

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**JELENA TOPIĆ**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA**

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**JELENA TOPIĆ**

**MERJENJE KONCENTRACIJ NEKATERIH ZDRAVILNIH  
UČINKOVIN V ODPADNIH VODAH IN TKIVIH RIB S TEKOČINSKO  
KROMATOGRAFIJO, SKLOPLJENO S TANDEMŠKO MASNO  
SPEKTROMETRIJO**

**MEASUREMENT OF VARIOUS PHARMACEUTICALS IN  
WASTEWATER AND IN FISH TISSUES BY LIQUID  
CHROMATOGRAPHY COUPLED TO TANDEM MASS  
SPECTROMETRY**

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložbo sem opravljala na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

## ZAHVALA

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

Zahvaljujem se tudi podjetju Komunala d.o.o. Sevnica za pomoč pri pridobitvi vzorcev odpadne vode iz CČN Sevnica.

Posebna zahvala pa gre moji družini in vsem bližnjim, ki so mi v času študija stali ob strani in me podpirali. Iskrena hvala mojemu očetu, ki mi je pomagal pri pridobitvi vzorcev rive iz reke Save.

## IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložbo samostojno izdelala pod vodstvom izr. prof. dr. Roberta Roškarja, mag. farm.

Jelena Topić, Sevnica 2016

## Komisija za zagovor

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Lucija Peterlin Mašič

Mentor: izr. prof. dr. Robert Roškar

Članica komisije: doc. dr. Mirjam Gosenca

**KAZALO VSEBIN**

<b>KAZALO PREGLEDNIC</b>	IV
<b>KAZALO SLIK</b>	V
<b>POVZETEK</b>	VI
<b>ABSTRACT</b>	VII
<b>1 UVOD</b>	1
<b>1.1 POTI VNOSA UČINKOVIN V OKOLJE</b>	2
<b>1.2 POJAVNOST RAZLIČNIH TERAPEVTSKIH SKUPIN UČINKOVIN V ODPADNIH VODAH</b>	3
<b>1.2.1 Nesteroidni antirevmatiki (NSAIR)</b>	3
<b>1.2.2 Antagonisti adrenergičnih receptorjev beta</b>	4
<b>1.2.3 Antibiotiki</b>	4
<b>1.2.4 Spojine, ki delujejo na osrednji živčni sistem (antidepresivi, antiepileptiki)</b>	5
<b>1.2.5 Učinkovine za zmanjševanje vsebnosti maščob in holesterola v krvi</b>	5
<b>1.3 VPLIV UČINKOVIN NA ORGANIZME</b>	6
<b>1.4 EKOTOKSIČNOST UČINKOVIN</b>	9
<b>1.5 EKSTRAKCIJSKE METODE ZA PRIPRAVO VZORCEV</b>	10
<b>1.5.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu</b>	11
<b>1.5.2 SPE-DEX tehnologija</b>	11
<b>1.6 METODE ZA IDENTIFIKACIJO IN KVANTIFIKACIJO UČINKOVIN V VZORCIH</b>	12
<b>2 NAMEN DELA</b>	14
<b>3 MATERIALI IN METODE</b>	15
<b>3.1 MATERIALI</b>	15
<b>3.1.1 Standardi (Referenčne spojine)</b>	15
<b>3.1.2 Interni standardi (Interne referenčne spojine)</b>	15
<b>3.1.3 Reagenti in topila</b>	16
<b>3.1.4 Vzorci odpadne vode</b>	16
<b>3.1.5 Vzorci rib</b>	16
<b>3.1.6 Naprave in pribor</b>	17
<b>3.2 METODE</b>	18
<b>3.2.1 Osnovne raztopine</b>	18
<b>3.2.1.1 Primarna osnovna raztopina (POR)</b>	18
<b>3.2.1.2 Sekundarna osnovna raztopina (SOR)</b>	19
<b>3.2.1.3 Delovne raztopine</b>	19

3.2.2	Priprava 50 mM fosfatnega pufra.....	19
3.2.3	Priprava topil.....	20
3.2.3.1	Priprava elucijskega topila za ekstrakcijo učinkovin iz odpadne vode .....	20
3.2.3.2	Priprava ekstrakcijskih topil in topil za elucijo za ekstrakcijo učinkovin iz ribjih tkiv.....	20
3.2.4	<b>EKSTRAKCIJA UČINKOVIN IZ ODPADNE VODE .....</b>	20
3.2.4.1	Priprava elucijskega topila .....	20
3.2.4.2	Priprava standardov .....	20
3.2.4.3	Metoda SPE-DEX.....	20
3.2.4.4	Metoda standardnega dodatka za izračun koncentracije učinkovin v odpadni vodi	21
3.2.4.5	Priprava realnega vzorca odpadne vode .....	22
3.2.5	<b>RAZVOJ METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIBJIH TKIV.....</b>	23
3.2.5.1	Priprava tkiva .....	23
3.2.5.2	Postopek ekstrakcije iz tkiva .....	23
3.2.5.3	SPE postopek .....	24
3.2.5.4	Priprava standardne raztopine za izračun izkoristka ekstrakcije na SPE sistemu	24
3.2.6	<b>OPTIMIZACIJA METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIBJIH TKIV</b>	24
3.2.6.1	Izbor ustreznega elucijskega topila.....	24
3.2.6.2	Mediji za redčenje vzorca pred nanosom na SPE .....	25
3.2.6.3	Volumen redčitve vzorca pred nanosom na SPE.....	25
3.2.6.4	Izbira ustreznega ekstrakcijskega topila .....	25
3.2.6.5	Vpliv koncentracije na izkoristek .....	26
3.2.6.6	Masa ribjega tkiva.....	26
3.2.7	<b>KONČNA METODA .....</b>	26
3.2.7.1	Metoda za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva.....	26
3.2.7.2	LC-MS/MS pogoji .....	27
3.2.8	<b>VREDNOTENJE METODE ZA ANALIZO RIBJEGA TKIVA .....</b>	28
3.2.8.1	Vrednotenje SPE postopka .....	28
3.2.8.2	Vrednotenje analizne metode .....	29
3.2.9	<b>ANALIZA RIBE IZ REKE SAVE, RIBOGOJNICE IN TRGOVINE .....</b>	31
4	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	32
4.1	<b>EKSTRAKCIJA UČINKOVIN IZ ODPADNE VODE .....</b>	32
4.1.1	Vzorčenje v poletnem obdobju (junij 2015) .....	32
4.1.2	Vzorčenje v zimskem obdobju (december 2015) .....	33

<b>4.1.3</b>	<b>Primerjava rezultatov poletnega in zimskega vzorčenja .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1.4</b>	<b>Primerjava z drugimi državami.....</b>	<b>37</b>
<b>4.2</b>	<b>RAZVOJ METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIB .....</b>	<b>37</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Optimizacija metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1.1</b>	<b>Primerjava elucijskih topil .....</b>	<b>40</b>
<b>4.2.1.2</b>	<b>Medij za redčenje vzorca pred nanosom na SPE .....</b>	<b>42</b>
<b>4.2.1.3</b>	<b>Volumen redčenja vzorca pred nanosom na SPE.....</b>	<b>43</b>
<b>4.2.1.4</b>	<b>Izbira ekstrakcijskega topila za ribja tkiva .....</b>	<b>44</b>
<b>4.2.1.5</b>	<b>Vpliv koncentracije na izkoristek .....</b>	<b>45</b>
<b>4.2.1.6</b>	<b>Primerjava različnih mas ribjega tkiva.....</b>	<b>46</b>
<b>4.3</b>	<b>VREDNOTENJE METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIB.....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Vrednotenje SPE postopka .....</b>	<b>47</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Vrednotenje analizne metode .....</b>	<b>48</b>
<b>4.4</b>	<b>UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI UČINKOVIN V TKIVIH RIB IZ SAVE, TRGOVINE IN RIBOGOJNICE .....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>ZAKLJUČEK .....</b>	<b>55</b>

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Koncentracije nekaterih učinkovin, ki so jih določili v različnih tkivih rib. (MDL = pod mejo zaznave metode, n.d. = ni določeno, LOQ = meja določitve metode) .....	7
Preglednica II: Metoda ekstrakcije na SPE-DEX. ....	20
Preglednica III: Postopek priprave vzorcev CČN Sevnica.....	22
Preglednica IV: Uporabljena elucijska topila.....	24
Preglednica V: Uporabljeni mediji za redčenje vzorca pred nanosom na SPE.....	25
Preglednica VI: Ostanek ekstrakcijskega topila po redčenju. ....	25
Preglednica VII: Uporabljena ekstrakcijska topila. ....	26
Preglednica VIII: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze.....	27
Preglednica IX: Nastavitev ionskega izvora.....	27
Preglednica X: MRM prehodi, napetosti fragmentorja, kolizijske energije, polariteta in retencijski časi izbranih učinkovin. ....	28
Preglednica XI: Priprava standardnih raztopin za vrednotenje linearnosti SPE. ....	28
Preglednica XII: Priprava raztopin, ki smo jih dodali ribjemu tkivu, za vrednotenje linearnosti analizne metode. ....	30
Preglednica XIII: Faktor redčenja in navedba dejanskih koncentracij posameznih učinkovin pri deklarirani koncentraciji 1 µg/L.....	31
Preglednica XIV: Analizirana tkiva rib (X), vključenih v raziskavo. ....	31
Preglednica XV: Osnovni podatki o izbranih učinkovinah za razvoj metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva. ....	39
Preglednica XVI: Relativni izkoristek učinkovin pri izbranih elucijskih topilih SPE postopka. 41	
Preglednica XVII: Relativni izkoristek učinkovin, kjer smo za redčenje uporabili ultračisto vodo.....	42
Preglednica XVIII: Relativni izkoristek učinkovin, kjer smo za redčenje uporabili 50 mM fosfatni pufer.....	42
Preglednica XIX: Relativni izkoristek učinkovin pri izbranih ekstrakcijskih topilih. ....	44
Preglednica XX: Relativni izkoristek učinkovin pri dveh različnih koncentracijah učinkovin... 45	
Preglednica XXI: Relativni izkoristek učinkovin pri različnih masah ribjega tkiva. ....	46
Preglednica XXII: Parametri linearnosti SPE postopka. ....	47
Preglednica XXIII: Validacijski parametri analizne metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva* (prilagojeno glede na učinkovino (glej preglednico XXIII)). ....	48
Preglednica XXIV: Vzorci ribjih tkiv, v katerih smo zaznali učinkovine, vendar jih kvantitativno nismo ovrednotili, ker so bile koncentracije pod LOQ. ....	51

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Način vnosa učinkovin v okolje (povzeto po [8]). .....	2
Slika 2: Sistem SPE-DEX® 4790.....	12
Slika 3: Metoda standardnega dodatka.....	21
<i>Slika 4: Koncentracijsko območje učinkovin v odpadni vodi CČN Sevnica (junij 2015). ....</i>	32
Slika 5: Grafični prikaz učinkovin, ki so bile na vtoku CČN Sevnica prisotne v koncentraciji višji od 100 ng/L (junij 2015).....	33
Slika 6: Koncentracijsko območje učinkovin v odpadni vodi CČN Sevnica (december 2015). ...	34
Slika 7: Grafični prikaz koncentracij učinkovin, ki so bile na vtoku CČN Sevnica prisotne v koncentraciji nad 100 ng/L (december 2015).....	34
Slika 8: Učinkovitost čiščenja CČN Sevnica za nekatere učinkovine. ....	36
Slika 9: Koncentracijsko območje nekaterih učinkovin na iztoku CČN Sevnica (marec 2015). .	38
Slika 10: Grafični prikaz izkoristkov pri zaostanku topil z dodanimi standardimi odkloni.....	43
Slika 11: LC-MS/MS kromatogrami učinkovin pri koncentraciji 2,50 ng/g tkiva (vrednotenje linearnosti analizne metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib). Poleg skupnega kromatograma (total ion chromatogram – TIC) so prikazani tudi kromatogrami izbranih učinkovin pri posameznih MRM prehodih.....	50

## POVZETEK

Zdravilne učinkovine spadajo v razred novih okoljskih onesnažil zaradi njihovega konstantnega sproščanja v okolje in morebitnega vpliva na vodne organizme. V magistrski nalogi smo ugotavljali prisotnost izbranih učinkovin na vtoku in iztoku Centralne čistilne naprave Sevnica v treh časovnih točkah vzorčenja: marca, junija in decembra 2015. Izbrane učinkovine v odpadni vodi smo vrednotili z delno avtomatizirano metodo ekstrakcije na trdnem nosilcu (SPE-DEX), ki ji je sledila analiza z tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno spektrometrijo (LC-MS/MS). Na vtoku smo tako junija kot tudi decembra ugotovili prisotnost več kot 30% v analizo vključenih učinkovin v različnem koncentracijskem območju. Na iztoku so bile koncentracije učinkovin praviloma nižje, tako junija kot tudi decembra pa je bil v najvišji koncentraciji prisoten tramadol ( $> 1 \mu\text{g/L}$ ).

Osrednji cilj magistrske naloge je bil razviti enostavno metodo za ekstrakcijo učinkovin iz rib. Rezultati marčevskega vzorčenja so bili osnova za izbor učinkovin, ki smo jih vključili v razvoj metode za merjenje izbranih koncentracij v ribjem tkivu. V obzir smo tudi fizikalno-kemijske lastnosti izbranih učinkovin in njihovo sposobnost biokopičenja. Za analizo smo izbrali naslednje učinkovine: atorvastatin, dezipramin, diklofenak, irbesartan, karbamazepin, naproksen, risperidon, simvastatin, tramadol, triklosan in valsartan. Pri vrednotenju metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib smo uporabili vzorce mišičnega tkiva. Razvita metoda temelji na homogenizaciji tkiva z nerjavečimi jeklenimi kroglicami, ki ji sledi ekstrakcija z acetonitrilom, centrifugiranje in čiščenje vzorca z ekstrakcijo na trdnem nosilcu (SPE). Instrumentalno analizo smo izvedli z LC-MS/MS. Najvišje in najbolj ponovljive izkoristke smo dobili, če smo supernatant pred SPE redčili do 25 mL s 50 mM fosfatnim pufrom, uravnanim na pH 7. Metodo smo validirali in določili območje linearnosti, ki je bilo v razponu od 0,1 – 1000 ng/g tkiva, odvisno od posamezne učinkovine. Meje določitve so bile v razponu od 0,1 – 10 ng/g tkiva, le za naproksen je bila ta meja višja. Ponovljivost metode je bila dobra, saj so bili relativni standardni odkloni pri vseh učinkovinah nižji od 7,5%. Izkoristki ekstrakcije so bili v območju med 24,0 in 108,5%. Metodo smo uporabili za ugotavljanje izbranih učinkovinah v ribah iz Save in ribogojnice. Analizirali smo posamezna ribja tkiva in sicer mišice, jetra, ledvica, kožo in škrge. Rezultati so pokazali, da sta v nekaterih vzorcih prisotna karbamazepin in tramadol, vendar sta oba pod mejo določitve.

**Ključne besede:** odpadna voda, ekstrakcija, zdravilne učinkovine, ribe, LC-MS/MS

## ABSTRACT

Pharmaceuticals are considered as emerging pollutants of particular concern due to their continuous release into the environment and the potential impact on aquatic organisms. In this master's thesis we performed a screening for pharmaceuticals in the wastewater of the Wastewater Treatment Plant Sevnica in three samplings: March, June and December 2015. For the screening of pharmaceuticals we used a semi-automated SPE-DEX method, followed by LC-MS/MS analysis. We detected more than 30% of the monitored pharmaceuticals in different concentration range. For most of the compounds, the concentrations in the effluent were lower. Tramadol was present in the effluent at concentration above 1 µg/L, both in June and December 2015 samplings.

The main goal of the Master thesis was to develop a simple method for the extraction of selected pharmaceuticals from fish tissue. The results of the occurrence of pharmaceuticals in the effluent from the March 2015 sampling were used for the selection of the target compounds for evaluation in fish tissue, where also the physico-chemical characteristics and the bioaccumulation potential was also taken into account. We chose tramadol, risperidone, desipramine, carbamazepine, irbesartan, naproxen, valsartan, atorvastatin, triclosan, simvastatin and diclofenac. The method was optimized and validated on muscle tissue. The developed method is based on the tissue homogenization with stainless steel beads, followed by extraction with acetonitrile, centrifugation and sample clean-up with solid-phase extraction (SPE). The instrumental analysis was performed with LC-MS/MS. The highest and the most reproducible recoveries were observed for the samples that were diluted to 25 mL with 50 mM phosphate buffer pH 7. The method was validated and the linearity range was established, which was in the range of 0.1 – 1000 ng/g, depending of the compound. The recoveries for the target pharmaceuticals were in the range of 24.0 – 108.5%, with good reproducibility as the relative standard deviation values for all compounds were below 7.5%. Quantification limits for the compounds were in the 0.1 – 10 ng/g range, except for naproxen. We applied the method to the fish tissue samples from the river Sava and from the aquaculture establishment. We chose muscle, liver, skin, kidney and gill tissue samples. The results showed presence of tramadol and carbamazepine in some tissue, but the concentrations were below the limit of quantification.

**Keywords:** wastewater, extraction, pharmaceuticals, fish, LC-MS/MS

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ACN – acetonitril

APCI – kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku

ATS – atorvastatin

CČN – Centralna čistilna naprava

ČN – čistilna naprava

DEZ – dezipramin

DKF – diklofenak

d-SPE – disperzivna ekstrakcija na trdnem nosilcu E<sub>2</sub> – 17-beta-estradiol

EC<sub>50</sub> – koncentracija snovi, pri kateri pride ob izpostavljenosti do učinka na 50% izpostavljenih organizmov

ESI – elektrorazprševalna ionizacija

GC-MS – plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

GC-MS/MS – plinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo

IRB – irbesartan

KBZ – karbamazepin

LC – tekočinska kromatografija

LC-MS – tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo

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

LC-TOF-MS – tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo na osnovi časa preleta LLE – ekstrakcija tekoče-tekoče

LOQ – meja določitve

LPO – lipidna peroksidacija

MAE – ekstrakcija z mikrovalovi

MBE – ekstrakcija na osnovi membrane

MRM – multirezidualna analiza

MS – masni spektrometer, masna spektrometrija

NAP – naproksen

NSAIR – nesteroidni antirevmatiki

PLE – ekstrakcija pod povišanim tlakom

POR – primarna osnovna raztopina

QQQ – kvadrupolni masni detektor

QuEChERS - hitra, učinkovita, poceni, lahka, robustna in varna tehnika za ekstrakcijo

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

RIS – risperidon

RSD – relativni standardni odklon

SFE – superkritična tekočinska ekstrakcija

SIS – simvastatin

SLE – ekstrakcija tekoče-trdno

SOR, SOR I, SOR II – sekundarna osnovna raztopina

SPE – ekstrakcija na trdnem nosilcu

SPE-DEX – pol-avtomatski SPE sistem SPE-DEX® 4790 proizvajalca Horizon Technology

SPME – mikroekstrakcija na trdnem nosilcu

SSRI – selektivni zaviralci ponovnega privzema serotonina

TKS – triklosan

TRM – tramadol

UAE – ekstrakcija z ultrazvokom

VAL – valsartan

## 1 UVOD

Zdravilne učinkovine spadajo v razred novih okoljskih onesnažil (*angl. emerging environmental contaminants*), ki se jih uporablja tako v veterinarski in humani medicini [1]. Nova okoljska onesnažila predstavljajo spojine, ki se jih zaradi socioloških in ekonomskih sprememb v zadnjih desetletjih sprošča v vodna telesa v znatnih količinah ter predstavljajo grožnjo vodnim ekosistemom [2]. Zdravilne učinkovine so spojine s farmakološkim delovanjem, ki se vežejo na receptorje v telesu [1]. V tuji literaturi je pogosto moč zaslediti izraz »farmacevtiki« (*angl. pharmaceuticals*), ki združuje učinkovine, ki se uporabljajo v humani medicini in učinkovine, ki se uporabljajo v veterinarski medicini. V Sloveniji izraz še ni bil definiran v nobenem strokovnem slovarju. Farmacevtiki predstavljajo skupino spojin, ki nosijo farmakološki učinek in se uporabljajo za izdelavo zdravil. Farmacevtiki imajo za razliko od izraza zdravilna učinkovina v povezavi z okoljem negativni prizvok, saj so to spojine, ki lahko škodujejo ne-tarčnim organizmom. Čeprav so v okolju prisotne že več desetletij, so njihove koncentracije v okolju začeli spremljati šele v zadnjih dveh desetletjih letih, k temu pa je najbolj pripomogel napredek v razvoju analiznih tehnik (tekočinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (LC-MS) ali tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) in plinska kromatografija sklopljena z masno spektrometrijo (GC-MS) ali tandemsko masno spektrometrijo (GC-MS/MS). Napredek v razvoju tehnik omogoča vrednotenje analitov v zelo nizkem koncentracijskem območju (ng/L) v zelo kompleksnih vzorcih v trdnem ali tekočem stanju, na primer v odpadnih vodah ter v površinskih vodah in podtalnici [3].

Poraba zdravil je v Evropi zelo visoka in Evropska Komisija (EU) je leta 2015 sprejela izvedbeni sklep 2015/495 o določitvi nadzornega seznama snovi za spremljanje na ravni Unije na področju vodne politike v skladu z Direktivo 2008/105/ES Evropskega parlamenta in Sveta, na katerega je uvrstila diklofenak, tri steroidne hormone (17-beta-estradiol, 17-alfa-etiinilestradiol in estron) ter tri makrolidne antibiotike (eritromicin, klaritromicin in azitromicin) [4]. Pričakovati je, da se bo poraba zdravil v prihodnosti povečala zaradi višjega življenskega standarda in daljše življenske dobe ter večanja števila starejše populacije [5]. Količina učinkovin in njihovih bioaktivnih metabolitov, ki se pojavljajo v okolju, je nizka (najpogosteje v ng/L koncentracijskem območju). Ključni problem učinkovin je njihovo kontinuirano sproščanje v okolje, kar lahko negativno vpliva na prisotne vodne in kopenske organizme, ki so nizkim koncentracijam učinkovin lahko izpostavljeni skozi celotno življensko obdobje [6].

## 1.1 POTI VNOSA UČINKOVIN V OKOLJE

Učinkovine se po zaužitju izločijo ali v nespremenjeni obliki ali pa kot metabolit in skozi različne poti vstopijo v vodne ekosisteme [1]. Pri prepoznavanju poti vnosa učinkovin pa je potrebno ločiti učinkovine za humano uporabo in učinkovine, ki se uporabljajo v veterini [7]. Na sliki 1 je prikazano, kako učinkovine dosežejo okolje.



Slika 1: Način vnosa učinkovin v okolje (povzeto po [8]).

Učinkovine so po zaužitju izpostavljeni fiziološkim procesom absorpcije, metabolizma, distribucije in izločenja. Določen delež učinkovin se izloči v nespremenjeni obliki ali kot aktivni metaboliti z urinom in/ali fecesom in tako vstopi v odpadne vode [9]. Vir vstopa učinkovin v okolje predstavljajo tudi bolnišnične in industrijske odpadne vode farmacevtskih podjetij [10]. Komunalne odpadne vode so glavno stičišče, preko katerega v okolje vstopijo učinkovine za humano uporabo in odpadna, neuporabljenia zdravila [1].

Usodi učinkovin za humano uporabo in učinkovin za veterinarsko uporabo sta po izločanju z urinom in/ali fecesom precej različni. Izločene učinkovine za humano uporabo gredo skozi komunalne čistilne naprave (ČN) predno dosežejo reke in druge površinske vode [9]. Pri učinkovinah, ki se jih uporablja v veterini, živinoreji in akvakulturi za terapevtske namene ali kot promotorje rasti, obstaja večja verjetnost, da bodo neposredno onesnažile zemljo in podtalnico brez predhodne obdelave na ČN [7, 9]. Neposreden vnos teh učinkovin v vodne

ekosisteme je posledica akvakulture (ribogojnice), posredni vnos veterinarskih učinkovin pa je posledica spiranja in pronicanja ostankov teh učinkovin skozi polja in zaradi gnojenja polj s hlevskim gnojem [11] ali z blatom iz ČN [1]. Primarni viri učinkovin v površinskih vodnih telesih so komunalne ČN, ki čistijo gospodinjske odpadne vode, odpadne vode iz bolnišnic in odpadne vode proizvajalcev zdravil [10].

## **1.2 POJAVNOST RAZLIČNIH TERAPEVTSKIH SKUPIN UČINKOVIN V ODPADNIH VODAH**

Zdravilne učinkovine so eden izmed najbolj pomembnih razredov novih okoljskih onesnažil. Njihova pojavnost je bila zaznana v naravnih vodah, odpadnih vodah, sedimentih in blatu iz ČN. Natančna določitev učinkovin, še posebej v okoljskih vzorcih, lahko predstavlja analitsko težavo zaradi kompleksnosti matrice in njihove nizke koncentracije. Napredek v analiznih tehnikah in metodah ekstrakcije, derivatizacije in čiščenja vzorcev omogoča kvantifikacijo analitov in njihovih metabolitov v ng/L koncentracijskem območju [12].

Učinkovine so široka in struktурno izjemno različna skupina spojin, ki imajo različne fizikalno-kemijske lastnosti in namen uporabe. Khetan in Collins sta v svoji študiji identificirala osem terapevtskih skupin, ki so pomembne za pojavnost učinkovin za humano uporabo v vodnih okoljih. Skupine, ki so okoljsko zanimive so: nesteroidni antirevmatiki (NSAIR), antagonisti adrenergičnih receptorjev beta, antibiotiki, antiepileptiki, zdravila za zniževanje holesterola v krvi, antidepresivi, hormoni in antihistaminiki [9].

Čeprav so farmacevtiki v okolju prisotni že več desetletij, so se s tem področjem intenzivno začeli ukvarjati v zadnjih dvajsetih letih [1, 13–15]. Verlicchi in sod. so v študiji preverjali prisotnost 118 učinkovin, ki pripadajo 17 različnim terapevtskim skupinam. Med njimi je bilo 23 spojin analgetikov/protivnetnih učinkovin, 36 antibiotikov, deset učinkovin, ki se uporablja v psihiatriji, 12 antagonistov adrenergičnih receptorjev beta in tri učinkovine, ki se uporablja za zniževanje krvnega pritiska [16].

### **1.2.1 Nesteroidni antirevmatiki (NSAIR)**

NSAIR so skupina zdravil, ki se uporablja za zdravljenje vnetja in bolečine ter zniževanja temperature (antipiretično delovanje) [17]. So ena najbolj pomembnih terapevtskih skupin na svetu z ocenjeno letno produkcijo več kiloton [18]. Med najbolj uporabljane NSAIR spadajo ibuprofen in naproksen v ZDA ter diklofenak v Evropi [9]. Ibuprofen, naproksen, diklofenak in nekatere njihove metabolite pogosto merijo tako v odpadnih kot tudi v površinskih vodah [1]. V VB so v iztoku ČN našli ibuprofen (263 ng/L), diklofenak (98 ng/L), ketoprofen (16 ng/L)

in naproksen (370 ng/L). Določili so tudi druge analgetike (salicilna kislina (164 ng/L) paracetamol (11,7 µg/L) in tramadol (43,8 µg/L)) [19]. Al Aukidy in sod. so vzorčili vodo iz iztoka dveh ČN v dolini Po na severu Italije. V iztoku ČN so izmerili diklofenak v koncentracijskem območju 223 – 800 ng/L, ketoprofen v območju do 23 ng/L in naproksen v območju do 21 ng/L [20]. Različne NSAIR so zaznali tudi drugod po svetu. Srednja vrednost paracetamola je v ZDA v iztoku ČN znašala je 354 ng/L in 152 ng/L, v površinski vodi pa je bila vrednost nižja (15 ng/L). Ibuprofen so določili v koncentracijah 928 ng/L in 2,6 µg/L, v preiskovani površinski vodi pa ga niso zaznali [21]. V Sloveniji so v površinskih vodah (reke) vzorčili 16 vzorcev. V 11 vzorcih so določili naproksen (17-80 ng/L) in diklofenak (9-49 ng/L) [22].

### 1.2.2 Antagonisti adrenergičnih receptorjev beta

Antagonisti adrenergičnih receptorjev beta predstavljajo eno izmed najpomembnejših skupin zdravil, ki se izdajajo na recept. Uporabljajo se v terapiji kardiovaskularnih bolezni, pri zdravljenju visokega krvnega pritiska in srčnih aritmij. Učinkovine niso dolgo obstojne, a jih v odpadnih vodah in površinskih vodah mnogokrat določijo zaradi pogostosti uporabe [9]. V VB so določili atenolol, propranolol in metoprolol v vseh analiziranih vzorcih; tako v odpadnih vodah kot v površinskih vodah, kar kaže na to, da učinkovitost procesov čiščenja odpadne vode ni najboljša [19]. Gros in sodelavci (23) so v vzorcih iztoka petih ČN na Hrvaškem zaznali propranolol v koncentracijah 100 – 470 ng/L (srednja koncentracija je bila 290 mg/L), najvišji določeni koncentraciji atenolola in sotalola pa sta bili 1150 ng/L (srednja koncentracija 400 ng/L) in 210 ng/L (srednja koncentracija 185 ng/L). Koncentracije atenolola in sotalola so bile v nekaterih vzorcih pod mejo detekcije, metoprolol pa je bil v vseh vzorcih vtoka in iztoka čistilnih naprav pod mejo detekcije [23]. V Atenah so določili propranolol, metoprolol in atenolol tako na vtoku kot na iztoku ČN; najvišje koncentracije so se pojavile pri atenololu [24]. Atenolol se metabolizira v majhnem obsegu in se v enakem deležu izloči z urinom in fesesom [9].

### 1.2.3 Antibiotiki

Antibiotiki so v širšem pomenu kemoterapevtska sredstva, ki inhibirajo ali uničijo rast mikroorganizmov (bakterije, glive, protozoje). Pogosto citirana skrb glede pojava antibiotikov v vodah je širjenje sevov bakterij, ki so odporne (rezistentne) na antibiotike. Genetska selekcija odpornih bakterij je lahko ireverzibilna posledica, do katere pride predvidoma zaradi prisotnih nizkih koncentracij različnih antibiotikov, ki jih najdemo v vodah. Antibiotiki, ki so prisotni v

kanalizacijskih iztokih, lahko potencialno negativno vplivajo na razgradnjo organskih delcev. Možen vpliv prisotnih antibiotikov je zmanjšanje raznovrstnosti bakterijske populacije, ki pa je lahko razlog za manjšo sposobnost biorazgradnje organskih delcev. Večja kot je raznovrstnost bakterijske populacije, večja je verjetnost, da se bodo prisotne spojine biorazgradile [9, 25].

V Avstraliji so ugotavljali prisotnost 28 različnih antibiotikov. Na vtoku ČN je bila najvišja določena koncentracija antibiotikov do 64 µg/L, prisotni pa so bili predvsem β-laktami, kinoloni in sulfonamidi. ČN so bile učinkovite pri odstranjevanju antibiotikov iz odpadne vode, saj je bila povprečna stopnja odstranjevanja nad 80% za vse preiskovane antibiotike. Najvišja maksimalna koncentracija antibiotika na iztoku ČN je bila 3,4 µg/L (tilozin) [26]. Prav tako so v ČN v Italiji določili koncentracijo več antibiotikov v različnih koncentracijah. Antibiotiki, ki so bili prisotni v vseh vzorcih so bili ciprofloksacin (27 – 514 ng/L), ofloksacin (150 – 1081 ng/L), sulfametoksazol (46 – 317 ng/L), eritromicin (9 – 53 ng/L), linkomicin (11 – 846 ng/L) in spiramicin (1,4 – 161 ng/L) [27].

#### **1.2.4 Spojine, ki delujejo na osrednji živčni sistem (antidepresivi, antiepileptiki)**

Učinkovine, ki vplivajo na osrednji živčni sistem, lahko selektivno delujejo na receptorje za bolečino, znižajo vročino, uporabljajo pa se lahko tudi za zdravljenje depresije, manije ali shizofrenije [9]. Karbamazepin je pomembna učinkovina, ki se uporablja predvsem za zdravljenje različnih oblik epilepsije in je ena izmed najpogosteje prisotnih učinkovin v odpadnih vodah [6]. Določili so ga v vzorcih odpadne vode ČN v Italiji, ZDA, VB, Španiji [19, 23, 27, 28]. Castiglioni in sod. so določili karbamazepin v šestih od skupno osmih preiskovanih ČN. V ZDA so karbamazepin določili v več kot 90% vzorcev, v koncentracijskem območju 33 – 1318 ng/L [28].

Najpogosteje predpisani antidepresivi so selektivni zaviralci ponovnega privzema serotoninu (SSRI), ki se uporabljajo za zdravljenje depresije, motenj hranjenja, anksioznosti in obsesivno-kompulzivnih motenj [1]. Oliveira in sodelavci so analizirali odpadne vode štirih ČN, ki prejemajo vode srednje velikih bolnišnic. V vzorcih iztoka ČN so določili fluoksetin v koncentracijah do 0,13 µg/L, sertralin do 0,08 µg/L in escitalopram do 0,16 µg/L. Določili so tudi antidepresiv venlafaksin, ki je zaviralec ponovnega privzema noradrenalina, v koncentracijah do 0,55 µg/L [29].

#### **1.2.5 Učinkovine za zmanjševanje vsebnosti maščob in holesterola v krvi**

Lipidne abnormalnosti so eden izmed ključnih dejavnikov pri razvoju bolezni kardiovaskularnega sistema. Študije so pokazale, da zmanjšanje koncentracij lipoproteinov z

nizko gostoto, ki prenašajo holesterol po krvi, lahko zniža pojavnost koronarnih srčnih bolezni pri širokem spektru pacientov. Klofibrična kislina je aktivni metabolit več pogosto uporabljenih krvnih lipidnih regulatorjev in je ena izmed najpogosteje določevanih učinkovin v vodah [1, 9, 14]. V VB so v vzorcih iztoka dveh ČN določili klofibrično kislino, bezafibrat in simvastatin. Na obeh ČN je bila najvišja koncentracija učinkovine bezafibrat, maksimalna koncentracija pa je znašala 667 ng/L [19]. V ZDA so v vzorcih iztoka ČN, ki prejemajo odpadno vodo iz bolnišnic, določili gemfibrozil, ki spada v skupino v fibratov, v koncentracijah 0,23 – 0,84 µg/L. Atorvastatin so zaznali v enem vzorcu iztoka ČN s koncentracijo 0,07 µg/L [29].

### 1.3 VPLIV UČINKOVIN NA ORGANIZME

Stalno sproščanje učinkovin v okolje in nezmožnost popolne razgradnje učinkovin s strani ČN poraja skrbi o možnih negativnih učinkih učinkovin, predvsem na vodne ekosisteme. Zaradi nepopolne razgradnje učinkovin se le-te sproščajo v površinske vode, kjer so prisotne predvsem v ng/L koncentracijskem območju. Učinkovine ciljajo specifične metabolne in molekularne poti pri ljudeh in živalih. Ko preidejo v okolje, lahko učinkujejo tudi na druge organizme [1, 2, 30].

Največ objavljenih študij v povezavi s prisotnostjo učinkovin v organizmih se je osredotočilo na vodne vretenčarje, predvsem ribe. Ribe so prisotne v skoraj vseh vodnih ekosistemih in imajo ključno vlogo v prehranjevalni verigi. Kljub nekaterim omejitvam, kot je visoka mobilnost, so najbolj uporabljeni organizmi za izvajanje monitoringa v naravnih vodnih sistemih. Tudi drugi organizmi (nevretenčarji, alge) igrajo kritično vlogo v vodnih ekosistemih in imajo sposobnost integracije hitrih okoljskih sprememb, kar validira njihovo pozicijo indikatorjev sprememb v okolju [31]. Ena izmed prvih študij, ki je potrdila prisotnost učinkovin v sladkovodnih ribah je bila izvedena v ZDA, kjer določili fluoksetin, sertralin in njune metabolite v možganih v maksimalni koncentraciji 30 ng/g [32]. V preglednici I so podane koncentracije nekaterih učinkovin, ki so jih določili v različnih tkivih rib.

*Preglednica I: Koncentracije nekaterih učinkovin, ki so jih določili v različnih tkivih rib. (MDL = pod mejo zaznave metode, n.d. = ni določeno, LOQ = meja določitve metode)*

Učinkovina	Matriks	Koncentracija	Referenca
<b>IBUPROFEN</b>	plazma	$0,94 \pm 0,31 \text{ pg}/\mu\text{L}$	[33]
	plazma	$2,5 - 3,8 \text{ ng/mL}$	[34]
<b>DIKLOFENAK</b>	plazma	$1,74 \pm 1,48 \text{ pg}/\mu\text{L}$	[33]
	homogenat	$8,8 \pm 0,5 \text{ ng/g}$ in $4,1 \pm 0,9 \text{ ng/g}$	[35]
	plazma	$0,15 - 0,83 \text{ ng/mL}$	[34]
<b>KARBAMAZEPIN</b>	plazma	$0,40 \pm 0,38 \text{ pg}/\mu\text{L}$	[33]
	homogenat	$0,20 \text{ ng/g}$	[36]
	jetra	$17,9 \pm 2,4 \text{ ng/g}$	[35]
	mišice	$0,83 - 1,44 \text{ ng/g}$	[37]
	plazma	$0,030 - 0,055 \text{ ng/mL}$	[34]
	jetra	<MDL – $0,11 \text{ ng/g}$	[34]
	možgani	<MDL – $0,11 \text{ ng/g}$	[34]
	file s kožo	<MDL – $2,3 \text{ ng/g}$	[38]
	jetra	<MDL – $6 \text{ ng/g}$	[38]
	plazma	$0,35 \pm 0,31 \text{ pg}/\mu\text{L}$	[33]
<b>GEMFIBROZIL</b>	jetra	n.d. – $70 \text{ ng/g}$	[38]
	plazma	$0,98 \pm 0,04 \text{ pg}/\mu\text{L}$	[33]
<b>TRIKLOSAN</b>	file s kožo	<MDL	[38]
	plazma	$0,98 \pm 0,04 \text{ pg}/\mu\text{L}$	[33]
<b>KOFEIN</b>	homogenat	$1,6 \text{ ng/g}$	[36]
	homogenat	$0,55 \text{ ng/g}$	[36]
	mišice	$32,01 \pm 4,63 \text{ pg/g}$ in $81,63 \pm 8,19 \text{ pg/g}$	[39]
	mišice	$0,66 - 1,32 \text{ ng/g}$	[37]
	mišice	$0,61 - 6,21 \text{ ng/g}$	[40]
	plazma	$0,25 - 1,8 \text{ ng/mL}$	[34]
	jetra	$6,5 - 64 \text{ ng/g}$	[34]
	možgani	$6,2 - 17 \text{ ng/g}$	[34]
	file s kožo	<MDL – $1,7 \text{ ng/g}$	[38]
	jetra	<MDL – $10 \text{ ng/g}$	[38]
<b>FLUOKSETIN</b>	mišice	<LOQ – $4,0 \pm 2,6 \text{ ng/g}$	[41]

	jetra	n.d. – 19 ng/g	[38]
ATORVASTATIN	žolč	n.d. – $2,1 \pm 2,5 \mu\text{g/L}$	[41]
	žolč	$0,30 \pm 0,02 \mu\text{g/L} – 0,44 \pm 0,05 \mu\text{g/L}$	[41]
VENLAFAKSIN	mišice	<LOQ – $17 \pm 13 \text{ ng/g}$	[41]
	homogenat	$0,6 \pm 0,02 \text{ ng/g}$	[35]
	žolč	<LOQ – $0,46 \pm 0,14 \mu\text{g/L}$	[41]
NORFLUOKSETIN	mišice	3,49 – 5,14	[37]
	file s kožo	<MDL – 4,0 ng/g	[38]
	jetra	33 – 73 ng/g	[38]
	žolč	$0,22 \pm 0,04 \mu\text{g/L} – 1,14 \pm 0,33 \mu\text{g/L}$	[41]
SERTRALIN	mišice	<LOQ – $2,09 \pm 1,0 \text{ ng/g}$	[41]
	plazma	0,14 – 0,51 ng/mL	[34]
	jetra	1,0 – 7,9 ng/g	[34]
	možgani	1,0 – 9,2 ng/g	[34]
	file s kožo	<MDL – 11 ng/g	[38]
	jetra	21 – 381 ng/g	[38]
PAROKSETIN	žolč	n.d. – $2,84 \pm 1,96 \mu\text{g/L}$	[41]
	mišice	<LOQ – $0,40 \pm 0,30 \text{ ng/g}$	[41]
DILTIAZEM	mišice	$2,04 \pm 0,68 \text{ pg/g}$ in $5,69 \pm 0,45 \text{ pg/g}$	[39]
	mišice	0,11 – 0,27 ng/g	[37]
	file s kožo	<MDL – 0,15 ng/g	[38]
	jetra	<MDL – 0,7 ng/g	[38]
CITALOPRAM	homogenat	$0,8 \pm 0,1 \text{ ng/g}$	[35]
KARAZOLOL	homogenat	$3,8 \pm 0,7 \text{ ng/g}$	[35]
SALBUTAMOL	homogenat	$2,6 \pm 0,3 \text{ ng/g}$	[35]
DIAZEPAM	mišice	1,99 – 16,57 ng/g	[40]
INDOMETACIN	plazma	2,0 – 4,7 ng/g	[34]
	jetra	1,3 – 5,4 ng/g	[34]
	možgani	0,35 – 2,0 ng/g	[34]
TRIKLOSAN	plazma	11 – 110 ng/mL	[34]
	jetra	110 – 910 ng/g	[34]
	možgani	13 – 88 ng/g	[34]

## 1.4 EKOTOKSIČNOST UČINKOVIN

Ekotoksičnost je lastnost snovi, ki lahko v ustrezeni koncentraciji povzroči negativne učinke na okolje in organizme, ki ta okolja naseljujejo [42]. Ugotavljanje ekotoksičnosti učinkovin temelji predvsem na standardiziranih akutnih testih toksičnosti (smernice OECD 209, 210, 211, 226, 232, 233 [43, 44]), ki uporabljajo organizme kot so alge, živalski plankton, nevretenčarje in ribe [30]. Testiranje akutne toksičnosti se najpogosteje izvaja v kontroliranih laboratorijskih pogojih, z uporabo posamezne spojine in določene indikatorske vrste. Najpogosteje se testiranja izvajajo na vodnih bolhah (*Daphnia magna*) [45]. Evropska komisija je klasificirala spojine v tri glavne kategorije. Spojine, pri katerih je EC<sub>50</sub> 10 – 100 mg/L so klasificirane kot škodljive, spojine z EC<sub>50</sub> 1 – 10 mg/L toksične in spojine, pri katerih je EC<sub>50</sub> manjši od 1 mg/L, kot zelo toksične [46, 47]. NSAIR (paracetamol, ibuprofen, diklofenak in naproksen), učinkovine za zmanjševanje lipidov v krvi (bezafibrat in klofibrična kislina), karbamazepin in trimetoprim so generalno klasificirani kot škodljivi za vodne organizme. Ofloksacin, sulfametoksazol, oksitetraciklin in eritromicin pa v večini padejo znotraj toksičnega območja za vodne organizme [45].

Najbolj znan primer negativnega učinka učinkovin na populacijo živali se je zgodil v Indiji in Pakistanu. V letu 2004 je prišlo do nenavadno velike smrtnosti v populaciji treh vrst jastrebov. Jastrebi so se hranili z mrhovino živine, visoka smrtnost pa je bila povezana z odpovedjo ledvic. Razlog za odpoved ledvic je bil diklofenak, ki so ga v Pakistanu in Indiji uporabljali pri zdravljenju živine [48].

V Kanadi so izvedli sedem let dolgo študijo z ribami, ki je pokazala, da kronična izpostavljenost črnoglavega pisanca (*Pimephales promelas*) nizkim koncentracijam 17-alfa-etinilestradiola (5–6 ng/L) povzročila feminizacijo samcev, spremenjeno oogenezo pri samicah in kolaps populacije v jezeru [49].

Študija, kjer so ribe vrste šarenka (*Oncorhynchus mykiss*) izpostavili atorvastatinu v koncentraciji, v kateri se ta pojavlja v okolju, je pokazala da je prišlo do spremembe v izražanju genov, ki sodelujejo v membranskem transportu v škrghah. Prav tako je prišlo do spremembe v izražanju genov v tkivu škrge, ki sodelujejo v procesih biotransformacije, odzivih na oksidativni stres in pri celični smrti (apoptozi) [50].

Izvedli so tudi študijo, kjer so šarenko (*Oncorhynchus mykiss*) izpostavili karbamazepinu na treh koncentracijskih nivojih (1,0 µg/L, 0,2 mg/L in 2,0 mg/L). Preverjali so, kako kronična izpostavljenost karbamazepinu (7, 21 in 42 dni) vpliva na prisotnost antioksidantov in na

delovanje encima  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPaza. Ugotovili so, da je v škrgah prišlo do biokemijskih in fizioloških sprememb. Daljša časovna izpostavljenost karbamazepinu je povzročila povišanje lipidne peroksidacije (LPO), kar nakazuje na peroksidativne poškodbe škržnega tkiva. LPO je eden izmed glavnih procesov, ki ga povzroči oksidativni stres. Prav tako so se pojavile spremembe pri karbonilaciji proteinov, ki je tako kot LPO, rezultat oksidativnega stresa v celici. Pri izpostavljenosti najnižji koncentraciji karbamazepina ( $1,0 \mu\text{g}/\text{L}$ ), v škrgah ni bilo značilnih fizioloških sprememb [51].

V ZDA so izvedli 28-dnevno kronično študijo, kjer so črnoglavega pisanca (*Pimephales promelas*) izpostavili metforminu v koncentraciji, ki se pojavlja na iztokih ČN ( $40 \mu\text{g}/\text{L}$ ). Preverjali so vpliv na reprodukcijo in izražanje genov povezanih z metabolizmom in razmnoževanjem. Vrednotili so tudi koncentracijo hormonov v plazmi. Metformin je povzročil indukcijo vitelogenina v jetrih samcev, kar nakazuje da je lahko metformin potencialni endokrinski motilec [52]. Vitelogenin je protein, ki ga sintetizirajo vitelogene samice in odlagajo v razvijajoči se oociti. Vitelogeneza je proces, v katerem jajčni estradiol spodbuja nastanek vitelogenina v jetrih. Jetrni receptorji za estrogen so prisotni tako v ribjih samcih in samicah, kot tudi v spolno nedozorelih potomcih, vendar so estrogenom praviloma izpostavljena zgolj jetra samic. Sinteza vitelogenina pri samcih in spolno nedozorelih potomcih je tako lahko bioindikator okoljske izpostavljenosti estrogenim spojinam [53].

## 1.5 EKSTRAKCIJSKE METODE ZA PRIPRAVO VZORCEV

Veliko spojin, ki so jih v zadnjih letih prvič določili v okoljskih vzorcih, je bilo lahko v okolju (vodi, sedimentu, zemlji) prisotno že več desetletij, a jih zaradi pomanjkanja ustreznih analitskih metod niso mogli določiti. Napredek v analitiki omogoča, da lahko identificiramo in določimo vedno več ksenobiotikov v okoljskih vzorcih [54].

Analitski postopek navadno vključuje pet glavnih korakov: vzorčenje, priprava vzorcev, ločevanje analitov, kvantitativno ovrednotenje analitov in analizo podatkov. Vzorčenje in priprava vzorcev sta dva ključna koraka in tudi zavzameta največ časa. Namen priprave vzorca je priprava realnega vzorca v vzorec, ki je primeren za analizo [55]. Učinkovine so v okoljskih vzorcih prisotne v prenizkih koncentracijah za direktno analizo. Zato je potrebno vzorce koncentrirati, hkrati pa tudi čistiti, da se zmanjša učinek ozadja [56]. Metode, ki se uporabljajo za ekstrakcijo vzorcev se razvrščajo v dve glavni skupini: metode za trdne vzorce in metode za tekoče vzorce. Najbolj pogosto uporabljeni metodi so ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE) (*on-line* SPE ali *off-line* SPE), ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE), mikroekstrakcija na trdnem nosilcu

(SPME), ekstrakcija na osnovi membrane (MBE), superkritična tekočinska ekstrakcija (SFE), ekstrakcija tekoče-trdno (SLE), ekstrakcija pod povišanim tlakom (PLE), ekstrakcija z ultrazvokom (UAE), ekstrakcija z mikrovalovi (MAE) [57] in v zadnjih letih tudi QuEChERS (hitra, učinkovita, poceni, lahka, robustna in varna tehnika za ekstrakcijo), ki temelji na disperzivni ekstrakciji na trdnem nosilcu (d-SPE) [58].

### 1.5.1 Ekstrakcija na trdnem nosilcu

Tradicionalno tehniko za pripravo vodnih vzorcev ekstrakcija tekoče-tekoče (LLE) je nadomestila ekstrakcija na trdnem nosilcu (SPE), ki je najpogosteje uporabljena tehnika za pripravo okoljskih vzorcev [55, 59]. Prednost SPE v primerjavi z LLE so višji izkoristki, izboljšana selektivnost, specifičnost in ponovljivost, manjša poraba organskih topil, krajši čas priprave vzorcev in lažja izvedba ter možnost avtomatizacije. Pri SPE se analiti ekstrahirajo in porazdelijo med trdno fazo in tekočo fazo. Analiti morajo imeti večjo afiniteto do trdne faze kot do komponent ozadja, zato je ključno izbrati ustrezni sorbent [55].

SPE je sestavljen iz naslednjih korakov:

- aktivacija stacionarne faze (aktivacija omogoči vezavo spojin)
- vzorce pred nanosom filtriramo, v kolikor je to potrebno
- nanos vzorca (spojine se vežejo na sorbent)
- spiranje sorbenta (odstranimo neželene spojine)
- sušenje sorbenta (odstranimo medij)
- spiranje analitov (desorpcija spojin iz stacionarne faze z ustreznim topilom).

Spiranju analitov sledi odhlapovanje elucijskega topila in razapljanje posušenega ostanka v topilu, ki je primerno za analizo [55].

Izbira sorbenta igra pri SPE ključno vlogo, saj vpliva na selektivnost, afiniteto in sposobnost vezave. Izbira sorbenta je odvisna od izbranih analitov in interakcij med sorbentom in funkcionalnimi skupinami analitov. Sorbente delimo v dve skupini: silikatni in polimerni. Polimerni sorbenti so v primerjavi s silikatnimi bolj stabilni v širšem pH območju. Silikatni sorbenti vključujejo silanolne skupine, ki lahko ireverzibilno vežejo nekatere analite (npr. tetracikline) [55]. Sorbenti, ki so na voljo na trgu in se pogosto uporabljajo so Oasis-HLB, C<sub>18</sub> sorbenti, Lichrolut ENV+, Oasis MCX in Strata-X [60].

### 1.5.2 SPE-DEX tehnologija

SPE-DEX® 4790 proizvajalca Horizon Technology (okrajšava: SPE-DEX) je delno avtomatiziran sistem za SPE ekstrakcijo spojin iz vodnih vzorcev (odpadna voda, površinske

vode, podtalnica, pitna voda, morska voda). Sistem SPE-DEX, ki je na voljo na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, je prikazan na sliki 2. Glavna prednost SPE-DEX je krajši čas ekstrakcije, prav tako pa ni potrebna prehodna filtracija vzorcev. V primerjavi z LLE ekstrakcijo je poraba topil nižja, prav tako pa so določeni koraki pri pripravi vzorcev avtomatizirani: dodajanje topil, namakanje in sušenje diska, spiranje steklenice in elucija analitov s sorbenta [61, 62].



Slika 2: Sistem SPE-DEX® 4790.

## 1.6 METODE ZA IDENTIFIKACIJO IN KVANTIFIKACIJO UČINKOVIN V VZORCIH

Instrumentalne analizne metode za identifikacijo in kvantifikacijo učinkovin v okoljskih vzorcih, ki se najpogosteje uporabljajo so GC-MS ali LC-MS oz. GC-MS/MS ali LC-MS/MS.

Tekočinska kromatografija (LC) deluje na principu porazdelitve komponent vzorca med stacionarno fazo (trdno ali tekočo) in tekočo mobilno fazo. Kromatografijo lahko glede na mehanizem zadrževanja analitov na koloni ločimo na adsorpcijsko, ionsko-izmenjevalno, izključitveno in porazdelitveno. Porazdelitveno kromatografijo pa lahko delimo še na normalno-fazno in reverzno fazno. Za analizo učinkovin v vodnih vzorcih se najpogosteje uporablja reverzno-fazna LC, saj učinkovine po večini niso hlapne spojine, nekatere so zelo

polarne in vsebujejo tudi ionizirajoče funkcionalne skupine (npr. karboksilne ali amino funkcionalne skupine) [59, 63].

Masna spektrometrija (MS) temelji na ločevanju analitov glede na njihovo  $m/z$  razmerje (razmerje med maso ( $m$ ) in nabojem ( $z$ )). Masni spektrometer detektira komponente vzorca, ki prispejo v masni analizator tako, da jih ionizira v obliko s pozitivnim ali negativnim nabojem. Ionizacija poteka v ionskem izvoru. Ioni pospešeno zapuščajo ionski izvor in vstopajo v masni analizator. V masnem analizatorju seioni nato ločijo glede na njihove  $m/z$  vrednosti. Kot detektor se uporablja fotopomnoževalka, ki šteje število prispelih ionov. Rezultat analize je dobljen masni spekter, v katerem je podana intenziteta ionov glede na  $m/z$  razmerje [64].

Poznamo več ionskih izvorov. Pri GC-MS se uporablja elektronska ionizacija (EI) ali kemijska ionizacija (CI), ki v obeh primerih poteka v vakuumu znotraj ionskega izvora. Pri LC-MS tehnikah pa se kot vir ionizacije najpogosteje uporablja elektrorazprševalna ionizacija (ESI), manj pogosto pa kemijska ionizacija pri atmosferskem pritisku (APCI) in fotoionizacija pri atmosferskem tlaku (APPI) [64].

Najbolj uporabljena metoda za analizo učinkovin v okoljskih vzorcih je tekočinska kromatografija sklopljena s tandemsko masno spektrometrijo (LC-MS/MS) [65]. LC se uporablja za ločitev analitov, MS pa za identifikacijo in kvantifikacijo analitov v vzorcu ali potrditev molekulske strukture [59]. Danes se najbolj uporablja trojni kvadrupolni masni analizator (QQQ), ker je selektivnost in občutljivost detektorja zelo visoka, s tem pa je omogočena identifikacija in kvantifikacija učinkovin v zelo nizkih koncentracijah (pod 1 ng/L) v kompleksnih okoljskih vzorcih [66]. QQQ uporablja multirezidualno analizo (MRM) s fiksнимi  $m/z$  vrednosti na prvem (Q1) in tretjem (Q3) kvadrupolu, drugi kvadrupol (Q2) pa služi kot kolizijska celica. MRM je najobčutljivejši način in z njo smo sposobni zaznati analite pri najnižjih koncentracijah. Alternativa QQQ za analizo učinkovin v okoljskih vzorcih je masni analizator na osnovi preleta časa LC-TOF-MS (*angl. time-of-flight*), ki je manj občutljiv analizator, a primeren za identifikacijo ne-tarčnih spojin v okoljskih vzorcih [59].

## 2 NAMEN DELA

Pojavljanje učinkovin v živih organizmih je zaskrbljujoče, saj ima lahko prisotnost učinkovin škodljiv učinek na izpostavljene organizme. Poraba zdravil je vse večja, k čemer botruje tudi staranje populacije. Učinkovine in njihovi metaboliti tako neprestano vstopajo v okolje. Naš cilj bo ugotoviti prisotnost in koncentracijo izbranih 111 učinkovin na vtoku in iztoku Centralne čistilne naprave (CČN) Sevnica z uporabo predhodno razvite in optimizirane delno avtomatizirane metode SPE-DEX. Odpadno vodo CČN Sevnica bomo vzorčili trikrat, v različnih letnih časih (spomladi, poleti, pozimi). Na osnovi pridobljenih podatkov - učinkovine, ki bodo prisotne na iztoku CČN Sevnica, nam bodo služile za izbor učinkovin, ki jih lahko pričakujemo v ribjih tkivih. Nato bomo razvili in optimizirali metodo za vrednotenje izbranih učinkovin v ribjih tkivih. Dobljene ekstrakte bomo po obdelavi vzorca analizirali z instrumentom LC-MS/MS.

Najprej bomo razvili in optimizirali postopek ekstrakcije, ki vključuje čiščenje in koncentriranje vzorcev rib, hkrati pa omogoča dobro ponovljivost in občutljivost. Metodo bomo optimizirali na mišičnem tkivu. Metodo za ekstrakcijo učinkovin v tkivih rib bomo razvili tako, da bomo preverili parametre, ki najpomembnejše vplivajo na izkoristek ekstrakcije. Preizkusili bomo različna ekstrakcijska topila, različne mase tkiva ter kako redčenje in pH supernatanta vplivata na izkoristek ekstrakcije. Prav tako bomo optimizirali SPE postopek, tako da bomo preizkusili različna elucijska topila. V nadaljevanju bomo metodo ovrednotili; preverili ali je metoda ponovljiva, točna in linear na izbranem območju ter določili meje določitve za vse izbrane zdravilne učinkovine.

Optimizirano metodo bomo uporabili na vzorcih rib iz ribogojnice, trgovine in reke Save, kamor se izliva iztok iz CČN Sevnica. Ugotavljali bomo prisotnost izbranih učinkovin v različnih tkivih rib. Dobljene rezultate bomo primerjati z rezultati podobnih študij iz tujine.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 MATERIALI

##### 3.1.1 Standardi (Referenčne spojine)

- acetazolamid, acetilsalicilna kislina, alprazolam, amantadinijev klorid, amiloridijev klorid, amitriptilinijev klorid, amoksicilin, ampicilin, antipirin, atenolol, azitromicin, bezafibrat, bisoprolol fumarat, bromazepam, bumetanid, cimetidin, desipraminijev klorid\*, diazepam, diklofenak natrijeva sol\*, donepezilijev klorid monohidrat, enalapril maleat, enalaprilat, escitalopram oksalat, fenitoin, fenoterolijev bromid, finasterid, fluoksetinijev klorid, formoterol fumarat, furosemid, gabapentin, gemfibrozil, glibenklamid, glipizid, griseofulvin, haloperidol, hidrokloktiazid, indapamid, irbesartan\*, kaptopril, karbamazepin\*, karvedilol, ketokonazol, ketoprofen, klofibrinska kislina, klonipraminijev klorid, klonazepam, klonidin, klorheksidin, klorotiazid, kofein, kumarin, kvetiapin hemifumarat, lansoprazol, levamisolijev klorid, loperamidijev klorid, loratidin, lorazepam, metforminijev klorid, metoklopramidijev klorid, metoprolol tartrat, nalidiksna kislina, naproksen\*, nifedipin, norfloksacin, ofloksacin, oksazepam, olanzapin, omeprazol, pantoprazol natrijeva sol, paracetamol, pravastatin natrijeva sol, pirimidon, probenicid, prometazinijev klorid, propifenazon, propranololijev klorid, raloksifenijev klorid, ranitidinijev klorid, rifampicin, salbutamol hemisulfat, salicilna kislina, salmeterol ksinofoat, selegilinijev klorid, sertralinijev klorid, simvastatin\*, tamoksifen citrat, teofilin, topiromat, toremifen citrat, tramadolijev klorid\*, triklosan\*, trimetoprim, valsartan\*, venlafaksinijev klorid, verapamilijev klorid, ziprasidonijev klorid monohidrat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija), amlodipin maleat, atorvastatin kalcijeva sol\*, etopozid, feksofenadinijev klorid, imatinib mezilat, lakozamid, lamotrigin, levetiracetam, likarbazepin, lizinopril, oksakarbazepin, ramipril, risperidon\*, rosuvastatin kalcijeva sol, sildenafil citrat, sumatriptan sukinat (Sequoia Researcher Products, Pangbourne, VB), ciprofloksacin (AppliChem GmbH, Darmstadt, Nemčija).

Čistost vseh uporabljenih standardov je bila >97 %. Standarde označene z \* smo uporabili pri razvoju metode za vrednotenje učinkovin v ribjem tkivu.

##### 3.1.2 Interni standardi (Interne referenčne spojine)

Za interne standarde smo uporabili izotopsko označene spojine: atorvastatin-d<sub>5</sub> kalcijeva sol, fluoksetinijev-d<sub>5</sub> klorid, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-diklofenak, [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-sertralinijev klorid (AlsaChim, Illkirch-

Graffenstaden, Francija), ciprofloksacinijev-d<sub>8</sub> klorid hidrat, diazepam-d<sub>5</sub>, imatinib-d<sub>8</sub>, metoprolol-(isopropil-d<sub>7</sub>) (+)-tartrat, propranolol-d<sub>7</sub> (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija).

### 3.1.3 Reagenti in topila

- Acetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), M = 41,05 g/mol, ≥ 99,9 %, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Acetonitril (C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>N), M = 41,05 g/mol, ≥ 99,9 %, LC-MS grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Destilirana voda, Fakulteta za farmacijo
- Diklorometan (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), M = 84, 93 g/mol, 99,9 %, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O), M = 46,07 g/mol, 96 % (Kefo d.o.o., Ljubljana, Slovenija)
- Etilacetat (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>), M = 88,11 g/mol, Eur. Ph. (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)
- 2-propanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O) M = 60,10 g/mol, ≥ 99,5 % (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Kalijev dihidrogenfosfat (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), M = 136,08 g/mol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Klorovodikova kislina (HCl), M = 36,46 g/mol, Titrisol® za pripravo 1 M raztopine (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Metanol (CH<sub>3</sub>OH), M = 32,04 g/mol, ≥ 99,9 %, HPLC grade (Sigma-Aldrich, Steinheim, Nemčija)
- Natrijev hidroksid (NaOH) M = 40,00 g/mol, Titrisol® za pripravo 1 M raztopine (Merck KgaA, Darmstadt, Nemčija)
- Ultračista voda, pridelana z MilliQ – Advantage A 10 (Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, ZDA)
- Vodovodna voda, Fakulteta za farmacijo

### 3.1.4 Vzorci odpadne vode

- 16.3.2015 vtok in iztok CČN Sevnica (2x 1,5 L vtok, 2x 1,5 L iztok)
- 15.6.2015 vtok in iztok CČN Sevnica (3x 1,5 L vtok, 3x 1,5 L iztok)
- 14.12.2015 vtok in iztok CČN Sevnica (3x 1,5 L vtok, 3x 1,5 L iztok)

### 3.1.5 Vzorci rib

- A) 22.3.2015 dve ribi iz ribogojnice v bližini kraja Stari trg pri Ložu vrste potočna zlatovčica (*Salvelinus fontinalis*)

- B) 15.6.2015 očiščena riba vrste šarenka (*Oncorhynchus mykiss*) kupljena v trgovini v Ljubljani (Delamaris)
- C) 4.10.2015 riba vrste podust (*Chondrostoma nasus nasus*) ulovljena v Sevnici, približno 1 km nizvodno od iztoka CČN Sevnica (nasprotni breg reke Save), donirana s strani ribiške družine.

### 3.1.6 Naprave in pribor

- Analitska tehntica Excellence Plus (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)
- Centrifuga Eppendorf 5415 R (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Hladilnik 5±3 °C z zamrzovalnikom -20 °C (Gorenje, Velenje, Slovenija)
- Homogenizator Bullet Blender® (Next Advance, Inc., New York, ZDA)
- Kroglice za homogeniziranje: 1,4 mm kroglice iz nerjavečega jekla (Next Advance, Inc., New York, ZDA)
- pH metra MA 5750 (Iskra, Kranj, Slovenija) in MP 220 (Mettler Toledo, Greifensee, Švica)
- Plastične mikrocentrifugirke Eppendorf SafeLock™ 2 mL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Polavtomatske pipete: 2-20 µL, 20-200 µL, 100-1000 µL (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)
- Pufrne raztopine: pH 3, ph 7 in pH 10 (Panreac Quimica S.L.U., Barcelona, Španija)
- Stresalnik Vibromix 10 (Tehntica, Železniki, Slovenija)
- Tehntica AG 245 (Mettler Toledo, Greifensee, ZDA)
- TurboVap LV (Caliper, Hopkinton, Massachusets, ZDA)
- Ultrazvočni čistilnik Sonis 4 (Iskra, Kranj, Slovenija)
- Ostalo: magneti, nastavki za pipete, parafilm M, spatula, štoparica, vzmeti za steklene vložke, zamaški za viale, zaščitne rokavice

Steklovina (čaše, meritne bučke, meritni valji, zamaški, čolnički za tehtanje, viale, polnilne pipete, stekleni vložki za viale)

### SPE sistem

- Kadička Visiprep™ Solid Phase Extraction Vacuum Manifold (Supelco, Bellefonte, Pennsylvania, ZDA)

- Kartuše Strata-X Polymeric Reversed Phase 60 mg/3 mL (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, ZDA)
- Oljna vakumska črpalka DOA-P504-BN (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)

### SPE-DEX sistem

- Diski Atlantic® HLB SPE Disk (Horizon Technology Inc., New Hampshire, ZDA)
- Ekstraktor SPE-DEX® 4790 (Horizon Technology Inc., New Hampshire, ZDA)
- Filtri (Atlantic® Fast Flow Sediment Pre-Filters; 1 µm in 5 µm)
- Industrijski plin N<sub>2</sub> M = 28,01 g/mol, ≥ 99,9 %, (Messer, Ruše, Slovenija)
- Oljna vakumska črpalka (Gast Manufacturing Inc., Harbor, Michigan, ZDA)
- Programska oprema Envision™ platform Controller software
- Stekleni vsebnik 1000 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- Viala za eluat 20 mL (Thermo Fisher Scientific, ZDA)
- Posode za odpad

### LC-MS/MS sistem

- Agilent 1290 Infinity UHPLC (Agilent Technologies, ZDA)
- Agilent 6460 Triple Quadrupole LC-MS (Agilent Technologies, ZDA)
- Ionski izvor: Jetstream® ESI ionski izvor
- Kolona: Poroshell EC-C18 100x3 mm, 2,7 µm (Agilent Technologies, ZDA)
- Programska oprema: MassHunter Workstation

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Osnovne raztopine

#### 3.2.1.1 Primarna osnovna raztopina (POR)

Pripravili smo referenčne raztopine obravnavanih učinkovin (navedene pod točko 3.1.1) s koncentracijo 1 mg/mL. Na tehtič smo natehtali maso 5 mg posamezne učinkovine in jo raztopili v 5 mL MeOH.

### 3.2.1.2 Sekundarna osnovna raztopina (SOR)

Sekundarno osnovno raztopino s koncentracijo 1 mg/L smo pripravili s 1000-kratnim redčenjem primarne osnovne raztopine ( $c = 1 \text{ mg/L}$ ). 25  $\mu\text{L}$  POR smo prenesli v 25 mL bučko in do oznake dopolnili z MeOH.

Pripravili smo dve osnovni raztopini:

- **Sekundarna osnovna raztopina I (SOR I):** Raztopina pripravljena iz 111 primarnih osnovnih raztopin za analizo odpadne vode (delo s SPE-DEX).
- **Sekundarna osnovna raztopina II (SOR II):** Raztopina pripravljena iz 11 primarnih osnovnih raztopin za razvoj metode za analizo učinkovin v ribjih tkivih (delo s SPE).

### 3.2.1.3 Delovne raztopine

Pripravili smo naslednje delovne raztopine:

- **Delovna raztopina A (delo s SPE-DEX in vzorci odpadne vode):** Delovno raztopino A s koncentracijo 200  $\mu\text{g/L}$  smo pripravili tako, da smo odpipetirali 2 mL SOR I in jo prenesli v 10 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z ultračisto vodo (MilliQ).
- **Delovna raztopina B (ekstrakcija učinkovin iz vzorcev ribjega tkiva):** Delovno raztopino B s koncentracijo 200  $\mu\text{g/L}$  smo pripravili tako, da smo odpipetirali 1 mL SOR II in jo prenesli v 5 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z ultračisto vodo (MilliQ).
- **Delovna raztopina C (ekstrakcija učinkovin iz vzorcev ribjega tkiva):** Delovno raztopino C s koncentracijo 20  $\mu\text{g/L}$  smo pripravili tako, da smo odpipetirali 100  $\mu\text{L}$  SOR II in jo prenesli v 5 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z ultračisto vodo (MilliQ).

## 3.2.2 Priprava 50 mM fosfatnega pufra

Za pripravo 1 L 50 mM fosfatnega pufra smo natehtali 6,80 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in ga kvantitativno prenesli v 1L bučo, raztopili v destilirani vodi in dopolnili merilno bučko do oznake ter jo premešali. Pripravljeno raztopino  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  smo s pH metrom umerili na ustrezno pH vrednost (3, 5, 7, 9) z dodajanjem 1 M HCl ali 1 M NaOH.

### 3.2.3 Priprava topil

#### 3.2.3.1 Priprava elucijskega topila za ekstrakcijo učinkovin iz odpadne vode

Elucijsko topilo, ki je mešanica acetonitrila (ACN), metanola (MeOH) in 2-propanola (2-PrOH) v volumskem razmerju 50/25/25 smo pripravili tako, da smo z merilnim valjem odmerili ustrezni volumen vsakega topila in ga prenesli v 1000 mL bučko.

#### 3.2.3.2 Priprava ekstrakcijskih topil in topil za elucijo za ekstrakcijo učinkovin iz ribjih tkiv

Izbrano ekstrakcijsko in elucijsko topilo smo pripravili tako, da smo s pomočjo polnilne pipete in merilnega valja odmerili ustrezni volumen topila in ga prenesli v 25 mL merilno bučko.

### 3.2.4 EKSTRAKCIJA UČINKOVIN IZ ODPADNE VODE

#### 3.2.4.1 Priprava elucijskega topila

Elucijsko topilo je zmes acetonitrila, metanola in 2-propanola v razmerju 50/25/25. Pripravili smo ga po postopku, opisanem v poglavju 3.2.3.1.

#### 3.2.4.2 Priprava standardov

Postopek priprave standardov je opisan v poglavju 3.2.1.3. Iz sekundarne osnovne raztopine SOR I smo pripravili delovno raztopino A.

#### 3.2.4.3 Metoda SPE-DEX

250 mL vzorca odpadne vode smo razredčili z 250 mL 50 mM pufra pH 3. Uporabili smo predhodno optimizirano metodo, ki so jo razvili na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko na Fakulteti za farmacijo. Cikli uporabljeni metode so navedeni v preglednici II.

*Preglednica II: Metoda ekstrakcije na SPE-DEX.*

	Topilo	Čas namakanja [s]	Čas sušenja [s]
<b>Predpriprava SPE</b>	MeOH	15	0
	MeOH	15	15
	ultračista voda	15	15
	ultračista voda	10	10
<b>nanos vzorca</b>			
<b>sušenje</b>		60	
<b>spiranje</b>	elucijsko topilo	180	60

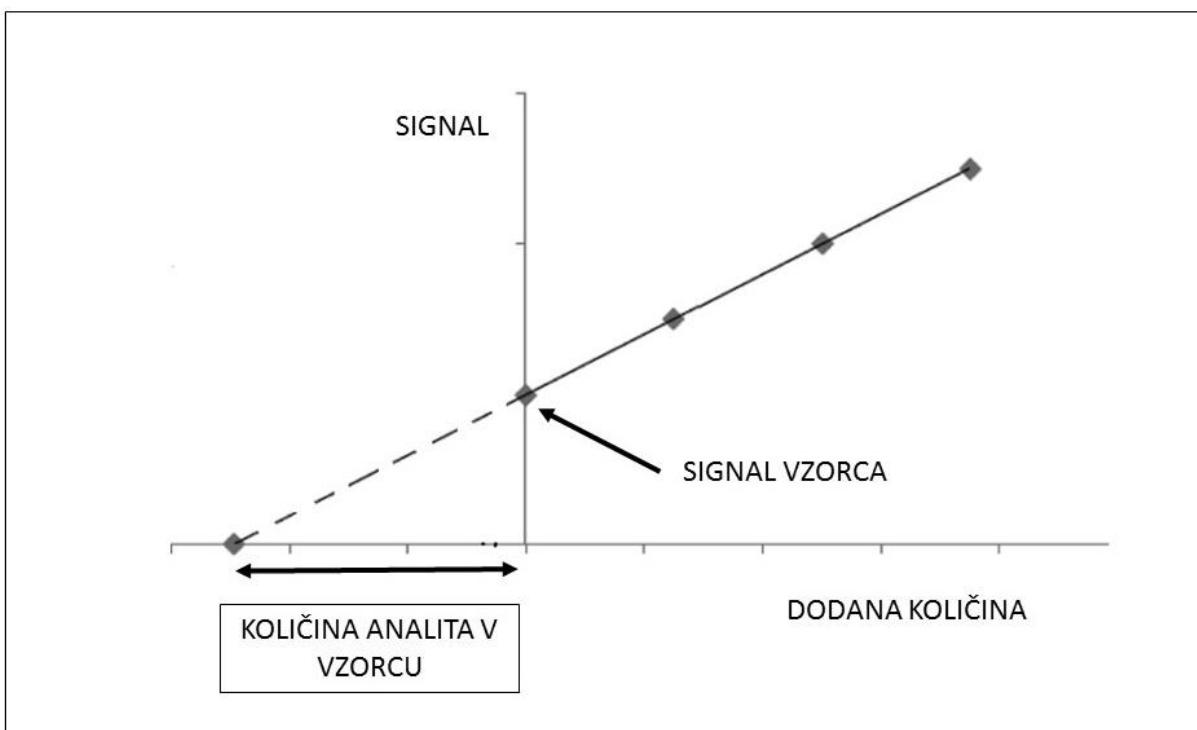
Eluat smo prenesli v 25 mL merilno bučko in do oznake dopolnili z elucijskim topilom. 1 mL eluata smo prenesli v vialo in analizirali z LC-MS/MS.

### **3.2.4.4 Metoda standardnega dodatka za izračun koncentracije učinkovin v odpadni vodi**

Koncentracije učinkovin smo izračunali z metodo standardnega dodatka. Za izvedbo te metode potrebujemo enake volumne preiskovane raztopine. Vsem vzorcem, razen enemu, dodamo različne volumne koncentracije SOR I, nato pa sledimo postopku metode SPE-DEX, ki je opisan v poglavju 3.2.4.3. Z izbrano analizno metodo izmerimo odzive analita v posameznih vzorcih in jih grafično prikažemo. S pomočjo Microsoft Office Excel programa izračunamo parametre umeritvenih premic (enačba 1); naklon ( $k$ ), presečišče z y osjo ( $n$ ) in determinacijski koeficient ( $R^2$ ). Os y predstavlja odziv, os x pa koncentracijo dodanega analita v vzorcu. Skozi točke ekstrapoliramo premico do točke na osi x, kjer je  $y = 0$ . Vrednost na x osi predstavlja dejansko koncentracijo analita v vzorcu (slika 3) [67]. Koncentracijo izračunamo s pomočjo enačbe 2.

$$y = kx + n \quad (\text{Eqačba } 1)$$

$$\text{Koncentracija} = - \frac{\text{presečišče z y osjo}}{\text{naklon premice}} \quad (\text{Eqačba } 2)$$



Slika 3: Metoda standardnega dodatka.

### **3.2.4.5 Priprava realnega vzorca odpadne vode**

Vodo smo vzorčili na CČN Sevnica v treh časovnih točkah (marec, junij in december 2015). Vzorčili smo na vtoku CČN (pred čiščenjem) in na iztoku CČN (po čiščenju) z metodo trenutno zajetega vzorca. CČN Sevnica se nahaja na ravnici reke Save nizvodno od naselja Log, njena obremenitev je sestavljena iz odpadne vode prebivalcev in zaposlenih v industriji, kapaciteta pa 9900 populacijskih enot. Gre za komunalno ČN, ki vključuje procese delne nitrifikacije, nitrifikacije in delne aerobne stabilizacije blata. Odpadna voda doteče po dotočni kanalizaciji do vhodnega črpališča, kjer so locirane tri potopne črpalke. Opremljena je s postajo za sprejem vsebine greznic, kjer se nahaja naprava za izločanje grobih delcev. Ti se v napravi operejo in stisnejo ter odlagajo v polivinilkloridne vreče. Odpadna voda iz prezračenega peskolova in maščobnika odteka v prezračevalni bazen, kjer poteka biološko čiščenje. Očiščena odpadna voda se z aktivnim blatom preliva v naknadni usedalnik, kjer se aktivno blato loči od prečiščene vode. Prečiščena voda odteka skozi merilni jašek v reko Savo [68].

Postopek priprave vzorcev iz CČN Sevnica je podan v preglednici III. Vzorce odpadne vode smo analizirali z metodo SPE-DEX (poglavlje 3.2.4.3), koncentracijo učinkovin v odpadni vodi pa smo izračunali z metodo standardnega dodatka (poglavlje 3.2.4.4). Vzorcem smo dodali znan volumen SOR I oz. delovne raztopine A. Podatki o dodanih voluminih so navedeni v preglednici III. V odpadni vodi je prisotno veliko onesnažil in tudi delcev, ki lahko vplivajo na sam proces ekstrakcije in morebitno mašenje diskov za ekstrakcijo, zato smo vzorce odpadne vode pred analizo redčili s 50 mM fosfatnim pufom pH=3. Z redčenjem tudi zmanjšamo vpliv matrice. Po eluciji smo iz bučke z eluatom odvzeli od vsakega vzorca po 1 mL, eluat prenesli v mikrocentrifugirko in do suhega posušili do suhega na TurboVap-u. Zaostanek smo raztopili v 1 mL rekonstitucijskega topila ACN:MeOH = 50/50, 2 minuti mešali z vrtinčenjem in prenesli v viale ter analizirali na LC-MS/MS. Pripravili smo tudi vzorce standardne raztopine s koncentracijami 2, 5, 10 in 20 µg/L (koncentracija v eluatu pred sušenjem), ki so nam služili pri izračunu koncentracije analitov v odpadni vodi.

#### **Preglednica III: Postopek priprave vzorcev CČN Sevnica.**

Vzorec	Volumen odpadne vode [mL]	Volumen ultra čiste vode [mL]	Volumen pufra [mL]	V SOR I c= 1 mg/L	V delovne raztopine A c=200 µg/L	V odpadne vode pred SPE-DEX [µL]	Koncentracija v vzorcu [µg/L]
Slepi vzorec		500					
Odpadna voda	250	/	250	/	/	/	0

<b>odpadna voda + del. raztopina A</b>	250	/	250	/	250	0,2
<b>odpadna voda + del. raztopina A</b>	250	/	250	/	625	0,5
<b>Odpadna voda + SOR I</b>	250	/	250	250	/	1
<b>Odpadna voda + SOR I</b>	250	/	250	500	/	2

\* Koncentracija v 250 mL vzorca odpadne vode

Razlika v koncentraciji učinkovin na vtoku in iztoku ČN nam pove, kako učinkovita je ČN pri odstranjevanju onesnažil. Učinkovitost čiščenja CČN Sevnica smo izračunali s pomočjo enačbe 3.

$$Učinkovitost čiščenja [\%] = \frac{c(vtok) - c(iztok)}{c(vtok)} \times 100 \quad (Enačba\ 3)$$

### 3.2.5 RAZVOJ METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIBJIH TKIV

#### 3.2.5.1 Priprava tkiva

Ribam smo odstranili organe in v plastične mikrocentrifugirke prenesli približno natančno 1 g posameznega tkiva, kjer je bilo to možno. Odvzeli in analizirali smo jetra, ledvice, kožo, škrge in mišično tkivo. Vzorcev mišičnega tkiva smo pripravili največ, saj je bilo tega tkiva največ na razpolago. Razvoj metode je potekal na mišičnem tkivu. Mikrocentrifugirke s tkivom smo shranili na – 80 °C.

#### 3.2.5.2 Postopek ekstrakcije iz tkiva

Pred začetkom dela smo odtalili mišično tkivo, ki je bilo shranjeno v zamrzovalniku na – 80 °C. Odmrznjenemu mišičnemu tkivu smo nato dodali 1 odmerno žličko homogenizacijskih kroglic s premerom 1,4 mm iz nerjavečega jekla. Plastične mikrocentrifugirke smo prenesli na homogenizator Bullet Blender in homogenizirali 5 min pri hitrosti 4. Tkvu smo nato dodali 1 mL izbranega ekstrakcijskega topila in 50 µL delovne raztopine B s koncentracijo 200 µg/L. Mikrocentrifugirke smo zopet homogenizirali 5 min pri hitrosti 4. Homogenizirane vzorce smo nato prenesli na centrifugo, kjer smo centrifugirali 5 min pri 4 °C in hitrosti 15 000 x g (15209 rpm). Odvzeli smo 800 µL supernatanta in ga prenesli v merilno bučko izbranega volumna in do oznake redčili z izbranim medijem za redčenje. Sledilo je dodatno čiščenje vzorcev s SPE.

Postopek je opisan v poglavju 3.2.5.3. Izkoristek ekstrakcije smo izračunali pri isti koncentraciji analita z enačbo 4.

$$\text{Izkoristek [\%]} = \frac{\text{odziv v vzorcu}}{\text{odziv v raztopini standarda}} \times 100 \% \quad (\text{Enačba 4})$$

$$\text{Relativni izkoristek [\%]} = \frac{\text{izkoristek učinkovine}}{\text{maksimalni izkoristek učinkovine}} \times 100 \% \quad (\text{Enačba 5})$$

### **3.2.5.3 SPE postopek**

Kartuše smo najprej aktivirali z 10 mL MeOH, za ekvilibracijo pa smo nanesli 3 mL ultračiste vode. Pretok smo uravnali na 1 mL/min. Sledil je nanos vzorca. Po nanosu vzorca je sledilo vakuumsko sušenje za 10 min in nato elucija z 2 mL izbranega elucijskega topila. Eluirali smo v 2 mL mikrocentrifugirko. Eluat smo nato posušili do suhega na vodni kopeli pri 40 °C z napravo TurboVap. Zaostanek smo raztoplili v 250 µL topila za raztavljanje ACN:MeOH = 50/50 (v/v), ga vorteksirali 2 min in 150 µL vzorca prenesli v vialo s steklenim vložkom. Vzorce smo analizirali z LC-MS/MS. Izkoristek smo izračunali z enačbo 4. Odzive analitov v vzorcu smo primerjali glede na raztopino standarda 32 µg/L, ki smo ga pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.5.4.

### **3.2.5.4 Priprava standardne raztopine za izračun izkoristka ekstrakcije na SPE sistemu**

Za izračun izkoristka ekstrakcije smo pripravili standard s koncentracijo 32 µg/L, saj je končna koncentracija po pripravi v vzorcu ob predpostavki 100% izkoristka 32 µg/L. Raztopino smo pripravili tako, da smo odpipetirali 800 µL delovne raztopine B in jo prenesli v 5 mL merilno bučko in do oznake dopolnili s topilom ACN:MeOH = 50/50.

## **3.2.6 OPTIMIZACIJA METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIBJIH TKIV**

### **3.2.6.1 Izbor ustrezneg elucijskega topila**

Pri optimizaciji SPE postopka smo preverjali različna elucijska topila, ki so navedena v preglednici IV. Postopek priprave topil je opisan v poglavju 3.2.3.2, postopek ekstrakcije v poglavju 3.2.5.2 in SPE postopek v poglavju 3.2.5.3.

*Preglednica IV: Uporabljena elucijska topila.*

Št.	Elucijsko topilo
1.	Acetonitril
2.	ACN:MeOH = 50:50 (v/v)
3.	ACN:MeOH = 80:20 (v/v)
4.	ACN:MeOH:2-PrOH = 50:25:25 (v/v)

<b>5.</b>	ACN:2-PrOH = 80:20 (v/v)
<b>6.</b>	ACN:2-PrOH = 50:50 (v/v)

### 3.2.6.2 Mediji za redčenje vzorca pred nanosom na SPE

50 mM fosfatni pufer smo pripravili po postopku opisanem v poglavju 3.2.2. Na enak način smo umerili tudi ultračisto vodo. Uporabljeni mediji za redčenje supernatanta ekstrakta ribjega tkiva so podani v preglednici V. Postopek ekstrakcije je opisan v poglavju 3.2.5.2, SPE postopek pa v poglavju 3.2.5.3 Pri redčenju z ultračisto vodo smo kot elucijsko topilo uporabili ACN:MeOH:2-PrOH = 50/25/25, pri redčenju s 50 mM fosfatnim pufrom pa topilo ACN:MeOH = 80/20.

*Preglednica V: Uporabljeni mediji za redčenje vzorca pred nanosom na SPE.*

Št.	Medij
<b>1.</b>	Ultračista voda pH=3
<b>2.</b>	Ultračista voda pH=5
<b>3.</b>	Ultračista voda pH=7
<b>4.</b>	Ultračista voda pH=9
<b>5.</b>	50 mM fosfatni pufer pH=3
<b>6.</b>	50 mM fosfatni pufer pH=5
<b>7.</b>	50 mM fosfatni pufer pH=7
<b>8.</b>	50 mM fosfatni pufer pH=9

### 3.2.6.3 Volumen redčitve vzorca pred nanosom na SPE

Supernatant ekstrakta ribjega tkiva smo redčili do 10 mL ali do 25 mL. 800 µL ekstrakta ribjega tkiva smo prenesli v merilno bučko izbranega volumna in do oznake dopolnili s 50 mM fosfatnim pufrom pH=7. Zaostanek ekstrakcijskega topila v vzorcu po redčenju je podan v preglednici VI. Postopek ekstrakcije je opisan v poglavju 3.2.5.2, SPE postopek pa v poglavju 3.2.5.3.

*Preglednica VI: Ostanek ekstrakcijskega topila po redčenju.*

Št.	Redčenje vzorca	% ekstrakcijskega topila
<b>1.</b>	na 10 mL	8%
<b>2.</b>	na 25 mL	3,2%

### 3.2.6.4 Izbira ustreznega ekstrakcijskega topila

Pri razvoju ekstrakcijske metode smo preverjali, kako na izkoristek ekstrakcije vplivajo različna ekstrakcijska topila, ki so navedena v preglednici VII. Postopek priprave 1 g tkiva je opisan v poglavju 3.2.3.2, postopek ekstrakcije v poglavju 3.2.5.2 in SPE postopek v poglavju 3.2.5.3.

**Preglednica VII: Uporabljena ekstrakcijska topila.**

Št.	Ekstrakcijsko topilo
1.	Acetonitril
2.	ACN:MeOH = 80:20 (v/v)
3.	ACN:MeOH = 75:25 (v/v)
4.	ACN:MeOH = 50:50 (v/v)
5.	Metanol
6.	Diklorometan
7.	Etil acetat

**3.2.6.5 Vpliv koncentracije na izkoristek**

Pri postopku ekstrakcije 1 g tkiva smo uporabili različno koncentracijo delovne raztopine in preverjali ali koncentracija analita vpliva na izkoristek ekstrakcije. Uporabili smo delovni raztopini B in C s koncentracijama 200 µg/L in 20 µg/L. Postopek priprave je opisan v poglavju 3.2.1.3. Pri koncentraciji 20 µg/L je končna koncentracija v tkivu ob predpostavki 100% izkoristka, 1 ng/g tkiva, pri koncentraciji 200 µg/L, pa desetkrat višja (10 ng/g). Postopek ekstrakcije je opisan v poglavju 3.2.5.2, SPE postopek pa v poglavju 3.2.5.3.

**3.2.6.6 Masa ribjega tkiva**

Pri postopku ekstrakcije smo uporabili različne mase tkiva in preverjali kako masa uporabljenega tkiva vpliva na izkoristek ekstrakcije. Uporabljene mase ribjega tkiva so bile: 300 mg, 600 mg in 1 g v treh paralelkah. Postopek ekstrakcije je opisan v poglavju 3.2.5.2, SPE postopek pa v poglavju 3.2.5.3.

**3.2.7 KONČNA METODA****3.2.7.1 Metoda za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva**

Pred začetkom dela smo odtalili tkivo, ki je bilo shranjeno v zamrzovalniku na – 80 °C. Odmrznjenemu 1g mišičnega tkiva smo nato dodali 1 odmerno žličko homogenizacijskih kroglic s premerom 1,4 mm iz nerjavečega jekla. Plastične mikrocentrifugirke smo prenesli na homogenizator Bullet Blender in homogenizirali 5 min pri hitrosti 4. Tkivu smo nato dodali 1 mL acetonitrila in 50 µL delovne raztopine B s koncentracijo 200 µg/L. Mikrocentrifugirke smo zopet homogenizirali 5 min pri hitrosti 4. Homogenizirane vzorce smo nato prenesli na centrifugo, kjer smo centrifugirali 5 min pri 4 °C in hitrosti 15 000 x g. Odvzeli smo 800 µL supernatanta in ga prenesli v 25 mL merilno bučko in do oznake redčili s 50 mM fosfatnim pufom pH 7. Sledilo je dodatno čiščenje vzorcev s SPE. Uporabili smo kartuše Strata-X, ki smo jih aktivirali s 10 mL MeOH in 3 mL ultračiste vode. Sledil je nanos vzorca (25 mL). Po

nanosu vzorca je sledilo 10 minutno sušenje kartuš z vakuumom. Eluirali smo v 2 mL mikrocentrifugirke, kot elucijsko topilo pa smo uporabili ACN:MeOH = 80/20 (v/v). Mikrocentrifugirke z eluatom smo sušili do suhega na vodni kopeli pri 40 °C z napravo TurboVap. Zaostanek smo raztopili v 250 µL topila za raztopljanje ACN:MeOH = 50/50 (v/v), ga vorteksirali 2 min in 150 µL vzorca prenesli v vialo s steklenim vložkom. Vzorce smo analizirali z LC-MS/MS.

### **3.2.7.2 LC-MS/MS pogoji**

Vzorce smo analizirali LC-MS/MS inštrumentom. Kromatografska ločba je potekala na koloni Poroshell EC-C18 100 x 3 mm, 2,7 µm pri 50°C. Uporabili smo gradientno elucijo, s topilom A (0,05% HCOOH v vodi) in topilom B (99% acetonitril). Uporabljeni pretoki in sestava mobilne faze so navedeni v preglednici VIII. Čas analize posameznega vzorca je bil 8,2 min, injicirali pa smo 1 µL vsakega vzorca.

**Preglednica VIII: Spreminjanje pretoka in sestave mobilne faze.**

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

Ionizacija analitov je potekala v elektronskem razprševalniku Agilent Jet Stream ESI. V preeglednici IX so podane nastavitev ionskega izvora. Z uporabo multirezidualne analize (MRM) smo detektirali izbrane analite. MRM prehodi, kolizijske energije, napetosti fragmentorja, polariteta ionizacije in retencijski časi so podani v preglednici X.

**Preglednica IX: Nastavitev ionskega izvora.**

Temperatura sušilnega plina	275 °C
Pretok plina	10 L/min
Nebulizator	45 psi (3,1 bar)
Temperatura plašča	350 °C
Pretok plina v plašču	11 L/min

<b>Napetost na kapilari</b>	4000 V
<b>Napetost na šobi</b>	1000 V

*Preglednica X: MRM prehodi, napetosti fragmentorja, kolizijske energije, polariteta in retencijski časi izbranih učinkovin.*

Učinkovina	MRM prehod [m/z]	Napetost fragmentorja [V]	Kolizijska energija [eV]	Polariteta ionizacija	Retencijski čas [min]
<b>atorvastatin</b>	559,3→440,2	180	17	pozitivna	6,32
<b>karbamazepin</b>	237,1→193,9	103	12	pozitivna	4,13
<b>dezipramin</b>	267,2→72,1	98	12	pozitivna	4,02
<b>diklofenak</b>	296,0→214,0	55	15	pozitivna	6,38
<b>irbesartan</b>	429,2→207,1	121	21	pozitivna	5,29
<b>naproksen</b>	229,1→168,9	70	26	negativna	5,93
<b>risperidon</b>	411,2→191,1	159	28	pozitivna	2,88
<b>simvastatin</b>	419,3→99,6	121	29	pozitivna	7,01
<b>tramadol</b>	264,2→58,1	81	17	pozitivna	2,58
<b>triklosan</b>	286,9→35,1	60	4	negativna	6,80
<b>valsartan</b>	436,2→207,1	81	25	pozitivna	6,12

### 3.2.8 VREDNOTENJE METODE ZA ANALIZO RIBJEGA TKIVA

Pri vrednotenju analizne metode so na voljo številne mednarodne smernice. Mi smo uporabili smernico Mednarodne konference o harmonizaciji (ICH) za validacijo analiznih metod, ki vključuje vrednotenje testiranih validacijskih parametrov [69]. Vrednotili smo ponovljivost, linearnost, točnost, območje metode in mejo določitve.

#### 3.2.8.1 Vrednotenje SPE postopka

Linearnost samega SPE postopka smo ovrednotili v koncentracijskem območju od 0,05 µg/L do 1 µg/L. Postopek priprave standardnih raztopin je podan v Preglednica XI. Z metodo najmanjših kvadratov smo izdelali umeritvene premice, izračunali pripadajoče enačbe in determinacijske koeficiente ( $R^2$ ). Za mejo sprejemljivosti smo si postavili kriterij  $R^2 > 0,99$ . Merilne bučke s standardnimi raztopinami smo do oznake smo napolnili s 50 mM fosfatnim pufom pH = 7.

*Preglednica XI: Priprava standardnih raztopin za vrednotenje linearnosti SPE.*

Standardna raztopina	Postopek priprave	Koncentracija pred SPE	Koncentracija po SPE
<b>Raztopina A</b>	50 µL SOR II v 50 mL bučko	1,00 µg/L	40 µg /L
<b>Raztopina B</b>	25 µL SOR II v 100 mL bučko	0,250 µg/L	10 µg /L

<b>Raztopina C</b>	25 mL raztopine B v 50 mL bučko	0,125 µg/L	5 µg /L
<b>Raztopina D</b>	10 mL raztopine B v 50 mL bučko	0,050 µg/L	2 µg /L

10 mL posamezne raztopine smo kvantitativno prenesli v 10 mL bučke in ekstrahirali z metodo SPE po postopku opisanem v poglavju 3.2.5.3. Kot elucijsko topilo smo uporabili ACN: MeOH = 80/20.

### 3.2.8.2 Vrednotenje analizne metode

- *Linearost*

Linearost metode smo opredelili s pomočjo statistične obdelave odzivov analitov v vzorcih. Za preverjanje linearnosti metode smo pripravili vzorce z devetimi različnimi koncentracijami in vzorec, ki mu nismo dodali standardne raztopine tj. slepi vzorec. Za vsako koncentracijsko točko in tudi slepi vzorec smo naredili tri paralelke. Linearost metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib smo ugotavljali v koncentracijskem območju 1 µg/L – 50 µg/L. Delali smo z vzorci mišičnega tkiva, saj smo mišičnega tkiva imeli največ na voljo. Iz primarnih osnovnih raztopin smo pripravili vmesno raztopino SOR II, iz katere smo nato pripravili raztopine, ki smo jih dodali tkivnim vzorcem. Raztopine standardov z različnimi koncentracijami (1-50 µg/L) za dodajanje vzorcem smo pripravili v 10 mL bučki in do oznake dopolnili z metanolom (Preglednica XII). Tkvu smo dodali 50 µL posamezne raztopine standarda in dobili koncentracijo učinkovine v ribjem tkivu izraženo v ng učinkovine/g tkiva. Z metodo linearne regresije smo določili umeritveno premico za posamezen analit (enačba 1). Korelacijo med koncentracijo v vzorcu in odzivov smo ovrednotili s koeficientom  $R^2$ . Za mejo, ki zagotavlja ustrezno linearost smo si postavili kriterij  $R^2 \geq 0,99$ . Iz povprečnih odzivov učinkovine za vsako koncentracijo smo izračunali naslednje parametre: RSD, točnost, izkoristek,  $R^2$ , mejo določitve (LOQ) in območje metode. Parametri regresijske premice so nam služili za vrednotenje prisotnosti in koncentracije učinkovine v različnih vzorcih ribjih tkiv. Uporabili smo pogoje končne metode, ki so navedeni v poglavju 3.2.7.

- *Ponovljivost*

Ponovljivost smo izvedli na šestih vzorcih mišičnega tkiva. Uporabili smo pogoje optimizirane metode, ki so navedeni v poglavju 3.2.7. Ta parameter smo testirali ob dodatku raztopine standardov s koncentracijo 200 µg/L, ki smo jo pripravili po postopku, opisanem v poglavju 3.2.1.3 (delovna raztopina B). Za vrednotenje ponovljivosti smo uporabili relativni standardni odklon, ki smo ga izračunali z enačbo 6.

$$\text{Relativni standardni odklon (RSD) [\%]} = \frac{\text{standardni odklon odzivov vzorca}}{\text{povprečje odzivov vzorca}} \times 100 \quad (\text{Enačba 6})$$

- *Točnost*

Točnost metode smo ovrednotili tako, da smo s pomočjo regresijske premice izračunali koncentracijo vsake učinkovine ter nato izračunali odstotek odstopanja izračunane koncentracije od dejanske koncentracije. Za ustrezno mejo odstopanja izračunane koncentracije od dejanske koncentracije smo določili  $\pm 20\%$ . Točnost smo izračunali po enačbi 7.

$$\text{Točnost [\%]} = \frac{(\text{izračunana koncentracija} - \text{dejanska koncentracija})}{\text{dejanska koncentracija}} \times 100 \quad (\text{Enačba 7})$$

- *Meja določitve in območje analizne metode*

Za določitev mejo določitve (LOQ) se uporablajo različni pristopi. Mi smo izbrali tistega pri katerem se LOQ ovrednoti kot najnižja koncentracija, pri kateri sta točnost oziroma odstotek napake manjši od  $\pm 20\%$  in ponovljivost oziroma RSD manjši od 20%. Poleg LOQ smo določili tudi delovno območje metode. Za spodnjo mejo delovnega območja metode smo postavili koncentracijo, ki je za učinkovino LOQ. Za zgornjo mejo smo postavili koncentracijo, pri kateri je bil koreacijski koeficient linearnosti še vedno ustrezen.

**Preglednica XII: Priprava raztopin, ki smo jih dodali ribjemu tkivu, za vrednotenje linearnosti analizne metode.**

Koncentracija* standarda [ $\mu\text{g/L}$ ]	V dodane SOR II v 10 mL bučko [ $\mu\text{L}$ ]	Koncentracija učinkovine v tkivu* [ng/g tkiva]
1	10	0,05
2	20	0,10
5	50	0,25
7,5	75	0,38
10	100	0,50
15	150	0,75
20	200	1,00
35	350	1,75
50	500	2,50

\* Končna koncentracija učinkovine v tkivu ob predpostavki 100 % izkoristka (prilagojeno glede na učinkovino (glej Preglednica XIII)).

Navedena koncentracije posameznega standarda v raztopini oziroma v tkivu (preglednica XII) velja ob predpostavki, da je faktor redčenja 1. Raztopino standardov smo namreč prilagodili glede na odziv na masnem detektorju in pričakovane LOQ vrednosti. Faktor redčenja, z

navedenimi dejanskimi koncentracijami posamezne učinkovine v raztopini standarda 1 µg/L, je podan v preglednici XIII.

**Preglednica XIII: Faktor redčenja in navedba dejanskih koncentracij posameznih učinkovin pri deklarirani koncentraciji 1 µg/L.**

	TRM	RIS	DEZ	KBZ	IRB	NAP	VAL	ATS	TKS	SIS	DKF
<b>Faktor redčenja</b>	5	10	10	5	10	0,02	0,5	2	0,1	1	0,5
<b>Dejanska koncentracija pri 1 µg/L</b>	0,2	0,1	0,1	0,2	0,1	50	2	0,5	10	1	2
	µg/L										

### 3.2.9 ANALIZA RIBE IZ REKE SAVE, RIBOGOJNICE IN TRGOVINE

Analizirali smo ribo iz Save, ribo iz ribogojnice in ribo iz trgovine. Uporabili smo pogoje optimizirane metode, opisane v poglavju 3.2.7., vendar realnim vzorcem nismo dodali 50 µL delovne raztopine, dodali smo le 1 mL ekstrakcijskega topila acetonitrila. Vsebnost učinkovin v ribjih tkivih smo vrednotili na osnovi izračunanih regresijskih premic, rezultati pa so predstavljeni v poglavju 4.4. Tkiva, ki smo jih analizirali pri posamezni ribi, so navedena v preglednici XIV.

**Preglednica XIV: Analizirana tkiva rib (X), vključenih v raziskavo.**

TKIVO					
RIBA	MIŠICE	JETRA	LEDVICE	KOŽA	ŠKRGE
SAVA	X	X	-	X	X
TRGOVINA	X	-	-	-	-
RIBOGOJNICA	X	X	X	-	X
<b>Riba A: reka Sava</b>	[vrsta: podust ( <i>Chondrostoma nasus nasus</i> )]				
<b>Riba B: trgovina</b>	[vrsta: šarenka ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )]				
<b>Riba C: ribogojnica</b>	[vrsta: potočna zlatovčica ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )]				

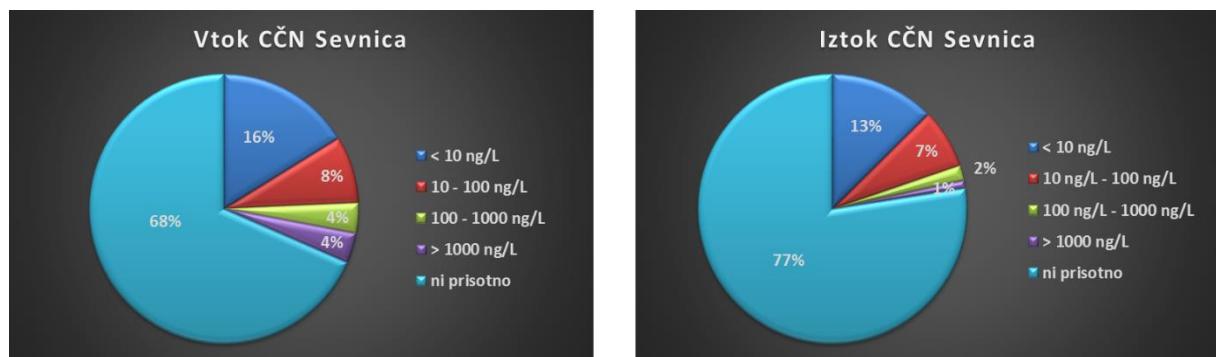
## 4 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 4.1 EKSTRAKCIJA UČINKOVIN IZ ODPADNE VODE

S predhodno optimizirano metodo smo ugotavljali prisotnost 111 različnih učinkovin na vtoku in iztoku CČN Sevnica. Odpadno vodo smo vzorčili v spomladanskem (marec 2015), poletnem (junij 2015) in v zimskem obdobju (december 2015). Rezultati spomladanskega vzorčenja so nam bili v pomoč pri izbiri tarčnih učinkovin, ki smo jih vključili v razvoj metode za ekstrakcijo izbranih učinkovin iz ribjega tkiva, so predstavljeni v poglavju 4.2.

#### 4.1.1 Vzorčenje v poletnem obdobju (junij 2015)

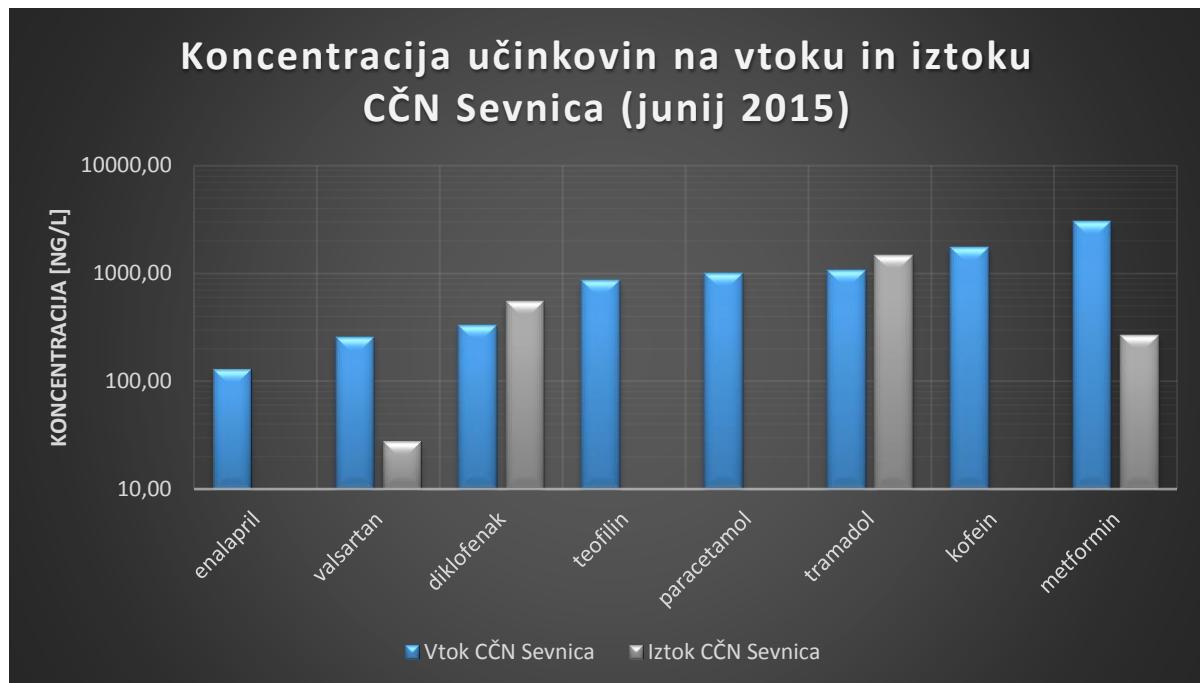
Na sliki 4 so grafično prikazana koncentracijska območja učinkovin, ki so bile prisotne na vtoku in iztoku CČN Sevnica. Izmed analiziranih 111 učinkovin, je bilo na vtoku CČN Sevnica prisotnih 35 učinkovin (32%) na iztoku pa 25 (23%) učinkovin. Iz grafa je razvidno, da je bilo na iztoku prisotnih manj učinkovin. Prisotne učinkovine smo tako na vtoku kot tudi na iztoku razdelili v 4 koncentracijska območja. Tako na vtoku kot tudi na iztoku je bilo največ učinkovin prisotnih v koncentraciji nižji od 10 ng/L (16% in 13%). V primerjavi z vtokom je bilo na iztoku manj učinkovin v koncentraciji 100 – 1000 ng/L in nad 1000 ng/L. Na vtoku CČN je bilo takšnih učinkovin 8%, na iztoku pa 3%.



*Slika 4: Koncentracijsko območje učinkovin v odpadni vodi CČN Sevnica (junij 2015).*

Na sliki 5 so grafično predstavljene koncentracije izbranih učinkovin, ki so bile na vtoku prisotne v koncentraciji višji od 100 ng/L. Prav tako so podane koncentracije istih učinkovin na iztoku, v kolikor so bile prisotne. V najvišjih koncentracijah na vtoku so bili prisotni metformin (3,0 µg/L), kofein (1,8 µg/L), tramadol (1,1 µg/L) in paracetamol (1,0 µg/L). Na iztoku so bile v najvišjih koncentracijah prisotne učinkovine tramadol (1,5 µg/L), diklofenak (556,2 ng/L) in metformin (268,9 ng/L). Primerjava učinkovin na vtoku in iztoku kaže, da se vse učinkovine

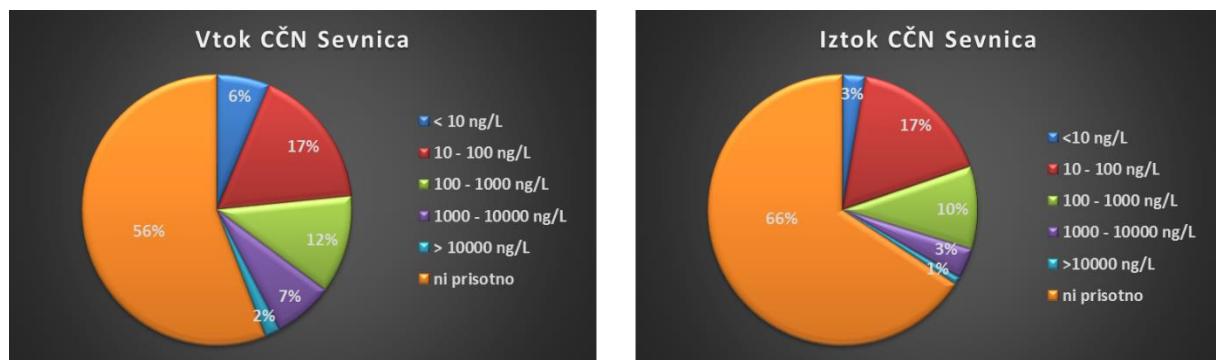
niso popolnoma odstranile, in da je bila v nekaterih primerih koncentracija učinkovin višja na iztoku kot pa na vtoku CČN Sevnica (diklofenak in tramadol).



*Slika 5: Grafični prikaz učinkovin, ki so bile na vtoku CČN Sevnica prisotne v koncentraciji višji od 100 ng/L (junij 2015).*

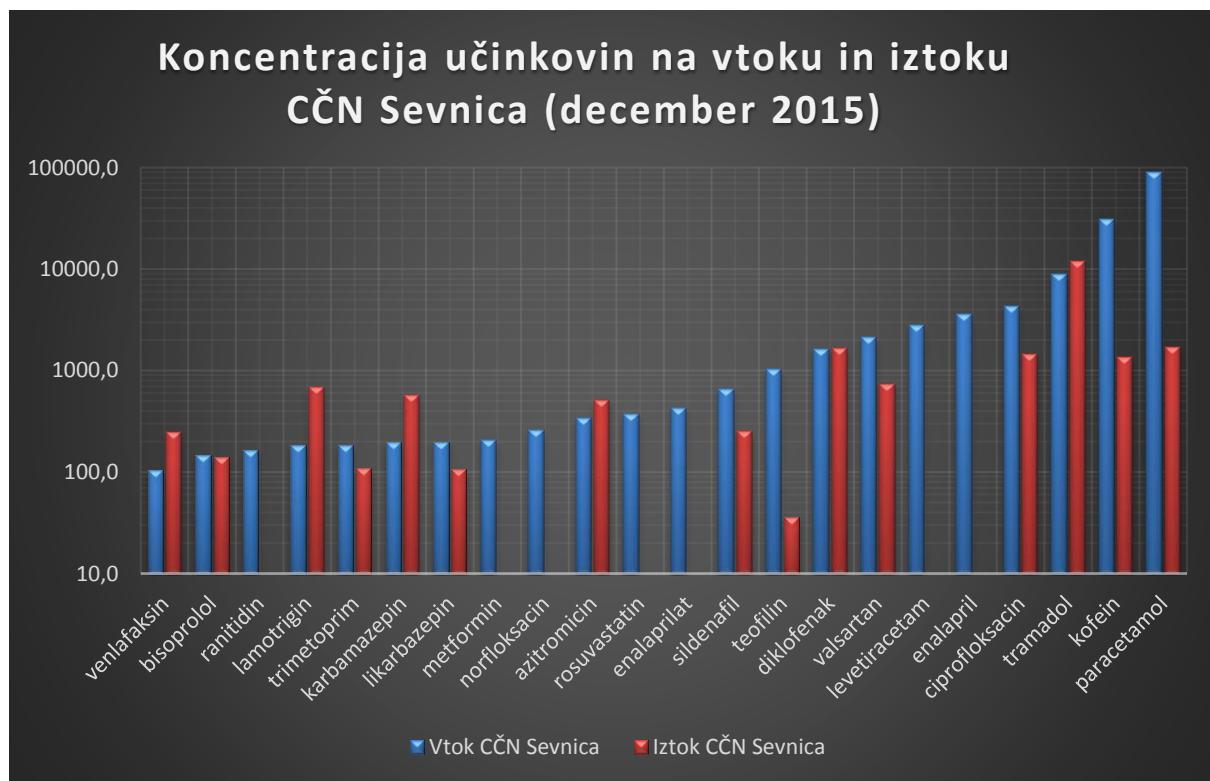
#### 4.1.2 Vzorčenje v zimskem obdobju (december 2015)

Na sliki 6 je grafično prikazano koncentracijsko območje učinkovin na vtoku in iztoku CČN Sevnica v vzorcih, ki smo jih odvzeli v mesecu decembru. Od 111 učinkovin, ki smo jih preverjali v vzorcih CČN Sevnica v zimskem obdobju, je bilo na vtoku prisotnih 49 (44%), na iztoku pa 38 (34%). Učinkovine, ki so bile prisotne v odpadni vodi, smo razdelili v pet koncentracijskih območij. Tako na vtoku kot na iztoku je bilo največ učinkovin prisotnih v koncentracijskem območju 10 – 100 ng/L (17%). Takšnih učinkovin je bilo decembra 19, medtem ko jih je bilo junija v tem koncentracijskem območju na vtoku devet, na iztoku pa osem. Decembra so bile v odpadni vodi tudi učinkovine v koncentraciji nad 10 µg/L. Na vtoku sta bili takšni dve učinkovini (2%), na iztoku pa ena učinkovina (1%).



Slika 6: Koncentracijsko območje učinkovin v odpadni vodi CČN Sevnica (december 2015).

Na sliki 7 so predstavljene učinkovine, ki so bile na vtoku prisotne v koncentraciji nad 100 ng/L in njihove koncentracije na iztoku, v kolikor so bile prisotne. Takšnih učinkovin je bilo 22. Na iztoku je bilo prisotnih manj učinkovin, v koncentraciji nad 100 ng/L jih je bilo 16. V najvišjih koncentracijah na vtoku CČN Sevnica sta bila prisotna kofein ( $31,2 \mu\text{g}/\text{L}$ ) in paracetamol ( $89,8 \mu\text{g}/\text{L}$ ). Zaznali smo tudi visoke koncentracije ciprofloksacina ( $4,3 \mu\text{g}/\text{L}$ ) in tramadola ( $8,8 \mu\text{g}/\text{L}$ ). Na iztoku je bil v najvišji koncentraciji prisoten tramadol ( $11,9 \mu\text{g}/\text{L}$ ), v koncentraciji nad  $1 \mu\text{g}/\text{L}$  pa so bili prisotni še kofein, ciprofloksacin, diklofenak in paracetamol. Pri nekaterih učinkovinah je bil učinek čiščenja 100% in jih na iztoku ni bilo, pri nekaterih pa smo zopet opazili višjo koncentracijo na iztoku CČN Sevnica (npr. tramadol).



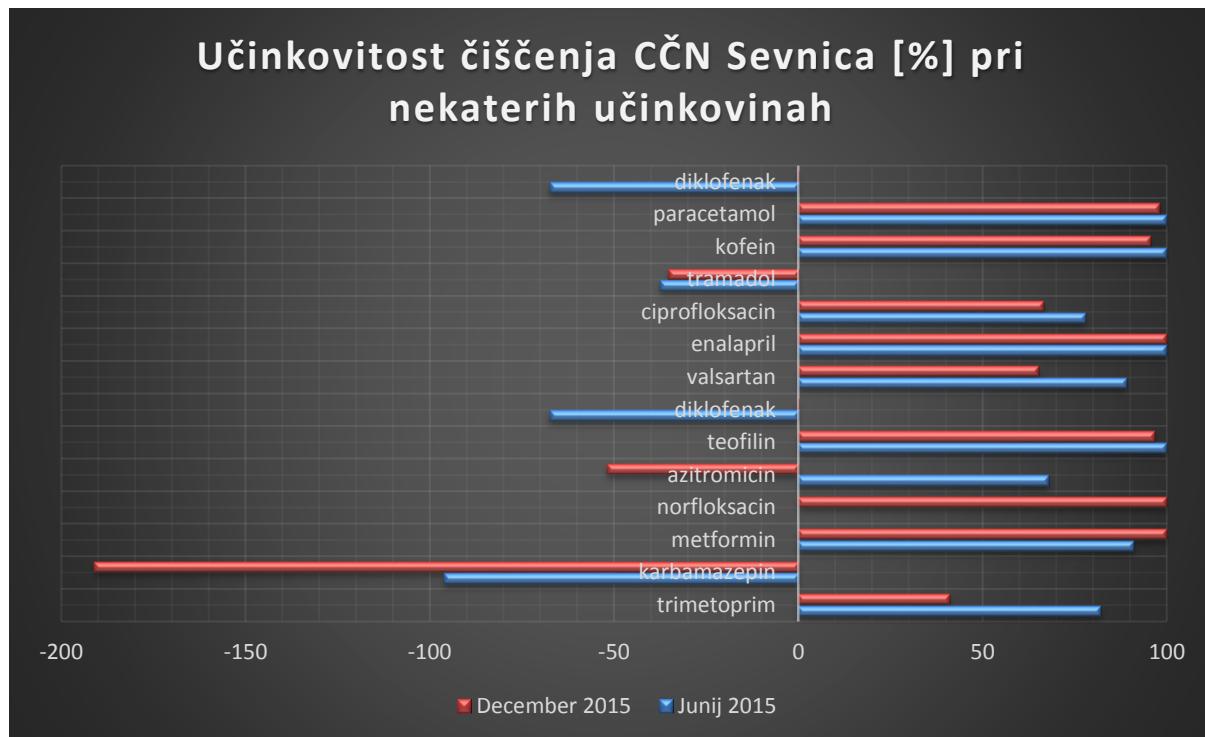
Slika 7: Grafični prikaz koncentracij učinkovin, ki so bile na vtoku CČN Sevnica prisotne v koncentraciji nad  $100 \text{ ng/L}$  (december 2015).

#### 4.1.3 Primerjava rezultatov poletnega in zimskega vzorčenja

V primerjavi s poletnim vzorcem je bilo v zimskem vzorcu odpadne vode prisotnih več učinkovin tako na vtoku kot tudi na iztoku CČN Sevnica. Na vtoku je bilo poleti prisotnih 32% učinkovin, pozimi pa 43%. Na iztoku je bilo poleti prisotnih 23%, pozimi pa 34%. Primerjava poletnega in zimskega vzorčenja je pokazala, da smo v zimskih vzorcih v odpadni vodi našli višje koncentracije antibiotikov. Junija so bile koncentracije vseh prisotnih antibiotikov na iztoku (ofloksacin, trimetoprim, ciprofloksacin, norfloksacin in azitromicin) nižje od 10 ng/L. Vsi antibiotiki, ki smo jih zaznali na iztoku v decembru, so bili prisotni v koncentraciji višji od 100 ng/L, ciprofloksacin celo s koncentracijo 1,5 µg/L. Občutno višji sta bili decembra na vtoku koncentraciji kofeina in paracetamola. Koncentraciji paracetamola in kofeina sta bili decembra 89,8 µg/L in 31,2 µg/L, junija pa 1,0 µg/L in 1,8 µg/L. Pri kofeinu so visoka nihanja lahko posledica tega, da je prisoten tako v hrani in pijači kot zdravilih. Decembra 2015 smo na iztoku CČN Sevnica izmerili sildenafil v koncentraciji 250,6 ng/L, medtem ko junija 2015 ta učinkovina v odpadni vodi CČN Sevnica ni bila prisotna. Metformin je bil po drugi strani na vtoku prisoten v višji koncentraciji junija (3,0 µg/L) kot decembra (203,9 ng/L), na iztoku pa smo ga zaznali samo junija (268,9 ng/L). Določene učinkovine se uporablajo sezonsko, kar pomeni, da je pričakovano, da bodo v določenem letnem času koncentracije nekaterih učinkovin višje. Sezonsko višje koncentracije so bile opažene na vtoku ČN v Švici, saj so bile koncentracije ciprofloksacina in norfloksacina višje v zimskih in spomladanskih mesecih. Ciprofloksacin se uporablja za zdravljenje sezonskih bolezni kot so infekcije dihal (bronhitis, pljučnica) in infekcij ušes, nosu in grla (faringitis, sinusitis, vnetja ušes) [70]. Višje koncentracije ciprofloksacina v zimskem vzorčenju smo opazili tudi v naših rezultatih, saj je bila koncentracija ciprofloksacina decembra na iztoku 1,5 µg/L, junija pa manj kot 10 ng/L.

Na sliki 8 je predstavljena učinkovitost čiščenja CČN Sevnica za izbrane učinkovine. Učinkovitost čiščenja CČN Sevnica smo izračunali po enačbi 3. Določene učinkovine so imele negativno učinkovitost čiščenja (angl. *negative removal rate*), kar pomeni, da so bile koncentracije višje na iztoku kot pa na vtoku. Izrazit negativni učinek čiščenja je bil opažen decembra pri karbamazepinu in junija pri diklofenaku. Tramadol smo izmerili v višjih koncentracijah na iztoku tako junija kot tudi decembra. Učinkovine, pri katerih je bila koncentracija na iztoku v obeh vzorčenjih nižja za več kot 90% so bile metformin, enalapril, kofein, teofilin in paracetamol. Norfloksacin je bil junija prisoten v zelo podobni koncentraciji na vtoku in iztoku CČN Sevnica (4,94 ng/L) in 4,93 ng/L. Podobno smo opazili tudi decembra pri diklofenaku. Na vtoku je bil prisoten v koncentraciji 1,63 µg/L, na iztoku pa v koncentraciji

1,64 µg/L. Glavni mehanizmi, ki so vključeni v procesu razgradnje učinkovin so biorazgradnja, oksidacija, hidroliza, demetilacija, razcepitev glukoronidnih konjugatov, sorpcija na blatu ali delcih s hidrofobnimi in elektrostatskimi interakcijami, filtracija in kemijska oksidacija [72].



Slika 8: Učinkovitost čiščenja CČN Sevnica za nekatere učinkovine.

Razlogov za pojav višjih koncentracij na iztoku je lahko več; nastanek metabolitov in/ali transformacijskih produktov (glukuronski konjugati, metilati, glicinati), ki se v procesu čiščenja lahko pretvorijo nazaj v osnovno spojino (angl. *parent compound*) [65]. Karbamazepin in diklofenak spadata med učinkovine, ki jih najpogosteje zaznajo v odpadnih vodah. Pomembni metaboliti karbamazepina, ki se izločajo z urinom, so 10,11-epoksikarbamazepin (karbamazepin-epoksid) in trans-10,11-dihidrokarbamazepin (karbamazepin-diol). Pri diklofenaku poznamo šest glavnih metabolitov, ki se izločajo z urinom, med njimi 4-hidroksi-diklofenak in 5-hidroksi-diklofenak [71]. Dejavniki, ki vplivajo na koncentracijo učinkovine na vtoku ČN so redčenje zaradi vnosa industrijskih odpadnih vod, razpad učinkovine v odtočnih kanalih, količina padavin in način vzorčenja. Prav tako so višje koncentracije na vtoku lahko posledica učinka matrice, ki lahko privede do povečanja ali zmanjšanja odziva na analizni opremi. Pri metodi trenutnega zajetja vzorca ni upoštevan čas zadrževanja učinkovine na ČN in natančna opredelitev učinkovitosti odstranjevanja učinkovine tako ni možna. Za natančnejšo opredelitev učinkovitosti čiščenja bi potrebovali 24-urne kompozitne vzorce odpadne vode. Pri tem postopku zajetja vzorcev pa je lahko težava kemična stabilnost analitov. Za boljšo

predstavo obremenjenosti ČN z učinkovinami je potrebno vzeti v obzir, da se predvsem lipofilne učinkovine lahko adsorbirajo na aktivno blato ali delce [45, 65].

#### 4.1.4 Primerjava z drugimi državami

Naše rezultate smo primerjali s podatki iz drugih držav. Primerjati podatke med državami je zahtevno, saj je nabor učinkovin, ki jih analizirajo v odpadnih vodah, različen glede na uporabljeni metodo in dosegljivost standardov učinkovin. Prav tako se države razlikujejo po številu populacije in pogostosti uporabe določenih učinkovin. Na vtoku ČN v Atenah (Grčija) sta bili v najvišjih koncentracijah izmerjena metformin (povpr. 135,2 µg/L) in kofein (povpr. 49,8 µg/L). V visokih koncentracijah sta bila prisotna tudi paracetamol (povpr. 29,6 µg/L) in valsartan (povpr. 8,7 µg/L) [24]. Na vtoku CČN Sevnica sta metformin in valsartan prisotna v nižjih koncentracijah kot v Atenah tako v poletnem in zimskem vzorčenju. Na vtoku CČN Sevnica sta bila decembra v visoki koncentraciji prisotna paracetamol (89,8 µg/L) in kofein (31,2 µg/L). V Španiji so izvedli dve leti dolgo študijo, v kateri so poročali o visokih koncentracijah paracetamola in kofeina. Kofein je bil na vtoku ČN prisoten v koncentracijah do 59 µg/L, paracetamol pa v območju 19,3 – 180,5 µg/L [72]. Visoke vrednosti paracetamola in tramadola so našli tudi na vtokih dveh ČN v južnem Walesu v VB. Povprečna koncentracija paracetamola je presegla 170 µg/L, tramadol pa je presegla 35 µg/L. [19]. Na vtoku CČN Sevnica so bile koncentracije tramadola nižje. Uporaba in poraba zdravil se razlikuje glede na državo; v Španiji se iz skupine analgetikov in NSAID najbolj pogosto uporablja učinkovini paracetamol ter ibuprofen [72–74]. V Sloveniji je bil v letu 2014 paracetamol najpogosteje predpisana učinkovina, diklofenak in tramadol pa sta bila na petem in osmem mestu glede na pogostost predpisovanja. Glede na to, da je paracetamol mogoče dobiti tudi brez recepta (OTC lista zdravil), je poraba zdravila in obremenitev odpadnih voda še toliko višja [75].

## 4.2 RAZVOJ METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIB

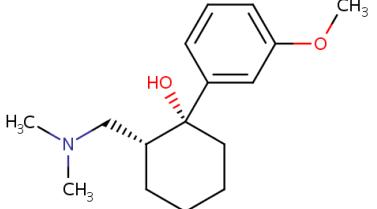
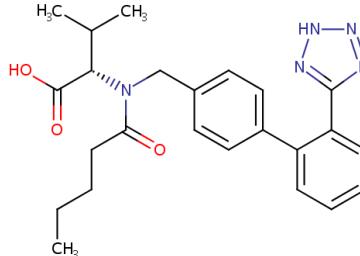
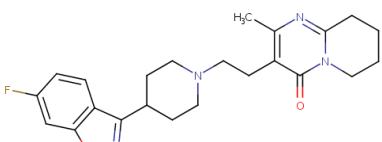
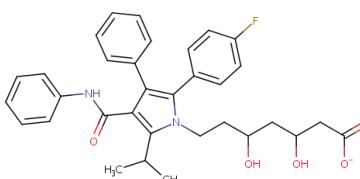
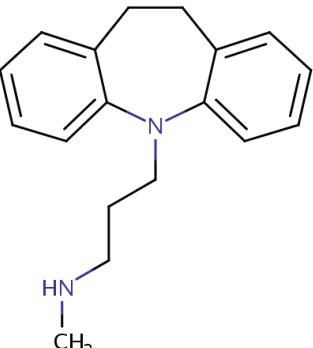
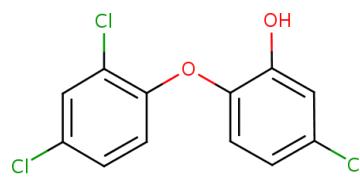
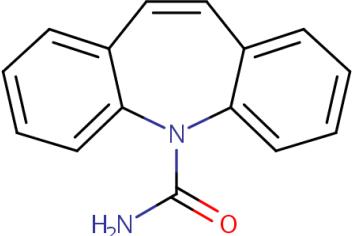
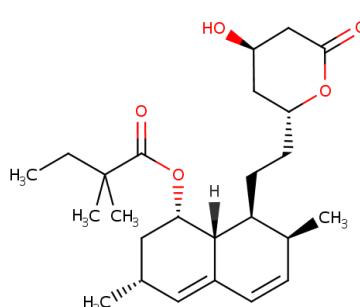
Rezultati spomladanskega vzorčenja CČN Sevnica so nam bili v pomoč pri izbiri učinkovin, katerih prisotnost smo kasneje ugotavljali v tkivih rib. Koncentracijsko območje, v katerem so bile prisotne nekatere učinkovine na iztoku CČN Sevnica, je predstavljeno na sliki 9. V koncentracijah nad 1 µg/L so bili prisotni naproksen, irbesartan, paracetamol, metformin in tramadol in valsartan.

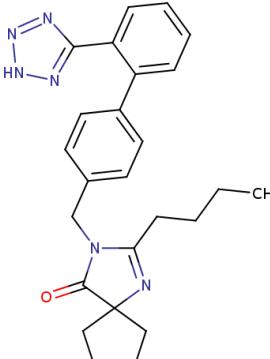
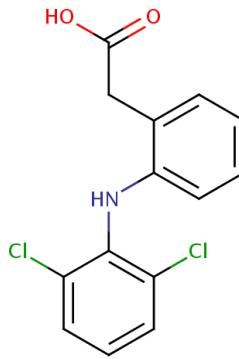
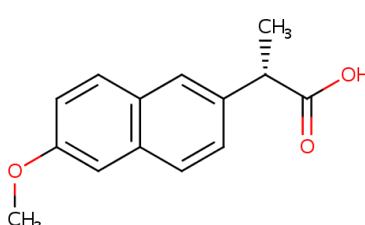


**Slika 9: Koncentracijsko območje nekaterih učinkovin na iztoku CČN Sevnica (marec 2015).**

Po pregledu literature in glede na fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin, ki so bile prisotne na iztoku CČN Sevnica ter sposobnost biokopičenja, smo izbrali učinkovine: tramadol (TRM), risperidon (RIS), dezipramin (DEZ), karbamazepin (KBZ), irbesartan (IRB), naproksen (NAP), valsartan (VAL), atorvastatin (ATS), triklosan (TKS), simvastatin (SIS) in diklofenak (DKF). V preglednici XV so prikazani osnovni podatki o izbranih učinkovinah in njihove strukturne formule.

**Preglednica XV: Osnovni podatki o izbranih učinkovinah za razvoj metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva.**

<p><b>TRM</b></p> <p>C<sub>16</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>2</sub> logP: 2,4 pKa: 9,41 analgetik</p> 	<p><b>VAL</b></p> <p>C<sub>24</sub>H<sub>29</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub> logP: 5,8 pKa: 3,6 zdravljenje hipertenzije</p> 
<p><b>RIS</b></p> <p>C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub> logP: 2,5 pKa: 8,76 antipsihotik</p> 	<p><b>ATS</b></p> <p>C<sub>33</sub>H<sub>35</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>5</sub> logP: 5,7 pKa: 4,33 zniževanje holesterola v krvi</p> 
<p><b>DEZ</b></p> <p>C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub> logP: 4,9 pKa: 10,4 antidepresiv</p> 	<p><b>TKS</b></p> <p>C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub>O logP: 4,76 pKa: 7,9 antiseptik</p> 
<p><b>KBZ</b></p> <p>C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O logP: 2,45 pKa: 13,9 antiepileptik</p> 	<p><b>SIS</b></p> <p>C<sub>25</sub>H<sub>38</sub>O<sub>5</sub> logP: 4,68 zniževanje holesterola v krvi</p> 

<p><b>IRB</b>  <b>C<sub>25</sub>H<sub>28</sub>N<sub>6</sub>O</b>  <b>logP: 6,0</b>  <b>pKa: 4,08</b>  <b>zdravljenje</b>  <b>hipertenzije</b></p> 	<p><b>DKF</b>  <b>C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>C<sub>2</sub>NO<sub>2</sub></b>  <b>logP: 4,51</b>  <b>pKa: 4,15</b>  <b>NSAIR</b></p> 
<p><b>NAP</b>  <b>C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub></b>  <b>logP: 3,18</b>  <b>pKa: 4,15</b>  <b>NSAIR</b></p> 	<p>* podatki pridobljeni iz spletnih strani:  <a href="https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/">https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/</a>  <a href="http://www.drugbank.ca/">http://www.drugbank.ca/</a></p>

Vzorci iz okolja so kompleksni, zato moramo najprej izolirati in koncentrirati izbrane učinkovine iz matrice. Biološki vzorci so še bolj kompleksni, saj je prisotno veliko neželenih komponent, ki lahko ovirajo analizo (lipidi, proteini, barvila), prav tako pa je koncentracija analitov nizka. Glede na to, da se fizikalno-kemijske lastnosti izbranih učinkovin precej razlikujejo (polarnost, topnost, stabilnost), je predstavljal razvoj metode, s katero bi dosegli zadovoljiv izkoristek ekstrakcije vseh učinkovin, velik izziv. Po navadi je potrebno skleniti kompromis med eksperimentalnimi pogoji, saj le-ti po navadi niso optimalni za vsako posamezno učinkovino [76].

#### 4.2.1 Optimizacija metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib

##### 4.2.1.1 Primerjava elucijskih topil

Razvoj metode smo začeli z optimizacijo SPE postopka, ki je pomemben korak pri drugi stopnji priprave vzorca, ko je potrebno očistiti ekstrakt ribjega tkiva. Na uspešnost SPE postopka pomembno vpliva narava organskega topila za elucijo, zato smo preverili različna topila in izbrali najbolj primernega za nadaljnje poskuse po postopku opisanem v poglavju 3.2.7. Testirali smo topila, ki se najpogosteje uporabljajo za spiranje analitov s kartuš in nekatere kombinacije teh topil (metanol in acetonitril). Za vsako topilo smo izvedli tri paralelke pri koncentraciji analitov 32 µg/L (v analiziranem vzorcu). Izkoristek (%) smo izračunali po enačbi

4, RSD (%)) pa po enačbi 6. Rezultate smo predstavili v obliki relativnega izkoristka pri pogoju maksimalnega izkoristka za posamezno učinkovino (%), ki smo ga izračunali po enačbi 5 (Preglednica XVI).

**Preglednica XVI: Relativni izkoristek učinkovin pri izbranih elucijskih topilih SPE postopka.**

IZKORISTEK [%] (RSD)						
	ACN:MeOH 50:50	ACN	ACN:MeOH 80:20	ACN: 2- PrOH 80:20	ACN:MeOH :2-PrOH 50:25:25	ACN:2- PrOH 50:50
<b>TRM</b>	14,5 (52,9)	33,6 (33,7)	<b>6,0 (0,0)</b>	100,0 (140,2)	10,6 (11,2)	8,7 (19,8)
<b>RIS</b>	12,9 (55,2)	43,6 (44,5)	<b>70,2 (0,3)</b>	100,0 (59,9)	53,8 (8,2)	69,2 (4,7)
<b>DEZ</b>	14,6 (48,2)	0,3 (191,1)	<b>21,6 (0,6)</b>	100,0 (103,8)	28,8 (34,1)	40,3 (17,4)
<b>KBZ</b>	36,0 (51,0)	75,1 (8,4)	<b>100,0 (11,1)</b>	85,5 (17,1)	73,0 (11,4)	69,3 (8,1)
<b>IRB</b>	100,0 (59,0)	58,2 (40,6)	<b>25,9 (3,4)</b>	23,3 (12,2)	25,0 (1,0)	25,8 (10,9)
<b>NAP</b>	50,8 (50,5)	54,7 (26,4)	<b>100,0 (2,0)</b>	60,4 (31,2)	66,9 (4,1)	57,3 (17,8)
<b>VAL</b>	69,3 (48,6)	55,2 (39,2)	<b>100,0 (4,8)</b>	88,0 (10,4)	95,5 (2,9)	97,3 (4,6)
<b>ATS</b>	47,5 (46,9)	43,7 (13,8)	<b>100,0 (2,4)</b>	62,0 (68,6)	84,2 (2,6)	80,3 (6,7)
<b>TKS</b>	38,1 (73,6)	100,0 (64,6)	<b>87,8 (7,5)</b>	17,5 (74,1)	65,8 (36,0)	23,1 (42,1)
<b>SIS</b>	7,9 (50,2)	19,7 (29,8)	<b>6,2 (54,7)</b>	100,0 (0,1)	52,1 (75,9)	82,7 (24,3)
<b>DKF</b>	100,0 (49,2)	86,5 (10,1)	<b>80,5 (0,6)</b>	66,1 (19,7)	77,7 (0,9)	75,3 (8,6)

Pri nobenem izmed preizkušenih elucijskih topil ni bil izkoristek najboljši za vse učinkovine, kar je bilo, glede na različne fizikalno-kemijske lastnosti učinkovin tudi pričakovano. Najboljše rezultate smo dobili z ACN:MeOH = 80/20 in ACN:MeOH:2-PrOH = 50/25/25. Pri SPE-DEX metodi za ekstrakcijo učinkovin iz odpadne vode se uporablja elucijsko topilo ACN:MeOH:2-PrOH = 50/25/25 (poglavlje 3.2.4.1). Za namene našega dela pa smo se odločili za elucijsko topilo ACN:MeOH = 80/20, saj je bila ponovljivost postopka višja kot pri topilu ACN:MeOH:2-PrOH = 50/25/25. Z izjemo simvastatina so bili pri topilu ACN:MeOH = 80/20 vrednosti RSD nižje od 15%. Tramadol in simvastatin sta imela izkoristek nižji od 10%, vendar je bil izkoristek tramadola, z izjemo topila ACN:2-PrOH = 80/20, nizek tudi pri drugih topilih, ki smo jih preverili. Pri topilu ACN:2-PrOH = 80/20 je bil sicer izkoristek v primerjavi z ostalimi topili dosti višji, vendar je bilo sisanje rezultatov pri tem topilu za tramadol najvišje (RSD = 140%).

#### **4.2.1.2 Medij za redčenje vzorca pred nanosom na SPE**

Ker je uravnavanje pH vzorca pred nanosom na SPE sistem običajna praksa pri analizi okoljskih vzorcev, smo preverili vpliv pH medija na izkoristek ekstrakcije, z namenom čim bolj zmanjšati izgube pri čiščenju vzorcev s SPE. Preverjali smo 50 mM fosfatni pufer in ultračisto vodo, ki smo ju umerili na različne pH (postopek 3.2.6.2.). Rezultate smo predstavili v obliki relativnega izkoristka za posamezno učinkovino (preglednica XVII in preglednica XVIII).

**Preglednica XVII: Relativni izkoristek učinkovin, kjer smo za redčenje uporabili ultračisto vodo.**

Relativni izkoristek [%] (RSD)											
Medij za redčenje ultračista voda											
	TRM	RIS	DEZ	KBZ	IRB	NAP	VAL	ATS	TKS	SIS	DKF
pH 3	100,0 (3,9)	39,0 (17,4)	100,0 (9,5)	99,5 (16,5)	73,5 (14,4)	14,7 (1,1)	64,2 (9,6)	3,4 (42,0)	10,3 (28,9)	100,0 (8,1)	88,0 (1,1)
pH 5	13,0 (43,6)	100,0 (25,7)	26,7 (9,8)	100,0 (2,7)	99,1 (8,7)	34,1 (20,6)	100,0 (6,6)	100,0 (5,6)	12,1 (12,3)	41,3 (21,1)	100,0 (6,1)
pH 7	1,6 (10,9)	64,0 (8,1)	14,0 (1,6)	79,1 (8,2)	98,0 (9,2)	100,0 (4,8)	85,9 (4,1)	91,4 (25,3)	95,3 (21,0)	69,9 (26,4)	88,8 (7,2)
pH 9	2,3 (15,1)	71,6 (18,1)	11,7 (7,4)	82,9 (8,2)	100,0 (6,8)	95,8 (23,4)	74,6 (30,1)	100,0 (26,3)	100,0 (9,0)	13,8 (31,6)	85,7 (12,4)

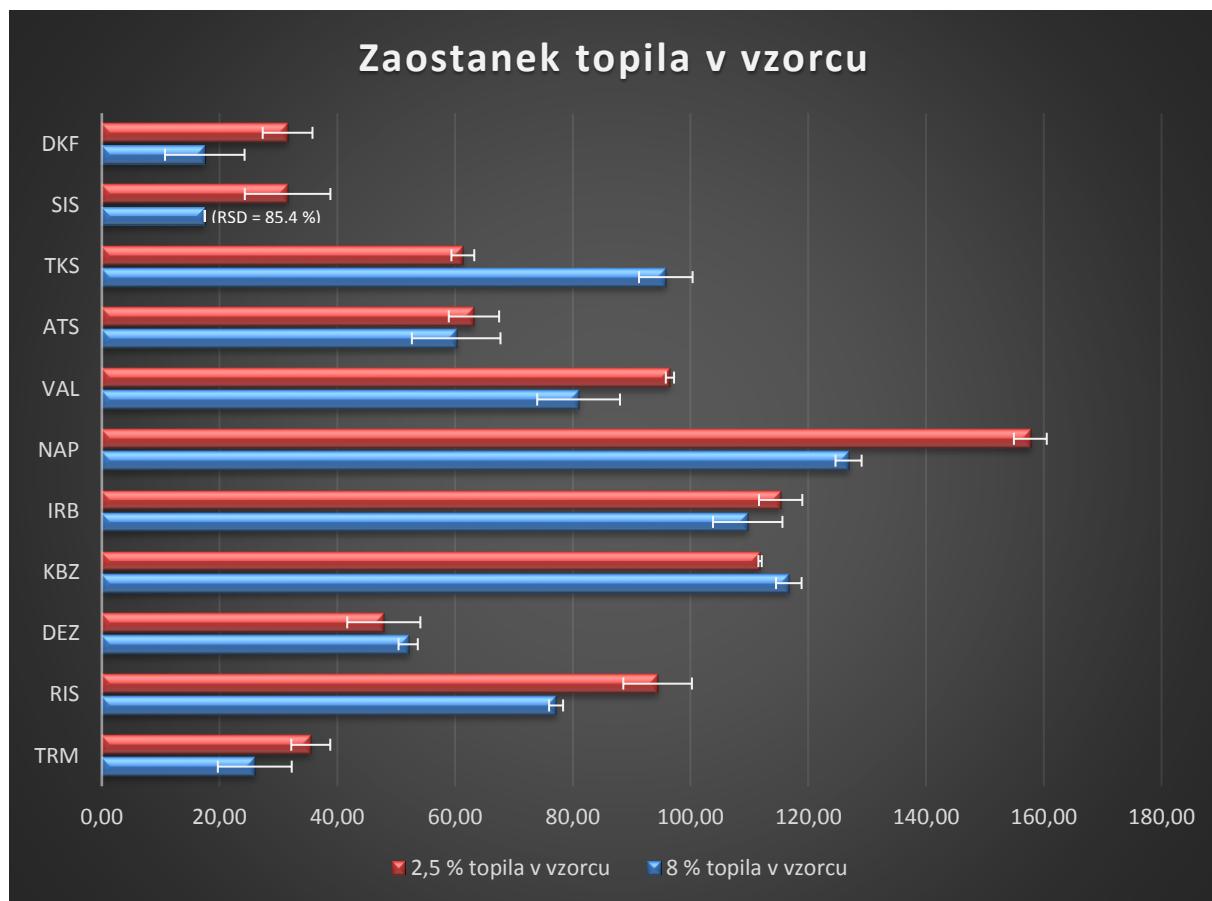
**Preglednica XVIII: Relativni izkoristek učinkovin, kjer smo za redčenje uporabili 50 mM fosfatni pufer.**

Relativni izkoristek [%] (RSD)											
Medij za redčenje 50 mM fosfatni pufer											
	TRM	RIS	DEZ	KBZ	IRB	NAP	VAL	ATS	TKS	SIS	DKF
pH 3	100,0 (2,4)	100,0 (5,2)	100,0 (17,6)	97,8 (5,8)	77,1 (8,9)	60,7 (16,4)	64,4 (23,0)	2,7 (4,2)	74,1 (21,9)	70,4 (27,4)	5,1 (13,0)
pH 5	27,7 (6,5)	82,0 (15,5)	49,8 (51,1)	100,0 (3,0)	82,5 (22,1)	100,0 (14,3)	93,9 (3,3)	34,3 (84,0)	66,9 (0,2)	72,2 (46,1)	8,1 (10,7)
<b>pH 7</b>	<b>4,5 (6,6)</b>	<b>48,4 (6,9)</b>	<b>23,5 (7,0)</b>	<b>84,7 (8,0)</b>	<b>100,0 (4,6)</b>	<b>99,9 (5,3)</b>	<b>98,7 (5,9)</b>	<b>100,0 (20,1)</b>	<b>100,0 (17,0)</b>	<b>100,0 (24,2)</b>	<b>32,7 (4,3)</b>
pH 9	6,3 (42,2)	40,6 (7,4)	12,2 (5,1)	87,2 (7,0)	99,1 (5,2)	99,1 (1,5)	100,0 (5,8)	88,6 (15,8)	61,1 (10,7)	14,4 (8,6)	100,0 (3,5)

Rezultati prikazani v preglednici XVII in preglednici XVIII so pokazali, da nobena kombinacija medija za redčenje, pH in elucijskega topila ni dala najboljšega izkoristka za vse učinkovine. RSD je visok pri pH 9 pri ultračisti vodi, saj je pri več kot polovici učinkovin presegal 15%. Pri ostalih pH je bila ponovljivost boljša. Izbrali smo medij 50 mM fosfatni pufer pH 7 v kombinaciji z elucijskim topilom ACN:MeOH = 80/20, saj so bili dobljeni izkoristki visoki, RSD pa pri več kot polovici učinkovin nižji od 15 %. Medij ultračista voda pH 7 v kombinaciji z elucijskim topilom ACN:MeOH:2-PrOH = 50/25/25 je imel primerljive RSD vrednosti, vendar so bili izkoristki pri večini učinkovin nižji.

#### **4.2.1.3 Volumen redčenja vzorca pred nanosom na SPE**

Volumen redčenja supernatanta ekstrakta ribjega tkiva je pomemben parameter, saj je od njega odvisno koliko topila je zaostalo v vzorcu. Zaostanek topila v vzorcu lahko vpliva na izkoristek ekstrakcije, saj lahko pride do spiranja analitov pri nanosu vzorca na SPE sistem. Postopek priprave z redčenjem supernatanta (na 10 mL ali 25 mL) je opisan v poglavju 3.2.6.3.



*Slika 10: Grafični prikaz izkoristkov pri zaostanku topil z dodanimi standardimi odkloni.*

Iz rezultatov, ki so prikazani na sliki 10 je razvidno, da je redčitev supernatanta na 25 mL (zaostanek topila 3,2%) primernejša za večino učinkovin. Pri redčenju supernatanta do 10 mL

je bil izkoristek ekstrakcije boljši le pri triklosanu, karbamazepinu in dezipraminu. Pri karbamazepinu in dezipraminu je bila razlika v izkoristkih okoli 5%, pri triklosanu pa je bila razlika nekoliko višja. Na osnovi teh rezultatov smo izbrali redčitev supernatanta do 25 mL, saj so bili izkoristki ekstrakcije v večini primerov višji, prav tako pa so bile vrednosti RSD nižje od 10%. Višji izkoristki so bili pri večjem redčenju pričakovani, saj je delež organskega topila v vzorcu nižji in tako manj vpliva na spiranje analitov s kartuš.

#### **4.2.1.4 Izbira ekstrakcijskega topila za ribja tkiva**

Na izkoristek ekstrakcije učinkovine iz tkiva vpliva narava organskega topila, zato smo sprva preverili različna topila in izbrali najbolj primernega za nadaljnje poskuse. Uporabili smo običajna topila za ekstrakcijo ter nekatere kombinacije obeh najpogosteje uporabljenih topil (MeOH in acetonitril). Postopek priprave vzorcev z izbranim ekstrakcijskim topilom je opisan v poglavju 3.2.7. Rezultate smo predstavili v obliki relativnega izkoristka (Preglednica XIX).

**Preglednica XIX: Relativni izkoristek učinkovin pri izbranih ekstrakcijskih topilih.**

IZKORISTEK [%] (RSD)							
	ACN:MeO H 75:25	ACN:MeO H 50:50	ACN:MeO H 80:20	MeOH	Diklorometan	Etil acetat	Acetonitril
TRM	38,8	100,0 (61,4)	14,8 (30,8)	73,3 (22,2)	52,1 (34,2)	10,7 (51,9)	<b>92,3 (13,6)</b>
RIS	65,1	85,4 (14,2)	69,8 (14,8)	50,5 (6,5)	40,2 (1,6)	39,3 (32,1)	<b>100,0 (9,5)</b>
DEZ	70,6	100,0 (11,1)	63,8 (14,1)	48,6 (6,8)	26,1 (3,6)	18,7 (25,4)	<b>82,0 (13,9)</b>
KBZ	69,1	82,5 (10,2)	81,8 (9,7)	54,5 (6,7)	39,9 (7,8)	75,7 (4,8)	<b>100,0 (6,4)</b>
IRB	70,1	82,0 (7,0)	87,4 (10,9)	55,3 (3,1)	32,8 (2,8)	56,9 (12,8)	<b>100,0 (5,5)</b>
NAP	58,5	77,5 (13,2)	87,8 (17,6)	45,7 (10,9)	10,5 (51,8)	58,8 (22,8)	<b>100,0 (13,1)</b>
VAL	72,1	100,0 (16,2)	29,5 (61,3)	59,8 (0,3)	3,9 (26,5)	7,3 (108,2)	<b>65,7 (48,4)</b>
ATS	74,0	97,7 (6,8)	79,4 (40,9)	61,0 (8,0)	27,2 (9,1)	100,0 (1,2)	<b>82,9 (15,5)</b>

<b>TKS</b>	30,3	46,5 (2,4)	24,8 (18,2)	11,1 (6,1)	42,6 (31,4)	42,1 (22,5)	<b>100,0 (14,8)</b>
<b>SIS</b>	78,3	100,0 (1,8)	11,4 (27,4)	54,6 (16,9)	43,2 (13,4)	55,4 (28,4)	<b>53,8 (22,1)</b>
<b>DKF</b>	24,8	32,4 (44,1)	93,1 (4,5)	81,3 (0,6)	52,3 (6,4)	91,1 (5,4)	<b>100,0 (10,5)</b>

Pri prvem topilu (ACN:MeOH = 75/25) zaradi tehničnih težav nismo analizirali treh paralelk, zato v preglednici XIX tudi ni podatka za RSD. Za pričakovati je bilo, da izbrano ekstrakcijsko topilo ne bo najboljše za vsako učinkovino, saj se učinkovine zelo razlikujejo po fizikalno-kemijskih lastnostih. Ugotovili smo, da je za ekstrakcijo najmanj primeren diklorometan, saj so bili v tem topilu najnižji izkoristki. Izkoristki so bili pri vseh učinkovinah nižji od 50%, izjema je bil diklofenak, ki pa je imel visoke izkoristke pri vseh izbranih topilih. Kot ekstrakcijsko topilo pa smo izbrali acetonitril, saj so bili izkoristki za šest učinkovin najboljši, a tudi večina ostalih je imela relativni izkoristek nad 80%. Ob tem pa so bili tudi RSD pri teh učinkovinah nižji od 15%. Dodaten argument za acetonitril je dejstvo, da je imel karbamazepin najboljši izkoristek in nizek RSD, glede na podatke iz literature [36–38], pa smo pričakovali, da bi lahko karbamazepin zaznali tudi v ribjem tkivu. Diklofenak je imel dokaj primerljive relativne izkoristke pri vseh topilih, ta trend pa je bil opazen že predhodno. Izredno visoki absolutni izkoristi za diklofenak (tudi nad 1000%) so nakazovali na onečiščenje sistema SPE s to učinkovino.

#### 4.2.1.5 Vpliv koncentracije na izkoristek

Preverili smo tudi, kako na izkoristek ekstrakcije vpliva različna koncentracija učinkovin v vzorcu. Izvedba je opisana v poglavju 3.2.5.2, primerjali pa smo izkoristke pri dveh koncentracijah, ki smo jih dodali tkivu, ki se razlikujeta za faktor 10. Rezultati so predstavljeni v preglednici XX v obliki relativnega izkoristka.

**Preglednica XX: Relativni izkoristek učinkovin pri dveh različnih koncentracijah učinkovin.**

Izkoristek [%] (RSD)												
	TRM	RIS	DEZ	KBZ	IRB	NAP	VAL	ATS	TKS	SIS	DKF	
<b>20</b>	100,0	94,5	100,0	75,8	71,8	84,2	100,0	100,0	65,6	100,0	100,0	
<b>ug/L</b>	(20,7)	(16,7)	(19,6)	(17,2)	(15,4)	(18,0)	(9,1)	(3,8)	(18,1)	(8,0)	(4,5)	
<b>200</b>	99,5	100,0	92,9	100,0	100,0	100,0	82,9	65,9	100,0	55,5	25,7	
<b>ug/L</b>	(3,2)	(4,2)	(4,7)	(5,4)	(4,0)	(5,4)	(6,6)	(6,3)	(7,5)	(7,0)	(4,1)	

Rezultati so pokazali, da so izkoristki primerljivi za večino učinkovin pri obeh koncentracijah. Pri tramadolu, risperidonu in dezipraminu praktično ni razlik. Največja razlika pa je pri diklofenaku, kjer je bil izkoristek pri nižji koncentraciji približno 4 krat višji in to potrjuje naša opažanja, da je šlo za onečiščenje SPE sistema z diklofenakom. Rezultati so pri višji koncentraciji bolj ponovljivi, kar ne preseneča, in so primerljivi z rezultati kasnejšega vrednotenja analizne metode (poglavlje 4.3.2).

#### **4.2.1.6 Primerjava različnih mas ribjega tkiva**

Nazadnje smo želeli preveriti ali ekstrakcija iz različnih mas tkiva vpliva na izkoristek ekstrakcije posamezne učinkovine. Ekstrakcijo in čiščenje s SPE smo izvedli z izbrano maso tkiva izvedli po postopku opisanem v poglavju 3.2.7. Rezultate smo predstavili v obliki relativnega izkoristka v primerjavi z maksimalnim izkoristkom za posamezno učinkovino.

**Preglednica XXI: Relativni izkoristek učinkovin pri različnih masah ribjega tkiva.**

IZKORISTEK [%] (RSD)			
	300 mg	600 mg	1000 mg
<b>TRM</b>	94,1 (15,9)	100,0 (15,3)	68,0 (3,2)
<b>RIS</b>	100,0 (10,4)	97,2 (11,4)	65,7 (4,2)
<b>DEZ</b>	100,0 (4,8)	98,7 (13,0)	51,8 (4,7)
<b>KBZ</b>	100,0 (14,0)	96,8 (11,2)	97,9 (5,4)
<b>IRB</b>	88,1 (10,8)	92,9 (12,8)	100,0 (4,0)
<b>NAP</b>	99,4 (24,1)	100,0 (18,4)	90,7 (5,4)
<b>VAL</b>	83,1 (24,2)	100,0 (17,3)	69,3 (6,6)
<b>ATS</b>	100,0 (9,7)	73,9 (7,6)	47,3 (6,3)
<b>TKS</b>	100,0 (7,0)	79,2 (8,8)	79,4 (7,5)
<b>SIS</b>	100,0 (1,3)	87,5 (7,9)	69,4 (7,0)
<b>DKF</b>	100,0 (8,9)	82,6 (8,8)	6,9 (4,1)

Rezultati izkoristkov učinkovin pri posamezni masi tkiva so prikazani v preglednici XXI. Izkoristki pri masi 300 mg in 600 mg so si med seboj precej podobni, deloma pa odstopajo pri 1000 mg. Razlike v dobljenih rezultatih so deloma posledica dejstva, da smo testirana s 1000

mg tkiva izvajali kasneje v ločenem eksperimentalnem setu. To je še posebej značilno za diklofenak, saj smo po odkritju onečiščenja, sistematično pristopili k odpravi tega problema – onečiščenje se je zmanjšalo za približno 10 krat (torej je to posledica razlike v relativnem izkoristku) in absolutni izkoristek za diklofenak je dosegel realno vrednost blizu 100%. Kljub nižjim izkoristkom za večino učinkovin pri največji testirani masi tkiva, smo izbrali 1000 mg zaradi več razlogov. Primarno želimo metodo, ki je čim bolj ponovljiva, tudi na račun manjše uspešnosti ekstrakcije. In vrednosti RSD so bile v tem primeru pri vseh učinkovinah nižje od 10%. Kot drugo, v večji masi tkiva je se nahaja več učinkovine in to je povezano z zmožnostjo znižanja meje zaznave analizne metode pri uporabi večje mase tkiva. Tudi iz literature smo zasledili, da se za ekstrakcijo pogosto uporablja 1 g tkiva [35, 37, 40]. Na osnovi pregleda literature [33, 36, 38] smo pričakovali, da bi bil lahko karbamazepin prisoten v tkivih rib, izkoristek karbamazepin pa je bil pri masi 1000 mg primerljiv z izkoristkoma pri masi 300 mg in 600 mg. V prihodnosti bo potrebno narediti bolj obsežno študijo z uporabo različnih mas tkiva, da dobimo bolj realno sliko, kako različna masa vpliva na izkoristek ekstrakcije.

### 4.3 VREDNOTENJE METODE ZA EKSTRAKCIJO UČINKOVIN IZ RIB

Vrednotenje ali validacija metode predstavlja zadnji korak pri razvoju in optimizaciji metode. Gre za proces, ki ga izvajamo z namenom, da dokažemo, da so rezultati, ki jih dobimo z razvito metodo zanesljivi in ponovljivi. V okviru vrednotenja metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib, smo preverjali ustreznost samega SPE postopka ter ponovljivost, točnost, linearnost, območje metode, mejo določitve in izkoristek metode [69].

#### 4.3.1 Vrednotenje SPE postopka

SPE postopek za čiščenje in koncentriranje vzorca je eden najbolj pomembnih korakov pri pripravi vzorcev, tudi ribjih tkiv. Zato smo v okviru naše naloge ločeno vrednotili ta postopek. Linearnost SPE smo preverjali v koncentracijskem območju od 0,05 µg/L do 1 µg/L (brez vzorcev tkiva) po postopku opisanem v poglavju 3.2.8.1. Rezultati parametrov linearnosti: determinacijski koeficient ( $R^2$ ) in enačba regresijske premice za posamezno učinkovino so podani v preglednici XXII.

*Preglednica XXII: Parametri linearnosti SPE postopka.*

Učinkovina	Regresijska premica	$R^2$
TRM	$y = 1121,8x - 1449,8$	0,9967
RIS	$y = 41317x - 34826$	0,9993
DEZ	$y = 16919x - 7222,9$	0,9999

KBZ	$y = 37352x - 20498$	0,9998
IRB	$y = 120435x - 55303$	0,9998
NAP	$y = 838,59x - 735,71$	0,9999
VAL	$y = 6634,9x + 1999,6$	0,9999
ATS	$y = 16542x - 21212$	0,9986
TKS	$y = 133,71x - 283,12$	0,9913
SIS	$y = 2694,7x - 4478,8$	0,9973
DKF	$y = 875,67x + 25338$	0,9650

SPE postopek, ki smo ga preverjali na vzorcih obogatenih z učinkovinami, je linearen v območju 0,05 µg/L do 1 µg/L za vse učinkovine, razen diklofenak, saj je bila linearnost znotraj postavljenega kriterija sprejemljivosti ( $R^2 \geq 0,99$ ). Ker je bil SPE sistem v tej stopnji razvoja metode onečiščen z diklofenakom, smo pred validacijo celotne analizne metode odpravili to pomanjkljivost.

#### 4.3.2 Vrednotenje analizne metode

Poleg samega SPE postopka smo ovrednotili tudi razvito metodo za ekstrakcijo učinkovin iz ribjih tkiv. To smo storili tako, da smo preverili naslednje parametre: linearnost, točnost, ponovljivost, območje metode in LOQ. Vrednotenje analizne metode je bilo izvedeno v skladu s postopkom opisanim v poglavju 3.2.8.2, rezultati pa so podani v preglednici XXIII.

**Preglednica XXIII: Validacijski parametri analizne metode za ekstrakcijo učinkovin iz ribjega tkiva\* (prilagojeno glede na učinkovino – glej preglednico XIII).**

	Izkoristek [%]	Ponovljivost RSD [%]	$R^2$	točnost na LOQ [%]	točnost na 1,75* ng/g [%]	LOQ[ng/g]	Linearnost območja [ng/g]
TRM	24,0	3,2	0,9945	13,8	2,4	1	1 – 10
RIS	56,2	4,2	0,9993	17,9	- 1,2	0,2	0,2 – 5
DEZ	31,8	4,7	0,9961	- 19,5	- 2,9	0,5	0,5 – 5
KBZ	90,2	5,4	0,9989	- 8,1	- 1,0	0,4	0,4 – 4
IRB	88,9	4,0	0,9992	15,0	- 0,2	0,1	0,1 – 5
NAP	69,5	5,4	0,9931	8,0	- 13,4	50	50 – 1000
VAL	42,7	6,6	0,9990	17,5	- 1,4	2	2 – 100
ATS	47,7	6,3	0,9981	0,6	- 3,1	2,5	2,5 – 25

<b>TKS</b>	57,9	7,5	0,9994	- 1,8	- 6,2	10	10 – 150
<b>SIS</b>	69,4	7,0	0,9724	- 19,4	8,2	1	2 – 15
<b>DKF</b>	108,5	4,1	0,9994	- 12,4	2,1	4	4 – 100

- *Linearnost*

Linearnost je sposobnost metode, da znotraj določenega koncentracijskega območja daje rezultate, ki so prenosorazmerni s koncentracijo posameznega analita v vzorcu. Linearnost metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib smo ugotavljali v koncentracijskem območju  $1 \mu\text{g/L} – 50 \mu\text{g/L}$  ( $0,05 – 2,50 \text{ ng/g tkiva}$ ). Linearnost smo opredelili z determinacijskim koeficientom  $R^2$ . Z izjemo simvastatina je metoda za ekstrakcijo učinkovin iz rib linearna v območju  $0,05 \text{ ng/g} – 2,50 \text{ ng/g tkiva}$ , saj so vse vrednosti ustrezale kriteriju  $R^2 \geq 0,99$ . Vrednost  $R^2$  pri simvastatinu je bila 0,97, kar ne zadostuje pogoju linearnosti.

- *Točnost*

Točnost metode podaje stopnjo ujemanja izračunane koncentracije z dejansko koncentracijo analitov v vzorcu. Postavljen kriterij za točnost je bil  $\pm 20\%$ . Pri drugi najvišji točki območja (koncentraciji  $1,75 \text{ ng/g tkiva}$ ) je bila metoda točna za vse učinkovine, saj so bile vrednosti znotraj postavljenega kriterija  $\pm 20\%$ . Pri večini učinkovin je bilo odstopanje manjše od 5%, izjemi so bili triklosan, simvastatin in naproxen, kjer je bilo odstopanje večje, a še vedno znotraj postavljenega kriterija. Preverili smo tudi točnosti pri LOQ koncentraciji. Pri LOQ koncentraciji je bila metoda točna za vse učinkovine, saj vrednosti ne presegajo meje 20%. Najmanjše odstopanje izračunane koncentracije od dejanske koncentracije smo opazili pri atorvasatinu in triklosanu, kjer je bila manj kot 2%. Pri karbamazepinu in naproxenu je bilo odstopanje manjše od 10%, pri ostalih učinkovinah je bilo to odstopanje višje, a še vedno znotraj postavljenega kriterija.

- *Ponovljivost*

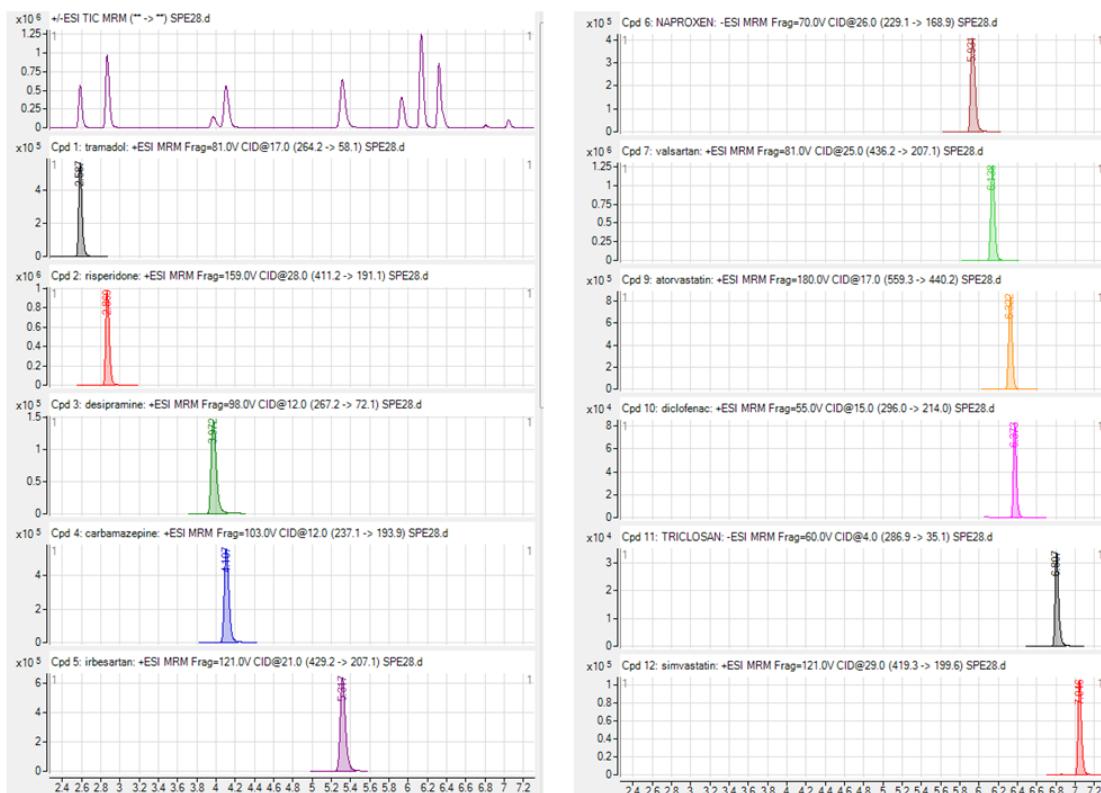
Ponovljivost analizne metode je definirana kot natančnost znotraj analiznega postopka. Vrednotimo jo kot stopnjo ujemanja rezultatov med serijo analiz istega vzorca pod enakimi pogoji. Ponovljivost metode smo preverjali na šestih paralelkah vzorca. Rezultate smo podali kot RSD. Ponovljivost metode je precej dobra, saj so vrednosti RSD nižje od 8%, kar je precej manj od postavljenega kriterija ( $RSD < 15\%$ ).

- *Meja določitve in delovno območje metode*

Delovno območje metode je koncentracijsko območje, znotraj katerega je metoda točna in natančna. Spodnja meja delovnega območja je LOQ, ki je najnižja koncentracija, pri kateri lahko analit kvantitativno opredelimo. LOQ smo določili v skladu s postopkom opisanim v poglavju 3.2.8.2. Zaradi različnih fizikalno-kemijskih lastnosti učinkovin se linearno območje metode in LOQ, ki smo ga določili, razlikuje za posamezno učinkovino. Za večino učinkovin je linearno območje v nizkem ng/g koncentracijskem območju. Velik razpon je opazen predvsem pri naproksenu, ki je imel tudi najvišji LOQ (50 ng/g). Pri ostalih učinkovinah so LOQ vrednosti nižje ali enake 10 ng/g. Pri risperidonu, dezipraminu, karbamazepinu in irbesartanu je bil LOQ nižji od 0,5 ng/g, pri tramadolu in simvastatinu pa 1 ng/g.

- *Izkoristek ekstrakcije*

Izkoristek ekstrakcije nam poda razmerje med odzivom analita v vzorcu in odzivom v raztopini standarda. Pove nam, kako uspešno smo ekstrahirali učinkovine iz tkiva. Izkoristek ekstrakcije smo izračunali po enačbi 4. Na sliki 11 je za ilustracijo prikazan rezultat LC-MS/MS analize vzorca po izvedenem postopku ekstrakcije učinkovin iz ribjega tkiva.



**Slika 11: LC-MS/MS kromatogrami učinkovin pri koncentraciji 2,50 ng/g tkiva (vrednotenje linearnosti analizne metode za ekstrakcijo učinkovin iz rib). Poleg skupnega kromatograma (total ion chromatogram – TIC) so prikazani tudi kromatogrami izbranih učinkovin pri posameznih MRM prehodih.**

Izkoristki ekstrakcije se gibljejo v razponu 24,0 – 108,5%. Najboljša izkoristka sta imela diklofenak in karbamazepin, najnižja pa tramadol in dezipramin. Vendar so bili izkoristki ekstrakcije zelo ponovljivi, kar pa je za metodo še bolj pomembno, kot pa sam izkoristek. Glede na literurne podatke smo pričakovali, da bi lahko v tkivu rib našli predvsem karbamazepin in diklofenak in pri obeh je bil izkoristek višji 90%.

#### **4.4 UGOTAVLJANJE PRISOTNOSTI UČINKOVIN V TKIVIH RIB IZ SAVE, TRGOVINE IN RIBOGOJNICE**

Eden izmed glavnih ciljev naloge je bil preveriti ali lahko s pomočjo razvite metode ugotovimo oz. kvantitativno ovrednotimo prisotnost izbranih učinkovin v tkivih rib iz različnih okolij (reka Sava, trgovina, ribogojnica). Vzorce tkiv smo pripravili po optimiziranem postopku opisanem v poglavju 3.2.7.. Vse vzorce smo pripravili v dveh paralelkah. Pri ribi iz trgovine smo preverjali prisotnost učinkovin le v mišičnem tkivu, saj smo imeli na voljo file ribe. Pri ribi iz Save in ribogojnice pa smo preverjali prisotnost učinkovin tudi v drugih tkivih. Rezultati so predstavljeni v preglednici XXIV.

*Preglednica XXIV: Vzorci ribjih tkiv, v katerih smo zaznali učinkovine, vendar jih kvantitativno nismo ovrednotili, ker so bile koncentracije pod LOQ.*

TKIVO					
RIBA	MIŠICE	JETRA	LEDVICE	KOŽA	ŠKRGE
SAVA	KBZ	KBZ, TRM	-	KBZ	KBZ, TRM
TRGOVINA	KBZ	-	-	-	-
RIBOGOJNICA	KBZ	KBZ, TRM	KBZ	-	KBZ, TRM
<b>Riba A: reka Sava</b> [vrsta: podust ( <i>Chondrostoma nasus nasus</i> )]					
<b>Riba B: trgovina</b> [vrsta: šarenka ( <i>Oncorhynchus mykiss</i> )]					
<b>Riba C: ribogojnica</b> [vrsta: potočna zlatovčica ( <i>Salvelinus fontinalis</i> )]					

Pri ugotavljanju prisotnosti učinkovin v tkivih rib lahko ovrednotimo določeno učinkovino in s tem podamo njeno koncentracijo v primeru, da je izračunana koncentracija v tkivu višja ali enaka ugotovljeni LOQ. V nobenem od analiziranih vzorcev tkiv ni bila presežena LOQ za nobeno od vključenih učinkovin. Vendar sta bili dve učinkovini zaznavni v nekaterih ribjih tkivih. Mejo zaznave (LOD) smo definirali kot razmerje odzivov med realnim in slepim vzorcem več kot 3:1. Odziv učinkovin je bil v teh primerih toliko višji od slepega vzorca, da lahko trdimo, da sta tako tramadol kot karbamazepin prisotna v tkivih, ki so podani v Preglednica XXIV. V analiziranih vzorcih se je nakazovala tudi prisotnost diklofenaka, a zaradi

težav z onečiščenjem SPE sistema, ne moremo z gotovostjo zatrditi, da je diklofenak prisoten v vzorcih ribjih tkiv.

Karbamazepin je bil prisoten v vseh treh ribah v vseh tkivih, tramadol pa je bil prisoten v dveh ribah, in sicer pri obeh tako v škrgah kot jetrih. Ker so bile ugotovljene koncentracije nižje od LOQ, točne koncentracije nismo uspeli kvantitativno ovrednotiti. Tako v ribi iz Save kot tudi iz ribogojnice je bilo karbamazepina več v škrgah. Ocenjena najvišja koncentracija karbamazepina v ribjem tkivu iz Save je bila okoli 0,02 ng/g. Ocenjena koncentracija tramadola je bila v škrgah in jetrih v rabi iz Save okoli 0,02 ng/g. Pri rabi iz ribogojnice je bila koncentracija tramadola v škrgah in jetrih približno dvakrat višja kot pa v Savi. Možna razloga za to je, da je ribogojnica zaprt sistem, kjer ni takšnega pretoka, kot v rekah. Analizirali smo tudi vodo iz ribogojnice in ugotovili, da so bile v vodi prisotne tri učinkovine: TRM, ciprofloksacin in norfloksacin, kar posredno potrjuje naše ugotovitve.

Zaradi stalnih izpustov učinkovin v okolje, so vodni organizmi, ki naseljujejo vode, v katere se stekajo iztoki ČN, še posebej dovzetni za biokopičenje teh spojin v svojih tkivih, kljub nizki koncentraciji učinkovin v vodah [76]. Ribe so zaradi svojega življenjskega prostora in fizioloških značilnosti še posebej dovzetne za privzem učinkovin, ki so prisotne v vodah [77]. Večina izvedenih študij o biokopičenju učinkovin v okolju je bilo izvedenih na ribah [76]. Tramadol so našli na Švedskem v plazmi rečnih rib, in sicer v koncentracijah 1,2 – 1,9 ng/mL [78]. Tramadol smo zaznali tudi v okviru naše raziskave v vzorcih škrg in jeter, v mišicah pa ni bil prisoten. V primerjavi s karbamazepinom je tramadol bolj polaren, in smo zato pričakovali, da bi ga lahko našli predvsem v jetrih, kjer poteka metabolizem. V Španiji so ugotavljalni prisotnost 20 učinkovin in izbranih metabolitov. Karbamazepin so našli v vzorcu jeter v koncentraciji 17,9 ng/g tkiva. V homogenizatu rabe so izmerili diklofenak v koncentraciji 8,8 ng/g tkiva [35]. Ostale učinkovine, ki so bile vključene v tej študiji, z našo metodo nismo vrednotili. V študiji izvedeni na Floridi v ZDA so razvili metodo za spremeljanje 11 učinkovin v homogenizatu rabe in v homogenizatu našli karbamazepin. Povprečna koncentracija je bila 0,20 ng/g [36]. V ZDA so v Teksasu izvedli tudi študijo za ugotavljanje 23 učinkovin in dveh metabolitov v tkivu rib. V vseh vzorcih so izmerili norfluoksetin (metabolit fluoksetina), diltiazem, difenhidramin in tudi karbamazepin. Povprečna koncentracija karbamazepina je bila 1,16 ng/g [37]. LOQ za karbamazepin je 0,12 ng/g, kar pomeni, da je ta metoda približno trikrat bolj občutljiva od naše metode, vendar še vseeno premalo, da bi kvantificirala karbamazepin v testiranih vzorcih iz naše raziskave. Diklofenaka in drugih učinkovin, ki so vključeni v našo metodo, z objavljenou metodo niso vrednotili [36].

Pri večini študij izvedenih na ribah se osredotočajo na eno skupino učinkovin, saj je zaradi podobnih fizikalno-kemijskih lastnosti spojin metodo lažje optimizirati [76]. Med najbolj pogoste učinkovine, ki jih analizirajo v tkivih rib so antidepresivi, ki spadajo v skupino SSRI (fluoksetin, sertralín, citalopram, paroksetin). Spremljali so jih v Kanadi [79] in ZDA [32, 80]. Prav tako se v tkivih rib pogosto analizirajo antibiotiki, ki se uporabljajo v veterinarski in humani medicini [81–84]. V Grčiji so razvili metodo za 115 učinkovin, ki se uporabljajo v veterinarski in humani medicini, med njimi je več kot 40 antibiotikov iz različnih skupin [85].

Učinkovine delujejo tako, da ciljajo specifične metabolne in molekularne poti pri ljudeh in živalih, a imajo lahko tudi pomembne neželenе učinke. Z vnašanjem učinkovin v okolje (glej Slika 1) lahko delujejo tudi na ne-tarčne organizme, ki imajo enake ali podobne tarčne organe, tkiva, celice ali biomolekule, kot ljudje. Nekateri receptorji pri živalih so podobni kot pri ljudeh, drugi pa so različni ali pa jih ni, zato se lahko izražajo drugačni učinki učinkovine pri živalih nižje na taksonomski lestvici [1]. Glede na to, da so izpusti učinkovin v vodno okolje stalni in so jih ribe izpostavljene skozi celoten življenjski cikel, je potrebno vzeti v obzir, da je zaradi dolgotrajne in kronične izpostavljenosti in biokopičenja nekaterih učinkovin, večja možnost negativnih učinkov, ki jih lahko imajo učinkovine prisotne v vodi in sedimentu, na ribe [77]. Študije so pokazale, da je lahko diklofenak prisoten v površinski vodi, kamor se stekajo izpusti ČN, v koncentracijskem območju, ki je toksično za ribe in nevretenčarje [31]. Diklofenak je povzročil citološke spremembe v ledvicah, jetrih in škrghah šarenke (*Oncorhynchus mykiss*) pri koncentraciji 1 µg/L [86], histološke spremembe (lezije na ledvicah in spremembe škrge) pa pri koncentraciji 5 µg/L [87]. Glede na visoke koncentracije diklofenaka na iztoku CČN Sevnica (1,6 µg/L) domnevamo, da je diklofenak prisoten tudi v površinskih vodah. Onečiščenje na sistemu SPE, ki je verjetno posledica tega, da se odpadna voda analizira na istem sistemu, je onemogočilo, da bi lahko z gotovostjo zatrdirili, da je bil diklofenak prisoten v ribah, ki smo jih analizirali.

Koncentracije učinkovin so v tkivih rib nizke, zato je malo možnosti, da bi lahko prišlo do akutnih učinkov v ribah. V analiziranih vzorcih so bile koncentracije tramadola in karbamazepina pod LOQ, ocenjena koncentracija za obe učinkovini v rabi iz Save je bila približno 0,02 ng/g. Kljub temu je potrebno imeti v mislih morebitne učinke mešanice učinkovin, še posebej pri učinkovinah, ki imajo podoben način delovanja. V takih primerih lahko pride do aditivnih ali sinergističnih učinkov, ki jih ni moč zaznati v kolikor ugotavljamo toksičnost posamezne učinkovine [47, 77]. Študija je pokazala, da je toksičnost diklofenaka in

ibuprofena pri vodnih bolhah (*Daphnia* sp.) aditivna; toksičnost obeh učinkovin skupaj je bila višja kot toksičnost posamezne učinkovine[47].

## 5 ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo se osredotočili na razvoj in optimizacijo preprostega postopka ekstrakcije izbranih učinkovin iz ribjega tkiva. Cilj naloge je bil uporabiti metodo na realnih vzorcih ribe iz reke Save in tudi širše.

Najprej smo vrednotili prisotnost učinkovin v odpadni vodi CČN Sevnica (vtok in iztok) z metodo SPE-DEX, ki je bila predhodno razvita in se uporablja v laboratorijih na Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko. Odpadno vodo CČN Sevnica smo vzorčili trikrat; marca 2015, junija 2015 in decembra 2015. Marca 2015 so bili na iztoku CČN Sevnica prisotni naproksen, irbesartan, paracetamol, metformin in valsartan v koncentracijah višjih od 1 µg/L. Rezultati so nam bili v pomoč pri izbiri učinkovin za razvoj metode za vrednotenje učinkovin v ribjih tkivih. V obzir smo vzeli tudi fizikalno-kemijske lastnosti in možnosti biokopičenja učinkovin. Izbrali smo tramadol, risperidon, dezipramin, karbamazepin, irbesartan, naproksen, valsartan, atorvastatin, triklosan, simvastain in diklofenak. Junija 2015 je bilo na vtoku prisotnih 32%, decembra 2015 pa 43% od 111 analiziranih učinkovin v različnem koncentracijskem območju. Na iztoku so bile koncentracije učinkovin pravilomanižje, tako junija kot tudi decembra pa je bil tramadol na iztoku prisoten v koncentraciji višji od 1 µg/L. V primerjavi z junijem 2015 je bilo decembra 2015 v odpadni vodi CČN Sevnica moč opaziti več učinkovin v višjih koncentracijah.

Pri razvoju metode ekstrakcije učinkovin iz rib smo uporabili vzorce mišičnega tkiva. V okviru razvoja metode smo preverjali različne parametre, kot so elucijska topila, ekstrakcijska topila, medij za redčenje ekstrakta ali uporaba različne mase tkiv za ekstrakcijo. Optimizirana metoda temelji na homogenizaciji tkiva z nerjavečimi jeklenimi kroglicami, ki ji sledi ekstrakcija z acetonitrilom, centrifugiranje in čiščenje vzorca z ekstrakcijo na trdnem nosilcu. Instrumentalno analizo smo izvedli z LC-MS/MS. Najvišje in najbolj ponovljive izkoristke smo dobili, če smo supernatant ekstrakta ribjega tkiva pred SPE redčili do 25 mL s 50 mM fosfatnim pufrom, uravnanim na pH 7.

Metodo smo validirali in določili območje linearnosti, ki je v razponu od 0,1 – 1000 ng/g tkiva, odvisno od posamezne učinkovine. Meje določitve so v razponu od 0,1 – 10 ng/g tkiva, le za naproksen je ta meja višja. Ponovljivost metode je dobra, saj so bili relativni standardni odkloni pri vseh učinkovinah nižji od 7,5%. Izkoristki ekstrakcije so v območju med 24,0 in 108,5%. Metodo smo nato uporabili za ugotavljanje izbranih učinkovin v ribah iz Save, trgovine in ribogojnice. Analizirali smo posamezna ribja tkiva in sicer mišice, jetra, ledvica, kožo in škrge.

Rezultati so pokazali, da sta v nekaterih vzorcih prisotna karbamazepin in tramadol, vendar sta oba pod mejo določitve. Ocenjena najvišja koncentracija obeh učinkovin je 0,02 ng/g tkiva.

Smiselno bi bilo vzorčiti tudi površinsko vodo iz Save nizvodno od iztoka CČN Sevnica, saj bi tako dobili vpogled v faktor redčenja in kakšna je koncentracija učinkovin v rekah. Glede na to, da nekatere ribe naseljujejo dno reke, bi bilo smiselno preverjati tudi prisotnost učinkovin v sedimentu. Pojavnost učinkovin v organizmih in vodah je antropogenega izvora in zavedati se moramo, da v okolje vnašamo spojine, ki lahko potencialno škodljivo učinkujejo na organizme. Čeprav so koncentracije učinkovin v organizmih nizke, je potrebno razmišljati o učinkih dolgoročne izpostavljenosti organizmov. Ker so ribe pomemben del naše prehrane, smo tudi ljudje izpostavljeni vnosu različnih učinkovin v svoja telesa s hrano.

**LITERATURA**

1. K. Fent, A. A. Weston DC. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. *Aquat. Toxicol.* 2006; (76):122 – 159.
2. Zenker A, Cicero MR, Prestinaci F et al. Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment. *J. Environ. Manage.* 2014; 133:378–387.
3. Rivera-Utrilla J, Sánchez-Polo M, Ferro-García MÁ et al. Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water. A review. *Chemosphere* 2013; 93(7):1268–1287.
4. Evropska Komisija (EU). IZVEDBENI SKLEP KOMISIJE (EU) 2015/495. Ur. List Evr. Unije 2015. [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015D0495&from=SL\\_13.5.2016](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/SL/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015D0495&from=SL_13.5.2016)
5. Kümmeler K. Pharmaceuticals in the Environment. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 2010; 35:57 – 75.
6. Petrović M, Hernando MD, Díaz-Cruz MS, Barceló D. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review. *J. Chromatogr. A* 2005; 1067(1-2):1–14.
7. Jorgensen SE, Halling-Sorensen B. Editorial: Drugs in the environment. *Chemosphere* 2000; 40(7):691–699.
8. Bound JP, Voulvoulis N. Household disposal of pharmaceuticals as a pathway for aquatic contamination in the United Kingdom. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113(12):1705–1711.
9. Khetan KS, Collins JT. Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment : A Challenge to Green Chemistry Human Pharmaceuticals in the Aquatic Environment : A Challenge to Green Chemistry. *Chem. Rev.* 2007; 107(September):2319–2364.
10. Pal A, Gin KYH, Lin AYC, Reinhard M. Impacts of emerging organic contaminants on freshwater resources: Review of recent occurrences, sources, fate and effects. *Sci. Total Environ.* 2010; 408(24):6062–6069.
11. Mompelat S, Le Bot B, Thomas O. Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water. *Environ. Int.* 2009; 35(5):803–814.
12. Fatta-Kassinos D, Meric S, Nikolaou A. Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: Current state of knowledge and future research. *Anal. Bioanal. Chem.* 2011; 399(1):251–275.
13. Kolpin DW, Kolpin DW, Furlong ET et al. Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* 2002; 36(6):1202–1211.
14. Ternes T a. Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers1Dedicated to Professor Dr. Klaus Haberer on the occasion of his 70th birthday.1. *Water Res.* 1998; 32(11):3245–3260.
15. Heberer T. Tracking persistent pharmaceutical residues from municipal sewage to drinking water. *J. Hydrol.* 2002; 266(3-4):175–189.
16. Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban

- wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment-A review. *Sci. Total Environ.* 2012; 429:123–155.
17. Krčevski-škvarč N, Rozman-marčič J, Ivanuša M. Nekateri novejši pogledi na nesteroidne antirevmatike. *Zdr. Vestn.* 2001; 70:405–413.
  18. Cleuvers M. Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen, and acetylsalicylic acid. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2004; 59(3):309–315.
  19. Kasprzyk-Hordern B, Dinsdale RM, Guwy AJ. The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* 2009; 43(2):363–380.
  20. Al Aukidy M, Verlicchi P, Jelic A et al. Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy. *Sci. Total Environ.* 2012; 438:15–25.
  21. Hedgespeth ML, Sapozhnikova Y, Pennington P et al. Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in treated wastewater discharges into Charleston Harbor, South Carolina. *Sci. Total Environ.* 2012; 437:1–9.
  22. Kosjek T, Heath E, Krbavčič A. Determination of non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAIDs) residues in water samples. *Environ. Int.* 2005; 31(5):679–685.
  23. Gros M, Petrović M, Barcelo D. Development of a multi-residue analytical methodology based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) for screening and trace level determination of pharmaceuticals in surface and wastewaters. *Talanta* 2006; 70(4):678–690.
  24. Dasenaki ME, Thomaidis NS. Multianalyte method for the determination of pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015;4229–4245.
  25. Kümmerer K. Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part II. *Chemosphere* 2009; 75(4):435–441.
  26. Watkinson AJ, Murby EJ, Kolpin DW, Costanzo SD. The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water. *Sci. Total Environ.* 2009; 407(8):2711–2723.
  27. Castiglioni S, Bagnati R, Calamari D et al. A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A* 2005; 1092(2):206–215.
  28. Kostich MS, Batt AL, Lazorchak JM. Concentrations of prioritized pharmaceuticals in effluents from 50 large wastewater treatment plants in the US and implications for risk estimation. *Environ. Pollut.* 2014; 184:354–359.
  29. Oliveira TS, Murphy M, Mendola N et al. Characterization of Pharmaceuticals and Personal Care products in hospital effluent and waste water influent/effluent by direct-injection LC-MS-MS. *Sci. Total Environ.* 2015; 518-519:459–478.
  30. Christen V, Hickmann S, Rechenberg B, Fent K. Highly active human pharmaceuticals in aquatic systems: A concept for their identification based on their mode of action. *Aquat. Toxicol.* 2010; 96(3):167–181.

31. Huerta B, Rodríguez-Mozaz S, Barceló D et al. Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: Analytical methods and environmental implications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404(9):2611–2624.
32. Brooks BW, Chambliss CK, Stanley JK et al. Determination of select antidepressants in fish from an effluent-dominated stream. *Environ. Toxicol. Chem.* 2005; 24(2):464–469.
33. Chen F, Gong Z, Kelly BC. Rapid analysis of pharmaceuticals and personal care products in fish plasma micro-aliquots using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2015; 1383:104–111.
34. Tanoue R, Nomiyama K, Nakamura H et al. Simultaneous determination of polar pharmaceuticals and personal care products in biological organs and tissues. *J. Chromatogr. A* 2014; 1355:193–205.
35. Huerta B, Jakimska A, Gros M et al. Analysis of multi-class pharmaceuticals in fish tissues by ultra-high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2013; 1288:63–72.
36. Wang J, Gardinali PR. Analysis of selected pharmaceuticals in fish and the fresh water bodies directly affected by reclaimed water using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* 2012; 404(9):2711–2720.
37. Ramírez AJ, Mottaleb MA, Brooks BW, Chambliss CK. Analysis of Pharmaceuticals in Fish Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 2007; 79(8):3155–3163.
38. Ramirez AJ, Brain RA, Usenko S et al. Occurrence of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Fish: Results of a National Pilot Study in the United States. *Environ. Toxicol. Chem.* 2009; 28(12):2587–2597.
39. Zhou SN, Oakes KD, Servos MR, Pawliszyn J. Application of Solid-Phase Microextraction for In Vivo Laboratory and Field Sampling of Pharmaceuticals in Fish. *Environ. Sci. Technol.* 2008; 42(16):6073–6079.
40. Mottaleb MA, Stowe C, Johnson DR et al. Pharmaceuticals in grocery market fish fillets by gas chromatography-mass spectrometry. *Food Chem.* 2016; 190:529–36.
41. Togunde OP, Oakes KD, Servos MR, Pawliszyn J. Determination of pharmaceutical residues in fish bile by solid-phase microextraction couple with liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Environ. Sci. Technol.* 2012; 46(10):5302–5309.
42. Sofilić T. Ekotoksikologija, Sveučilište u Zagrebu, Metalurški fakultet, Zagreb, 2014: 1-20
43. OECD and EU test Guidelines. <http://echa.europa.eu/support/oecd-eu-test-guidelines> 27.6.2016
44. OECD. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2:Effects on Biotic Systems. [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems\\_20745761](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-2-effects-on-biotic-systems_20745761) 13.5.2016
45. Petrie B, Barden R, Kasprzyk-Hordern B. A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring. *Water Res.* 2015; 72(0):3–27.
46. Commission of the European Communities. Technical Guidance Document in Support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for New Notified Substances and

- Commission Regulation (EC) No 1488/94 on Risk Assessment for Existing Substances - Part II: Environmental Risk Assessment, 1996.
47. Cleuvers M. Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects. *Toxicol. Lett.* 2003; 142(3):185–194.
  48. Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ et al. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 2004; 427(6975):630–633.
  49. Kidd KA, Blanchfield PJ, Mills KH et al. Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2007; 104(21):8897–8901.
  50. Ellesat KS, Holth TF, Wojewodzic MW, Hylland K. Atorvastatin up-regulate toxicologically relevant genes in rainbow trout gills. *Ecotoxicology* 2012; 21:1841–1856.
  51. Li ZH, Zlabek V, Velisek J et al. Responses of antioxidant status and Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase activity in gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, chronically treated with carbamazepine. *Chemosphere* 2009; 77(11):1476–1481.
  52. Niemuth NJ, Jordan R, Crago J et al. Metformin exposure at environmentally relevant concentrations causes potential endocrine disruption in adult male fish. *Environ. Toxicol. Chem.* 2015; 34(2):291–296.
  53. Kime D., Nash J., Scott A. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. *Aquaculture* 1999; 177(1):345–352.
  54. Buchberger WW. Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment. *J. Chromatogr. A* 2011; 1218(4):602.
  55. Pavlović DM, Babić S, Horvat AJM, Kaštelan-Macan M. Sample preparation in analysis of pharmaceuticals. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2007; 26(11):1062–1075.
  56. Buchberger WW. Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge. *Anal. Chim. Acta* 2007; 593(2):129–139.
  57. Farré M, Kantiani L, Petrović M et al. Achievements and future trends in the analysis of emerging organic contaminants in environmental samples by mass spectrometry and bioanalytical techniques. *J. Chromatogr. A* 2012; 1259:86–99.
  58. Núñez O, Gallart-Ayala H, Martins CPB, Lucci P. New trends in fast liquid chromatography for food and environmental analysis. *J. Chromatogr. A* 2012; 1228:298–323.
  59. Kim SC, Carlson K. LC-MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices. *TrAC - Trends Anal. Chem.* 2005; 24(7):635–644.
  60. Petrović M, Farré M, de Alda ML et al. Recent trends in the liquid chromatography-mass spectrometry analysis of organic contaminants in environmental samples. *J. Chromatogr. A* 2010; 1217(25):4004–4017.
  61. Horizon T. Brošura SPE-DEX 4790 Extractor System.  
<https://www.chromspec.com/pdf/hz03.pdf> 17.4.2016
  62. Horizon T. Brošua SPE-DEX ® 4790 AUTOMATED EXTRACTION SYSTEM.  
[http://www.horizontechinc.com/PDF/Product%20Brochures/B0051508\\_01\\_SPE-DEX\\_4790\\_brochure.pdf](http://www.horizontechinc.com/PDF/Product%20Brochures/B0051508_01_SPE-DEX_4790_brochure.pdf) 17.4.2016

63. Zwiener C, Frimmel FH. LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment - A critical review: Part I: Instrumentation and general aspects of analysis and detection. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 378(4):851–861.
64. Hansen S, Pedersen-Bjergaard S, Rasmussen K. Introduction to pharmaceutical chemical analysis, John Wiley and Sons, West Sussex, Velika Britanija, 2012: 231-260
65. Gros M, Petrović M, Barceló D. Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: A review. *Anal. Bioanal. Chem.* 2006; 386(4):941–952.
66. Petrović M. Methodological challenges of multi-residue analysis of pharmaceuticals in environmental samples. *Trends Environ. Anal. Chem.* 2014; 1:e25–e33.
67. Brodnjak Vončina D. Industrijska Analiza: Zbrano gradivo. Univerza v Mariboru, Fak. za Kem. Kem. Tehnol. 2007.
68. Krajnc U. Čistilna naprava Sevnica 1999-2010. Gradb. Vestn. 2011; 60:12–20.
69. ICH. ICH Topic Q2 (R1) Validation of Analytical Procedures : Text and Methodology. Int. Conf. Harmon. 2005; 1994(November 1996):17.  
[http://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf 1.4.2016](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
70. Couto S, Wyrtsch V, Wynn HK et al. Temporal dynamics of antibiotics in wastewater treatment plant influent. *Sci. Total Environ.* 2013; 458:20–26.
71. Zhang Y, Geißen S-U, Gal C. Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies. *Chemosphere* 2008; 73(8):1151–1161.
72. Bueno MJM, Gomez MJ, Herrera S et al. Occurrence and persistence of organic emerging contaminants and priority pollutants in five sewage treatment plants of Spain: Two years pilot survey monitoring. *Environ. Pollut.* 2012; 164:267–273.
73. AEMPS. UTILIZACIÓN DE ANALGÉSICOS NO OPIOIDES EN ESPAÑA 1992-2006, 2009.  
[http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/analgesicos\\_no\\_opio.pdf 3.4.2016](http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/analgesicos_no_opio.pdf)
74. AEMPS. Utilización de medicamentos antiinflamatorios no esteroides (AINE) en España durante el periodo 2000-2012, 2014.  
[http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/AINE.pdf 3.4.2016](http://www.aemps.gob.es/medicamentosUsoHumano/observatorio/docs/AINE.pdf)
75. NIJZ. PORABA AMBULANTNO PREDPISANIH ZDRAVIL V SLOVENIJI 2 0 1 4, 2015.  
[http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/datoteke/poraba\\_ambulantno\\_predpisanih\\_zdravil\\_v\\_sloveniji\\_2014.pdf 25.3.2016](http://www.niz.si/sites/www.niz.si/files/datoteke/poraba_ambulantno_predpisanih_zdravil_v_sloveniji_2014.pdf)
76. Huerta B, Rodríguez-Mozaz S. Chapter 6 – Analysis of Pharmaceutical Compounds in Biota. *Compr. Anal. Chem.*, 2013; 62:169–193.
77. Corcoran J, Winter MJ, Tyler CR. Pharmaceuticals in the aquatic environment: a critical review of the evidence for health effects in fish. *Crit. Rev. Toxicol.* 2010; 40(4):287–304.
78. Fick J, Lindberg RH, Parkkonen J et al. Therapeutic levels of levonorgestrel detected in blood plasma of fish: results from screening rainbow trout exposed to treated sewage effluents. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44(7):2661–2666.

79. Chu S, Metcalfe CD. Analysis of paroxetine, fluoxetine and norfluoxetine in fish tissues using pressurized liquid extraction, mixed mode solid phase extraction cleanup and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2007; 1163(1-2):112–118.
80. Schultz MM, Furlong ET, Kolpin DW et al. Antidepressant pharmaceuticals in two U.S. effluent-impacted streams: Occurrence and fate in water and sediment and selective uptake in fish neural tissue. *Environ. Sci. Technol.* 2010; 44(6):1918–1925.
81. Samanidou V, Evaggelopoulou E, Trötzmüller M et al. Multi-residue determination of seven quinolones antibiotics in gilthead seabream using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* 2008; 1203(2):115–123.
82. Zhao JL, Liu YS, Liu WR et al. Tissue-specific bioaccumulation of human and veterinary antibiotics in bile, plasma, liver and muscle tissues of wild fish from a highly urbanized region. *Environ. Pollut.* 2015; 198:15–24.
83. Dasenaki ME, Thomaidis NS. Multi-residue determination of seventeen sulfonamides and five tetracyclines in fish tissue using a multi-stage LC-ESI-MS/MS approach based on advanced mass spectrometric techniques. *Anal. Chim. Acta* 2010; 672(1-2):93–102.
84. Wagil M, Kumirska J, Stolte S et al. Development of sensitive and reliable LC-MS/MS methods for the determination of three fluoroquinolones in water and fish tissue samples and preliminary environmental risk assessment of their presence in two rivers in northern Poland. *Sci. Total Environ.* 2014; 493:1006–1013.
85. Dasenaki ME, Thomaidis NS. Multi-residue determination of 115 veterinary drugs and pharmaceutical residues in milk powder, butter, fish tissue and eggs using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* 2015; 880:103–121.
86. Triebskorn R, Casper H, Heyd A et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part II: cytological effects in liver, kidney, gills and intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 2004; 68(2):151–66.
87. Schwaiger J, Ferling H, Mallow U et al. Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: Histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 2004; 68(2):141–150.