrne svetilke in z dodatkom nitrata in 2-propanola. Ugotovili smo, da potek razgradnje SER v prisotnosti UV-sevanja najbolje opišemo z reakcijo psevdo 1. reda. Pri obeh izhodnih koncentracijah SER so rezultati pokazali, da je bil upad koncentracije SER s časom obsevanja najpočasnejši pri direktni fotorazgradnji. Najhitreje se je SER razgradil ob dodatku natrijevega nitrata. Z dodajanjem različnih koncentracij 2-propanola se je razgradnja v prisotnosti natrijevega nitrata upočasnila. Natrijev nitrat je pod vplivom svetlobe povzročil nastanek hidroksilnih radikalov, ki so razpad SER pospešili, medtem ko je 2-propanol reagiral s hidroksilnimi radikali in jih na ta način odstranjeval ter s tem upočasnil razgradnjo SER. Hitrost razgradnje pri dodatku najnižje koncentracije 2-propanola (0,0003 mmol/L) se ni bistveno spremenila oziroma je ostala enaka, saj je bila koncentracija 2-propanola, ki razgradnjo

zavira, prenizka. Pri dodatku največje koncentracije 2-propanola se je konstanta razgradnje vidno zmanjšala. Pri višji izhodni koncentraciji SER (1 mg/L) so hitrosti fotorazgradnje manjše kot pa pri nižji izhodni koncentraciji (10 µg/L). V okviru magistrskega dela smo postavili izhodišča za nadaljnje študije fotorazgradnje SER, tudi v smeri kasnejše identifikacije nastalih transformacijskih produktov SER.

Hitrosti razgradnje SER v površinskih vodah ne moremo natančno oceniti, saj je težko posnemati dejanske pogoje v okolju. V okolju je sicer primerljiva koncentracija nitrata kot smo jo uporabili v laboratorijskih poskusih, so pa dosti nižje koncentracije SER v podzemnih vodah, kar pomeni, da bi bila verjetno fotorazgradnja še hitrejša. Da bi se realnim pogojem še bolj približali, bi morali upoštevati tudi sočasno mikrobiološko razgradnjo in različne fizikalne procese, ki so prisotni v okolju (mešanje, raztopljanje, izhlapevanje, obarjanje in sedimentacija, vezava na delce). V okolju je lahko razgradnja SER različna tudi zaradi menjave dneva in noči, poleg tega pa je intenziteta svetlobe največja v zgornjih vodnih plasteh, medtem ko je v spodnjih plasteh majhna ali pa je sploh ni.

## 6 LITERATURA

1. Lamas J. P, Salgado-Petinal C, García-Jares C, Llompart M, Cela R, Gómez M: Solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of selective serotonin reuptake inhibitors in environmental water. *J Chromatogr A* 2004; 1046: 241–247.
2. Inštitut za varovanje zdravja Republike Slovenije: Ambulantno predpisovanje zdravil v Sloveniji po ATC klasifikaciji v letu 2012. Ljubljana, 2013: 72–75.
3. Harvey R. A, Champe P. C Finkel R, Clark M. A, Cubeddu L. X: Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology, 4th Edition. Lippincott Williams & Wilkins, 2009: 142–144.
4. [http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/4006b1\\_06\\_zoloft-label.pdf](http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/04/briefing/4006b1_06_zoloft-label.pdf) Dostop: oktober 2014.
5. Kosjek T, Heath E: Tools for evaluating selective serotonin re-uptake inhibitor residues as environmental contaminants. *Trend Anal Chem* 2010; 29: 832–847.
6. Silva L. J. G, Lino C. M, Meisel L. M, Pena A: Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Sci Total Environ* 2012; 437: 185–195.
7. Kwon J. W, Armbrust K. L: Laboratory persistence and fate of fluoxetine in aquatic environments. *Environ Toxicol Chem* 2006; 25: 2561–2568.
8. Kwon J. W, Armbrust K. L: Degradation of citalopram by simulated sunlight. *Environ Toxicol Chem* 2005; 24: 1618–1623.
9. Kwon J. W, Armbrust K. L: Photo-isomerization of fluvoxamine in aqueous solutions. *J Pharmaceut Biomed* 2005; 37: 643–648.
10. Kwon J. W, Armbrust K. L: Hydrolysis and photolysis of paroxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor, in aqueous solutions. *Environ Toxicol Chem* 2004; 23: 1394–1399.
11. Bajt O: Vpliv reakcijskega medija na fotokemične transformacije izbranih organskih polutantov. Doktorska disertacija, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za naravoslovje in tehnologijo, Ljubljana 1994.
12. Schwarzenbach R. P, Gschwend P. M, Imboden D. M: Environmental Organic Chemistry. John Wiley & Sons, Inc, 1993: 436–484.

13. <http://www.photochemicalreactors.co.uk/html/immersion-well-reactors.html> Dostop: oktober 2014.
14. Immersion Well Photochemical Reactors: Instruction manual. Photochemical Reactors Ltd 1981.
15. Brodnjak Vončina D: Analizna kemija II. Zbrano gradivo. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Maribor 2013: 178–189.
16. Kosjek T: Razvoj analiznega postopka določitve ostankov nesteroidnih protivnetnih učinkovin v odpadnih vodah. Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2004.
17. Bulletin 910: Guide to Solid Phase Extraction. Sigma-Aldrich Co. 1998.
18. SPE: Reference Manual & Users Guide. Phenomenex Inc. 2011.
19. Skoog D. A, West D. M, Holler F. J, Crouch S. R: Fundamentals of Analytical Chemistry, Ninth Edition. Cengage Learning 2013: 660, 821–826, 887–888, 892–895, 912–920.
20. <http://teaching.shu.ac.uk/hwb/chemistry/tutorials/chrom/gaschrm.htm> Dostop: januar 2014.
21. <http://www.crawfordscientific.com/Chromatography-Technical-Tips-Split-Splitless-Injection.html> Dostop: junij 2015.
22. Schummer C, Delhomme O, Appenzeller B. M. R, Wennig R, Millet M: Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. *Talanta* 2009; 77: 1473–1482.
23. Farajzadeh M.A, Nouri N, Khorram P: Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. *Trend Anal Chem* 2014; 55: 14–23.
24. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/m7891?lang=en&region=SI> Dostop: oktober 2014.
25. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/aldrich/394882?lang=en&region=SI> Dostop: oktober 2014.
26. [http://fs-server.uni-mb.si/si/inst/itkek/lakbp/izpiti/Analizna%20kemija%20\(okoljska%20analitika\)/Analizna%20kemija%20in%20Okoljska%20analitika%20-%20navodila%20za%20vaje%20-%202%20termin%2017-3-2008.pdf](http://fs-server.uni-mb.si/si/inst/itkek/lakbp/izpiti/Analizna%20kemija%20(okoljska%20analitika)/Analizna%20kemija%20in%20Okoljska%20analitika%20-%20navodila%20za%20vaje%20-%202%20termin%2017-3-2008.pdf) Dostop: november 2014.

27. [https:// facultystaff.richmond.edu/~cstevens/301/IS\\_General.html](https:// facultystaff.richmond.edu/~cstevens/301/IS_General.html) Dostop: december 2014.
28. <http://www.scbt.com/datasheet-219881-rac-sertraline-d3-hydrochloride.html> Dostop: junij 2015.
29. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/masspec/mplus2.html> Dostop: december 2014.
30. [http://www.waters.nl/SPE\\_CHEM.htm](http://www.waters.nl/SPE_CHEM.htm) Dostop: december 2014.
31. Certificate of Analysis: Oasis® HLB Extraction Cartridge, 2013.
32. <http://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X/X-CW%2C%20Weak%20Cation%20Mixed%20Mode?returnURL=/Products/Search/SPE> Dostop: december 2014.
33. ICH Harmonised Tripartite Guideline: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1), 2005.
34. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K: Introduction to Pharmaceutical Chemical Analysis. A John Wiley & Sons, Ltd. 2012: 30, 321–324.
35. Stanič U: Razgradnja nekaterih zdravilnih učinkovin in njihovih metabolitov v simuliranih pogojih čiščenja odpadnih voda. Diplomska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2010: 48.
36. Vione D, Maddigapu P.R, De Laurentiis E, Minella M, Pazzi M, Maurino V, Minero C, Kouras S, Richard C: Modelling the photochemical fate of ibuprofen in surface waters. Water Res 2011; 45: 6725–6736.
37. Huang J, Mabury S.A: Steady-state concentrations of carbonate radicals in field waters. Environ Toxicol Chem 2000; 19/9: 2181–2188.
38. [http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind\\_id=632](http://kazalci.arso.gov.si/?data=indicator&ind_id=632) Dostop: september 2015.
39. Šmidhofer Ž: Razvoj in validacija analizne metode na osnovi tekočinske kromatografije sklopljene z masno spektrometrijo za določanje sertralina v površinskih in odpadnih vodah. Magistrska naloga, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana 2015: 55.