

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ŽIGA ŠMIDHOFER**

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE NA OSNOVI TEKOČINSKE  
KROMATOGRFIJE SKLOPLJENE Z MASNO SPEKTROMETRIJO ZA  
DOLOČANJE SERTRALINA V POVRŠINSKIH IN ODPADNIH VODAH**

MAGISTRSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ŽIGA ŠMIDHOFER**

**RAZVOJ IN VALIDACIJA ANALIZNE METODE NA OSNOVI TEKOČINSKE  
KROMATOGRAFIJE SKLOPLJENE Z MASNO SPEKTROMETRIJO ZA  
DOLOČANJE SERTRALINA V POVRŠINSKIH IN ODPADNIH VODAH**

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF ANALYTICAL METHOD ON THE BASIS  
OF LIQUID CHROMATOGRAPHY COUPLED WITH MASS SPECTROMETRY FOR  
DETERMINATION OF SERTRALINE IN SURFACE AND WASTE WATERS

MAGISTRSKA NALOGA

LJUBLJANA, 2015

Magistrsko delo sem opravljal na Institutu Jožef Stefan in na Fakulteti za farmacijo pod somentorstvom doc. dr. Tine Kosjek, mag. farm. in pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se somentorici doc. dr. Tini Kosjek, mag. farm. in mentorju izr. prof. dr. Robertu Roškarju, mag. farm. za vso pomoč in nasvete, ki sta mi jih nudila pri izdelavi magistrske naloge. Obema se iskreno zahvaljujem za strokovno pomoč, trud, razumevanje ter optimizem in prijetno delovno okolje.

Največja zahvala pa gre družini, katera mi je v celotnem času študija stala ob strani in me podpirala.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Tine Kosjek, mag. farm..

Žiga Šmidhofer, Ljubljana 2015

## **Komisija za zagovor**

Predsednik komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

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

Somentor: doc. dr. Tina Kosjek, mag. farm.

Član komisije: doc. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

## Kazalo vsebine

Povzetek .....	III
Abstract.....	IV
Seznam kratic .....	V
1. Uvod .....	1
1.1 Selektivni zaviralci privzema serotonina .....	1
1.1.1 Kroženje SSRI in SER v okolju .....	2
1.1.2 Ekotoksičnost sertralina.....	5
1.1.3 Analizne metode za določanje SSRI-jev v okolju .....	7
2. Namen dela .....	15
3. Materiali in metode.....	16
3.1 Materiali.....	16
3.1.1 Reagenti in topila.....	16
3.1.2 Vzorci površinskih in odpadnih vod.....	16
3.1.3 Vode za pripravo delovnih raztopin SER .....	17
3.1.4 Standard in interni standard.....	17
3.1.5 Naprave in pribor.....	18
3.2 Metode .....	19
3.2.1 Razvoj in optimizacija.....	19
3.2.2 Optimizirana analizna metoda.....	25
3.2.3 Validacija metode SPE z LC-MS/MS .....	27
3.2.4 Vrednotenje metode.....	29
3.2.5 Analiza površinskih in odpadnih vod .....	30
4. Rezultati in razprava.....	31
4.1 Razvoj in optimizacija .....	31
4.1.1 Razvoj SPE.....	31

4.1.2	Razvoj LC-MS/MS.....	40
4.1.3	Težave pri analizi SER.....	42
4.2	Validacija metode SPE z LC-MS/MS .....	45
4.2.1	Izkoristek ekstrakcije pri različnih koncentracijah .....	45
4.2.2	Selektivnost .....	45
4.2.3	Linearnost.....	47
4.2.4	Ponovljivost in točnost priprave vzorca .....	49
4.2.5	Ponovljivost injiciranja.....	50
4.2.6	Meja zaznavnosti in meja določitve .....	51
4.3	Analiza površinskih in odpadnih vod .....	51
5.	Sklepi.....	54
6.	Literatura .....	56

## Povzetek

Sertralin (SER) je najpogosteje predpisan antidepresiv v Sloveniji, katerega poraba še narašča. Kemijsko je SER šibka baza s sorazmerno visokim adsorpcijskim koeficientom in razpolovnim časom fotolize v površinskih vodah. Zaradi teh lastnosti je SER dolgo obstojen v površinskih vodah, kjer se razporedi tudi v sediment. Površinske vode predstavljajo življenjsko okolje velikega števila različnih organizmov, ki so občutljivi na spremembe v svojem okolju. Prisotnost SER v okolju lahko pri ostalih sesalcih in tudi pri nevretenčarjih povzroči različne učinke. Za razvoj metode določanja SER v površinskih in odpadnih vodah smo se odločili, ker v Sloveniji še ni bila izvedena nobena študija, kjer bi določali SER v teh vodah. Zaradi pričakovanih zelo nizkih koncentracij SER v okolju (ng/L) smo morali vzorce najprej skoncentrirati na merljivo koncentracijo. Za koncentriranje in ekstrahiranje vzorcev smo uporabili metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE-ang. Solid phase extraction). V začetni fazi razvoja SPE smo SER v vzorcih detektirali z GC-MS (plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo), v drugem delu razvoja pa z LC-MS/MS (tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo) analizno metodo. Razvoj smo si zastavili tako, da smo najprej določili pomembne parametre pri SPE (izbor kolone za SPE, topila za kondicioniranje in elucijo, pH vzorcev za nanos, čas nanosa vzorcev in delež MeOH v topilu za spiranje). Začetni del razvoja SPE smo opravili z detekcijo na GC-MS, ki pa nam je omogočala le detekcijo razmeroma visokih koncentracij SER. Zaradi boljše občutljivosti in krajšega časa analize smo v drugem delu razvoja SPE uporabili LC-MS/MS analizno metodo. Pri prehodu na nižje koncentracije SER smo prvič zaznali kontaminacijo vzorcev s SER. Po ugotovitvi in odpravi glavnih vzrokov za kontaminacijo smo izvedli še validacijo optimizirane metode. Znotraj validacije smo vrednotili izkoristke pri različnih koncentracijah, selektivnost, dnevno in meddnevno točnost in ponovljivost, ponovljivost injiciranja, linearnost ter mejo določitve. Z validacijo smo dokazali ustreznost metode za določevanje SER v površinskih in odpadnih vodah. Z validirano metodo smo preizkusili še realne vzorce površinskih in odpadnih vod. V vzorcih površinskih vod je bil SER povsod pod mejo določitve, najbolj pa je glede na odziv izstopal vzorec Vz4, ki je bil zajet v reki Ljubljanici pri Zalogu. V odpadnih vodah smo SER določali v vodah, ki pritečejo v čistilno napravo (ČN) in v vodah, ki jo kasneje prečiščene zapustijo. V odpadnih vodah smo dokazali prisotnost SER v koncentracijskem območju od 16,7 do 38,8 ng/L, razvidno pa je tudi, da so ČN deloma učinkovite pri odstranjevanju SER, saj je bil odziv vzorcev odtoka za SER v vseh primerih nižji kot v vzorcih vod iz dotoka v ČN.

## Abstract

Sertraline (SER) is the most frequently prescribed antidepressant medication in Slovenia with its use still increasing. Chemically SER is a weak base with relatively high adsorption coefficient and high photolysis half-life in surface waters. As a consequence of these properties, SER is characterized by prolonged presence in surface waters and even distribution in earth's sediment. Surface waters represent a habitat for variety of different organisms which are sensitive to environmental changes. The presence of SER in these habitats can produce different effects in mammals as well as in invertebrates. The initial drive behind the development of a method for determining SER in surface and waste waters was the lack of studies in Slovenia which would determine SER presence in these waters. Due to expected low concentration of SER in the environment (ng/L concentrations) the samples were first concentrated to a measurable concentration. This was done by employing a solid phase extraction (SPE). In the first stage of SPE method development SER was detected via GC-MS, followed by the second stage consisting of LC-MS/MS sample analysis. Method development called for SPE parameter determination, such as the column used, solvents for conditioning and elution, sample pH and application time, and MeOH percentage in elution solvent. Initial approach with GC-MS method yielded detection only in samples with relatively high SER concentrations. In second phase, due to improved sensitivity and shorter analysis time, LC-MS/MS was applied for SER detection. While making a transition to low SER concentrations, sample contamination with SER was detected. Upon unmasking and eliminating primary causes for contamination, the optimized method was validated. Validation included the evaluation of recoveries at different concentrations, selectivity, day and intra-day accuracy and reproducibility of sample preparation, injection reproducibility, linearity and limit of quantification. With validation we've proved that our method is suitable for detecting SER in surface and waste waters. Afterwards validation method was tested on surface and waste water samples. Results from surface water samples have shown SER concentration below the limit of quantification in all cases. Out of these samples, Vz4, collected from river Ljubljanica at Zalog, stood out the most. On the other hand, waste water samples collected prior and after waste water filtrats have shown SER presence within 16.7-38.8 ng/L concentration range. It is also evident that, wastewater treatment plants are partly effective in SER removal since the SER concentration was lower in samples taken after the filtration process.

## Seznam kratic

**ACN** – acetonitril

**B** – baza

**CE** – kolizijska energija, ang. Collision energy

**CI** – kemijska ionizacija, ang. Chemical ionization

**CID** – s trki povzročena disociacija, ang. Collision induced dissociation

**CIT** – citalopram

**ČN** – čistilna naprava

**DAD** – detektor vrste diode array, ang. Diode array detector

**DDD** – definirani dnevni odmerek, ang. Defined daily dose

**DM** – diklorometan

**ECT** – escitalopram

**EC<sub>50</sub>** – koncentracija zdravila, ki povzroči 50% odziv od pričakovanega maksimalnega odziva, ang. Effective concentration

**EI** – ionizacija v električnem polju, ang. Electron ionization

**EMV** – ang. Electron multiplier voltage

**ESI** – ionizacija z razprševanjem v električnem polju, ang. Electrospray ionization

**EtAc** – etilacetat

**FAB** – bombardiranje s hitrimi atomi, ang. Fast atomic bombardment

**FDA** – ang. Food and Drug Administration

**FLV** – fluvoksamin

**FLU** – fluoksetin

**FT-ICR** – Fourierjeva transformacija – ionska ciklotronska resonanca, ang. Fourier Transform – ion cyclotron resonance

**GC** – plinska kromatografija, ang. Gas chromatography

**GC-MS** – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

**IC<sub>50</sub>** – srednja inhibitorna koncentracija, ang. Half maximal inhibitory concentration

**ICH** – Mednarodna konferenca o harmonizaciji, ang. International Conference on Harmonisation

**IJS** – Institut Jožef Stefan

**IS** – interni standard

**IT** – ionska past, ang. Ion trap

**LC** – tekočinska kromatografija, ang. Liquid chromatography

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

**LLE** – ekstrakcija tekoče-tekoče, ang. Liquid liquid extraction

**LPME** – tekočinska mikroekstrakcija, ang. Liquid-phase microextraction



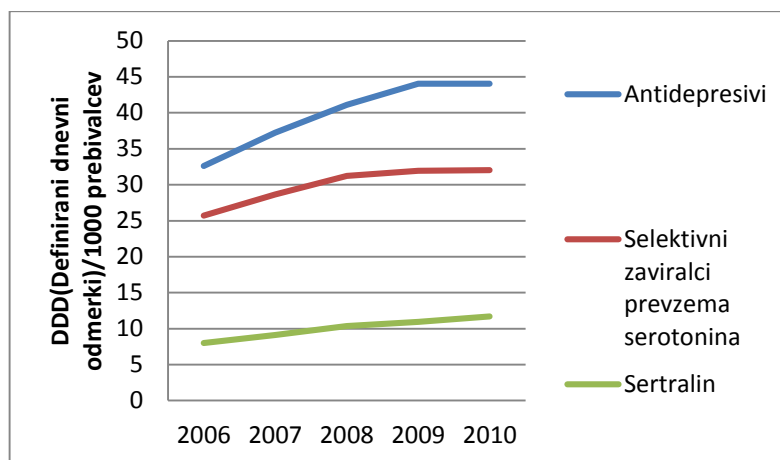
- LOD** – meja zaznavnosti, ang. Limit of detection
- LOEC** – najnižja koncentracija pri kateri so opazni učinki, ang. Lowest observed effect concentration
- LOQ** – meja določitve, ang. Limit of quantification
- MALDI** – laserska desorpcija/ionizacija iz matriksa, ang. Matrix assisted laser desorption ionization
- MAOI** – inhibitorji monoaminske oksidaze, ang. Monoamine oxidase inhibitors
- MeOH** – metanol
- MF** – mobilna faza
- MS/MS** – tandemsko masna spektrometrija
- m/z** – razmerje med maso in nabojem
- MRM** – spremljanje več reakcij, ang. Multiple reaction monitoring
- n** – število paralelk
- ND** – nismo detektirali, ang. Not detected
- NOEL** – najnižja koncentracija pri kateri ni opaznih učinkov, ang. No observed effect concentration
- PAR** – paroksetin
- PLE** – tekočinska ekstrakcija pri zvišanem tlaku, ang. Pressure liquid extraction
- RSD** – Relativni standardni odklon, ang. Relative standard deviation
- SD** – standardni odklon, ang. Standard deviation
- SER** – sertralin
- SER-d3** – trikrat devteriran sertralin
- SF** – stacionarna faza
- SIM** – spremljanje enega iona, ang. Single ion monitoring
- SLE** – ekstrakcija trdo-tekoče, ang. Solid Liquid extraction
- SPE** – ekstrakcija na trdnem nosilcu, ang. Solid phase extraction
- SPME** – mikroekstrakcija na trdnem nosilcu, ang. Solid phase microextraction
- SRM** – spremljanje ene reakcije, ang. Single reaction monitoring
- SSRI** – selektivni zaviralci privzema serotonina, ang. Selective serotonin reuptake inhibitors
- TCAs** – triciklični antidepresivi, ang. Tricyclic antidepressants
- TEA** – trietilamin
- TFC** – Turbo-flow kromatografija, ang. Turbo-flow chromatography
- TOF** – čas preleta, ang. Time of flight
- ZZZS** – Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije

## 1. Uvod

### 1.1 Selektivni zaviralci privzema serotonina

Med najpogosteje predpisane antidepresive prištevamo zaviralce monoaminske oksidaze (zaviralci MAO), triciklične antidepresive (TCAs) in selektivne zaviralce privzema serotonina (SSRI) (1). SSRI-ji predstavljajo zdravila prvega izbora pri terapiji depresije. Uporabljajo se tudi za terapijo bipolarnih motenj, napadov panike, posttravmatskega stresa, bulimije in drugih kompulzivnih motenj (2, 3). Med SSRI-je prištevamo fluoksetin (FLU), citalopram (CIT), paroksetin (PAR), sertralin (SER), fluvoksamin (FLV) in escitalopram (ECT) (4). Za razliko od tricikličnih antidepresivov SSRI-jev ne povezuje skupna osnovna struktura, kar nakazuje na to, da lahko prihaja do razlik pri farmakološkem delovanju in pri klinični učinkovitosti znotraj posameznih predstavnikov skupine (5). SSRI-ji se v možganih vežejo na transportne proteine v serotoninskih sinapsah in tako blokirajo ponoven privzem živčnega prenašalca serotonina, kar povzroči povečanje koncentracije le tega v sinaptičnih špranjah in posledično povečanje prevodnosti na serotoninskih nevronih (6). Serotonin se ne nahaja samo pri človeku ampak ga najdemo tudi pri drugih sesalcih in v različnih debelih nevretenčarjev. Aktivacija serotoninskih receptorjev pri drugih vrstah lahko povzroči drugačne učinke kot pri človeku (7). Kot večina zdravilnih učinkovin so SSRI-ji podvrženi metabolizmu v jetrih, kjer nastanejo bolj polarni metaboliti, ki se lažje izločijo iz telesa. Največkrat nastanejo N-demetilirani produkti, ki v skoraj vseh primerih ohranijo farmakološko aktivnost. Vsi glavni metaboliti SSRI-jev razen norfluoksetin imajo nižjo farmakološko učinkovitost kot osnovne učinkovine (8). Stopnja izločanja SSRI-jev skozi ledvica je splošno nizka, v povprečju se skozi ledvica izloči manj kot 12% SSRI-jev v nespremenjeni obliki (9). Po podatkih iz literature naj se bi skozi ledvica izločilo samo 0,2% SER v nespremenjeni obliki (1). Zaradi večjega števila ugotovljenih razpoložljivih motenj in zaradi večje ozaveščenosti družbe o pomembnosti duševnega zdravja poraba zdravil za terapijo duševnih motenj, predvsem SSRI-jev v zadnjih letih narašča (10). Po podatkih dosegljivih v publikaciji Eurobarometer on mental health iz leta 2010 je bilo kar 7% ljudi v EU in 8% ljudi v Sloveniji v letu 2009 na terapiji z antidepresivi (11). Glede na podatke ZZZS-ja (Zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije) so SSRI-ji v letu 2010 v Sloveniji predstavljali 72,7% delež med vsemi antidepresivi, SER pa je predstavljal 36,6% delež med vsemi SSRI-ji na slovenskem tržišču in 26,6% delež med vsemi antidepresivi, kar SER uvršča na sam vrh porabe antidepresivov v Sloveniji (12). Kot vidimo na sliki 1 poraba

antidepresivov, SSRI-jev in SER v Sloveniji narašča. V letu 2010 je poraba SER znašala 11,7 definirane dnevnega odmerka (DDD)/1000 prebivalcev.



Slika 1: Poraba antidepresivov, SSRI-jev in SER v Sloveniji (12)

### 1.1.1 Kroženje SSRI in SER v okolju

Vir kontaminacije odpadnih vod s SSRI-ji predstavljajo človeški izločki, neporabljena zdravila, ki so nepravilno zavržena in farmacevtska industrija. Glavni vir vstopa SSRI-jev v okolje predstavljajo ČN, ki niso dovolj učinkovite, da bi SSRI-je uspešno odstranile iz odpadnih vod (10). Antidepresivi se klinično uporabljajo v različnih zdravstvenih ustanovah (bolnišnicah, domovih za ostarele...), vendar tukaj predstavljajo majhen doprinos k vsem izločenim antidepresivom v odpadne vode. Pri študiji izvedeni v Oslu, so ugotovili, da SER in PAR iz bolnišničnih odplak predstavljata le 0,5% oz. 0,1% delež glede na celotno količino SER in PAR v vseh odplakih, ki pritečejo na to ČN (13). Glavni vir kontaminacije so tako odplake iz gosto naseljenih območij, saj se antidepresivi v večjem obsegu uporabljajo izven zdravstvenih ustanov (1). Vir kontaminacije predstavlja tudi odpadno blato, ki se nalaga v čistilnih napravah in ga nato kasneje deponirajo. To blato deževnica spira v okoliške vode kar predstavlja nevarnost za organizme v vodnem okolju in tudi na kopnem (14). Od leta 1998, ko je Evropska unija prepovedala odlaganje odpadnega blata v morju se blato daje v sežig ali pa se odlaga na kmetijskih površinah (15).

Kakšna bo usoda SSRI-jev v okolju lahko predvidevamo iz njihovih kemijskih lastnosti. SSRI-ji so šibke baze, ki so največkrat v obliki hidrokloridov in imajo nizek koeficient porazdelitve oktanol/voda ( $K_{ow}$ , 1,12-1,39) in s tem posledično relativno visoko topnost v vodi. Ta skupina zdravil pa ima razmeroma visok adsorpcijski koeficient ( $\log K_{oc}$ ), ki opisuje porazdeljevanje preiskovane substance med tekočo in trdno fazo (sediment oz. odpadno blato), normalizirano na vsebnost organskega ogljika v prsti oz. sedimentu. Za SER znaša

povprečni  $\log K_{oc}$  določen v petih različnih vzorcih sedimentov in prsti 4,17 (16). Zaradi visokega adsorpcijskega koeficienta se pričakuje, da se bo večina SSRI-jev sčasoma razporedila v sedimente, njihova koncentracija v vodah pa bo zaradi tega nižja (17). Raziskave so pokazale, da sta FLU in SER v sedimentih dobro obstojna. Koncentracija FLU se je v 30-tih dneh v sedimentu minimalno znižala, medtem ko je koncentracija SER po 30-tih dneh padla za 20% (17).

SSRI-ji so sintetične organske spojine z določenim farmakološkim delovanjem za katerega potrebujejo visoko stopnjo kemijske stabilnosti. To dejstvo pa posledično predstavlja problem pri učinkovitem odstranjevanju SSRI-jev iz odpadnih vod, prav tako pa so le ti v okolju zaradi dobre stabilnosti obstojni dlje (1). Glavne poti razgradnje SSRI-jev v okolju so fotoliza, mikrobiološka razgradnja in hidroliza. Kwon in Ambrust sta sicer dokazala, da je FLU v laboratorijskih pogojih v vodi pri različnih pH-jih dobro odporen na vse omenjene procese razgradnje, prav tako pa ima visoko stopnjo privzema v sedimente (16). Po odpornosti na fotolizo v jezerski vodi mu nato sledita CIT in SER. Razpolovni čas fotolize SER v jezerski vodi znaša 23 dni, medtem, ko znaša razpolovna doba fotolize SER pri pH-ju 9 samo še 10 dni (17). V okoljskih vodah so SSRI-ji dobro obstojni, velik del pa se jih adsorbira v sedimente, kjer so zaradi pomanjkanja procesov razgradnje obstojni še dlje časa (8). Raziskave so pokazale, da je odstranjevanje SER iz odpadnih vod s pomočjo čistilnih naprav nepopolno (2). V preteklih letih so dokazali prisotnost SER v velikem številu vzorcev iz čistilnih naprav in tudi površinskih vod. Dokazali pa so tudi, da se SER akumulira v vodnih organizmih. V preglednicah I in II so predstavljeni rezultati dosedanjih raziskav, pri katerih so SER določali v vzorcih odpadnih in površinskih vod.

Preglednica I: Pregled raziskav, kjer so dokazali SER v odpadnih vodah, povzeto po (1)

Država	Vtok (ng/L)	Iztok (ng/L)	Referenca	Leto izvedbe
Kanada	6 -6,1	5,1-5,8	(9)	2008
Kanada	14-34	/ (ni bilo meritve)	(18)	2010
Norveška	8,4-19,8	3,7-14,6	(19)	2008
ZDA	60	55,2	(2)	2008

V dveh raziskavah, ki so ju izvedli v ZDA, so v več vzorcih rečnega sedimenta odkrili prisotnost SER v koncentracijah med 0,09 in 0,67 ng/g (17) in v koncentracijah med 0,27 in 17,71 ng/g (20).

Preglednica II: Pregled raziskav, kjer so dokazali SER v površinskih vodah, povzeto po (1)

Država	Površinska voda	Koncentracija v reki (ng/L)	Referenca	Leto izvedbe
Kanada	St. Lawrence River	0,84-2,4	(9)	2008
Kanada	Grand River	6-17	(18)	2010
Norveška	Morska voda	<0,16	(19)	2008
Španija	Llorbregat reka	11	(21)	2011
ZDA	Površinska voda	1,1-34,9	(17)	2007
ZDA	Površinska voda	33-49	(2)	2008
ZDA	Površinska voda	<0,5-37,5	(20)	2010
Poljska	Utrata	<3,1	(4)	2014

Iz preglednic I in II je razvidno, da se SER nahaja v odpadnih in površinskih vodah. Razvidno je tudi, da so čistilne naprave le deloma učinkovite pri odstranjevanju SER iz odpadnih vod. Najverjetneje je, da se del SER v čistilnih napravah iz vode prerazporedi v sediment, ki ga nato deponirajo v okolju.

Leta 2004 je Brooksu uspelo odkriti, da se FLU in SER ter njuni metaboliti akumulirajo v mišicah, ledvicah in v možganih v različnih vrstah rib, ki so izpostavljene tem substancam v vodnem okolju. To je bila prva študija, kjer so dokazali kopičenje SSRI-jev v okoljskih organizmih. Kot je razvidno iz preglednice III, so bile najvišje koncentracije FLU in SER najdene v možganih in v ledvicah, povprečne koncentracije obeh metabolitov v vseh tkivih pa so bile višje od osnovnih substanc (22).

Preglednica III: SSRI-ji v različnih tkivih v ribah, povzeto po (22)

Tkivo	Koncentracija (ng/g $\pm$ SD)		
	Možgani	Ledvica	Mišice
FLU	1,58 $\pm$ 0,74	1,34 $\pm$ 0,65	0,11 $\pm$ 0,03
Norfluoksetin	8,86 $\pm$ 5,90	10,27 $\pm$ 5,73	1,07 $\pm$ 0,41
SER	4,27 $\pm$ 1,40	3,59 $\pm$ 1,67	0,34 $\pm$ 0,09
Demetilsertalin	15,60 $\pm$ 14,30	12,94 $\pm$ 10,45	0,69 $\pm$ 0,59

Podobna študija je bila izvedena tudi leta 2005, kjer so prav tako dokazali kopičenje SER v možganih rib v koncentracijah od 0,98 do 2,10 ng/g in demetilsertalina v koncentracijah, ki so bile v območju do 28,90 ng/g (21). V tej raziskavi so prav tako dokazali prisotnost SER in ostalih SSRI-jev v površinski vodi in v sedimentu. Rezultati v preglednici IV prikazujejo razporeditev SER v sedimentu in v rečni vodi vzdolž reke Boulder Creek v letu 2005. Mesta zajema vzorcev si sledijo od mesta nad pritokom čistilne naprave v reko (BC1) ter do od ČN vzdolž toka najbolj oddaljenega mesta zajema (BC4).

Preglednica IV: Razporeditev SER v vodnem okolju, povzeto po (21)

Vzorec	BC1 (Boulder Creek 1)	BC2	BC3	BC4
Rečna voda (ng/L)	ND*	2,20-5,15	2,97-5,92	0,84-3,22
Sediment (ng/g)	0,27-0,37	0,88-5,90	14,37-14,43	12,91-17,71

\*ND – ni bilo detektirano

### 1.1.2 Ekotoksičnost sertralina

Možnost vpliva farmacevtskih substanc in izdelkov za osebno nego v zelo nizkih koncentracijah v vodnih okoljih na razvoj vodnih organizmov je bila svetu prvič predstavljena leta 1985 (1). Učinki povezani z večjo koncentracijo serotonina v sinaptičnih špranjah se pri nižjih vretenčarjih in nevretenčarjih razlikujejo od tistih pri človeku. Posledično se lahko razlikujejo tudi učinki, ki jih imajo SSRI-ji na posamezne vrste (7). Negativni učinki SSRI-jev na vodne organizme, ki so izpostavljeni tem zdravilom so lahko naslednji: zapleti pri razvoju embrija, zmanjšanje reprodukcije, zakasnitev fiziološkega razvoja, zakasnitev nastopa obdobja spolne zrelosti in zmanjšanje agresije (1,14). SSRI-je so v dveh raziskavah primerjali med seboj in ugotovili naslednjo stopnjo akutne toksičnosti pri vodnih bolhah (od najmanjše do največje): CIT, FLV, PAR, FLU in SER. Teste so izvedli na vodnih bolhah *Ceriodaphnia dubia* (23) in *Daphnia magna* (24). Rezultati so pokazali vrednost  $EC_{50} = 0,12$  mg/L (23) in  $EC_{50} = 0,92$  mg/L (24) za SER pri 48 urnem testu, kjer vrednost  $EC_{50}$  predstavlja koncentracijo SER pri kateri je po 48 urah polovica organizmov negibnih. V isti raziskavi so dokazali  $EC_{50} = 4,3 \times 10^{-2}$  mg/L za SER pri 48 urnem testu na algi *Pseudokirchneriella subcapitata* (24). Pri testu kronične toksičnosti SER na vodni bolhi *Ceriodaphnia dubia* so določili vrednost LOEC (ang. Lowest observed effect concentration) za SER pri  $4,5 \times 10^{-2}$  mg/L in NOEC (ang. No observed effect concentration) pri  $9,0 \times 10^{-3}$  mg/L (23).

Podrobno raziskavo o ekotoksičnosti in citotoksičnosti SER so opravili leta 2009 na Irskem. V raziskavi so določali akutno in kronično ekotoksičnost SER s pomočjo nabora različnih testov, ki so vključevali teste na bakterijah (*Vibrio fischeri*), algah (*Pseudokirchneriella subcapitata*), nevretenčarjih (rak *Thamnocephalus platyurus* in *Daphnia magna*) in ribah (*Oncorhynchus mykiss*). Citotoksičnost so določali na dveh ribjih celičnih linijah PLHC-1 in RTG-2 s pomočjo treh barvil s katerimi so določali število mrtvih celic (7). Rezultati so prikazani v Preglednici V.

Preglednica V: Akutna toksičnost SER, povzeto po (7)

Vrsta	Test	EC <sub>50</sub> (mg/L)	NOEC (mg/L)	LOEC (mg/L)
Vibrio fischeri	5 min inhibicija	10,72	2,25	4,5
Vibrio fischeri	15 min inhibicija	9,2	2,25	4,5
Vibrio fischeri	30 min inhibicija	7,3	2,25	4,5
Pseudokirchneriella subcapitata	72 h inhibicija	0,14	0,05	0,075
Thamnocephalus platyurus	24 h smrtnost	0,6	0,4	0,6
Daphnia magna	24 h imobilizacija	3,1	-	-
Daphnia magna	48 h imobilizacija	1,3	0,1	0,18
Daphnia magna	21 dnevna smrtnost	0,12	0,032	0,1
Daphnia magna	21 dnevna reprodukcija	0,066	0,032	0,1
Oncorhynchus mykiss	96 h smrtnost	0,38	0,1	0,32

Kot je razvidno iz preglednice V je bil najmanj občutljiv test akutne toksičnosti na morskih bakterijah *Vibrio fischeri* (EC<sub>50</sub>=10,72 mg/L), najbolj občutljiv pa je bil test 21 dnevne reprodukcije na vodni bolhi *Daphnia magna* (EC<sub>50</sub>=6,6×10<sup>-2</sup> mg/L). Pri določanju kronične toksičnosti SER na vodni bolhi so določili vrednost LOEC=0,1 mg/L in NOEC=3,2×10<sup>-2</sup> mg/L. Pri testu citotoksičnosti na ribjih celičnih linijah PLHC-1 in RTG-2 so za SER določili vrednosti EC<sub>50</sub>=2,2 mg/L in EC<sub>50</sub>=3,1 mg/L.

Zelo dobro občutljivost je imel test vpliva SER na inhibicijo rasti različnih alg, kjer so določili IC<sub>50</sub>= 12,10×10<sup>-3</sup> mg/L za algo *Pseudokirchneriella subcapitata* (25). V isti raziskavi jim je prav tako uspelo dokazati vpliv zmesi treh SSRI-jev (SER, FLU, FLV) na razvoj fitoplanktona. Za najbolj občutljivi test se je po sedmih dneh izpostavitve zmesi SSRI-jev pokazal test, pri katerem so določali število organizmov skupine Cryptophyta in Dinophyta z EC<sub>50</sub>=99,6 nmol/L. Po 35-tih dneh izpostavitve pa je najboljšo občutljivost pokazal test vpliva na reprodukcijo celotnega fitoplanktona z EC<sub>50</sub>=246,9 nmol/L zmesi SSRI-jev (25).

SSRI-ji predstavljajo razmeroma novo skupino zdravilnih učinkovin, katerih poraba je še vedno v porastu (12). Leta 2006 je nehal veljati Pfizerjev patent za SER, zato so začela zdravilo izdelovati tudi generična farmacevtska podjetja, kar bo še povečalo dostopnost tega zdravila (26). Zavedati pa se je potrebno tudi, da se v okoljskih vodah poleg SER nahajajo tudi drugi SSRI-ji, ki imajo podobne učinke in lahko v kombinaciji kljub posameznim nizkim koncentracijam povzročajo različne učinke v vodnih organizmih (24,25).

Če primerjamo rezultate v preglednici II, kjer so navedene koncentracije v različnih vzorcih okoljskih vod in rezultate testov ekotoksičnosti in citotoksičnosti, pridemo do ugotovitve, da

so koncentracije SER, ki so jih dokazali v okolju za nekaj velikostnih razredov nižje kot tiste pri katerih se pojavijo merljivi toksični učinki pri različnih vodnih organizmih. Moramo pa se zavedati dejstva, da so vodni organizmi izpostavljeni nizkim koncentracijam SSRI-jev skozi celotno življenjsko obdobje, zato bi bilo potrebno izvesti raziskave, kjer bi merili vplive SSRI-jev v daljšem časovnem obdobju.

### **1.1.3 Analizne metode za določanje SSRI-jev v okolju**

Hiter napredek na področju novih analiznih tehnik in instrumentacije v zadnjem desetletju je pripomogel k odkritju velikega števila potencialno nevarnih substanc, ki se že nahajajo v okolju (10). Ob pojavu SSRI-jev so bile za klinične namene najprej razvite analizne metode za njihovo določanje v krvi, plazmi in urinu (27), za analizo v okoljskih koncentracijah pa je bilo potrebno razviti zanesljive, specifične in občutljive analitske metode. V preteklosti se je za analizo SSRI-jev pogosto uporabljala plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS), v zadnjem času pa je pogosteje v uporabi tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) (9). Okoljski vzorci potrebujejo zaradi svoje kompleksnosti, prisotnosti različnih interferenc in zaradi nizkih koncentracij analitov pred analizo še čiščenje in koncentriranje. S takšno pripravo vzorcev izboljšamo občutljivost in specifičnost celotne analizne metode.

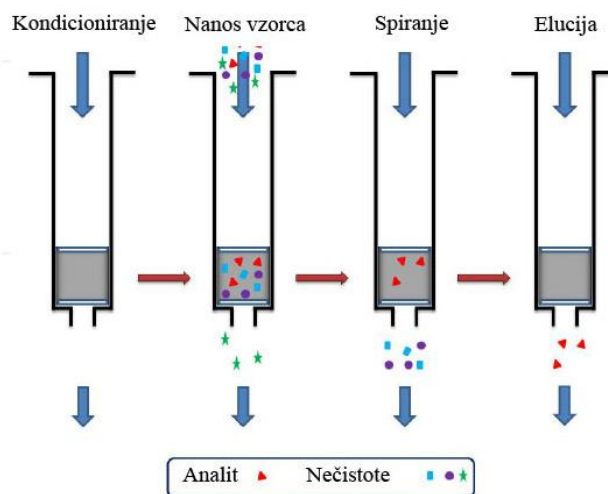
#### **1.1.3.1 Priprava vzorcev**

Namen priprave vzorcev je čiščenje oz. odstranitev motečih komponent in koncentriranje na merljivo koncentracijo ter raztapljanje v topilu primernem za nadaljnjo analizo z GC-MS ali LC-MS/MS instrumenti (8). Za ekstrakcijo SSRI-jev so bile v preteklosti uporabljene naslednje metode: ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE), ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE - ang. Liquid liquid extraction), ekstrakcija trdo-tekoče (SLE – ang. Solid liquid extraction), tekočinska mikroekstrakcija (LPME - ang. Liquid-phase microextraction), mikroekstrakcija na trdnem nosilcu (SPME - ang. Solid phase microextraction), tekočinska ekstrakcija pri zvišanem tlaku (PLE - ang. Pressure liquid extraction) in Turbo-flow kromatografija (TFC - ang. Turbo-flow chromatography) (10).

SPE predstavlja metodo izbora priprave vzorcev pri določevanju SSRI-jev v okolju. Osnovni princip SPE je porazdeljevanje analitov iz tekoče v trdno fazo. Vzorce se običajno nanese v kolone z uporabo membranske ali oljne črpalke, ki v kadički za ekstrakcijo ustvari podtlak, ki nato vzorec potegne iz čaše skozi cevke v kolono in skozi njo. Prvi del procesa priprave vzorcev predstavlja kondicioniranje sorbenta z različnim topili, s čim dosežemo, da se le ta



omoči in tako preide v aktivno stanje, v katerem je sposoben vezati analit. Sledi nanos vzorca, spiranje in elucija analita iz sorbenta z ustreznimi topili kot vidimo na sliki 2.



Slika 2: Prikaz ekstrakcije z SPE, povzeto po (28)

Način priprave vzorcev z SPE je primeren zaradi razmeroma nizke porabe topil, visoke selektivnosti, dobrega izkoristka ekstrakcije in možnosti direktne povezave z LC-MS/MS in GC-MS instrumentalnima metodama. Kljub možnosti avtomatizacije celotnega postopka se še vedno v večini uporablja neavtomatizirana »off-line« priprava vzorcev. Poznamo več tipov kolon, ki se med seboj razlikujejo po kemijski strukturi sorbenta. Za analizo SSRI-jev so v raziskavah uporabljali reverzno-fazne silikatne sorbente, reverzno-fazne polimerne sorbente, ionsko izmenjevalne sorbente in kolone, diske ali mikrotitrne ploščice z mešanimi sorbenti (10). Glavna predstavnika reverzno-faznih silikatnih sorbentov sta C8 in C18 sorbenta, ki zagotavljata ustrezno ekstrakcijo nepolarnih analitov iz polarnega vzorca. V primeru teh kolon silikagel predstavlja osnovo, na katero so vezane verige z 8 ali 18 ogljikovimi atomi. Glavna slabost teh nosilcev je, da imajo v svoji strukturi še vedno nekaj prostih silanolnih skupin, ki se lahko preko vodikove vezi povežejo z amini v SSRI-jih. Nosilca sta tudi nespecifična in vežeta večino nepolarnih interferenc. Zaradi povečanega zadrževanja analitov na koloni je lahko izkoristek ekstrakcije nižji, zato je pri reverzno-faznih silikatnih sorbentih pogosto potrebno prilagoditi pH vzorca (8,10).

Najpogosteje se za analizo SSRI-jev uporabljajo reverzno-fazni polimerni nosilci, kot je polidivinilbenzen vinilpirilodin. Retencija preiskovanih analitov temelji na tvorbi lipofilnih (Van der Waalsove vezi) in hidrofilnih (vodikove vezi in interakcija dipol-dipol) interakcij s tem sorbentom (29). Prednost tega sorbenta je, da pred ekstrakcijo ni potrebno uravnati pH-ja vzorca, saj je stabilen pri vseh vrednostih in je uporaben za analizo širokega nabora

različnih substanc. Pri ekstrakciji SER s tovrstnimi kolonami smo zasledili izkoristke ekstrakcije v vrednosti od 50 do 150% (10). V enem izmed virov je navedeno, da se izkoristek izboljša z alkaljenjem vzorcev na pH=12, saj v tem primeru SSRI-ji niso protonirani in se lažje vežejo na nepolarne sorbente (27). Za spiranje kolon, to je odstranjevanje motečih komponent, so v raziskavah uporabljali različna razmerja metanola (MeOH) v vodi v volumnih do 8 mL. Najmočnejše topilo za spiranje nanosa vzorca odpadne ali površinske vode v dosedanjih raziskavah z uporabo HLB nosilca je za kolono s 500 mg sorbenta predstavljalo 5 mL 70% MeOH v 2% amonijevem acetatu (10). Za elucijo SER iz Oasis® HLB nosilcev so avtorji uporabljali različna topila, od MeOH pa do kompleksnih mešanic MeOH, etilacetata (EtAc), diklorometana (DM), 2-propanola in heksana z dodatkom kisline ali baze.

V praksi so bile uporabljene tudi Strata™-X kolone (reverzno fazni polimerni sorbent), ki dajejo prav tako zelo visok izkoristek ekstrakcije (10).

Ker so SSRI-ji pri tipičnih pH vrednostih okoljskih vod pozitivno nabiti jih lahko ekstrahiramo tudi s pomočjo kationskih izmenjevalcev. Za zagotovitev pozitivne nabitosti vseh molekul analita moramo pH vrednost znižati vsaj dve enoti od pKa vrednosti preiskovanega analita, pri eluciji pa moramo dodati bazo (8). Velika prednost kationskih izmenjevalcev je, da jih lahko spiramo z močno polarnimi topili, brez da bi pri tem izgubili preiskovani analit in se tako učinkovito znebimo nečistot v kompleksnih matriksih (10). Pri ekstrakciji SSRI-jev z uporabo kationskih izmenjevalcev v eni izmed raziskav so za vse SSRI-je dosegli izkoristke višje od 80% (9).

Za ekstrakcijo SSRI-jev se uporabljajo tudi mešani sorbenti, kateri vsebujejo polimerne ostanke na katere so vezani močni kationski izmenjevalni nosilci. Tako dobimo sorbente, ki so sposobni vezave analitov preko tvorbe hidrofobnih,  $\pi$ - $\pi$ , vodikovih in ionskih vezi (10). V eni izmed raziskav, v kateri so za ekstrakcijo SSRI-jev uporabljali kolone Strata™ X-C so dosegli izkoristke med 44 in 95% (30). Za pripravo vzorcev SSRI-jev z mešanimi sorbenti se glede na literaturo najbolj uporabljajo kolone Oasis® MCX (10).

Mnenja o najbolj učinkovitem sorbentu za pripravo vzorcev SSRI-jev so deljena, še vedno pa največ raziskovalcev za pripravo vzorcev površinskih in odpadnih vod uporablja HLB Oasis® kolone (10).

Za ekstrakcijo vzorcev so v uporabi tudi druge metode. Za ekstrakcijo LLE je značilno razporejanje analitov iz vodnega medija v organsko topilo za ekstrakcijo, ki mora biti

izbrano glede na lastnosti preiskovanega analita. Slabost priprave vzorcev z LLE predstavlja dolg čas trajanja ekstrakcije pri vzorcih velikih volumnov, visoka poraba organskih topil, veliki volumni končnih vzorcev in možnost nastanka emulzij, ki zmanjšajo izkoristke. LLE se lahko uporablja tudi kot faza čiščenja vzorcev pred ekstrakcijo z SPE (10,30).

Pri metodi SLE gre v osnovi za razporejanje analita iz trdne faze v tekočo in se uporablja pri pripravi vzorcev sedimentov in tkiv različnih organizmov. Priprava vzorcev je pri SLE daljša in zahtevnejša ter vsebuje še predpripravo vzorcev s homogenizacijo, centrifugiranjem in obdelavo z ultrazvokom. Najpomembnejši korak pri SLE je izbor primerne topila za ekstrakcijo. Glede na literaturo so s SLE dosegli uspešnost ekstrakcije SER okoli 60% (31).

### **1.1.3.2 Instrumentalna analiza**

Pri analizi SSRI-jev v okolju se najpogosteje uporabljata plinska in tekočinska kromatografija sklopljeni z masnospektrometrično detekcijo.

#### ***Separacijske metode***

Kromatografska ločba analitov temelji na razporejanju analitov med trdno ali tekočo stacionarno fazo (SF) in med tekočo ali plinasto mobilno fazo (MF). Analiti (spojine) se pri potovanju skozi kolono ločijo zaradi njihovih različnih fizikalno-kemijskih lastnosti, ki povzročijo različno afiniteto analitov do SF oz. MF. Višjo afiniteto kot jo ima analit do SF, dlje se bo zadržal na koloni in obratno. Kromatografijo lahko ločimo na normalno in reverzno-fazno. Pri normalno-fazni kromatografiji je SF polarna, MF pa nepolarna in tako omogoča učinkovito ločevanje polarnih analitov. Obratno je pri reverzno-fazni kromatografiji, ki omogoča ločevanje nepolarnih spojin. Pri GC metodi predstavlja MF inertni plin (30).

#### **Plinska kromatografija**

Metoda GC temelji na potovanju uparjenih analitov v nosilnem plinu skozi kolono, ki ima trdno ali tekočo imobilizirano SF. Nosilni plin (helij, dušik, argon) je pri GC inerten, molekule pa se med seboj ločijo samo na podlagi afinitete do stacionarne faze. Spojine za analizo z GC morajo biti termostabilne, manj polarne in dovolj hlapne (30).

#### **Derivatizacija**

Spojine, ki ne izpolnjujejo zahtev za analizo z GC-MS metodo je potrebno predhodno derivatizirati z različnimi reagenti tako, da nastanejo bolj hlapne, stabilne in manj polarne spojine. Z derivatizacijo se prav tako doseže boljše občutljivost in selektivnost celotne metode. Mnoge spojine imajo v svoji strukturi funkcionalne skupine, ki naredijo spojino zelo

polarno, kar povzroči, da se spojine zelo dolgo zadržujejo na koloni oz. da do elucije sploh ne pride. Z derivatizacijo teh funkcionalnih skupin pride do zmanjšanja polarnosti in povečanje hlapnosti, tako, da pride do ločbe in elucije teh spojin iz kolone v razumnem času. Derivatizacija preiskovanih analitov poteka s kemično reakcijo, pri kateri je zelo pomembna pravilna izbira reagenta in pogojev reakcije, da pride do nastanka derivatov, ki so primerni za nadaljnjo analizo. Za derivatizacijo se običajno uporabljajo naslednji postopki: Derivatizacija na koloni, derivatizacija z dialkil acetali, siliranje, esterifikacija in acetiliranje. SER ima v svoji strukturi polarno sekundarno aminske funkcionalno skupino, katero lahko direktno derivatiziramo z reakcijo acetiliranja. Kot reagent se za to reakcijo uporablja anhidrid očetne kisline v topilu piridin. Za derivatizacijo sekundarnih aminov je pogosto v uporabi tudi siliranje. Derivatizacija ima tudi nekaj pomanjkljivosti saj dodatno podaljša čas analize, lahko povzroči nastanek nestabilnih produktov, zniža izkoristek celotnega postopka priprave vzorcev ter predstavlja korak v celotnem postopku kjer lahko pride do zapletov in izgub analita (32).

### **Tekočinska kromatografija**

Pri tekočinski kromatografiji je mobilna faza tekoča. V primeru tekočinske kromatografije je ključnega pomena izbor ustreznega topila za kromatografijo, saj se analiti, za razliko od GC, razporejajo med SF in MF tudi na podlagi afinitete do MF (30). V preteklosti je bila za separacijo SSRI-jev v večini uporabljena tekočinska kromatografija, saj je le-ta primernejša za bolj polarne analite, zahteva pa tudi krajši čas priprave vzorcev v primerjavi z GC (8). Pri separaciji SSRI-jev z LC raziskovalci najpogosteje uporabljajo reverzno-fazne C-18 kolone. Uporabljajo se tudi fenilne kolone s katerimi so v nekaterih raziskavah dosegli boljše separacijo kot s C-18 kolonami. Fenilne kolone lahko za razliko od C-18 kolon preko benzenovega obroča vzpostavijo  $\pi$ - $\pi$  interakcije s SSRI-ji in tako posledično omogočajo boljše separacijo (2). Vrstni red elucije SSRI-jev z uporabo C-18 kolon je sledeč: CIT < FLV < PAR < FLU < SER (10). Kot mobilno fazo so v dosedanjih raziskavah najpogosteje uporabljali različne mešanice MeOH in vode z dodatkom kisline ali baze. V večini raziskav jim je uspelo dokazati, da dodatek metanojske in etanojske kisline v koncentracijah od 0,01 do 5% v MF izboljša separacijo in občutljivost celotne metode, pri kateri se izvaja ionizacija v pozitivnem ESI (ang. electrospray ionization) načinu (10).

### ***Detekcijske metode***

Za analizo se najpogosteje uporabljata GC sklopljen z masnim spektrometrom (MS) in LC sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (MS/MS). Vzorci, ki pripotujejo iz kolone

morajo biti za nadaljnjo analizo na masnem detektorju v plinastem in ioniziranem stanju. To se doseže z odparevanjem topila in ionizacijo vzorcev. Poznamo t.i. Gas-phase source metode, pri katerih se vzorec najprej uplani, šele nato pa ionizira. Metode so primerne za ionizacijo termostabilnih substanc, ki imajo temperaturo vrelišča nižjo od 500 °C in maso nižjo od 1000 Da. Med te metode spadata kemična ionizacija (CI) in ionizacija z elektroni (EI). Za termično nestabilne in manj hlapne analite pa so v uporabi t.i. Desorption source tehnike ionizacije, pri katerih pride do neposredne pretvorbe analita iz tekočega ali trdnega stanja v plinski ion. Te metode so: elektrorazprševalna ionizacija (ESI), kemična ionizacija pri atmosferskem tlaku (APCI), laserska desorpcija/ionizacija iz matriksa (MALDI) in bombardiranje s hitrimi atomi (FAB) (30).

### **Ionizacija z elektroni (EI)**

Pri procesu ionizacije z elektroni vzorec najprej segrejemo na temperaturo pri kateri se nahaja v plinastem stanju. Vzorec nato izpostavimo toku elektronov. Do ionizacije pride, ko elektron z energijo okoli 70 eV pride dovolj blizu nevtralne molekule, da povzroči elektrostatični odboj zunanjega elektrona, tako dobimo molekularni kation. Pri EI se najpogosteje uporablja energija 70 eV. Pri manjši energiji bi bila ionizacija neučinkovita, pri višji energiji pa bi bila fragmentacija prevelika kar bi zmanjšalo kvaliteto informacij v masnem spektru (30).

### **Elektrorazprševalna ionizacija**

Za ionizacijo vzorcev SSRI-je se najpogosteje uporablja pozitivna ESI metoda, ki je primerna za ionizacijo anorganskih substanc, proteinov, polipeptidov in različnih biomolekul z maso višjo od 100000 Da. ESI se uporablja pri uvajanju vzorca iz LC v MS in poteka pri atmosferskem tlaku in pri sobni temperaturi, kar omogoča učinkovito ionizacijo termolabilnih vzorcev. V primeru, da s to metodo ionizacije dobimo anione govorimo o negativni ESI, če pa dobimo katione govorimo o pozitivni ESI. Negativno ESI uporabljamo kadar imamo v vzorcu analite s funkcionalnimi skupinami, ki oddajajo proton (fenolni alkohol, karboksilna skupina), pozitivno ESI pa kadar ima analit v svoji strukturi funkcionalno skupino ki sprejme proton (aminska skupina) (30).

Do nastanka ionov prihaja na ionskem izvoru tako, da vzorec iz kromatografske kolone potuje skozi jekleno iglo, na konici katere je napetost nekaj kilovoltov, ki pri razprševanju skozi to iglo povzroči nastanek nabitih kapljic. Kapljice nato potujejo do sušilne kapilare, kjer pride pod pretokom sušilnega plina do izhlapevanja topila. Izhlapevanje topila povzroči zgostitve naboja na površini kapljic, kar v neki točki privede do ločitev kapljic na manjše.

Proces se večkrat ponovi dokler topilo popolnoma ne izpari in ne dobimo nabitih molekul analita. Te nabite molekule nato skozi kapilaro prehajajo do masnega analizatorja (30).

### **Razvrščanje ionov**

Na masnem analizatorju pride najprej do razvrščanja ionov glede na razmerje med maso in nabojem ( $m/z$ ). Najpogosteje se sklopljeni z LC in GC uporabljajo naslednji masni analizatorji: enojni in trojni kvadrupolni analizator (ang. Quadropole), analizator z ionsko pastjo (ang. IT – ion trap), analizator časa preleta (ang. TOF – time of flight) in FT-ICR (ang. Fourier Transform – ion cyclotron resonance) (30).

### **Enojni in trojni kvadrupolni masni analizator**

Pri enojnem kvadrupolnem masnem analizatorju ioni potujejo od ionskega izvora v kvadrupol, ki je sestavljen iz štirih nerjavečih palic hiperbolične oblike. Te palice so priklopljene na vir direktne in izmenične napetosti, ki preko različno nabitih elektrod ustvarjajo oscilirajoče električno polje, ki omogoča prehod izbranemu ionu s točno določenim razmerjem  $m/z$ . Enojni kvadrupolni analizator omogoča snemanje spektrov za ione na masnem analizatorju samo pri določenem razmerju  $m/z$ , takrat govorimo o SIM načinu (ang. Single ion monitoring) in tudi v izbranem širokem spektru vrednosti  $m/z$  (ang. SCAN mode). Pri SIM načinu ima metoda večjo občutljivost kot pri SCAN načinu vendar ne omogoča potrditve identitete spojine. Pri SIM načinu sta vrednosti LOD (meja zaznavnosti, ang. Limit of detection) in LOQ (meja določitve, ang. Limit of quantification) za preiskovani ion občutno nižji kot pri SCAN načinu (30).

Trojni kvadrupolni analizator omogoča, da pridobimo masne spektre fragmentov že vnaprej izbranih ionov. Trojni kvadrupol sestoji iz dveh kvadrupolov oz. masnih filtrov med katerima se nahaja kolizijska celica. Analiti po ionizaciji vstopijo v prvi kvadrupol, kjer izberemo točno določen ion, ki ga vodimo v kolizijsko celico, kjer ta razpade na fragmente. Nastale fragmente nato ločimo v drugem kvadrupolu in detektiramo na detektorju (30).

Glavna prednost trojnega kvadrupola pred enojnim kvadrupolom je, da lahko ione z istim razmerjem  $m/z$  še dodatno fragmentiramo in jih nedvoumno določimo na podlagi masnega spektra njihovih fragmentov. Pri trojnem kvadrupolnem analizatorju v prvem kvadrupolu izberemo ione s točno določenim razmerjem  $m/z$ , ioni z višjim ali nižjim razmerjem  $m/z$  kvadrupol zapustijo ali pa se zaletijo v palice. Izbrani ioni zapustijo prvi kvadrupol in preidejo v kolizijsko celico, kjer pride zaradi trkov do razpada na fragmentne ione (CID – ang. Collision induced dissociation). Do fragmentacije lahko pride zaradi trkov med ioni,

zaradi interakcije iona s kolizijskim plinom, interakcije s posebno površino kolizijske celice ali zaradi obsevanja z laserjem. Izbrani ioni nato potujejo do drugega kvadrupola, kjer ponovno pride do ločitve in izbora hčerinskih ionov, ki jih želimo detektirati. Ione na masnem analizatorju lahko spremljamo samo pri določenem razmerju  $m/z$  (SIM načinu), ali pa izbranem širokem spektru vrednosti  $m/z$  (ang. Scan mode). Kadar spremljamo samo en prekursorski in fragmentni ion govorimo o SRM prehodu (ang. Single Reaction Monitoring), kadar pa spremljamo več prekursorskih in fragmentnih ionov pa je govora o MRM prehodu (ang. Multiple reaction monitoring). Ion z največjim odzivom uporabimo za kvantitativno analizo, medtem ko odzivi preostalih ionov istega analita potrjujejo njegovo identiteto. Pri masnem analizatorju je ključnega pomena visok vakuum, ki preprečuje trke med posameznimi ioni ter izgubo naboja (30, 33).

Za detekcijo se praviloma uporablja fotopomnoževalka z dvema dinodama, ki sta nameščeni pravokotno na tok ionov in se tako uspešno izogibata trkom z nevtralnimi molekulami hkrati pa privlačita visoko nabite molekule. Ob trku preiskovanih ionov s prvo dinodo pride do izbitja elektronov, ki ob trku z drugo dinodo iz nje izbijejo elektrone, ki se usmerijo v pomnoževalnik, kjer se elektronski tok ojača do merljivega električnega toka, na podlagi intenzitete katerega določimo število trkov pri posameznem razmerju  $m/z$  (33).

### ***Kvantitativno vrednotenje***

V prejšnjih dveh poglavjih opisana analizna metoda omogoča tudi kvantitativno določitev izbranih spojin, ki se jo izračuna na podlagi primerjave površine kromatografskih vrhov vzorcev in standardov z znano koncentracijo analita. Metoda za kvantitativno določitev je relativna, izračun koncentracije pa temelji na uporabi metod standardnega dodatka, internega standarda (IS) ali eksterne standarda. Pri metodi internega standarda, dodamo v vse vzorce in standarde točno določeno znano količino IS. Glavno prednost metode IS predstavlja to, da je IS izpostavljen vsem kritičnim točkam tekom celotne analize in tako zmanjša vpliv napak pri delu in sprememb v odzivnosti inštrumenta na končni rezultat. Preiskovani analit in IS morata imeti podobne fizikalno kemijske lastnosti in čimbolj podoben retencijski čas. V primeru uporabe tehnike GC-MS in LC-MS/MS se kot IS po navadni uporabljajo izotopsko označeni analogi osnovnih spojin, ki se ločijo na podlagi odziva na masnem detektorju (30, 33).

## 2. Namen dela

Antidepresivi, ki se nahajajo v vodnem okolju, zaradi motenj homeostaze centralnega in perifernega živčevja, predstavljajo nevarnost za normalen razvoj številnih organizmov, tudi človeka (4).

Cilj naloge je razviti analizno metodo za določanje SER v vodnem okolju. Kljub njegovi veliki porabi glede na ostale antidepresive, do danes v Sloveniji še ni bila izvedena nobena raziskava v kateri bi določali koncentracijo SER v odpadnih in površinskih vodah. Ker se SER nahaja v okoljskih vodah v zelo nizkih koncentracijah (ng/L), bomo izvedli koncentriranje in izolacijo vzorca z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE), končno analizo pa z LC-MS/MS metodo. Pri optimizaciji ekstrakcije na trdnem nosilcu se bomo osredotočili na izbor primerne ekstrakcijske kolone, izbor primerne pH-ja vzorcev za nanos na kolono, izbor primerne topila za elucijo in volumna topila za elucijo. V sklopu razvoja SPE bomo ovrednotili tudi izgube pri pripravi vzorcev v koraku nanosa na kolone in v koraku spiranja kolon. V prvem delu optimizacije postopka priprave vzorcev bomo uporabili analizno metodo GC-MS. Pri analizi s to metodo bomo uporabili že vpeljano metodo za določanje SER, saj bo smisel prvega dela poskusov optimizirati ekstrakcijo na trdnem nosilcu. V drugem delu poskusov bomo optimizirano ekstrakcijo na trdnem nosilcu uporabili v sklopu z LC-MS/MS metodo. Pri LC-MS/MS metodi se bomo osredotočili na optimizacijo pogojev na koloni in detektorju, tako, da bomo lahko SER detektirali in kvantificirali v čim nižjih koncentracijah. Optimizirano metodo bomo nato validirali na ekstrahiranih vzorcih standardov v čisti površinski in odpadni vodi.

Po zaključeni optimizaciji in validaciji bomo metodo preizkusili tudi na okoljskih vzorcih površinskih in odpadnih vod. S tem bomo dobili podatke o prisotnosti SER v površinskih in odpadnih vodah v Sloveniji. Ti podatki zaenkrat pri nas še ne obstajajo, domnevamo pa, da se SER nahaja v površinskih vodah zelo nizkih koncentracijah (okoli 1 ng/L), saj slovenske reke zaradi nizke poseljenosti niso močno obremenjene z odpadnimi zdravili in njihovimi metaboliti.



### 3. Materiali in metode

#### 3.1 Materiali

##### 3.1.1 Reagenti in topila

Preglednica VI: Reagenti in topila uporabljena pri razvoju metode SPE in LC-MS/MS

Ime	Proizvajalec	Čistost	Empirična formula	MM (g/mol)
MeOH	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska	≥99,9%	CH <sub>3</sub> OH	32,04
Acetonitril (ACN)	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska	≥99,9%	CH <sub>3</sub> CN	41,05
ACN LC-MS čistote	Fluka, Sigma-Aldrich, Steinheim Nemčija	≥99,9%	CH <sub>3</sub> CN	41,05
Aceton	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska	≥99,9%	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> CO	58,08
Mravljična kislina	Merck, Darmstadt, Nemčija	98-	HCOOH	46,03
Surapor		100%		
EtAc	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska	≥99,9%	CH <sub>3</sub> COOC <sub>2</sub> H <sub>5</sub>	88,11
DM	J.T. Baker, Deventer, Nizozemska	≥99,9%	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	84,93
Destilirana voda	Institut Jožef Stefan, Ljubljana, Slovenija	/	H <sub>2</sub> O	18,02
Trietilamin (TEA)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	≥99,9%	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> N	101,19
Piridin	Acros organics, Geel, Belgija	≥99,8%	C <sub>5</sub> H <sub>5</sub> N	79,10
Acetandhidrid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	≥99,9%	(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O	102,09
Stisnjen dušik	Messer, Ruše, Slovenija	/	N <sub>2</sub>	28,03
Natrijev hidroksid	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	≥97,0%	NaOH	40,00
Ocetna kislina	Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija	≥99,7%	CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> H	60,05

##### 3.1.2 Vzorci površinskih in odpadnih vod

Pri analizi okoljskih vzorcev smo analizirali 4 vzorce površinskih vod in 4 vzorce odpadnih vod. Pri odpadnih vodah smo analizirali vzorce iz dveh čistilnih naprav, prvi vzorec je predstavljal pritok odpadne vode, drugi vzorec pa odtok prečiščene odpadne vode (Preglednica VII).

## Preglednica VII: Vzorci okoljskih vod

Ime vzorca	Vrsta vzorca	Kraj zajema	Čas zajema
Vz1	Površinska voda	Reka Ljubljanica Špica, Ljubljana	11.4.2014 09:15
Vz2	Površinska voda	Reka Krka pred ČN, Novo mesto	11.4.2014 10:45
Vz3	Površinska voda	Reka Krka po ČN, Novo mesto	11.4.2014 10:15
Vz4	Površinska voda	Reka Ljubljanica Zalog, Ljubljana	11.4.2014 14:16
Vz5	Odpadna voda	ČN Novo mesto dotok	11.4.2014 10:40
Vz6	Odpadna voda	ČN Novo mesto odtok	11.4.2014 10:30
Vz7	Odpadna voda	ČN Ljubljana dotok	11.4.2014 14:35
Vz8	Odpadna voda	ČN Ljubljana odtok	11.4.2014 14:45

### 3.1.3 Vode za pripravo delovnih raztopin SER

Za pripravo delovnih raztopin SER za validacijo smo uporabili površinsko vodo, ki smo jo vzorčili iz reke Iške v Iškem Vintgarju dne 4.6.2014 ob 17:05. Ta površinska voda ne vsebuje SER. Vodo smo prenesli v laboratorij v plastičnem vsebniku, nato pa smo jo prelili v litrske steklenice, ki smo jih shranili v skrinji pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Za pripravo standardnih raztopin v odpadni vodi smo uporabili sintetično odpadno vodo, ki smo jo pripravili tako, da smo v vodi iz pipe raztopili hranila in minerale. Uporabili smo naslednje snovi: ekstrakt kvasa (130 mg/L), pepton iz kazeina (130 mg/L), ekstrakt mesa (130 mg/L),  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  (317 mg/L),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (40 mg/L),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (24 mg/L),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (8 mg/L),  $\text{CaCO}_3$  (100 mg/L),  $\text{MgCO}_3$  (100 mg/L),  $\text{NaCl}$  (40 mg/L) in  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (5 mg/L).  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{MgCO}_3$  in  $\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  so bile proizvedene v Mercku, Darmstadt, Nemčija. Mesni ekstrakt, ekstrakt kvasa in pepton iz kazeine so proizvodi Fluke, (Steinheim Nemčija),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  je proizvod Kemike (Zagreb, Hrvaška),  $\text{CaCO}_3$  je proizvod Carlo Erba (Milano, Italija),  $\text{NaCl}$  pa proizvaja Riedel-de Haën (Seelze-Hannover, Nemčija) (34). Sintetično odpadno vodo smo pripravili dan pred validacijo in jo do validacije shranili v hladilniku pri  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

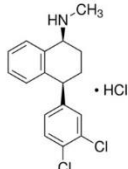
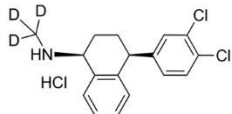
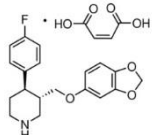
### 3.1.4 Standard in interni standard

**Standard:** Sertralin hidroklorid; stopnja čistosti  $\geq 99,9\%$ ; donacija farmacevtskega podjetja.

**Interni standard 1:** Paroksetin maleat; stopnja čistosti  $\geq 98,0\%$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija.

**Interni standard 2:** Sertralin-d3 hidroklorid (trikrat devteriran SER - SER-d3), stopnja čistosti  $\geq 98,0\%$ ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija.

Preglednica VIII: Osnovne lastnosti standardov

Ime spojine	Strukturna formula	Empirična formula	MM (g/mol)
SER hidroklorid		$C_{17}H_{17}NCl_2 \cdot HCl$	342,69
SER-d3 hidroklorid		$C_{17}D_3H_{14}Cl_2N \cdot HCl$	345,71
PAR, maleat		$C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot C_4H_4O_4$	445,44

### 3.1.5 Naprave in pribor

- Ultrazvočni čistilnik Sonis 4, Iskra, Šentjernej, Slovenija
- Mešalnik Vibromix 114 EV, Tehtnica, Železniki, Slovenija
- pH meter; pH330 – set 1, WTW, Weilheim, Nemčija
- Avtomatske pipete 20-200  $\mu$ L, 100-1000  $\mu$ L in 1000-5000  $\mu$ L; Eppendorf, Hamburg, Nemčija
- Avtomatske pipete 2-20  $\mu$ L, 20-100  $\mu$ L, 200 -1000  $\mu$ L in 1000-5000  $\mu$ L; Gilson, Middleton, ZDA
- Steklovina: čaše, merilne bučke, Pasteurjeva pipeta, steklena palčka, čolniček za tehtanje, merilni valj, stekleni lij, viala, Büchnerjev lij in Büchnerjeva bučka.
- Ostali inventar: Prižema, mufa, najlonski filter, nitrocelulozni filtri, zamaški za viala, štoparica Hanhart, nastavki za pipete, kovinske spatule, Parafilm M...
- **Sistem za ekstrakcijo na trdnem nosilcu:**
  - Steklena kadička za SPE Supelco Visiprep™ DL SPE Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA)
  - Vakuumska črpalka Milipore WP6111560 (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, ZDA)
  - SPE kolone: Oasis® HLB 60 mg (Waters, Massachusetts, Milford, ZDA); Strata™-X 33  $\mu$ m polymeric reversed phase 60 mg/3 ml (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
  - Plastične cevke, plastične brizge
- Analitski sistem GC-MS HP 6890 (Hewlett-Packard, Palo Alto, ZDA)

- S kapilarno kolono DB-5 MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA) dolžine 30 m, s premerom 0,25 mm in debelino SF 250  $\mu\text{m}$ .
- Analitski sistem LC-MS/MS: Agilent 1290 Infinity LC in Agilent 6460 Triple Quadropole Jetstream<sup>®</sup> LC-MS (Agilent Technologies, Santa Clara, California, ZDA)
  - Agilent 1290 Infinity LC vključuje razplinjevalec, binarno črpalko, avtomatski vzorčevalnik, termostat za kolono, UV-VIS detektor (DAD)
  - Agilent 6460 Triple Quadropole Jetstream LC-MS z Jetstream<sup>®</sup> ESI ionskim izvorom.
  - Kromatografska kolona: Kinetex C18, 50 $\times$ 2,1 mm, 2,6  $\mu\text{m}$  (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)
  - Predkolona: Luna C18(2) 4 $\times$ 2 mm (Phenomenex, Torrance, California, ZDA)  
MassHunter - programska oprema za krmiljenje in obdelavo podatkov.

## 3.2 Metode

### 3.2.1 Razvoj in optimizacija

#### 3.2.1.1 SPE

##### *Priprava raztopin*

##### **Priprava raztopin standardov SER in IS**

Raztopine standarda za SER in PAR smo pripravili tako, da smo najprej natančno zatehtali približno 1 mg posameznega standarda vsakega v svojo v 10 mL bučko. Bučki smo nato z MeOH dopolnili do oznake. Raztopino PAR smo še 10-krat redčili, tako da smo 1 mL osnovne raztopine odpipetirali v 10 mL bučko in jo z MeOH dopolnili do oznake. Osnovno raztopino standarda SER smo najprej redčili 10- in 100-krat. Nato pa smo 100-krat razredčeno raztopino SER redčili še 10- in 100-krat. Raztopino standarda SER-d3 smo pripravili tako, da smo 1 mL standarda v obliki hidroklorida s koncentracijo 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  iz viala prenesli v 20 mL bučko in z MeOH dopolnili do oznake. Raztopino smo nato redčili še 10- in 100-krat. Standard PAR smo uporabljali na začetku raziskav vendar smo ga kasneje zamenjali s SER-d3. Pripravljeni standardi so prikazani v preglednici IX. Tako pripravljene raztopine standardov smo shranili zaščitene pred svetlobo v hladilniku pri 5  $^{\circ}\text{C}$ .

Preglednica IX: Raztopine standardov SER, paroksetina in SER-d3

Ime	Koncentracija $\mu\text{g/mL}$	Identiteta standarda
St 1	88,3	SER
St 2	8,83	SER
St 3	$8,83 \times 10^{-1}$	SER
St 4	$8,83 \times 10^{-2}$	SER
St 5	$8,83 \times 10^{-3}$	SER
ISP1	101	PAR
ISP2	10,1	PAR
IS1	4,47	SER-d3
IS2	$4,47 \times 10^{-1}$	SER-d3
IS3	$4,47 \times 10^{-2}$	SER-d3

### **Priprava delovnih raztopin standarda SER v destilirani vodi**

#### *Priprava delovnih raztopin za optimizacijo SPE z GC-MS analizno metodo*

Za potrebe razvoja SPE s pomočjo GC-MS smo pripravili dve delovni raztopini standarda SER v 200 mL destilirane vode, ki sta prikazani v preglednici X. Za vrednotenje uspešnosti ekstrakcije vzorcev smo hkrati pripravili standarde raztopine SER in IS v 2 mL vialah. Pripravili smo jih tako, da smo v vialo odmerili iste količine IS in SER kot pri delovnih raztopinah SER Raz1 in Raz2. Raztopine v vialah smo posušili do suhega, acetilirali, ponovno posušili in raztopili v 0,5 mL EtAc, s čimer smo dobili koncentracijo, ki ustreza koncentraciji SER v Raz1 in Raz2 po 100% ekstrakciji. Tako smo pripravili standardne raztopine stRaz1 in stRaz2. V prvem delu razvoja metode smo zaradi nižje občutljivosti GC-MS instrumenta uporabljali visoke koncentracije preiskovanega analita ( $\mu\text{g/L}$ ). Visoke koncentracije smo uporabili tudi zaradi tega, ker smo tako lažje vrednotili izgube pri nanosu in pri spiranju vzorca.

Preglednica X: Delovne raztopine standarda SER v destilirani vodi

Ime	Izhodni standard	Volumen dodanega standarda ( $\mu\text{L}$ )	Končna koncentracija ( $\mu\text{g/L}$ )
Raz1	St 2	200	8,83
Raz2	St 2	500	22,1

#### *Priprava delovnih raztopin za optimizacijo SPE z LC-MS/MS analizno metodo*

Za namene dokončnega razvoja SPE z metodo LC-MS/MS smo pripravili delovne raztopine SER v 200 mL destilirane vode v koncentracijskem območju od 1,02 ng/L do 8,83  $\mu\text{g/L}$  (Preglednica XI). Hkrati smo pripravili še standardne raztopine stRaz3 - stRaz7. Pripravili

smo jih tako, da smo v 2 mL vialo odpipetirali isto količino standarda SER in IS kot pri vzorcih raztopin standardov SER. Tako pripravljene vzorce smo pred analizo posušili do suhega in raztopili v 0,5 mL topila za LC-MS/MS analizo (MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1).

Preglednica XI: Delovne raztopine standarda SER v destilirani vodi

Ime	Izhodni standard SER	Volumen dodanega standarda ( $\mu$ L)	Končna koncentracija ( $\mu$ g/L)
Raz3	St 5	23	$1,02 \times 10^{-3}$
Raz4	St 5	230	$1,02 \times 10^{-2}$
Raz5	St 4	57	$2,52 \times 10^{-2}$
Raz6	St 3	113	0,499
Raz7	St 2	200	8,83

### **Optimizacija SPE z GC-MS analizo**

V prvem delu optimizacije SPE smo uporabili GC-MS analizo metodo. Za izhodiščni protokol za optimizacijo SPE smo privzeli pogoje postopka ekstrakcije, katere so v tem laboratoriju že uporabljali pred našim delom za študijo fotorazgradnje SER. Postopek je predstavljen v preglednici XII.

Preglednica XII: Postopek priprave vzorcev z SPE za analizo z GC-MS

Korak	Podrobnosti
Priprava vzorcev v destilirani vodi	200 mL
Kondicioniranje kolone	3 mL MeOH
Ekvilibracija kolone	3 mL destilirane H <sub>2</sub> O
Nanos vzorca	Raz1 ali Raz2 (pretok $\geq 2$ mL/min)
Sušenje	Pri podtlaku vsaj pol ure do sipkega
Elucija	$3 \times 1$ mL MeOH
Prvo sušenje	Z N <sub>2</sub> do 0,5 mL pri 40°C
Kvantitativni prenos v 2 ml vialo	Prenos 0,5 mL vzorca v vialo in spiranje s $3 \times 300$ $\mu$ L MeOH
Dodatek IS	200 $\mu$ L ISP2 oz. kasneje 200 $\mu$ L IS1
Sušenje do suhega	Pri 40°C s prepihanjem z N <sub>2</sub>
Acetiliranje	5 $\mu$ L piridina in 15 $\mu$ L acetanhidrida - 1 uro pri sobni temperaturi
Sušenje do suhega	Pri 40°C s prepihanjem z N <sub>2</sub>
Raztapljanje v topilu za analizo na GC-MS	0,5 mL EtAc

V prvem delu optimizacije SPE smo preučevali naslednje spremenljivke:

- Izbor primerne kolone za SPE,
- iskanje izgub pri SPE,

- določitev optimalne hitrosti pretoka pri nanosu na kolone,
- izbor topila za elucijo,
- izbor primerne pH-ja za nanos vzorcev,
- vpliv koncentracije MeOH v fazi spiranja kolon.

### ***Optimizacija SPE z LC-MS/MS analizo***

Po končanem prvem delu optimizacije smo delno optimiziran postopek priprave vzorcev ovrednotili z analizo metodo LC-MS/MS. Bili smo mnenja, da lahko pri postopku priprave vzorcev z LC-MS/MS boljše ovrednotimo izgube in postopek priprave vzorcev še izboljšamo. Za namene drugega dela razvoja SPE smo uporabili že delno optimiziran postopek priprave vzorcev, ki je prikazan v preglednici XIII.

V drugem delu optimizacije SPE smo vrednotili naslednje parametre:

- Ponovljivost postopka priprave vzorcev,
- iskanje izgub v fazi nanosa vzorca na kolone,
- vpliv deleža MeOH v vodi v fazi spiranja kolon,
- vpliv kvantitativnega prenosa na izkoristek ekstrakcije,
- vrednotenje izkoristka pri različnih koncentracijah
- in določanje vzroka kontaminacije vzorcev.

Preglednica XIII: Postopek priprave vzorcev s SPE za analizo z LC-MS/MS

Korak	Podrobnosti
Priprava vzorcev v destilirani vodi	200 mL; pH=11,3
Kondicioniranje kolone prvič	3 mL DM:ACN=1:1
Kondicioniranje kolone drugič	3 mL MeOH
Ekvilibracija kolone	3 mL destilirane vode
Nanos vzorca	Raz1 - Raz7 (pretok < 1,67 mL/min)
Sušenje	Pri podtlaku vsaj pol ure do sipkega
Elucija	3 × 1 mL 2% TEA v DM:ACN=1:1
Prvo sušenje	Z N <sub>2</sub> do 0,5 mL pri 40°C
Kvantitativni prenos v 2 ml vialo	Prenos 0,5 mL vzorca v vialo in spiranje s 3 × 300 µL DM:ACN=1:1
Dodatek IS	45 µL IS2 ali 45 µL IS3
Sušenje do suhega	Pri 40°C s prepihanjem z N <sub>2</sub>
Raztapljanje v topilu za analizo z LC-MS/MS	0,5 mL H <sub>2</sub> O:MeOH=1:1

### 3.2.1.2 Analizna metoda GC-MS

#### *Postopek dela*

Eluirane in posušene vzorce smo morali pred analizo na GC-MS še derivatizirati. Vzorce smo po eluciji najprej posušili do 0,5 mL in jih prenesli v 2 mL vialo, dodali smo jim znano količino IS in jih posušili do suhega. Posušeni vzorec smo dodali 5  $\mu$ L topila piridina in 15  $\mu$ L anhidrida očetne kisline in jih pustili za eno uro pri sobni temperaturi zaščitene pred svetlobo, da je reakcija potekla. Nato smo vzorce popolnoma posušili in jih raztopili v 0,5 mL EtAc. Tako pripravljene vzorce smo nato aplicirali na sistem GC-MS. Postopek priprave vzorcev je prikazan v preglednici XII.

#### *Pogoji meritev GC-MS*

Ločbo analitov smo izvajali s plinskim kromatografom HP 6890 s kapilarno kolono DB-5 MS dolžine 30 m, s premerom 0,25 mm in debelino stacionarne faze 250  $\mu$ m. Pogoji za ločbo na plinskem kromatografu so prikazani v preglednici XIV in XV. Vzorce smo pred ločbo ionizirali z EI. Energija za ionizacijo je znašala 70 eV. Masne fragmente smo detektirali v SIM načinu, pri čemer smo sledili fragmentnim ionom za SER z razmerjem  $m/z=347$  in  $m/z=349$ , za PAR  $m/z=234$  in  $m/z=371$  ter SER-d3  $m/z=350$  in  $m/z=352$ .

Preglednica XIV: Nastavitve GC-MS za analizo SER

Parameter	Podrobnosti
Nosilni plin	Helij
Hitrost nosilnega plina	1 mL/min
Temperatura injektorja	270 °C
Način injiciranja	Splitless
Volumen injiciranja	1 $\mu$ L
Temperaturni program	Prikazano v preglednici XV
Temperatura vmesnika	250 °C
Čas ločbe	18 min

Preglednica XV: Temperaturni program segrevanja peči plinskega kromatografa

Temperatura	Hitrost naraščanja temperature (°C/min)	Čas (min)
100 °C	0	0-2
do 300 °C	20	2-12
300 °C	0	12-18

### 3.2.1.3 Analizna metoda LC-MS/MS

Drugi del optimizacije metode ekstrakcije vzorcev in validacijo smo izvedli z LC-MS/MS metodo. S prehodom na novo metodo analize smo prav tako morali modificirati metodo



priprave vzorcev. Za potrebe analize z LC-MS/MS nam vzorcev ni več potrebno acetilirati ampak jih po eluciji samo posušimo do suhega in rekonstruiramo v 0,5 mL topila za nadaljnjo analizo z LC-MS/MS (H<sub>2</sub>O:MeOH=1:1). To metodo smo najprej razvili na standardnih raztopinah in jo nato uporabili za vrednotenje ekstrahiranih vzorcev.

### ***Priprava raztopin***

Za namene optimizacije parametrov LC-MS/MS smo pripravili raztopine SER in IS v 0,5 mL topila za analizo z LC-MS/MS. Vzorce smo pripravili tako, da smo najprej v 2 mL vialo odpipetirali znan volumen standardne raztopine SER in 45 µL IS3 (preglednica XVI). Vzorce smo nato posušili pri 40°C pod pretokom dušika in jih nato rekonstruirali v 0,5 mL topila za analizo.

Preglednica XVI: Priprava vzorcev za optimizacijo parametrov LC-MS/MS

Vzorec	Izhodni standard	Volumen dodanega St SER(µL)	Koncentracija SER v 0,5 mL (µg/L)	Primerljiva koncentracija v 200 mL vzorca (ng/L)
VzMs1	St 2	200	$35,3 \times 10^2$	$8,83 \times 10^3$
VzMs2	St 5	23	0,424	1,02
VzMs3	St 4	57	10,1	25,2

### ***Optimizacija parametrov LC-MS/MS***

#### **MS/MS**

S pomočjo programa Optimizer, ki je del programske opreme MassHunter smo z vzorcem VzMs1 definirali MRM prehode, optimalne kolizijske energije in fragmentor. Fine nastavitve parametrov smo določili z vzorcema VzMs2 in VzMs3.

#### **LC**

Kot izhodiščno mobilno fazo smo uporabili 0,1% mravljinčno kislino (MFA) in ACN (MFB), ki predstavljata primerno MF za analizo v pozitivnem ESI, kar potrjujejo tudi podatki iz literature (10). Uporabili smo C-18 kolono Kinetex s »core-shell« delci. Kolona je optimalna za doseganje ozkih vrhov, kar izboljša občutljivost metode. V sklopu razvoja LC smo spreminjali gradient programa izpiranja in pretok. Oba parametra smo optimizirali glede na čas analize in občutljivost metode.

### 3.2.2 Optimizirana analizna metoda

#### 3.2.2.1 SPE

Optimiziran postopek po katerem smo pripravili vzorce za analizo z LC-MS/MS je podrobneje predstavljen v preglednici XVII. Pri optimizirani metodi smo uporabili kolone HLB Oasis<sup>®</sup>. Kolone smo najprej kondicionirali s 3 mL topila ACN:DM=1:1, katerega smo pustili stati na koloni 5 minut. Nato smo topilo spustili skozi kolono in dodali 3 mL MeOH, s katerim smo sprali ostanek prejšnjega topila. Za ekvilibracijo smo uporabili 3 mL destilirane vode. Vzorce smo pripravili v 200 mL destilirane vode oz. kasneje v 200 mL površinske vode. Vzorce smo iz čaš prelivali v 60 mL brizge, ki smo jih pritrdili na kolone (Slika 3). Čas nanosa vzorcev je znašal več kot uro in pol. Po nanosu vzorcev smo kolone spirali s 6 mL 40% raztopine MeOH v destilirani vodi. Spiranje je trajalo 15 sekund. V naslednjem koraku smo kolono posušili s pomočjo podtlaka. Sledila je elucija neposredno v 2 mL vial. Kot topilo za elucijo smo uporabili 2% TEA v topilu ACN:DM=1:1. Elucijo smo izvedli v treh korakih, vsakič s po 0,6 mL. Po eluciji je sledilo sušenje vzorca pod pretokom N<sub>2</sub> do suhega pri 40 °C. Po sušenju smo vzorce rekonstruirali v topilu MeOH:H<sub>2</sub>O=1:1. Vzorce smo raztopili s pomočjo mešanja na vibracijskem mešalniku za 15 sekund. Tako pripravljene vzorce smo analizirali na LC-MS/MS pod pogoji navedenimi v naslednjem poglavju. Vse kolone, ki smo jih uporabili so bile za 1-kratno uporabo. Podrobnosti optimiziranega postopka so prikazane v preglednici XVII.

Preglednica XVII: Optimizirana SPE metoda

Korak	Podrobnosti
Priprava vzorcev v destilirani vodi	200 mL
Kondicioniranje kolone 1	3 mL DM:ACN=1:1
Kondicioniranje kolone 2	3 mL MeOH
Ekvilibracija kolone	3 mL H <sub>2</sub> O
Nanos vzorca	pretok < 1,67 mL/min
Spiranje	6 ml 40% MeOH v H <sub>2</sub> O
Sušenje	Vsaj pol ure do sipkega
Elucija	3 × 0,6 mL 2% TEA v DM:ACN=1:1
Dodatek IS	45 µL IS3
Sušenje do suhega	Pri 40°C s prepihanjem z N <sub>2</sub>
Raztapljanje v topilu	0,5 mL H <sub>2</sub> O:MeOH=1:1
Mešanje na vibracijskem mešalniku	15 sekund
Analiza	LC-MS/MS



Slika 3: Prikaz nanosa vzorcev na kolone

### 3.2.2.2 LC-MS/MS

#### *Metoda MS/MS*

Za analizo preiskovanih analitov smo uporabljali masni analizator Agilent 6460 sklopljen s trojnim kvadrupolnim MS/MS analizatorjem. Kot vir ionizacije smo uporabili pozitivno ionizacijo z razprševanjem raztopin v električnem polju (ESI). V preglednici XVIII so prikazane nastavitve masnega analizatorja.

Preglednica XVIII: Nastavitve masnega analizatorja za analizo SER

Parameter	Podrobnost
Sušilni plin	275 °C pri 10 mL/min
Nebulizacijski plin	45 psi
Jetstream® plin	350 °C pri 11 mL/min
Napetost na kapilari	3000 V
Nozzle voltage®	0 V
EMV	300 V
SER: MRM prehod, kolizijska energija (CE),	306 > 275; 8 (kvantifikacija) 306 > 159; 20 (kvalifikacija)
SER-d3: MRM prehod, kolizijska energija (CE),	309 > 275, 8 (kvantifikacija) 309 > 159, 20 (kvalifikacija)
Fragmentor	60 V
Širina masne ločljivosti na prvem kvadrupolu	1 Da
Širina masne ločljivosti na drugem kvadrupolu	1 Da
Razdelilni čas (dwell time)	100 ms

### Metoda LC

Ločba na koloni je potekala pod pogoji, ki so prikazani v preglednici XIX.

Preglednica XIX: Nastavitve in pogoji LC za analizo SER

Parameter	Podrobnost
Temperatura kolone	50 °C
V injiciranja vzorca	1 µL
Spiranje injektorja	80 % MeOH
Mobilna faza	0,1 % mravljična kislina (MFA) in ACN (MFB) po gradientnem programu (preglednica XX)
Čas analize	3 minute

Preglednica XX: Gradientni program LC za analizo SER

Čas (min)	Delež MFA (%)	Pretok (mL/min)
0	95	0,35
1,1	90	0,35
1,3	50	0,65
2	40	0,65
2,1	95	0,65

### 3.2.3 Validacija metode SPE z LC-MS/MS

#### 3.2.3.1 Validacija z ekstrahiranimi vzorci standardov SER v površinski vodi in sintetični odpadni vodi

##### *Priprava raztopin*

##### **Priprava delovnih raztopin standarda SER površinski vodi**

Za potrebe validacije metode na ekstrahiranih vzorcih smo pripravili 6 različnih delovnih raztopin SER v 200 mL površinske vode v koncentracijskem območju med 1,02 in 49,9 ng/L. Vsem vzorcem, razen tistim za določanje izkoristka ekstrakcije, smo dodali 45 µL IS3 pred ekstrakcijo. Vzorce smo pripravili tako, da smo najprej površinsko vodo iz reke Iška, ki nima prisotnega SER, prefiltrirali skozi nitrocelulozni filter z velikostjo por 1,2 µm nato pa še skozi najlonski filter z velikostjo por 0,45 µm. Tako pripravljeno vodo smo odmerili v čaše (V = 200 mL) ter jim dodali točno določen volumen standarda SER in IS (Preglednica XXI). Za vrednotenje uspešnosti ekstrakcije smo pripravili standardne raztopine stVzV2, stVzV4 in stVzV5. Pripravili smo jih tako, da smo v 2 mL vialo odpipetirali isto količino standarda SER in IS kot pri vzorcih delovnih raztopin standardov SER. Tako pripravljene vzorce smo za potrebe analize z LC-MS/MS le posušili do suhega in raztopili v 0,5 mL topila za LC-MS/MS analizo.

Preglednica XXI: Priprava delovnih raztopin standardov SER v čisti okoljski vodi

Vzorec	Izhodni St SER	Volumen dodanega St SER( $\mu$ L)	Koncentracija SER v 200 mL (ng/L)
VzV1	St 5	23	1,02
VzV2	St 5	57	2,52
VzV3	St 5	114	5,03
VzV4	St 5	228	10,1
VzV5	St 4	57	25,2
VzV6	St 4	113	49,9

**Priprava delovnih raztopin standarda SER v sintetični odpadni vodi**

Za potrebe priprave umeritvene krivulje iz standardnih raztopin SER v 200 mL sintetične odpadne vode smo pripravili 6 delovnih raztopin v koncentracijskem območju od 5,03 do 99,8 ng/L (Preglednica XXII). Delovne raztopine standardov SER v sintetični odpadni vodi smo pripravili po istem postopku kot delovne raztopine standardov v površinski vodi.

Preglednica XXII: Priprava delovnih raztopin standardov SER v sintetični odpadni vodi

Vzorec	Izhodni St SER	Volumen dodanega St SER( $\mu$ L)	Koncentracija SER v 200 mL (ng/L)
VzVO1	St 5	114	5,03
VzVO2	St 4	228	10,1
VzVO3	St 4	57	25,2
VzVO4	St 4	113	49,9
VzVO5	St 4	226	99,8

***Postopek dela***

Validacijo na ekstrahiranih vzorcih standardov smo izvajali 4 zaporedne dni. Prvi dan validacije smo pripravili tri paralelke vzorcev VzV1, VzV4 in VzV5, katerim smo IS dodali šele po ekstrakciji, s čimer smo ovrednotili izkoristek ekstrakcije pri različnih koncentracijah. Prvi dan smo prav tako pripravili vzorce VzV2, VzV4, VzV6 in VzVO6 v treh paralelkah. Tako smo spremljali selektivnost, ponovljivost in točnost znotraj enega dneva. Drugi dan validacije smo v dveh paralelkah pripravili vzorce VzV2, VzV3, VzV4, VzV5 in VzV6 z namenom določitve umeritvene krivulje ter vrednotenja meddnevne ponovljivosti in točnosti. Tretji dan smo pripravili VzV2, VzV4 in VzV6 v dveh paralelkah z namenom vrednotenja meddnevne ponovljivosti in točnosti. Četrty dan smo pripravili še vzorce VzVO1–VzVO5 v dveh paralelkah z namenom določitve umeritvene krivulje v sintetični odpadni vodi. Pri vsaki analizi smo najprej pomerili slepe vzorce, nato pa še vzorce delovnih raztopin v naraščajočih koncentracijah. Vsak vzorec smo v LC-MS/MS injicirali 3-krat.

### 3.2.4 Vrednotenje metode

V sklopu vrednotenja analize metode smo kot osnovo uporabili ICH smernico Q2 (R1) (35) in FDA smernico za validacijo bioanaliznih metod (36). Pri validaciji metode smo vrednotili izkoristek ekstrakcije pri različnih koncentracijah, selektivnost, linearnost, točnost, ponovljivost ter mejo zaznavnosti in mejo določitve.

#### 3.2.4.1 Izkoristek ekstrakcije

Izkoristek smo vrednotili pri vzorcih VzV1, VzV4 in VzV5 in sicer tako, da smo ekstrahirali raztopine standardov SER, katerim smo dodali IS po ekstrakciji, t.j. šele pred analizo z LC-MS/MS. Pri validaciji naše metode na ekstrahiranih vzorcih smo izkoristek ekstrakcije izračunali na podlagi primerjave razmerja odzivov SER/IS ekstrahiranih vzorcev z razmerjem odzivov standardnih raztopin SER/IS primerljivih koncentracij (stVzV1, stVzV4 in stVzV5). Kot kriterij smo si zadali vrednost izkoristka nad 70% in RSD < 15%.

#### 3.2.4.2 Selektivnost

Selektivnost smo dokazali z analizo vzorca topila za nadaljnjo analizo z LC-MS/MS, IS ter standarda SER in IS v topilu za raztapljanje vzorcev. Dodatno smo selektivnost ovrednotili tudi kvantitativno z določanjem odziva SER pri dveh MRM prehodnih za tri različne koncentracije SER v čisti površinski vodi znotraj celotnega koncentracijskega območja metode. Selektivnost smo prav tako ovrednotili na raztopini standarda v sintetični odpadni vodi (VzVO6). Odziv SER smo vrednotili pri MRM prehodih (306>275 in 306>129), pri čemer predstavlja prehod 306>275 osnovo za kvantitativno vrednotenje vsebnosti SER. Selektivnost smo določili tako, da smo izračunali razmerje odzivov med MRM prehodoma 306>275 in 306>129. Rezultat smo podali kot povprečno vrednost razmerja pri posamezni koncentraciji in RSD, ki naj bo nižji od 15%. To je bil tudi kriterij za selektivnost metode.

#### 3.2.4.3 Linearnost

Linearnost smo preverjali na ekstrahiranih vzorcih v čisti okoljski vodi v območju med 2,52 in 49,9 ng/L (Preglednica XXI) in na ekstrahiranih vzorcih v sintetični odpadni vodi v območju med 5,03 in 99,8 ng/L (Preglednica XXII). Linearnost smo vrednotili kot odvisnost razmerja med odzivom SER in odzivom IS od koncentracije SER. Regresijsko premico smo izračunali na podlagi metode najmanjših kvadratov, kot merilo za linearnost smo postavili vrednost  $R^2 > 0,99$ .

#### **3.2.4.4 Točnost**

Točnost smo določali tako, da smo na podlagi odziva vzorca iz umeritvene premice izračunali koncentracijo in jo primerjali z dejansko koncentracijo SER v vzorcu. Točnost znotraj enega dne smo določali pri treh različnih koncentracijah (VzV2, VzV24, VzV6; Preglednica XXI) v treh paralelkah, ki so pokrivalo celotno območje meritev. Meddnevno točnost smo določali v obdobju treh dni pri vzorcih istih koncentracij v dveh paralelkah. Točnost smo izračunali z uporabo enačbe:  $točnost[\%] = \left(\frac{C_i}{C_t}\right) * 100$  pri čemer predstavlja  $C_i$  izmerjeno koncentracijo,  $C_t$  pa teoretično koncentracijo. Kot kriterij pri določanju točnosti na ekstrahiranih vzorcih smo upoštevali vrednost  $100 \pm 15\%$ .

#### **3.2.4.5 Ponovljivost**

Na ekstrahiranih vzorcih smo preučevali dnevno, meddnevno ponovljivost in ponovljivost injiciranja pri treh različnih koncentracijah (VzV2, VzV4, VzV6; Preglednica XXI). Rezultat za ponovljivost injiciranja in ponovljivost metode smo podali v obliki relativnega standardnega odklona (RSD). Za ponovljivost injiciranja smo postavili kriterij  $RSD < 5\%$ , za ponovljivosti celotne metode ekstrakcije vzorcev pa  $RSD < 15\%$ .

#### **3.2.4.6 Meja zaznavnosti in meja določitve**

Meje zaznavnosti v sklopu validacije nismo določali, saj smo imeli pri slepih vzorcih odziv pri razmerju med maso in nabojem značilnim za SER. Mejo določitve smo določili na podlagi dobljenih rezultatov umeritvene premice. Kriterij za postavitev te meje je ustrezna točnost ( $100 \pm 20\%$ ) in ponovljivosti ( $RSD < 20\%$ ) metode.

### **3.2.5 Analiza površinskih in odpadnih vod**

Po zaključku validacije smo metodo preizkusili tudi na realnih vzorcih površinskih (Vz1-Vz4) in odpadnih vod (Vz5-Vz8) (preglednica VII). Vsebnost SER smo določali v dveh rekah. Na vsaki reki smo izbrali dve točki zajema, tako smo lahko vrednotili vpliv čistilne naprave na prisotnost SER. V odpadnih vodah smo vrednotili vsebnost SER na dveh ČN, vzorčili smo odpadno vodo iz pritoka ČN in odtoka. S tem smo ovrednotili sposobnost ČN za odstranjevanje SER iz okolja. Vzorce smo po zajemu zamrznili in jih do analize shranjevali v skrinji pri  $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Dan pred analizo smo vzorce dali odtajat na sobno temperaturo. Odtaljene vzorce odpadnih vod in površinskih vod smo filtrirali skozi nitrocelulozne filtre velikosti  $1,2\text{ }\mu\text{m}$  in skozi najlonske filtre velikosti  $0,45\text{ }\mu\text{m}$ , nato pa smo izvedli ekstrakcijo in analizo na način kot je opisano v poglavju 3.2.2.

## 4. Rezultati in razprava

### 4.1 Razvoj in optimizacija

Metodo ekstrakcije vzorcev in metodo LC-MS/MS smo razvijali postopoma s spreminjanjem posameznih parametrov ter sočasnega vrednotenja njihovih vplivov na izkoristek ekstrakcije in na odziv na LC-MS/MS. Optimizirano metodo smo nato validirali, z njo pa smo na koncu analizirali še vzorce površinskih in odpadnih vod. Za razvoj SPE smo v začetku uporabljali višje koncentracije, saj so pridobljeni rezultati zanesljivejši variacija pa je nižja. Zaradi visokih koncentracij analita smo za detekcijo uporabljali analizno metodo GC-MS. Za analizo z GC-MS smo uporabili že razvito metodo, ki so jo pred našim delom uporabljali za študijo fotorazgradnje SER. Večino parametrov pri ekstrakciji na trdnem nosilcu smo optimizirali s pomočjo analize z GC-MS metodo. Z LC-MS/MS metodo smo preverili pravilnost rezultatov dobljenih z GC-MS, ovrednotili smo izkoristek ekstrakcije pri bistveno nižjih koncentracijah ter določili še dodatne parametre same metode ekstrakcije. V drugem delu razvoja analizne metode smo morali za vrednotenje izkoristka ekstrakcije pri koncentracijah ng/L razviti še instrumentalno metodo LC-MS/MS.

#### 4.1.1 Razvoj SPE

Namen razvoja metode je bil doseči čim višji in ponovljiv izkoristek ekstrakcije vzorcev iz vodnega matriksa. Pri vseh poskusih za namene razvoja SPE smo izvajali ekstrakcijo v vsaj dveh paralelkah.

##### 4.1.1.1 Izbor nosilca za ekstrakcijo

Za ekstrakcijo vzorcev smo izbrali nosilca Strata™-X in Oasis® HLB, ki sta primerna za adsorpcijo kislih, bazičnih in nevtralnih spojin. Lastnosti obeh nosilcev so prikazane v preglednici XXIII.

Preglednica XXIII: Povzetek glavnih značilnosti uporabljenih nosilcev za ekstrakcijo

Nosilec	Oasis® HLB (37)	Strata™-X (38)
Velikost delcev (µm)	30	33
pH območje	0-14	1-14
Volumen kolone (mL)	3	3
Specifična površina (m <sup>2</sup> /g)	450	800
Povprečni premer por (Å)	80	85
Masa sorbenta (mg)	60	60



Oba nosilca sta si zelo podobna zato tudi nismo pričakovali večje razlike v izkoristku ekstrakcije. Za poskus, kjer smo vrednotili izkoristek in ponovljivost ekstrakcije na dveh različnih nosilcih smo pripravili štiri vzorce Raz1. Poskus smo izvedli po metodi ekstrakcije predstavljeni v preglednici XII. Hitrost nanosa vzorcev je bila višja od 2 mL/min. S primerjavo odzivov ekstrahiranih vzorcev in vzorcev standardov smo izračunali izkoristek ekstrakcije. Rezultati so podani v preglednici XXIV.

Preglednica XXIV: Izkoristek in ponovljivost (RSD) ekstrakcije pri različnih kolonah za ekstrakcijo (n=2)

Ime nosilca	Oasis <sup>®</sup> HLB	Strata <sup>™</sup> -X
Povprečni izkoristek (%)	19,7	14,8
RSD (%)	12,8	38,0

Iz rezultatov v preglednici XXIV vidimo, da daje Oasis<sup>®</sup> HLB boljši izkoristek ob boljši ponovljivosti. Iz navedenih razlogov smo se odločili, da za nadaljnjo uporabo izberemo Oasis<sup>®</sup> HLB nosilce za ekstrakcijo. V tej fazi razvoja metode so bili izkoristki zaradi neoptimizirane metode in zaradi začetniških težav pri izvedbi SPE še zelo nizki. Naš naslednji cilj je bil optimizirati pogoje ekstrakcije pri katerih bodo izkoristki višji kot 70%.

#### **4.1.1.2 Iskanje izgub pri postopku ekstrakcije vzorcev standardnih raztopin**

Zato smo naše aktivnosti najprej usmerili v iskanje potencialnih vzrokov za nižje izkoristke. Na začetku smo se osredotočili na preverjanje izgub pri samem nanosu. Preverili smo ali se na preiskovanih nosilcih po eluciji zadržuje še kaj analita. Pri tem poskusu smo ponovili postopek ekstrakcije pod istimi pogoji kot v prejšnjem poglavju. Posušene kolone smo najprej eluirali s 3×1 mL MeOH (1. Elucija) nato pa jih še dodatno eluirali s 4×1 mL EtAc (2. Elucija), da smo preverili če se SER še zadržuje na koloni. Za namen tega poskusa smo pripravili višjo koncentracijo SER (Raz2) v 4 paralelkah, ker smo raztopino, ki steče skozi trdne nosilce pri nanosu analita zbirali v čaše in še enkrat ponovno ekstrahirali na novih nosilcih, ter preverili koliko analita izgubimo pri nanosu na kolone (2. Ekstrakcija). Rezultati so prikazani v preglednici XXV.

Preglednica XXV: Izgube pri postopku ekstrakcije (n=4)

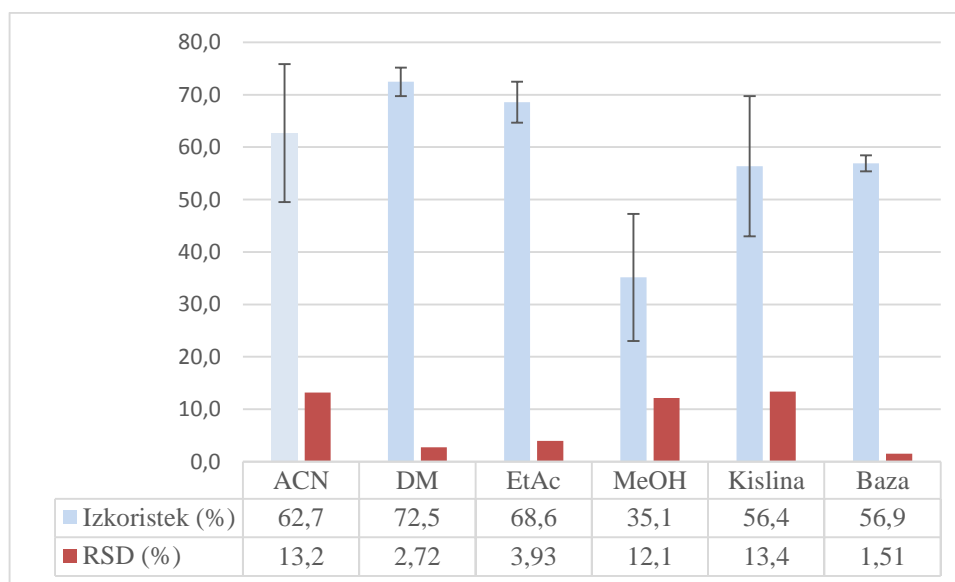
	1. Elucija	2. Elucija	2. Ekstrakcija
Povprečni izkoristek (%)	44,4	0,81	0,00
RSD (%)	0,43	5,01	-

Iz rezultatov v preglednici XXV lahko sklepamo, da nismo imeli izgub pri nanosu in da se

je ves analit zadržal na koloni, saj pri drugi ekstrakciji nismo detektirali preiskovanega analita. S tem smo dokazali, da tudi pri visokih koncentracijah SER ne presežemo kapacitete kolone za vezavo SER. Dobljeni rezultati nakazujejo, da elucija pod takšnimi pogoji ni dovolj učinkovita.

#### 4.1.1.3 Izbor topila za elucijo

V nadaljevanju poskusov smo se osredotočili na izbor topila za kondicioniranje in elucijo. Topilo za elucijo je zelo pomembno saj ne sme kemično reagirati s preiskovanim analitom, vendar mora vseeno prekiniti vezi med analitom in sorbentom, da se analit lahko eluira. Celoten protokol SPE postopka smo glede na prvi poskus bistveno spremenili. Tokrat smo za kondicioniranje kolon uporabili 3 mL topila za elucijo, ki smo ga sprali s 3 mL MeOH, kolono pa smo ekvilibrirali s 3 mL destilirane vode. V prvi seriji poskusov za izbor topila smo pripravili 12 vzorcev Raz1. Za poskus smo izbrali topila ACN, MeOH, DM, EtAc, ter 2% HCOOH v MeOH (kislina) in 2% TEA v MeOH (baza). Nanos vzorcev je prvič potekal z znižano hitrostjo nanosa (< 1,7 mL/min). Pri eluciji smo prvi alikvot topila zadržali v stiku s kolono 5 minut. Izkoristki ekstrakcij pri uporabi različnih topil s pripadajočo ponovljivostjo so prikazani na sliki 4.

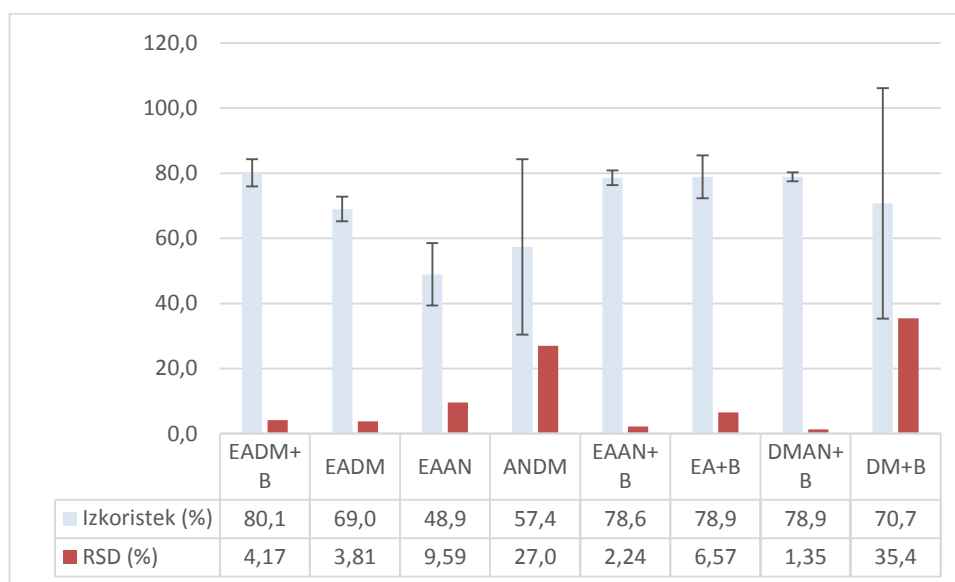


Slika 4: Povprečni izkoristki in ponovljivost (RSD) pri uporabi različnih topilih za elucijo (n=2)

Na podlagi rezultatov na sliki 4 smo prišli do ugotovitev, da imamo najboljši izkoristek ekstrakcije pri eluciji z DM, kjer smo imeli tudi dobro ponovljivost. Ugotovili smo tudi, da so pri počasnejšem nanosu vzorca izkoristki boljši. Pri dodatku kisline in baze k MeOH v 2% volumskem deležu smo izkoristek povišali za več kot 20%. Boljši izkoristek in predvsem

ponovljivost smo imeli pri dodatku TEA k MeOH, zato smo ga pri nadaljnjih poskusih dodajali k topilu za elucijo.

V drugi seriji poskusov za izbor najprimernejšega topila za elucijo smo postopek ekstrakcije ponovno rahlo priredili. Pripravili smo 12 vzorcev Raz1. Za topila za elucijo smo izbrali mešanice različnih topil v razmerju 1:1. V takšnem razmerju smo pripravili naslednje zmesi topil: EtAc in ACN (EAAN), ACN in DM (ANDM) ter EtAc in DM (EADM). Na drugi polovici vzorcev smo opravili elucijo z istimi topili vendar smo jim dodali bazo trietilamin. Dodatno smo preizkusili tudi topila EtAc in DM z dodatkom baze. V posameznem eksperimentu so bila topila za kondicioniranje in za kvantitativni prenos enaka kot topila za elucijo, vendar brez dodatka baze. Rezultati so prikazani na sliki 5.



Slika 5: Povprečni izkoristki in RSD pri uporabi sestavljenih topil za elucijo (n=2)

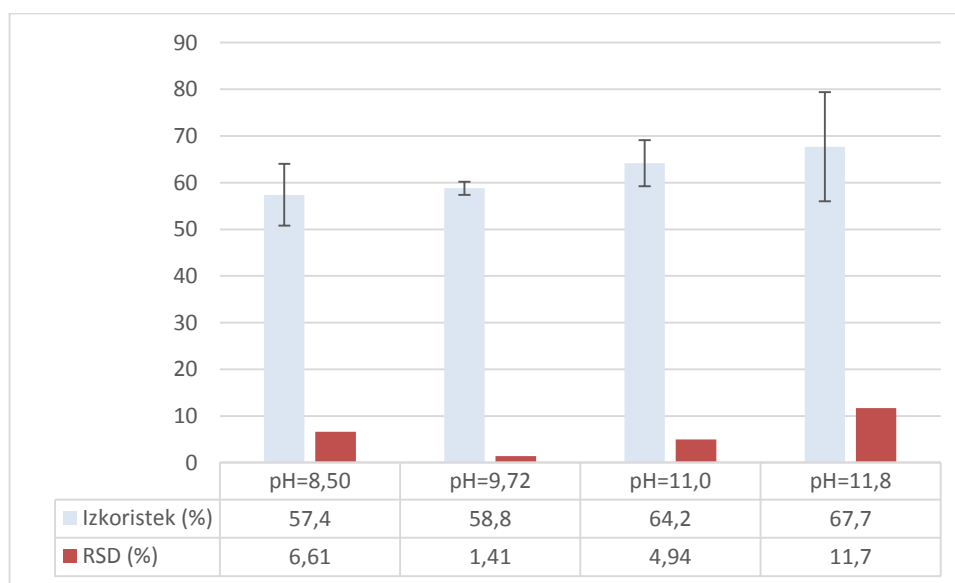
Na podlagi rezultatov na sliki 5 smo se odločili, da za nadaljnje poskuse za elucijsko topilo izberemo EtAc:DM=1:1 z dodatkom TEA. Pri uporabi tega topila za kondicioniranje (brez dodatka baze), elucijo in kvantitativni prenos (brez dodatka baze) smo dosegli več kot 80% izkoristek ekstrakcije in dobro ponovljivost.

#### 4.1.1.4 Vpliv pH vrednosti delovne raztopine vzorca na izkoristek ekstrakcije

V naslednji seriji poskusov smo se osredotočili na preiskovanje vpliva pH delovne raztopine vzorca. Znano je, da lahko pH vzorca vpliva na sposobnost vezave nekaterih spojin na sorbent (27). Nosilci Oasis<sup>®</sup> HLB so stabilni pri vrednosti pH-ja od 0 do 14, zato smo si lahko privoščili izrazitejšo spremembo pH-ja vzorcev delovnih raztopin. SER je šibka baza s pKa=9,85; zato smo sklepali, da se bo pri višjih vrednostih pH-ja ves analit nahajal v

neionizirani obliki in bo tako imel večjo afiniteto do polimernega nosilca. Za ta poskus smo pripravili delovne raztopine Raz1 s pH vrednostmi od 8,50 do 11,8. Delovne raztopine smo pripravili tako, da smo najprej naalkalili destilirano vodo z 0,2 M raztopino NaOH v destilirani vodi do navedenih pH vrednosti. Nato smo dodali še standardno raztopino SER. Tako pripravljene delovne raztopine smo nanесли na kolone. Kot topilo za elucijo smo pri tem poskusu uporabili zmes EtAc in DM v razmerju 1:1 brez dodatka baze. Izkoristki so bili glede na prejšnji poskus nižji, verjetno zaradi dejstva, ker v tem poskusu topilu za elucijo nismo dodali TEA, mogoče je na rezultat vplival tudi na novo vpeljan IS. Bolj pomembna od izkoristka je bila v tem trenutku direktna primerjava izkoristkov med delovnimi raztopinami SER z različnimi pH-ji.

V tej fazi razvoja metode smo kot IS prvič uporabili SER- d3. Standard smo uporabili zaradi bolj podobnih kemijsko-fizikalnih lastnosti z našim preiskovanim analitom, kot pa jih ima paroksetin. Rezultati so prikazani na sliki 6.

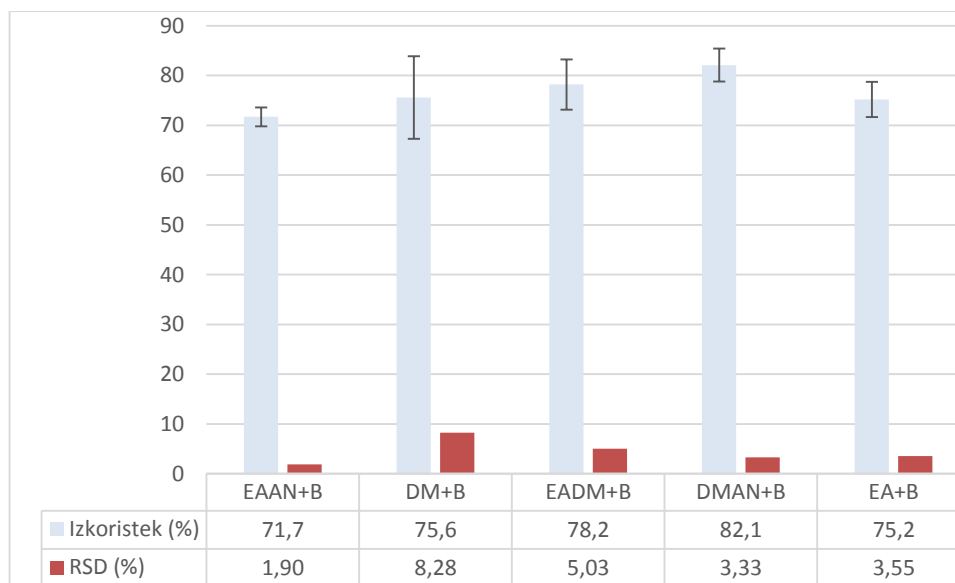


Slika 6: Vpliv pH vrednosti delovne raztopine vzorca na izkoristek in ponovljivost (RSD) ekstrakcije (n=2)

Iz rezultatov je razvidno, da je najboljši izkoristek pri pH=11,8, kar potrjuje naše predvidevanje, da bo izkoristek ekstrakcije najvišji pri pH= pKa (SER) + 2 enoti. Pri tem pH-ju se večina SER nahaja v neionizirani obliki in ima zato večjo afiniteto do polimernega nosilca HLB Oasis®. Problem pri tako visokem pH-ju je bila slaba ponovljivost meritev, saj je RSD znašal več kot 10%. Iz tega razloga smo se odločili, da za nadaljnje poskuse in meritve izberemo pH, ki je za pol enote nižji (pH=11,3).

#### 4.1.1.5 Izbor topila za elucijo pri novi vrednosti pH-ja delovne raztopine

V tem eksperimentu smo ponovili poskus pod točko 4.1.1.3. z razliko, da smo uravnali pH delovnih raztopin na 11,3; kot IS pa smo uporabili SER-d3. Kot topila za elucijo smo uporabili najbolj učinkovita topila iz poskusa 4.1.1.3: EtAc:ACN=1:1 (EAAN+B), DM (DM+B), EtAc:DM=1:1 (EADM+B), DM:ACN=1:1 (DMAN+B) in EtAc (EA+B). Vsem topilom smo dodali 2% volumski delež TEA.



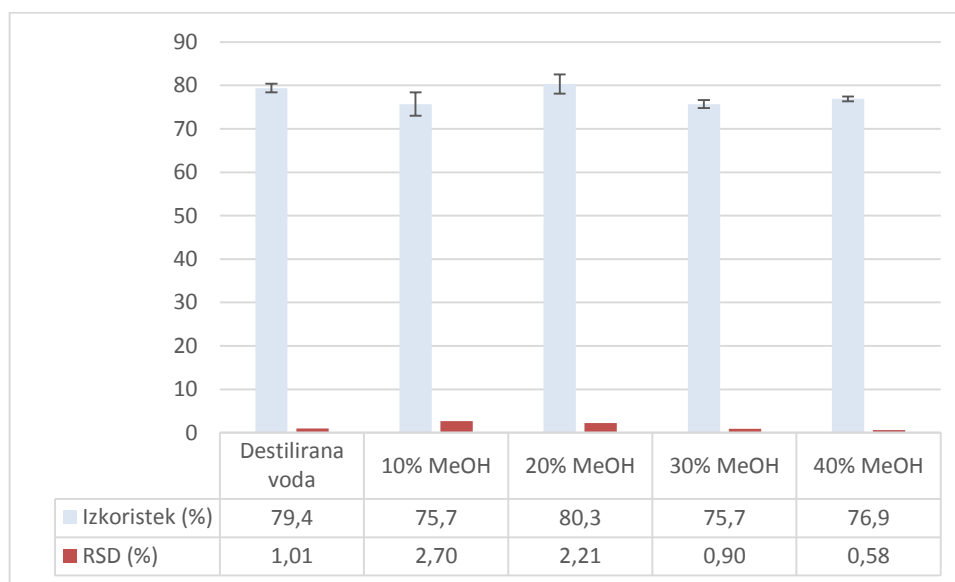
Slika 7: Izbor topila za elucijo pri novi vrednosti pH-ja delovnih raztopin (pH=11,3) (n=2)

Na podlagi rezultatov na sliki 7 smo kot topilo za elucijo za vse nadaljne poskuse izbrali topilo DM:ACN = 1:1 z dodatkom TEA. Pri tem topilu smo pod temi pogoji dosegli izkoristek višji od 80% z dobro ponovljivostjo.

#### 4.1.1.6 Vpliv deleža metanola v raztopini za spiranje na izkoristek ekstrakcije

V zadnji fazi poskusov z analizo z GC-MS smo izvedli še poskus pri katerem smo merili, kako vpliva delež MeOH v raztopini za spiranje na izkoristek ekstrakcije. Spiranje je zelo pomembna faza, saj z njo po nanosu našega analita iz nosilca odstranimo druge komponente vzorca, ki so se pri izbranih pogojih prav tako vezale na sorbent in bi lahko motile nadaljnjo instrumentalno analizo. Za ta poskus smo pripravili 12 delovnih raztopin Raz1, ki smo jih nanesli na nosilce, nato pa smo jih spirali z različnimi volumskimi deleži MeOH (do 40% MeOH v H<sub>2</sub>O) v 6 mL destilirane vode. Rezultati so prikazani na sliki 8. Na podlagi rezultatov lahko sklepamo, da delež MeOH v raztopini za spiranje do 40% nima pomembnejšega vpliva na izkoristek ekstrakcije. Glavni razlog dobrega zadrževanja SER na koloni je njegova nepolarnost. Vpliv je verjetno nizek tudi zaradi tega, ker je kolona v stiku

s topilom za spiranje precej manj časa kot pa topilo za elucijo. Faza spiranja je trajala okoli 15 sekund. Za nadaljnje poskuse smo za spiranje uporabljali 20% raztopino MeOH v destilirani vodi, pri čemer smo se zavedali, da lahko v primeru težav, delež MeOH povečamo tudi do 40%.



Slika 8: Vpliv deleža MeOH v raztopini za spiranje na izkoristek ekstrakcije (n=2)

#### **4.1.1.7 Prehod iz metode GC-MS na LC-MS/MS ter dokončna optimizacija SPE**

V prvi fazi razvoja smo optimizirali SPE metodo priprave vzorcev na GC-MS. Za prehod na LC-MS/MS metodo smo se odločili zaradi tega, ker pričakujemo zelo nizke koncentracije SER (1-50 ng/L) v površinskih in odpadnih vodah. Uporaba metode LC-MS/MS je primernejša za vzorce z nizko koncentracijo SER, saj jo odlikuje boljša občutljivost, natančnost, nižja meja zaznavnosti in določitev ter krajši čas analize. Naš cilj v drugem delu razvoja SPE na LC-MS/MS je bil preizkusiti in optimizirati ekstrakcijo vzorcev v ng/L območju, ter dodatno iskanje izgub pri postopku ekstrakcije na trdnem nosilcu. Kot izhodiščno metodo SPE smo uporabili metodo, ki smo jo optimizirali z GC-MS opisano v preglednici XIII.

#### **4.1.1.8 Preizkus ustreznosti priprave vzorcev in iskanje izgub pri SPE**

Z uporabo LC-MS/MS metode smo najprej ustrezno ovrednotili primernost postopka ekstrakcije in priprave vzorcev. Vrednotili smo izkoristek in ponovljivost ekstrakcije.

V začetku poskusov z analizo z LC-MS/MS metodo smo ohranili visoko koncentracijo SER, saj smo želeli imeti primerljive pogoje s tistimi na GC-MS, obenem pa smo na ta način lahko

v večji meri ovrednotili izgube pri fazi nanosa in spiranja vzorcev. V tem poskusu smo pripravili 9 vzorcev Raz1, 3 za vrednotenje izkoristka ekstrakcije in 6 za vrednotenje ponovljivosti. Rezultati so prikazani v preglednicah XXVI in XXVII.

Preglednica XXVI: Izkoristek ekstrakcije in RSD z uporabo LC-MS/MS metode (n=3)

Vzorec	Raz1
Povprečni izkoristek (%)	78,7
RSD (%)	5,23

Glede na rezultate v preglednici XXVI smo ugotovili, da je priprava vzorcev z SPE primerna za analizo z LC-MS/MS metodo. Izkoristek je primerljiv s tistim na GC-MS, dosegli smo zadovoljivo ponovljivost, čas celotne analize pa smo skrajšali za dobro uro.

Ostalim šestim vzorcem Raz1 pri tem poskusu smo dodali IS že pred analizo. Na podlagi odzivov teh vzorcev smo vrednotili ponovljivost ekstrakcije. Rezultati za ponovljivost znotraj enega dneva so prikazani v preglednici XXVII.

Preglednica XXVII: Ponovljivost SPE (n=6)

Vzorec	P* (SER)	P(IS)	Razmerje (SER/IS)
Povprečna vrednost	$13,0 \times 10^4$	$8,94 \times 10^4$	16,6
RSD (%)	8,11	9,24	1,66

\* P - odziv vzorca (površina pod krivuljo)

Iz preglednice XXVII je razvidno, da je ponovljivost celotne metode dobra. Prav tako vidimo kako pomemben vpliv ima dodatek IS na ponovljivost postopka (Razmerje SER/IS). Pri delovnih raztopinah za vrednotenje izkoristka (Preglednica XXVI) smo zbrali frakcijo, ki je stekla skozi kolone (F1-F3). Iz zbranih frakcij smo odvzeli 1 mL raztopine, od katerega smo 1  $\mu$ L direktno, brez predhodnega koncentriranja, analizirali na LC-MS/MS. Teh vzorcev nismo ponovno ekstrahirali, saj je imel že izhodni vzorec (Raz1) razmeroma visoko koncentracijo in bi zato SER in IS v primeru prisotnosti z LC-MS/MS direktno zaznali. Rezultati so prikazani v preglednici XXVIII.

Preglednica XXVIII: Izgube pri nanosu vzorcev

Vzorec	P(SER)	P(IS)	Delež SER (%)
F1	137	386	1,22
F2	68,0	609	0,61
F3	112	471	1,00
Povprečna vrednost	106	489	0,943

Odziv za SER je bil pri frakcijah nizek. Ob upoštevanju koncentriranja pri ekstrahiranih vzorcih, smo izračunali delež SER v frakciji glede na celotno maso SER v Raz1. Iz rezultatov je razvidno, da se pri nanosu na kolono izgubi v povprečju nekaj manj kot 1% celotne količine SER. S tem poskusom smo še enkrat dokazali, da se pri visokih koncentracijah SER ne preseže kapacitete kolone za SPE.

#### **4.1.1.9 Vpliv deleža metanola v raztopini za spiranje na izkoristek ekstrakcije**

Naš namen poskusov z analizo na LC-MS/MS je bil dobro preizkusiti in potrditi ugotovitve iz poskusov z analizo na GC-MS, zato smo še enkrat izvedli poskus pri katerem smo vrednotili izgube v fazi spiranja z različnimi koncentracijami MeOH v raztopini za spiranje. Pripravili smo 12 vzorcev Raz1.

Preglednica XXIX: Vpliv deleža MeOH v raztopini za spiranje na izkoristek ekstrakcije (n=2)

Vzorec	Delež MeOH (%)	Delež glede na celoten SER v 200 mL vzorca (%)	Izkoristek ekstrakcije (%)
W1	20	0,743	57,7
W2	30	0,493	57,0
W3	40	0,788	56,3
W4	50	0,320	58,4
W5	60	0,316	56,7
Povprečje		0,532	57,2

Za spiranje smo uporabili 20, 30, 40, 50 in 60% raztopine MeOH v vodi. Vzorce smo spirali s 6 mL raztopine za spiranje. S tem poskusom smo potrdili rezultate, ki smo jih dobili pri analizi na GC-MS. Izgube pri spiranju segajo največ do 0,79% glede na celotno količino SER v 0,2 L začetnega vzorca. Vpliva višjega deleža MeOH na spiranje SER iz kolon ni opaziti, saj izkoristki ostajajo podobni, kljub povečanju deleža MeOH v raztopini za spiranje. Za nadaljne delo smo za spiranje kolon uporabljali 40% raztopino MeOH v 6 mL vode.

#### **4.1.1.10 Vrednotenje kvantitativnega prenosa in volumna topila za elucijo**

Najbolj kritični del za izgube v celotnem procesu priprave vzorcev je bil kvantitativni prenos vzorca iz velike viala v 2 mL vialo. Kvantitativni prenos smo uporabljali, ker smo vzorce eluirali s 3-krat po 1 mL topila za elucijo v večje zbirne viala, ki pa niso kompatibilne z avtomatskim vzorčevalnikom LC-MS/MS. Eluat je bilo zato potrebno posušiti do 0,5 mL in ga kvantitativno prenesti v 2 mL viala. V poskusu optimizacije tega postopka smo vsak mililiter eluata zbirali ločeno v 2 mL vialo in preverjali kolikšen del analita se eluira v posameznih korakih elucije. Eluat smo v viali posušili do suhega in ga rekonstruirali v topilu



za analizo. Elucijo smo izvedli v 4 korakih po 1 mL, vzporedno pa tudi v 4 korakih po 0,6 mL v posamezne vialo ter 3-krat 0,6 mL v eno skupno vialo. Za ta poskus smo pripravili 6 vzorcev Raz1, po dve paralelki za vsak pogoj.

Preglednica XXX: Vrednotenje kvantitativnega prenosa (n=2)

Vzorec	Vzorec	Poprečni izkoristek (%)	RSD(%)
4×1mL	1. 1 mL	92,4	0,922
	2. 1 mL	9,99	60,3
	3. 1 mL	3,56	81,0
	4. 1 mL	2,06	93,3
	Seštevek	108	
4×0,6 mL	1. 0.6 mL	86,9	7,90
	2. 0.6 mL	9,82	63,9
	3. 0.6 mL	3,66	74,6
	4. 0.6 mL	2,31	67,3
	Seštevek	103	
3× 0,6 mL v eno vialo		88,8	3,18

Glede na rezultate iz preglednice XXX vidimo, da so se izkoristki zelo izboljšali ter, da se v prvem in drugem alikvotu topila za elucijo eluira večina preiskovanega analita, tako pri eluciji z 1 mL kot pri eluciji z 0,6 mL. V ostalih frakcijah se eluira relativno malo analita. Prav tako pa smo dokazali, da dosežemo dobre izkoristke in dobro ponovljivost tudi pri eluciji s 3-krat po 0,6 mL v eno vialo. Vzorec iz te vialo smo nato le posušili in rekonstruirali v topilu primernem za nadaljnjo analizo. Izkoristek direktne elucije v eno vialo je nižji kot seštevek izkoristkov v posamezne vialo, vendar moramo upoštevati zelo slabo ponovljivost pri eluciji v drugem, tretjem in četrtem koraku, zato rezultati niso čisto primerljivi. S tem, ko smo vzorce eluirali direktno v vialo smo skrajšali tudi čas analize. Za nadaljnjo pripravo vzorcev smo vse vzorce eluirali direktno v 2 mL vialo v treh korakih po 0,6 mL in ne več v zbirno vialo v treh korakih po 1 mL. Iz metode priprave vzorcev smo tako odstranili kvantitativni prenos eluiranega vzorca iz zbirne v 2 mL vialo, ki je predstavljal kritični del celotnega postopka, pri katerem je bila velika možnost, da prihaja do izgub in napak, ki so posledica človeškega faktorja. Hkrati pa visoki izkoristki, ki so presegli tudi 100%, kažejo na možnost kontaminacije vzorcev znotraj postopka priprave vzorcev.

#### 4.1.2 Razvoj LC-MS/MS

Instrumentalno metodo za SER smo razvili na instrumentu Agilent 6460 Triple Quadropole LC-MS/MS. Razvoj metode smo zastavili tako, da smo najprej razvili detekcijski del nato pa še kromatografski del metode s ciljem ločiti analit od matriksa ozadja.

#### 4.1.2.1 Metoda MS/MS

Osnovne nastavitve na masnem detektorju smo v začetku optimizirali z vzorcem visoke koncentracije SER (VzMs1). Izhajali smo iz priporočenih nastavitvev, ki se uporabljajo za ESI v pozitivnem načinu na tem inštrumentu. Pri analizi vzorca VzMs1 smo sproti spreminjali in vrednotili vse nastavitve MS/MS inštrumenta. S pomočjo orodja Optimizer, ki je del programske opreme MassHunter, smo najprej določili MRM prehode za SER in IS, skupaj z optimalno kolizijsko energijo in fragmentorjem. Z vzorci nižjih koncentracij (VzMs2 in VzMs3) smo še dodatno optimizirali nastavitve instrumenta (pretok in temperaturo sušilnega plina, pretok in temperaturo Jetstream plina, nebulizacijski plin, napetost na kapilari, Nozzle Voltage<sup>®</sup>). Glede na osnovne nastavitve smo dosegli izboljšanje s spremembo napetosti na kapilari iz 4000 na 3000 V za 12%. S spremembo Nozzle voltage<sup>®</sup> iz 1000 na 0 V pa smo dobili za 17% višji signal. Pri optimizaciji ostalih parametrov so bile izboljšave za največ 5%, zato smo te pogoje privzeli (preglednica XVIII). Po fini optimizaciji metode smo prav tako dosegli ustrezno razmerje med odzivi posameznih vzorcev različnih koncentracij, ki se je pri optimizirani metodi (Nova metoda, preglednica XXXI) premaknilo v bližino dejanskega razmerja izmerjenih koncentracij SER, ki znaša 24,7. Odzivi analize teh vzorcev so prikazani v preglednici XXXI.

Preglednica XXXI: Rezultati analize vzorcev z optimizirano LC-MS/MS analize metode (n=4)

	Stara metoda		Nova metoda	
	P(SER)	Razmerje P(SER/IS)	P(SER)	Razmerje P(SER/IS)
VzMs2	546	$8,15 \times 10^{-2}$	$1,61 \times 10^3$	$4,60 \times 10^{-2}$
VzMS3	$76,3 \times 10^2$	1,12	$50,6 \times 10^2$	1,21
Razmerje (SER/IS) VzMs3/VzMs2		13,7		26,3

#### 4.1.2.2 Metoda LC

Ustrezno kromatografsko ločbo SER od potencialnih komponent vodnega matriksa smo dosegli na osnovi različnih programov spiranja z uporabo 0,1% mravljične kisline in acetonitrila kot komponent mobilne faze. Optimizirane nastavitve pogojev ločbe pri LC in optimiziran program spiranja sta prikazana na preglednicah XIX in XX. Drugih mobilnih in stacionarnih faz nismo niti preizkusili, ker smo že z izbranimi pogoji dobili dovolj dobro ločbo in občutljivost metode.

### 4.1.3 Težave pri analizi SER

#### 4.1.3.1 Previsoki izkoristi ekstrakcije SER pri nizkih koncentracijah

V vseh poskusih optimizacije SPE metode smo delali z višjimi koncentracijami SER (8,83 µg/L), ker smo tako lažje ovrednotili izgube pri nanosu, spiranju in kvantitativnem prenosu. Ker so predmet naše končne analize okoljske vode v katerih pričakujemo SER v območju ng/L koncentracij, smo zato v naslednjem koraku določali uspešnost priprave vzorca na standardnih raztopinah nižjih koncentracij SER. Za namene tega poskusa smo pripravili vzorce standardnih raztopin Raz3, Raz5 in Raz6. Rezultati so prikazani preglednici XXXII.

Preglednica XXXII: Izkoristki ekstrakcije pri vzorcih z različnimi koncentracijami SER (n=2)

Vzorec	Koncentracija v 200 mL (ng/L)	Izkoristek (%)	RSD (%)
Raz3	1,02	1761	108
Raz5	25,2	227	43,2
Raz6	499	89,3	4,41

Pri vzorcih Raz3 in Raz5 so bili odzivi za SER nekajkrat višji v primerjavi z neekstrahiranimi vzorci standardov primerljivih koncentracij. Pričakovan izkoristek smo dosegli le pri vzorcu Raz6. Prav tako je bila pri nizkih koncentracijah tudi zelo slaba ponovljivost. Iz rezultatov smo sklepali, da prihaja do kontaminacije vzorcev s SER v enem od korakov celotne metode. Pred ponovitvijo poskusa smo temeljito očistili vso opremo namenjeno pripravi vzorca. Pri čiščenju cevk za nanos vzorca na kolono smo zraven spiranja z MeOH in destilirano vodo uvedli še spiranje z DM. Vso steklovino, ki smo jo uporabili za nadaljnjo delo smo prežarili pri 300 °C. Prav tako smo temeljito očistili kadičko za izvajanje ekstrakcije in vso opremo, ki smo jo uporabljali pri pripravi vzorcev.

Kljub vsem ukrepom smo dobili v drugem poskusu zelo podobne rezultate kot v prvem poskusu. Rezultati v preglednici XXXIII kažejo na to, da vira kontaminacije iz postopka priprave vzorcev nismo odstranili.

Preglednica XXXIII: Izkoristki ekstrakcij pri različnih koncentracijah SER (n=3)

Vzorec	Koncentracija v 200 mL (ng/L)	1. poskus izkoristek (%)	2. poskus izkoristek (%)	3. poskus izkoristek (%)	Vzorec	5. poskus izkoristek (%)
Raz 3	1,02	1761	1416	1160	Raz 3	182
Raz 5	25,2	227	275	80,6	Raz 4	98,6
Raz 6	499	89,3	83,7	/		

Za tretji poskus smo pripravili samo vzorce Raz3 in Raz5. Na podlagi rezultatov v

preglednici XXXIII vidimo, da smo v tem poskusu s ponovnim čiščenjem opreme in znižanjem koncentracije IS za 10-krat dosegli realni izkoristek pri vzorcih s koncentracijo 25,2 ng/L. Pri najnižji koncentraciji so izkoristki še vedno previsoki, vendar se z vsakim poskusom znižujejo, kar nakazuje na spiranje SER iz opreme. Sumili smo, da se SER zadržuje na cevkah in se počasi spira. Možen vzrok onesnaženja je lahko tudi elektroda pH metra, ki je bila sočasno uporabljena v raziskavi, pri kateri so delali z nekaj tisočkrat višjimi koncentracijami SER. V naslednjem koraku smo v istem dnevu pripravili dva zaporedna poskusa analize slepih vzorcev destilirane vode (brez dodatka SER; poskus 4 in poskus 5). Poskusa smo načrtovali tako, da smo označili cevke in mesta na kadički in s tem preverili, če se pri uporabi istih cevk odziv SER zmanjšuje, kar bi potrdilo našo domnevo o spiranju SER iz sistema. V 4. poskusu smo pripravili 12 slepih vzorcev, v 5. poskusu pa 6 slepih vzorcev, poleg katerih smo pripravili tudi vzorce Raz3 in Raz4. Pri pripravi vzorcev smo opustili alkaljenje do pH-ja 11,3. Vpliv elektrode pH metra na kontaminacijo smo vrednotili s primerjavo rezultatov poskusa 3 in poskusa 4 (Preglednica XXXIV). S primerjavo rezultatov poskusa 4 in poskusa 5 smo ovrednotili spiranje SER iz cevk za nanos vzorcev. Rezultati so prikazani v preglednici XXXV.

Preglednica XXXIV: Povprečni odzivi SER pri slepih vzorcih v treh zaporednih poskusih

	3. poskus (n=6)	4. poskus (n=12)	5. poskus (n=6)
Povprečna P(SER)	11933	2602	1567
RSD SER(%)	74,1	80,3	68,3

Iz preglednice XXXIV je razvidno, da se je odziv SER pri vzorcih po opustitvi alkaljenja z NaOH močno zmanjšal. S tem smo dokazali, da je bila vir kontaminacije elektroda pH metra, zato smo v nadaljnjih poskusih opustili alkaljenje vzorcev. Iz razlike med odzivi pri prvem in drugem delu četrtega poskusa je razvidno, da prihaja do spiranja cevk pri slepih vzorcih, saj se je odziv zmanjšal skoraj na vseh mestih za SPE z uporabo istih cevk. Spiranje cevk je še bolj nazorno razvidno iz preglednice XXXV. Na istih mestih na kadički z uporabo istih cevk se je odziv SER zmanjšal.

Preglednica XXXV: Odziv SER pri uporabi istih cevk za nanos vzorca

	4. poskus - P(SER)	5. poskus P(SER)	Znižanje odziva SER (%)
S1	1051	799	24,0
S2	4913	2789	43,2
S3	3586	1114	68,9
S4	8801	4147	52,9
S5	2765	2884	-4,30
S6	2613	1441	44,9

V petem poskusu smo določali tudi izkoristke ekstrakcije za Raz3 in Raz4. Iz preglednice XXXIII (5. poskus) vidimo, da smo dosegli realne izkoristke pri Raz3, pri Raz4 pa smo močno zmanjšali kontaminacijo.

#### 4.1.3.2 Prisotnost SER v topilu za elucijo in v raztopini IS

Med iskanjem izvora kontaminacije s SER smo preverili tudi topilo za elucijo in raztopino IS. Pripravili smo dva vzorca topila za elucijo, ter dva vzorca IS v koncentraciji 4,02 ng/mL v topilu za raztapljanje vzorca. Hkrati smo pomerili še standardno raztopino SER st.Raz3. Rezultati so prikazani v preglednici XXXVI.

Preglednica XXXVI: Odziv SER in IS v topilu za elucijo in v IS

Vzorec	Podrobnejši opis vzorca	P(IS)	P(SER)
T1	ACN:DM=1:1	50	44
T2	ACN:DM=1:1	25	32
IST1	IS v topilu za raztapljanje vzorca	38199	54
IST2	IS v topilu za raztapljanje vzorca	40452	44
St.Raz3	0,41 µg/L SER	39421	1632

Iz preglednice XXXVI je razvidno, da je v topilu za elucijo zanemarljiva količina SER. Odziv SER je v teh vzorcih občutno nižji kot pri standardni raztopini st.Raz3, kar pomeni da ne elucijsko topilo, ne raztopina IS nista kontaminirani s SER. Koncentracija st.Raz3 je ekvivalentna koncentraciji SER 1,02 ng/L v delovni raztopini pred ekstrakcijo.

#### 4.1.3.3 Menjava laboratorija in cevki ter opustitev alkaljenja

Po ugotovitvi virov kontaminacije smo se odločili, da laboratorijsko delo v celoti preselimo iz laboratorija na Institutu Jožef Stefan v laboratorij na Fakulteti za farmacijo. Glavni razlog je bila s SER kontaminirana oprema, prav tako pa se je v istem laboratoriju na delu iste opreme sočasno izvajalo raziskavo, pri kateri so uporabljali nekaj tisoč-krat višje koncentracije SER. Iz laboratorija na IJS smo si sposodili le kadičko za ekstrakcijo in črpalko. Opremo smo pred uporabo temeljito očistili. Namesto cevk smo za nanos na kolone uporabili 60 ml brizge (slika 3), katere smo namestili na kolone in v njih postopoma dolivali vzorce. Brizge smo po vsakem poskusu namočili v MeOH in jih dali na ultrazvok za pol ure, čiščenje smo po istem postopku ponovili še z destilirano vodo. Zaradi kontaminacije preko elektrode pH metra smo opustili tudi alkaljenje vzorcev. Za prvi poskus na novi lokaciji smo pripravili 4 slepe vzorce in 4 vzorce Raz3. Rezultati so prikazani v preglednici XXXVII.

Preglednica XXXVII: Odzivi SER v slepih vzorcih in Raz3 po menjavi laboratorija (n=4)

Vzorec	P(IS)	P(SER)	razmerje SER/IS	RSD(%)	Izkoristek (%)
Slepi	22253	191	$8,58 \times 10^{-3}$	38,9	
Raz3	31082	1161	$3,74 \times 10^{-2}$	7,17	76,6

Z menjavo laboratorija ter z opustitvijo alkaljenja smo dosegli občutno nižje odzive za SER v slepih vzorcih in realne izkoristke ekstrakcije tudi pri najnižji koncentraciji SER.

## 4.2 Validacija metode SPE z LC-MS/MS

Po optimizaciji metode smo izvedli še validacijo metode na ekstrahiranih vzorcih po protokolih opisanih v poglavjih 3.2.2., 3.2.3. in 3.2.4.

### 4.2.1 Izkoristek ekstrakcije pri različnih koncentracijah

Izkoristek ekstrakcije predstavlja uspešnost ekstrakcije vzorca. V sklopu validacije smo določali izkoristek ekstrakcije pri treh različnih koncentracijah SER v čisti okoljski vodi (Preglednica XXXVIII).

Preglednica XXXVIII: Izkoristek in ponovljivost (RSD) ekstrakcije analizne metode (n=3)

Vzorec	Deklarirana koncentracija	Razmerje SER/IS	Izkoristek ekstrakcije(%)	RSD (%)
VzV1	1,02	$5,51 \times 10^{-2}$	86,2	7,20
VzV4	10,1	0,363	75,6	13,3
VzV5	25,2	0,901	74,0	4,04
Slepi	0,00	$4,42 \times 10^{-2}$	/	3,39

Iz rezultatov v preglednici XXXVIII vidimo, da ima metoda zadovoljive izkoristke ekstrakcije (74,0-86,2%) ter zadovoljivo ponovljivost (4,04-13,3%) v celotnem koncentracijskem območju. Kot izhodiščno najnižjo koncentracijo smo na začetku uporabili vzorec s koncentracijo SER 1,02 ng/L, vendar smo pri tem poskusu ugotovili, da so odzivi v primerjavi s slepimi vzorci prenizki, da bi lahko pri tej koncentraciji določili mejo določitve. Zato smo v nadaljevanju validacije uporabili vzorce s koncentracijo SER 2,52 ng/L za preverjanje njihove ustreznosti kot spodnje meje območja metode.

### 4.2.2 Selektivnost

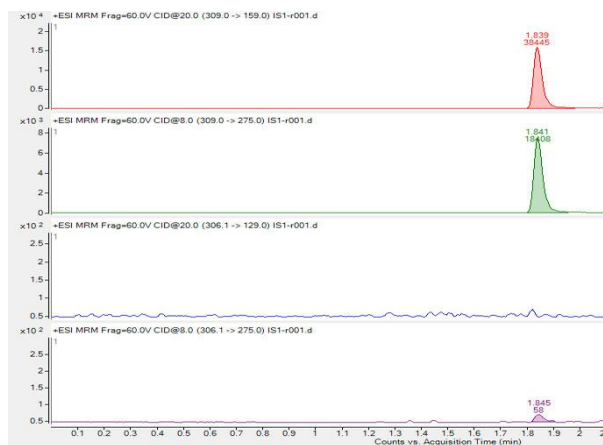
Selektivnost predstavlja sposobnost metode, da lahko z njo nedvoumno analiziramo preiskovani analit ob pristonosti drugih komponent v vzorcu. Ponavadi vzorci vsebujejo nečistote, razgradne produkte ali pa različne matrikse. Metoda je selektivna kadar so

kromatografski vrhovi preiskovanega analita in ostalih prisotnih komponent v vzorcu jasno ločeni in se ne prekrivajo. Kot vidimo na slikah 9,10 in 11 je naša metoda selektivna, saj v vzorcu topila za nadaljnjo analizo z LC-MS/MS ni odziva pri retencijskem času in MRM prehodih za SER in SER-d3. Prav tako vidimo, da v raztopini IS nimamo odziva pri MRM prehodih za identifikacijo in kvantifikacijo SER.

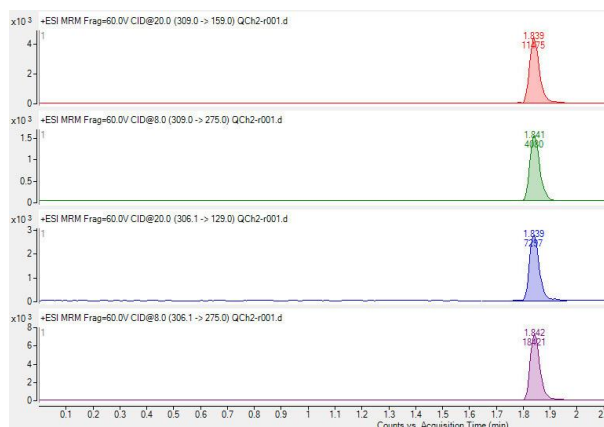
Na slikah 9,10 in 11 predstavlja prvi kromatogram odzive pri MRM prehodu za identifikacijo IS, drugi kromatogram odziv pri MRM prehodu za kvantifikacijo IS. Tretji kromatogram predstavlja odziv pri MRM prehodu za identifikacijo, četrti kromatogram pa odziv pri MRM prehodu za kvantifikacijo SER.



Slika 9: Kromatogram topila za raztapljanje vzorca



Slika 10: Kromatogram IS



Slika 11: Kromatogram standarda SER in IS

Po postopku opisanem v poglavju 3.2.4.2 smo selektivnost v vzorcih standarda SER v neonesnaženi površinski in v sintetični odpadni vodi ovrednotili tudi kvantitativno. Rezultati so prikazani v preglednici XXXIX. Po priporočilih proizvajalca je dovoljeno do 15% odstopanje (RSD) pri posamezni koncentraciji. Kot vidimo iz rezultatov smo selektivnost potrdili pri vseh treh koncentracijah pri vzorcih standardov v površinski vodi. Variabilnost rezultatov je odvisna tudi od koncentracije analita v vzorcu, v našem primeru vidimo da VzV2 (najnižja koncentracija) prav tako rahlo odstopa, kar je posledica dokaj nizkega odziva pri MRM prehodu za identifikacijo SER. Selektivnost smo potrdili tudi za SER v sintetični odpadni vodi (VzVO5). Razmerje med kvantitativnim in kvalitativnim prehodom je praktično enako kot pri vzorcih raztopin standardov SER v površinskih vodah, kar pomeni, da je metoda selektivna tudi za bolj kompleksne vzorce.

Preglednica XXXIX: Razmerje med kvantitativnim in kvalitativnim MRM prehodom za SER (n=4)

	Razmerje odzivov SER <sub>275</sub> /SER <sub>129</sub>	SD	RSD(%)
VzV2	2,38	0,09	3,60
VzV4	2,51	0,03	1,00
VzV6	2,52	0,04	1,70
VzVO5	2,48	0,05	2,00
Skupaj	2,47	0,07	2,70

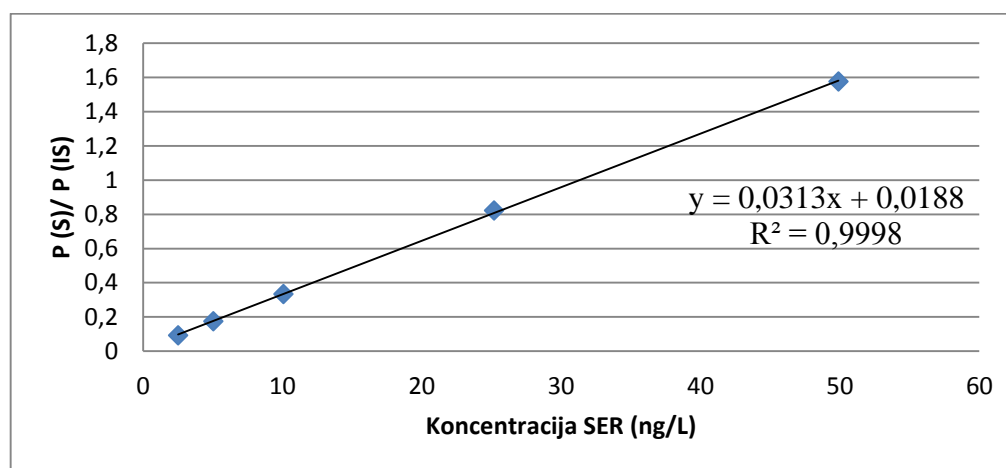
#### 4.2.3 Linearnost

Linearnost predstavlja sposobnost analitskega postopka, da metoda znotraj danega območja daje rezultate, ki so neposredno ali z definiranimi matematičnimi pretvorbami premosorazmerni koncentraciji analita v vzorcu. Linearnost določamo skozi celotno območje analiznega postopka pri najmanj petih različnih koncentracijah. Regresijska



premica, ki je končni rezultat izračuna, je definirana z enačbo  $y = kx + n$ , pri čemer  $y$  predstavlja razmerje odzivov med SER in IS,  $x$  koncentracijo analita,  $k$  naklon premice ter  $n$  vrednost pri kateri premica seka ordinato. Korelacijo med spremenljivkama podaja Pearsonov koeficient  $R$  oz. determinacijski koeficient  $R^2$ .

Za namene validacije smo po metodi opisani v poglavju 3.2.4.3 določali linearnost v raztopinah vzorcev standardnih raztopin SER v dveh matriksih. Linearnost smo določali v vzorcih standardov SER v čisti površinski vodi in v sintetični odpadni vodi saj imajo odpadne vode kompleksnejši matriks kot čiste površinske vode in lahko pri njih pričakujemo največkrat nižje odzive pri istih koncentracijah SER. Najprej smo določili linearnost analizne metode pri vzorcih pripravljenih v čisti okoljski vodi. Za namene določitve linearnosti smo pripravili 5 vzorcev (VzV2-VzV6, Preglednica XXI). Takšno koncentracijsko območje smo izbrali zaradi pričakovanih zelo nizkih koncentracij SER v površinskih vodah (Preglednica II). Rezultate analize teh vzorcev smo obdelali z metodo linearne regresije in jih predstavili na sliki 12.

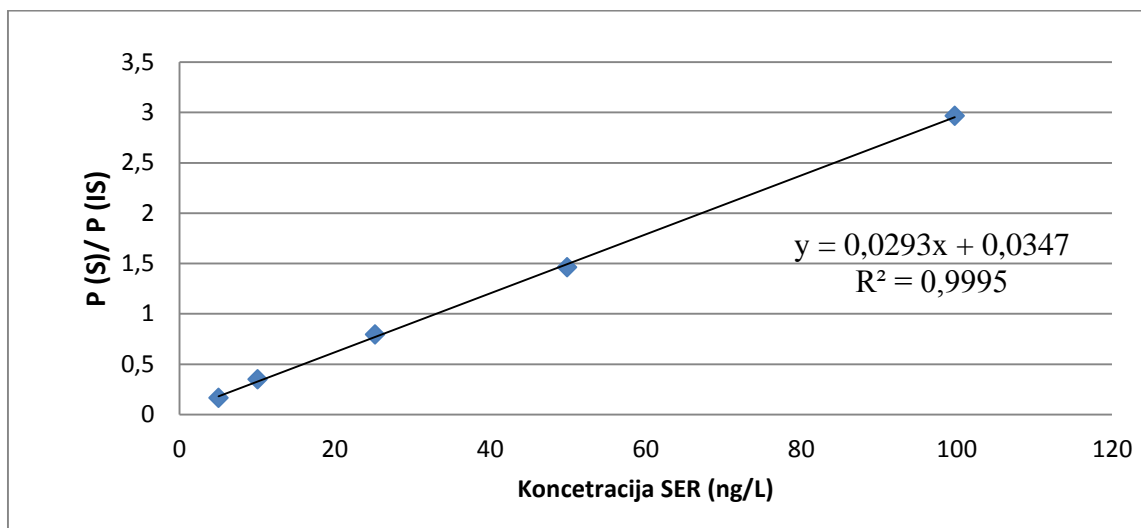


Slika 12: Umeritvena premica za vzorce SER v površinski vodi

Iz umeritvene premice (Slika 12) vidimo, da razmerje površin med odzivom SER in IS premo sorazmerno narašča z naraščanjem koncentracije SER. Izvrstna linearnost metode znotraj koncentracijskega območja 2,52-49,9 ng/L je razvidna iz visokega determinacijskega koeficienta ( $R^2=0,9998$ ).

Linearnost analizne metode za meritve v odpadnih vodah smo določali v ločeni analizi, kjer smo kot matriks uporabili sintetično odpadno vodo. Sintetično odpadno vodo smo pripravili po recepturi, ki so jo uporabili v podobnih raziskavah (34). Tako pripravljeno vodo smo uporabili, ker glede na parametre kakovosti vode predstavlja približek realnih odpadnih vod

iz ČN, hkrati pa ne vsebuje SER. Pripravili smo vzorce v koncentracijskem območju od 5,03 do 99,8 ng/L (VzVO1-VzVO5) saj smo glede na podatke iz literature (Preglednica I) pričakovali višje koncentracije SER v odpadnih kot pa v površinskih vodah.



Slika 13: Umeritvena premica za vzorce SER v sintetični odpadni vodi

Iz umeritvene premice na sliki 13 vidimo, da razmerje površin med odzivom SER in odzivom IS v sintetični odpadni vodi premosorazmerno narašča z naraščanjem koncentracije SER, kar je razvidno tudi iz determinacijskega koeficienta ( $R^2=0,9995$ ).

Pri obeh umeritvenih premicah sta naklona podobna. Prav tako sta podobna tudi naklona premic v različnih matriksih v istem koncentracijskem območju (5,03-49,9 ng/L). Naklon premice v tem koncentracijskem območju v neosnaženi površinski vodi v znaša  $k_{np}=0,0312$  L/ng v sintetični odpadni vodi pa  $k_s=0,0288$  L/ng. Ti rezultati nakazujejo, da je metoda daje zelo podobne rezultate v površinskih in odpadnih vodah.

Dokazali smo, da je metoda linearna v določenih koncentracijskih območjih v obeh matriksih. Na podlagi umeritvenih premic smo nato izračunali koncentracije SER v površinskih in odpadnih vodah. Dobra linearnost metode predstavlja večjo verodostojnost dobljenih rezultatov analize površinskih in odpadnih vod.

#### 4.2.4 Ponovljivost in točnost priprave vzorca

Ponovljivost metode predstavlja natančnost meritev pod enakimi delovnimi pogoji v kratkem časovnem obdobju. Stopnja ponovljivosti metode izraža stopnjo ujemanja odzivov pri večkratni pripravi vzorcev enake koncentracije. Po priporočilu ICH smernice je potrebno ponovljivost določati pri vsaj treh koncentracijah, ki so razporejene čez celotno

koncentracijsko območje analize (35). Točnost analizne metode izraža ujemanje dobljene koncentracije s pravo koncentracijo. Ponovljivost in točnost znotraj enega dne smo določali po metodah opisanih v poglavjih 3.2.4.4 in 3.2.4.5. Po metodah opisanih v teh poglavjih smo prav tako proučevali meddnevno ponovljivost in točnost. Rezultati dnevne točnosti in ponovljivosti so prikazani v preglednici XL.

Preglednica XL: Ponovljivost in točnost znotraj enega dne (n=3)

Vzorec	Deklarirana c SER (ng/L)	Povprečno Razmerje SER/IS	Izmerjena c SER (ng/L)	Točnost (%)	RSD (%)
VzV2	2,52	$9,28 \times 10^{-2}$	2,34	92,8	6,50
VzV4	10,1	0,334	10,1	99,9	0,489
VzV6	49,9	1,78	56,2	112	0,341

Kot je razvidno iz preglednice XL je metoda točna in ponovljiva znotraj enega dne v celotnem koncentracijskem območju (2,52-49,9 ng/L). V preglednici XLI so prikazani rezultati vrednotenja meddnevne točnosti in ponovljivosti.

Preglednica XLI: Meddnevna točnost in ponovljivost (n=2)

Vzorec	Deklarirana c SER (ng/L)	Razmerje SER/IS				Povprečno	Izmerjena c SER (ng/L)	Točnost (%)	RSD (%)
		1. dan	2. dan	3. dan					
VzV2	2,52	$9,18 \times 10^{-2}$	$9,28 \times 10^{-2}$	$9,17 \times 10^{-2}$	$9,21 \times 10^{-2}$	2,34	93,0	0,651	
VzV4	10,1	0,335	0,352	0,333	0,340	10,3	102	3,18	
VzV6	49,9	1,78	1,58	1,58	1,65	52,0	104	6,98	

Iz rezultatov, ki so prikazani v preglednici XLI vidimo, da je metoda dobro ponovljiva saj je  $RSD < 7\%$  pri vseh koncentracijah, kar je mnogo bolje od postavljenega kriterija ( $RSD < 15\%$ ) Metoda je tudi točna v celotnem koncentracijskem območju saj so rezultati znotraj postavljenega kriterija.

Ponovljivosti in točnosti nismo posebej vrednotili v sintetični odpadni vodi, saj je bilo že iz umeritvenih premic razvidno, da so odzivi zelo primerljivi.

#### 4.2.5 Ponovljivost injiciranja

V sklopu validacije smo po metodi opisani v poglavju 3.2.4.5 na vzorcih VzV2, VzV4 in VzV6 preverjali tudi ponovljivost injiciranja (Preglednica XLII).

Preglednica XLII: Ponovljivost injiciranja ekstrahiranih vzorcev

Vzorec	Deklarirana koncentracija (ng/L)	Povprečno razmerje SER/IS	RSD (%)	število injiciranj
VzV2	2,52	$9,73 \times 10^{-2}$	4,75	3
VzV4	10,1	0,332	1,51	3
VzV6	49,9	1,77	1,83	3

Kot vidimo v preglednici XLII je injiciranje znotraj postavljenega kriterija ( $RSD < 5\%$ ) na vseh treh koncentracijskih nivojih.

#### 4.2.6 Meja zaznavnosti in meja določitve

Meja zaznavnosti je najmanjša količina analita v vzorcu, ki jo lahko z analizo metodo zaznamo in zanesljivo ločimo od ozadja, vendar ne nujno tudi kvantitativno ovrednotimo. Meja določitve predstavlja najmanjšo količino analita v vzorcu, ki jo lahko kvantitativno ovrednotimo z ustrezno točnostjo in natančnostjo.

Meje zaznavnosti nismo mogli določiti, saj smo imeli kljub vsem ukrepom za preprečitev kontaminacije še vedno odziv za SER v slepih vzorcih. Mejo določitve smo določili po enem izmed pristopov za določanje po FDA smernicah (36). Tak pristop je najbolj smiseln saj smo imeli odziv SER pri slepih vzorcih. Meja določitve je bila najmanjša koncentracija pri kateri je bila metoda še dovolj točna ( $100 \pm 20\%$ ) in ponovljiva ( $RSD < 20\%$ ), da lahko analit še kvantitativno ovrednotimo. Meja določitve je v našem primeru znašala 2,52 ng/L. Če sicer preračunamo LOD kot 3-kratno in LOQ kot 10-kratno povprečno vrednost SD odziva treh slepih vzorcev dobimo vrednosti  $LOD = 0,959$  ng/L in  $LOQ = 1,30$  ng/L.

#### 4.3 Analiza površinskih in odpadnih vod

Na osnovi validacije analizne metode (4.2.) smo ugotovili, da je razvita analizna metoda, ki vključuje pripravo vzorcev z SPE in instrumentalno analizo z LC-MS/MS primerna za določanje SER v površinskih vodah. V zadnjem delu smo zato z validirano metodo tudi testirali na vzorcih površinskih, pa tudi odpadnih vod.

V površinskih vodah pričakujemo SER predvsem v predelih, ki so obremenjeni z antropogenimi izvori onesnaženja, kot so večja mesta, oziroma kjer prečiščena odpadna voda iz ČN vstopa v vodno okolje. Po literaturnih podatkih se SER v površinskih vodah nahaja v koncentracijah od 0,16 do 49 ng/L (Preglednica II), zato smo tudi samo pričakovali analit v koncentracijah do 50 ng/L. Odločili smo se, da bomo odvzeli vzorce na lokacijah, ki so po

naših pričakovanih najbolj obremenjena s SER, kot tudi z ostanki drugih zdravil. En vzorec za analizo smo odvzeli na Ljubljanski Špici (Vz1), drugi pa v Zalogu (Vz4). Ti dve točki smo izbrali, da bi lahko vrednotili vpliv mesta Ljubljana in čistilne naprave na vsebnost SER v reki Ljubljanici. Druga dva vzorca smo pridobili na reki Krki pred ČN (Vz2) in po čistilni napravi (Vz3). Tudi tukaj smo želeli ovrednotiti vpliv čistilne naprave na onesnaženost reke s SER. Vzorce smo analizirali po metodi opisani v poglavju 3.2.2 in 3.2.5. Meritve smo za vsak vzorec opravljali v dveh paralelkah.

Preglednica XLIII: Rezultati analize površinskih vod (n=2)

Vzorec	Mesto zajema	Povprečno razmerje SER/IS	RSD (%)	Določene koncentracije SER (ng/L)*	Rezultat
Vz1	Lj-Špica	$2,35 \times 10^{-2}$	5,36	0,151	< LOQ
Vz4	Lj-Zalog	$5,15 \times 10^{-2}$	11,5	1,04	< LOQ
Vz2	NM-pred ČN	$2,57 \times 10^{-2}$	55,6	0,223	< LOQ
Vz3	NM-po ČN	$3,37 \times 10^{-2}$	20,0	0,484	< LOQ

\*koncentracija je preračunana zgolj informativno, saj metoda ni bila razvita za določanje tako nizkih koncentracij

Iz rezultatov v preglednici XLIII je razvidno, da je v vseh vzorcih koncentracija SER pod mejo določitve. Trije vzorci imajo podoben odziv kot slepi vzorec čiste površinske vode, vzorec Vz4 pa odstopa, vendar je še vedno pod mejo določitve. Vzorec Vz4 je prav tako najbolj okoljsko obremenjen z odplakami iz ČN Ljubljana. Prav tako vidimo, da je metoda pri tako nizkih koncentracijah zelo slabo ponovljiva saj so RSD-ji pri vzorcih 2 in 3 krepko nad 15%. Rezultati so deloma tudi pričakovani saj so reke v Sloveniji zaradi velike vodnatosti in nizke poseljenosti razmeroma nizko obremenjene z ostanki zdravil.

V odpadnih vodah, ki pritečejo in odtečejo iz ČN se po literaturnih podatkih SER nahaja v območju od 3,7 do 60 ng/L (Preglednica I), podobno stanje smo pričakovali tudi za slovensko vodno okolje. V odpadnih vodah smo torej pričakovali višjo koncentracijo SER kot v površinskih vodah, saj so površinske vode mnogo bolj razredčene kot odpadne, prav tako pa naj bi se del SER med čiščenjem odpadnih vod razgradil (Preglednica I). Pri analizi odpadnih vod smo analizirali 4 vzorce dveh različnih čistilnih naprav (Čistilna naprava Novo mesto in Čistilna naprava Ljubljana). Pri vsaki čistilni napravi smo preverili koncentracijo SER v odpadni vodi ki priteče v ČN in v prečiščeni vodi ki zapusti ČN. S takšnim načrtovanjem odvzema vzorcev smo vrednotili tudi učinkovitost čistilne naprave. Vzorce smo analizirali po metodi opisani v poglavju 3.2.2 in 3.2.5.

## Preglednica XLIV: Rezultati analize odpadnih vod

Vzorec	Mesto zajema	Povprečno razmerje SER/IS	RSD (%)	Izračunana koncentracija glede na umeritveno premico (ng/L)
Vz5	ČN-NM dotok	1,08	2,10	35,8
Vz6	ČN-NM odtok	0,523	5,42	16,7
Vz7	ČN-LJ dotok	1,17	11,1	38,8
Vz8	ČN-LJ odtok	0,792	1,97	25,9

Iz rezultatov v preglednici XLIV vidimo, da imamo v odpadnih vodah prisoten SER v koncentracijah od 16,7 do 38,8 ng/L. Razvidno je, da je vsebnost SER v odpadnih vodah večja v Ljubljani kot v Novem mestu. Iz rezultatov je razvidno, da so ČN le deloma učinkovite pri odstranjevanju SER iz odpadnih vod, kar pomeni, da SER skozi ČN vstopa v okolje, kjer predstavlja potencialno nevarnost za zdravje vodnih organizmov. ČN Novo mesto odstrani iz odpadnih vod 53,5% vsega SER, ČN Ljubljana pa odstrani iz odpadnih vod 33,2% SER. Zaenkrat ne poznamo vodnih organizmov na katere ima SER vpliv tudi v koncentracijah, ki smo jih izmerili in zasledili v literaturi, res pa je, da so bile študije izvedene le na posameznih vrstah vodnih organizmov. Prav tako ne poznamo identitete vseh razpadnih produktov SER, ki bi lahko v okolju povzročali še večjo škodo. Zelo slabo raziskano je tudi sinergistično delovanje SER s preostalimi SSRI oz. s preostalimi prisotnimi kontaminanti. Cilj razvoja tehnologije čistilnih naprav v prihodnosti je, da bodo le te odpadno vodo očistile do te mere, da več ne bo vsebovala okolju potencialno škodljivih spojin. V prihodnosti bo potrebno izvesti teste kronične izpostavljenosti vodnih organizmov skozi daljše časovno obdobje in na podlagi teh rezultatov podati dokončne smernice za uspešno odstranjevanje SER iz vod. Prisotnost SER v odpadnih vodah v obeh čistilnih napravah je primerljiva z literaturnimi podatki (Preglednica I). Koncentracija SER v odpadnih vodah je primerljiva z ugotovljenimi koncentracijami SER v odpadnih vodah v državah kjer so prav tako vrednotili prisotnost SER.

Pri analizi odpadnih vod, ki predstavljajo kompleksne matrikse smo imeli izraženo supresijo ionov, kar se je videlo kot znižan odziv IS. Do t.i. učinka matriksa je prišlo tudi pri pripravi umeritvene krivulje v sintetični odpadni vodi, vendar ta učinek ni bil tako izrazit. Za zmanjšanje možnosti pojava ionske supresije bi lahko izbrali šibkejše elucijsko topilo ali močnejše topilo za spiranje sorbenta.

## 5. Sklepi

V sklopu magistrske naloge smo v začetku poskusov najprej ovrednotili in optimizirali pogoje priprave vzorcev SER z SPE s pomočjo detekcije na GC-MS. Izbrali smo ustrezne kolone za ekstrakcijo SER (Oasis<sup>®</sup> HLB, 60mg/3mL), izbrali smo najboljše topilo za kondicioniranje kolon (DM:ACN=1:1) in elucijo (2% TEA v 3×1 ml DM:ACN=1:1), določili smo optimalni čas nanosa vzorcev ( $t_n > 1,5h$ ), optimalno pH vrednost vzorcev za nanos (pH=11,3), vpliv deleža MeOH v topilu za spiranje na uspešnost ekstrakcije (20% MeOH v 6 mL H<sub>2</sub>O) ter preverili, v kateri fazi priprave vzorcev lahko prihaja do izgub.

Pri prehodu na bolj občutljivo LC-MS/MS metodo smo najprej na vzorcih standardov določili ustrezne nastavitve same analizne metode. Najprej smo optimizirali detekcijski del nato pa še kromatografski del metode. Z razvito metodo detekcije smo nato preverili ustreznost postopka priprave vzorcev za analizo primerjalno glede na GC-MS. Prav tako smo preverili, kje v postopku prihaja do izgub, ovrednotili smo vpliv kvantitativnega prenosa iz večjih vial v manjše na izkoristek ekstrakcije in vpliv deleža MeOH v topilu za spiranje na izkoristek ter ovrednotili izkoristek priprave vzorcev pri različnih koncentracijah.

Pri detekciji z metodo LC-MS/MS smo se prvič srečali s kontaminacijo vzorcev s SER. Do kontaminacije je prihajalo, ker so v istem laboratoriju na isti opremi sočasno izvajali poskuse z nekaj 1000-krat višjimi koncentracijami SER. Za odkrivanje vzrokov kontaminacije smo porabili veliko časa saj smo morali ovrednotiti vsak del postopka priprave vzorcev, kjer bi lahko prišlo do onesnaženja. Po določitvi in odstranitvi vzrokov kontaminacije ter preselitvi eksperimentalnega dela v laboratorij na Fakulteti za farmacijo smo dosegli realne izkoristke tudi pri vzorcih standardnih raztopin SER z 1,02 ng/L v destilirani vodi.

Po optimizaciji metode in odstranitvi vzrokov kontaminacije smo naredili validacijo razvite analizne metode za določanje SER v površinskih vodah, znotraj katere smo določili izkoristek ekstrakcije pri različnih koncentracijah (74,0-86,2%), potrdili selektivnost, linearnost ( $R^2=0,9998$ ), meddnevno in dnevno ponovljivost (RSD <15%) ter točnost (93,0-112,6%), ponovljivost injiciranja (RSD <7%) in mejo določitve (2,52 ng/L). Isto analizno metodo smo uporabili tudi na odpadni vodi, kjer smo določili linearnost ( $R^2=0,9995$ ). Zaradi primerljivih rezultatov linearnosti za SER v čisti površinski in sintetični odpadni vodi smo se odločili, da vse preostale parametre validacije preverimo le na vzorcih čistih površinskih vod. Ker smo pri validaciji ponovno zaznali SER v slepih vzorcih pripravljenih v površinski vodi, meje zaznavnosti nismo mogli določiti.

Optimizirana analizna metoda nam je omogočala kvantitativno določevanje SER v površinskih vodah v koncentracijskem območju od 2,52 ng/L do 49,9 ng/L in v odpadnih vodah v koncentracijah od 5,03 do 99,8 ng/L. V tem koncentracijskem območju smo za metodo dokazali ustrezno selektivnost, linearnost, točnost in ponovljivost.

Pri končni validaciji smo zaradi težav s kontaminacijo preko elektrode pH metra opustili alkaljenje vzorcev. Pri razvoju še bolj občutljive analizne metode za določanje SER v vodi bi morali ponovno vpeljati alkaljenje vzorcev s pripravo puferskih raztopin različnih koncentracij SER, poskuse pa bi morali izvajati v ločenem laboratoriju, kjer bi imeli nadzor nad kontaminacijo s SER. Razvoj metode bi lahko izvedli tudi z uporabo kationskih nosilcev, pri katerih bi dosegli večjo selektivnost pri nanosu, spiranju in eluciji. Občutljivost analizne metode bi lahko povečali s povečanjem volumna injiciranja v LC-MS/MS. Kljub vsem zapletom smo razvili metodo s katero lahko kvantitativno določimo koncentracijo SER v zelo nizki koncentraciji 2,52 ng/L v površinskih vodah in v koncentraciji 5,03 ng/L v odpadnih vodah. Za določevanje SER v površinskih vodah v nižjem koncentracijskem območju bi bilo potrebno popolnoma odpraviti vzroke kontaminacije.

V sklopu magistrske naloge nam je uspelo dokazati prisotnost SER v odpadnih vodah v koncentracijskem območju od 16,7 do 38,8 ng/L. Ugotovili smo tudi, da so ČN le deloma učinkovite pri odstranjevanju SER iz odpadnih vod, ki se med čiščenjem odpadne vode bodisi razgradi z aktivnim blatom, ali pa se glede na visok adsorpcijski koeficient prerazporedi v odpadno blato. SER nam v površinskih vodah zaradi laboratorijske kontaminacije vzorcev ni uspelo dokazati, kljub temu pa je odziv za SER v vzorcu Vz4 odstopal od odziva slepih vzorcev, kar nam daje slutiti, da se SER nahaja tudi v površinskih vodah v obremenjenih regijah v Sloveniji.



## 6. Literatura

1. Silva L, Lino CM, Meisel LM, Pena A: Selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRIs) in the aquatic environment: An ecopharmacovigilance approach. *Sci. total environ.* 2012; 437: 185-195
2. Melissa MS, Edward TF: Trace Analysis of Antidepressant Pharmaceuticals. *Anal. Chem.* 2008; 80: 1756-1762
3. Stahl MS: Mechanism of action of serotonin selective reuptake inhibitors. *J. Affect. Disord.* 1998; 51: 215-235
4. Giebułtowicz J, Nałęcz-Jawecki G: Occurrence of antidepressant residues in the sewage-impacted Vistula. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2014; 104: 103-109
5. SJ, Van den Berg: Comparing SSRIs: from chemistry to clinical choice. *Hum. Psychopharmacol.* 1995; 10: 199-209
6. Frederick RW: A critical review of the mechanism of action for the selective serotonin reuptakeinhibitors: Do these drugs possess anti-inflammatory properties and how relevantis this in the treatment of depression? *Neuropharmacol.* 2013; 67: 304-317
7. Minagh E, Hernan R, O'Rourke K, Lyng MF, Davoren M: Aquatic ecotoxicity of the selective serotonin reuptake inhibitor sertraline hydrochloride in a battery of freshwater test species. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2009; 72: 434-440
8. Kosjek T, Heath E: Tools for evaluating selective serotonin re-uptake inhibitorresidues as environmentalcontaminants. *Trends Anal. Chem.* 2010; 29: 832-847
9. Lajeunesse A, Gagnon C, Sauve S: Determination of Basic Antidepressants and Their N-Desmethyl Metabolites in Raw Sewage and Wastewater Using Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2008; 80: 5325-5333
10. Silva LJ, Lino CM, Meisel LM, Pena A: Profiling Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) in the Environment: Trends in Analytical Methodologies. *Anal. Chem.* 2014; 44: 41-67
11. Evropska komisija, Eurobarometer on mental health, [http://www.ec.europa.eu/health/mental\\_health/docs/ebs345\\_country\\_national.zip](http://www.ec.europa.eu/health/mental_health/docs/ebs345_country_national.zip), avgust 2015
12. Pečar-Čad S, Hribovšek T: Ambulantno predpisovanje zdravil v Sloveniji po ATC klasifikaciji v letu 2010. Ljubljana : IVZ, 2011
13. Langford KH, Thomas KV: Determination of pharmaceutical compounds in hospital effluents and their contribution to wastewater treatment works. *Environ. Int.* 2009; 35: 766-770

14. Demeestere K, Petrović M, Gros M, Dewulf J, Langenhove HV, Barceló D: Trace analysis of antidepressants in environmental waters by molecularly imprinted polymer-based solid-phase extraction followed by ultra-performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2010; 396: 825-837
15. Redshaw HC, Cooke PM, Talbot MH, McGrath S, Rowland JS: Low biodegradability of fluoxetine HCl, diazepam and their human metabolites in sewage sludge-amended soil. *J. Soils Sediments* 2010; 8: 217-230
16. Kwon WJ, Armbrust LK: Aqueous Solubility, n-Octanol–Water Partition Coefficient, and Sorption of Five Selective Serotonin Reuptake Inhibitors to Sediments and Soils. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 2008; 81: 128-135
17. United States Environmental Protection Agency, Final Report: The Environmental Occurrence, Fate, and Ecotoxicity of Selective Serotonin Reuptake Inhibitors (SSRIs) in Aquatic Environments, [http://cfpub.epa.gov/ncer\\_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.highlight/abstract/1755/report/F](http://cfpub.epa.gov/ncer_abstracts/index.cfm/fuseaction/display.highlight/abstract/1755/report/F), avgust 2015
18. Metcalfe CD, Chu S, Judt C, Li H, Oakes DJ, Servos RM, Adrews MD: Antidepressants and their metabolites in municipal wastewater, and downstream exposure in an urban watershed. *Environ. Toxicol. Chem.* 2010; 29: 79-89
19. Vasskog T, Anderssen T, Pedersen-Bjergaard S, Kallenborn R, Jensen E: Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway. *J. Chromatogr. A* 2008; 1185: 194-205
20. Schultz MM, Furlong TE, Kolpin WD, Werner LS, Schoenfuss LH, Barber BL, Blazer SV, Norris OD, Vajda MA: Antidepressant Pharmaceuticals in To U.S. Effluent-Impacted Streams: Occurrence and Fate in Water and Sediment, and Selective Uptake in Fish Neural Tissue. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44: 1918-1925
21. Huerta-Fontela M, Galceran TM, Ventura F: Occurrence and removal of pharmaceuticals and hormones through drinking water treatment. *Water Res.* 2011; 45: 1432-1442
22. Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK, Ramirez A, Banks KE, Johnson RD, Lewis RJ: Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Chem.* 2005; 24: 464-9
23. Henry TB, Kwon JW, Armbrust KL, Black MC: Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in *Ceriodaphnia dubia*. *Environ. Chem.* 2004; 9: 2229-2233

24. Christensen AM, Faaborg-Andersen S, Ingerslev F, Baun A: Mixture and single-substance toxicity of selective serotonin reuptake inhibitors toward algae and crustaceans. *Envir. Chem.* 2007; 1: 85-91
25. Johnson JD, Sanderson H, Brain AR, Wilson JC, Solomon RK: Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2007; 67: 128-139
26. Doogan PD, Scappaticci AK, Hackett E: A method of treating anxiety related disorders using sertraline. US4962128 ZDA, 9. oktober 1990
27. Vasskog T, Berger U, Samuelsen JP, Kallenborn R, Jensen E: Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway. *J. Chromatogr. A* 2006; 1115: 187-195
28. Lucci P, Pacetti D, Núñez O, Natale GF: Current Trends in Sample Treatment Techniques. *Chromatography: The Most Versatile Method of Chemical Analysis*. s.l. : InTech 2012, str. 127-146
29. Hennion MC: Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 1999; 856: 3-54
30. Skoog DA, West DM: *Principles of instrumental analysis*. New York : Saunders College Publishing, 1997, 5. edicija
31. Lajeunesse A, Smyth SA, Barclay K, Sauve S, Gagnon C: Distribution of antidepressant residues in wastewater and biosolids following different treatment processes by municipal wastewater treatment plants in Canada. *Water Res.* 2012; 46: 5600-5612
32. Ahuja, S. *Journal of Pharmaceutical Sciences*. Derivatization in Gas Chromatography. *J. Pharm. Sci.* 1976; 2: 163-182.
33. Watson JT, Sparkman OD: *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation*. New York : John Wiley & Sons, 2007
34. Kosjek T, Heath E, Kompare B: Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 387: 1379-1387
35. ICH harmonized tripartite guideline: Validation of Analytical procedures: Text and Methodology Q2(R1), November 2005,  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1__Guideline.pdf), avgust 2015

36. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Drug Evaluation and Research (CDER), Rockville, maj 2001, <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/.../Guidances/ucm070107.pdf>, avgust 2015

37. Waters, Oasis HLB 3 cc Vac Cartridge, 60 mg Sorbent per Cartridge, 30 µm Particle Size, 100/pk [WAT094226], <http://www.waters.com/1/1/7953-wat094226-oasis-hlb-3-cc-vac-cartridge-60-mg-sorbent-per-cartridge-30-%CE%BCm-particle-size-100-pk.htm>, avgust 2015

38. Phenomenex, Inc, Strata™-X outperforms Oasis® HLB, <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e62d67d8-eef5-42f0-b829-4e188661ab57.pdf>, avgust 2015