
UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

**ODREĐIVANJE TRAGOVA LEKOVA U VODI
METODOM TEČNE HROMATOGRAFIJE
SA TANDEM MASENOM SPEKTROMETRIJOM**

-doktorska disertacija-

Svetlana D. Grujić

Beograd, 2009. godine

*Mentor: Dr Mila Laušević, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Članovi komisije: Dr Tatjana Vasiljević, docent
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Dr Slobodan Petrović, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Dr Jasna Đonlagić, redovni profesor
Tehnološko-metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

*Dr Slobodan Milosavljević, redovni profesor
Hemijskog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

Datum odbrane:

*Želim da se zahvalim prof. dr Mili Laušević za
svesrdnu i nesebičnu podršku koju mi je pružala tokom pet
godina mentorstva, kao i za stručne savete i izuzetnu
saradnju prilikom izrade doktorske disertacije.*

*Docent dr Tatjani Vasiljević dugujem iskrenu
zahvalnost za svestranu pomoć i stručne sugestije
tokom izrade ove teze.*

*Prof. dr Slobodanu Petroviću zahvaljujem se,
pre svega, na vrednim savetima koje mi je pružio
prilikom pisanja ovog rada, kao i na pomoći
prilikom nabavljanja analitičkih standarda lekova.*

*Želim da se zahvalim i ostalim članovima Komisije,
prof. dr Jasni Donlagić i prof. dr Slobodanu Milosavljeviću
na korisnim i kreativnim sugestijama koje su mi pružili
tokom pisanja doktorske disertacije.*

*Konačno, posebno se zahvaljujem svojim
koleginicama i kolegama sa Katedre za opštu i neorgansku
hemiju, kao i Katedre za analitičku hemiju i kontrolu
kvaliteta, Tehnološko-metalurškog fakulteta Univerziteta
u Beogradu na izvanrednom duhu saradnje,
razumevanju i neizmernoj podršci.*

ODREĐIVANJE TRAGOVA LEKOVA U VODI METODOM TEČNE HROMATOGRAFIJE SA TANDEM MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Izvod. Prisustvo tragova lekova u životnoj sredini postalo je predmet posebnog interesovanja u poslednjoj deceniji. U postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda lekovi se ne uklanjaju efikasno, zbog čega dospevaju u prirodne vode. Najveći problem predstavlja prisustvo antibiotika, zbog mogućnosti nastajanja rezistentnih bakterijskih sojeva. Zbog ograničenog znanja o koncentraciji, degradaciji i posledicama prisustva lekova u životnoj sredini, tragovi lekova u vodi još uvek nisu zakonski regulisani.

Većina analitičkih metoda za određivanje tragova lekova obuhvata hemijski slična jedinjenja iz jedne ili dve grupe lekova, uglavnom antibiotika. Veoma je teško ekstrahovati i detektovati hemijski različite analite iz većeg broja grupa lekova sa prihvatljivim prinosima i granicama detekcije. Zbog toga još uvek postoji potreba za novim, pouzdanim, multirezidualnim analitičkim metodama, koje omogućavaju brzo, osetljivo i selektivno određivanje tragova lekova u uzorcima iz životne sredine.

U ovoj studiji je opisan razvoj, optimizacija i primena analitičke metode za određivanje i pouzdanu potvrdu devetnaest lekova iz različitih farmakoloških grupa pri koncentracijama reda veličine ng dm^{-3} . Za analizu su odabrani lekovi koji spadaju među najčešće korišćene u Srbiji i pripadaju glavnim grupama lekova, kao što su antibiotici (β -laktami, cefalosporini, sulfonamidi, makrolidi i tetraciklini), benzodiazepini, antiepileptici i analgoantipiretici. Za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje analita iz uzoraka vode razvijena je i optimizovana procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi. Ekstrakti su analizirani metodom tečne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom, uz korišćenje jonskog trapa i elektrosprej jonizacije. Optimizovano je hromatografsko razdvajanje analita i uspostavljeni su pouzdani protokoli za maseno-spektrometrijsku potvrdu prisustva analita. Metoda je primenjena u analizi realnih uzoraka vode. Utvrđeno je da svi ispitivani uzorci sadrže tragove lekova. Dokazano je prisustvo karbamazepina, azitromicina, trimetoprima i paracetamola.

Ključne reči: multirezidualna analiza, antibiotici, tragovi lekova, tečna hromatografija–tandem masena spektrometrija, jonski trap, ekstrakcija na čvrstoj fazi, analiza vode.

DETERMINATION OF DRUG RESIDUES IN WATER BY LIQUID CHROMATOGRAPHY – TANDEM MASS SPECTROMETRY

Abstract. The presence of drug residues in the environment has become a subject of growing concern in the past decade. Wastewater treatment plants are not designed to remove drugs from the effluents and consequently they are released into natural waters. The major problem is the presence of antibiotics, because it can lead to generation of resistant bacterial strains. Owing to the limited knowledge on concentrations, degradation and effects of drugs in the environment, they have not yet been included in any environmental regulations.

The majority of analytical methods for determination of drug residues include chemically similar compounds from one or two drug classes, most of them being antibiotics. It is very difficult to extract and detect chemically dissimilar analytes from a number of drug classes with acceptable recoveries and limits of detection. Therefore, there is still need for new, reliable, multiresidual analytical methods, which enable rapid, sensitive and selective determination of pharmaceuticals in environmental samples, at trace levels.

This study describes development, optimization and application of the analytical method for determination and reliable confirmation of nineteen drugs from different therapeutic classes at ng dm^{-3} levels. Pharmaceuticals that are among the most frequently used in Serbia and that belong to the major drug groups, as antibiotics (β -lactams, cephalosporines, sulfonamides, macrolides and tetracyclines), benzodiazepines, antiepileptics, and analgoantipyretics, were chosen for the study. Solid-phase extraction procedure for efficient extraction and preconcentration of the analytes from water samples was developed and optimized. Extracts were analyzed using liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry with electrospray ionization. The chromatographic separation of the analytes was optimized, and reliable mass-spectrometric confirmation protocols were established. The method was applied to real water samples for monitoring of the selected drugs. The study has shown that all investigated samples contained drug residues, revealing the presence of carbamazepine, azithromycin, trimethoprim and paracetamol.

Keywords: multiresidual analysis, antibiotics, drug residues, liquid chromatography–tandem mass spectrometry, ion trap, solid-phase extraction, water analysis.

SADRŽAJ

1.	UVOD	1
2.	TEORIJSKI DEO	3
2.1.	Putevi kojima lekovi dospevaju u životnu sredinu	3
2.2.	Uklanjanje lekova u postrojenjima za prečišćavanje otpadnih voda	4
2.3.	Degradacija lekova u životnoj sredini	5
2.4.	Uklanjanje lekova u postrojenjima za prečišćavanje pijaće vode	5
2.5.	Problem prisustva lekova u prirodnoj i pijaćoj vodi	6
2.6.	Lekovi detektovani u prirodnoj i pijaćoj vodi	7
2.7.	Lekovi odabrani za analizu	13
2.8.	Analitika lekova – zahtevi i problemi	16
2.9.	Priprema uzoraka	19
2.10.	Tečna hromatografija visoke performanse	23
2.11.	Masena spektrometrija	26
2.12.	Sprega tačne hromatografije sa masenom spektrometrijom	29
2.12.1.	Tandem masena spektrometrija odabranih grupa lekova	31
3.	EKSPERIMENTALNI DEO	33
3.1.	Rastvori odabranih lekova i reagensi	33
3.2.	Snimanje masenih spektara analita	35
3.3.	Optimizacija hromatografskog razdvajanja analita	35
3.4.	Optimizacija HPLC-MS/MS parametara	36
3.5.	Ekstrakcija analita na čvrstoj fazi	37
3.5.1.	Izbor SPE kertridža	37
3.5.2.	Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka vode	47
3.5.3.	Izbor optimalne zapremine eluenta	47
3.5.4.	Izbor optimalne zapremine uzorka vode	47
3.5.5.	Validacija metode	48
3.6.	Kalibracija	48
3.7.	Uzimanje uzoraka vode	49

4.	REZULTATI I DISKUSIJA	53
4.1.	Maseni spektri analita	53
4.2.	Formiranje adukta amoksicilina sa metanolom	66
4.2.1.	Uticaj sastava rastvarača na ESI masene spektre amoksicilina	66
4.2.2.	Formiranje adukta amoksicilina sa metanolom tokom vremena	71
4.2.3.	Uticaj aditiva mobilne faze na efikasnost jonizacije amoksicilina	73
4.2.4.	Linearnost detektora za određivanje amoksicilina	75
4.3.	Optimizacija hromatografskog razdvajanja analita i HPLC-MS/MS parametara ..	76
4.4.	Ekstrakcija analita na čvrstoj fazi	78
4.4.1.	Izbor SPE kertridža	78
4.4.2.	Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka vode	81
4.4.3.	Izbor optimalne zapremine eluenta	83
4.4.4.	Izbor optimalne zapremine uzorka vode	84
4.4.5.	Validacija razvijene metode	86
4.5.	Kalibracija i uticaj matrice	87
4.6.	Analiza realnih uzoraka	88
4.7.	Potvrda prisustva analita	91
5.	ZAKLJUČNA RAZMATRANJA	98
6.	ZAKLJUČAK	100
	LITERATURA	101
	PRILOG	112
	OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE	123

1. U V O D

Savremena istraživanja u oblasti analitike zagađujućih supstanci u životnoj sredini proširena su sa tradicionalnih zagađujućih supstanci, kao što su polihlorovani bifenili, policiklični aromatični ugljovodonici i pesticidi, na „nove zagađujuće supstance“ kao što su lekovi i hormoni. Tragovi lekova u životnoj sredini postali su predmet interesovanja naučne javnosti u poslednjoj deceniji, s obzirom na to da niske koncentracije ovih analita ranije nisu mogle biti detektovane.

Lekovi dospevaju u životnu sredinu, u najvećoj meri, kao posledica nepotpunog uklanjanja iz komunalnih otpadnih voda. Međutim, u Srbiji, u svega nekoliko gradova postoje postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda, a Beograd nije jedan od njih. Procesi prečišćavanja površinske i podzemne vode takođe ne mogu u potpunosti ukloniti lekove, pa se u tragovima mogu naći i u vodi za piće. Pijaća voda tako može da sadrži tragove antibiotika, analgetika, sedativa i dr. Iako su koncentracije ovih lekova u vodi izuzetno niske, reda veličine $\mu\text{g dm}^{-3}$ ili ng dm^{-3} , za razliku od ostalih zagađujućih supstanci, lekovi su napravljeni tako da imaju efekte na čoveka pri niskim koncentracijama. Zbog toga njihov kontinualan unos u životnu sredinu može dovesti do dugoročnih negativnih posledica po zdravlje čoveka i vodenih životinja.

Najnovija istraživanja su pokazala da niske količine lekova u vodi utiču na sporiji rast ljudskih embriona, da mogu izazvati upalu krvnih ćelija i da ubrzavaju razmnožavanje ćelija raka dojke. Kod životinja je dokazan negativan uticaj na reproduktivnu funkciju i mogućnost borbe protiv infekcija. Ipak, efekti dugoročnog konstantnog izlaganja niskim količinama lekova po ljudsko zdravlje još uvek nisu dobro poznati. Poznato je da prisustvo antibiotika u životnoj sredini predstavlja problem zbog pojave bakterijskih sojeva rezistentnih na ove lekove. Ako se uzme u obzir da se u Evropskoj Uniji godišnje upotrebi oko 8500 t antibiotika u humanoj medicini i 4700 t u veterini, moguće je shvatiti zbog čega je ovo jedan od najaktuelnijih problema u hemiji životne sredine.

Iako je registrovano više od 3000 aktivnih sastojaka lekova, analitičke metode su razvijene za određivanje oko 150 lekova u uzorcima iz životne sredine. Većina ovih analitičkih metoda zasnovana je na gasnoj hromatografiji sa masenom spektrometrijom koja često zahteva derivatizaciju, tj. hemijsku modifikaciju analita. U poslednjoj deceniji, tečna hromatografija visoke performanse sa tandem masenom spektrometrijom je postala najpouzdanija tehnika za određivanje polarnih zagađujućih supstanci u životnoj sredini zbog visoke selektivnosti i izuzetne osetljivosti.

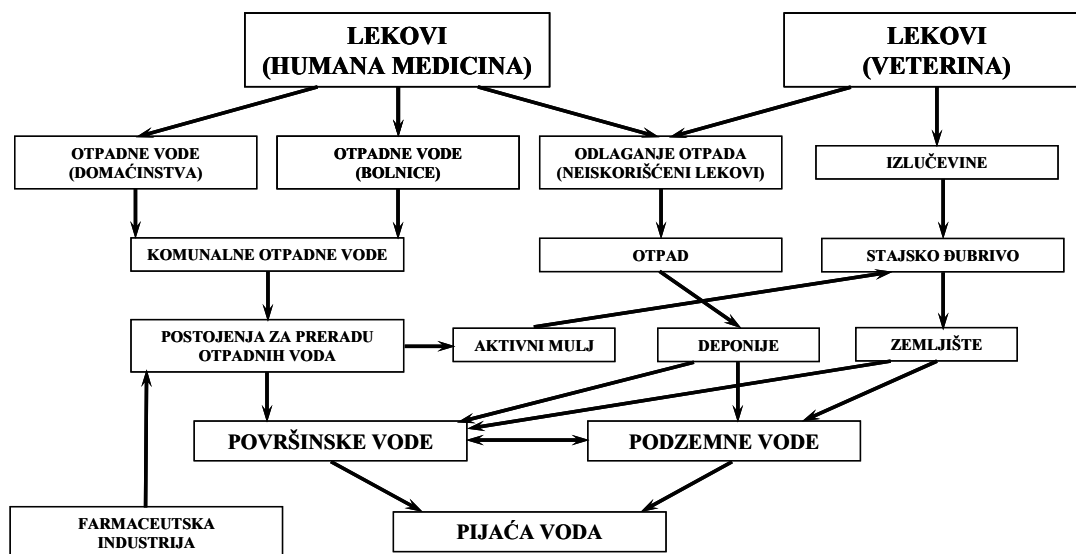
Većina radova koja se bavi analizom tragova lekova u vodi fokusirana je na specifičnu grupu lekova, s posebnim naglaskom na antibiotike koji se smatraju najvećim problemom. S obzirom na to da su u životnoj sredini prisutne različite grupe lekova u veoma kompleksnim smešama, razvoj multirezidualne analitičke metode je izuzetno značajan. Takođe, broj studija o zastupljenosti tragova lekova u životnoj sredini je malobrojan, pa su i podaci o stepenu zagađenja vode lekovima veoma ograničeni. Kao posledica nedovoljnog poznavanja zastupljenosti i mogućih posledica prisustva lekova u životnoj sredini, u svetu još uvek ne postoje propisi o maksimalno dozvoljenim koncentracijama ovih jedinjenja u životnoj sredini. Zbog toga su svetska istraživanja fokusirana na razvoj osetljivih i pouzdanih analitičkih metoda za detekciju niskih koncentracija lekova, kao i dobijanje informacija o prisustvu, ponašanju, razgradnji i vremenu zadržavanja ovih zagađujućih supstanci u životnoj sredini.

Predmet ovog rada je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova odabranih lekova u vodi. Za analizu su odabrani lekovi pripadaju glavnim grupama lekova, kao što su antibiotici (β -laktami, cefalosporini, sulfonamidi, makrolidi i tetraciklini), benzodiazepini, antiepileptici i analgoantipiretici, a koji spadaju u najčešće korišćene u našoj zemlji. Rad obuhvata razvoj postupaka za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje veoma različitih analita, optimizaciju hromatografskih postupaka za razdvajanje i uspostavljanje protokola za potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora. Posebna pažnja je posvećena izboru reakcija za pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova lekova i razvoju novih načina identifikacije i nedvosmislene potvrde prisustva analita. Razvijena metoda je primenjena na realne uzorke površinskih i podzemnih voda, pri čemu je dobijena studija o stanju zagađenosti vode najčešće korišćenim lekovima u našoj zemlji.

2. TEORIJSKI DEO

2.1. PUTEVI KOJIMA LEKOVI DOSPEVAJU U ŽIVOTNU SREDINU

Lekovi dospevaju u životnu sredinu kao posledica intenzivnog i konstantnog korišćenja u humanoj medicini i veterini. Glavni izvori zagađenja površinskih i podzemnih voda aktivnim supstancama lekova su gradske i poljoprivredne otpadne vode, odnosno domaćinstva, bolnice i poljoprivredna zemljišta (Halling-Sørensen *et al.* 1998; Robinson *et al.* 2007). Na slici 1 prikazani su mogući izvori zagađenja i putevi kojima lekovi dospevaju u površinske i podzemne vode.



Slika 1. Putevi kojima lekovi dospevaju u površinske i podzemne vode (Heberer 2002).

Najznačajniji put kojim lekovi dospevaju u životnu sredinu su komunalne otpadne vode. Nakon konzumiranja, u ljudskom organizmu lek podleže nizu metaboličkih reakcija, pri čemu nastaju metaboliti koji su često polarniji od polaznog jedinjenja. Zbog toga su rastvorljiviji u vodi, a time i često toksičniji od polazne supstance (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Lekovi se izlučuju delimično transformisani, pri čemu se i do 50% leka izluči u neizmenjenom obliku (Hirsch *et al.* 1999; Heberer 2002). U životnoj sredini, kao i u procesima prečišćavanja vode, metaboliti se mogu transformisati u polazno jedinjenje (Ternes 2001; Weigel *et al.* 2004).

Sledeći važan izvor tragova lekova u životnoj sredini su farme na kojima se lekovi intenzivno koriste za uzgoj stoke i živine. Najviše se upotrebljavaju antibiotici, za lečenje infekcija i preventivno, ali i kao dodatak hrani radi pospešivanja rasta životinja (Hirsch *et al.* 1999). Upotrebom stajskog đubriva, antibiotici se dalje mogu preneti na poljoprivredno zemljište, a ispiranjem zemljišta i u podzemne vode (Hartig *et al.* 1999; Heberer 2002).

Izvor zagađenja površinskih i podzemnih voda je i farmaceutska industrija, odnosno otpadne vode iz proizvodnje lekova. Ipak, ovo je lokalno zagađenje, koje ima uticaj na ograničeno područje (Hirsch *et al.* 1999). Odlaganjem lekova kojima je prošao rok upotrebe na deponije može doći do zagađenja podzemnih voda usled spiranja ovakvog zemljišta (Jørgensen and Halling-Sørensen 2000).

2.2. UKLANJANJE LEKOVA U POSTROJENJIMA ZA PREČIŠĆAVANJE OTPADNIH VODA

U postrojenjima za preradu i prečišćavanje gradskih otpadnih voda postoje dva stupnja zadržavanja štetnih supstanci. Prvi stupanj obuhvata adsorpciju zagađujućih supstanci, a zatim taloženje i uklanjanje čvrste supstance, dok drugi obuhvata aerobnu i anaerobnu biodegradaciju na aktivnom mulju (Robinson *et al.* 2007). Pre nego što se otpusti u površinske vode, u nekim postrojenjima se otpadna voda i dezinfikuje, obično hlorisanjem ili ultraljubičastim zračenjem (Ternes *et al.* 2002a).

S obzirom na to da većina lekova spada u polarna jedinjenja, dobro rastvorljiva u vodi i slabo biodegradabilna, lako mogu da izbegnu sedimentaciju i biološki tretman u procesu prečišćavanja otpadnih voda (Bendz *et al.* 2005). Koagulacija, flokulacija i procesi taloženja uglavnom nisu delotvorni u uklanjanju rastvorenih organskih zagađujućih supstanci (Ternes *et al.* 2002b). Biološki procesi su veoma efikasni za smanjenje koncentracije biodegradabilnih jedinjenja, dok se hlorisanje vode ili ozonizacija smatraju najefikasnijim načinom uklanjanja većeg broja lekova (Kim *et al.* 2007). Istraživanja su pokazala da se u postrojenjima za prečišćavanje gradskih otpadnih voda može eliminisati oko 40–60% lekova (Ternes 1998; Díaz-Cruz and Barceló 2005). Ukoliko se primenjuje i dezinfekcija, krajnje koncentracije lekova mogu biti još niže, pri čemu je hlorisanje vode efikasnije od ultraljubičastog zračenja (Renew and Huang 2004). Ipak, mnoge studije (Ternes 1998; Petrović *et al.* 2003, Ashton *et al.* 2004) su pokazale da se lekovi generalno slabo uklanjaju u procesima prečišćavanja otpadnih voda, posebno zbog činjenice da većina postrojenja ne sprovodi dezinfekciju otpadnih voda.

Efikasnost ukljanjanja leka u procesu prečišćavanja zavisi od mnogih faktora, kao što su priroda aktivne supstance leka, sastav otpadnih voda, tehnologija prerade otpadnih voda, tip i vreme korišćenja aktivnog mulja, temperatura, i dr. (Carballa *et al.* 2004; Roberts and Thomas 2006). Poznato je, na primer, da je procenat uklanjanja kiselih jedinjenja, kao što su lekovi diklofenak, ibuprofen i acetilsalicilna kiselina, prilično nizak (Petrović *et al.* 2003). Zbog velike rastvorljivosti u vodi, izuzetne polarnosti i otpornosti na degradaciju, ove supstance se teško adsorbuju i lako prolaze kroz procese prečišćavanja, ali i procese prirodne filtracije, i dospevaju do podzemnih voda i vode za piće (Buser *et al.* 1998; Ternes *et al.* 2002a). U procesu biodegradacije, koji je svakako efikasniji od procesa taloženja, ukloni se manje od 10% karbamazepina i trimetoprima (Clara *et al.* 2004), dok je efikasnost biodegradacije diklofenaka 10–39% (Hernando *et al.* 2006).

2.3. DEGRADACIJA LEKOVA U ŽIVOTNOJ SREDINI

Degradacija leka u životnoj sredini zavisi od hemijskih osobina aktivne supstance. Zbog postojanja raznih funkcionalnih grupa u molekulu aktivne supstance leka, kao što su karboksilna, hidroksilna, aldehidna ili amino grupa, kapacitet adsorpcije molekula na čvrstoj matrici, kao što je sediment, zavisi od pH sredine i sastojaka čvrste matrice (Jørgensen and Halling-Sørensen 2000; Robinson *et al.* 2007). Mnogi lekovi su lipofilni, zbog čega lako prolaze kroz ćelijsku membranu i bioakumuliraju se u vodenim životinjama (Halling-Sørensen *et al.* 1998). U vodenoj sredini aktivna supstanca se može dalje degradovati putem abiotičkih i biotičkih procesa. Abiotičke transformacije se odvijaju putem hidrolize i fotolize (Tixier *et al.* 2003). Pošto su lekovi po pravilu otporni na hidrolizu, jer su predviđeni za oralnu upotrebu, obim ove reakcije je za većinu lekova zanemarljiv. Najznačajniji način abiotičke transformacije lekova u površinskim vodama je direktna i indirektna fotoliza (Andreozzi *et al.* 2003). Direktna fotoliza se javlja direktnom adsorpcijom sunčeve svetlosti, dok indirektna fotoliza uključuje prirodne materije, kao što su huminske kiseline, koje pod uticajem sunčevog zračenja stvaraju jake oksidacione agense koji zatim degraduju ostatke lekova. Sporedni proizvodi ovakve degradacije često mogu biti toksičniji od polazne supstance (Nikolaou *et al.* 2007).

Iako je postojanost lekova u životnoj sredini relativno mala, oni su sveprisutni zbog toga što je brzina kojom se otpuštaju u okolinu mnogo veća od brzine njihove degradacije i transformacije (Bendz *et al.* 2005). Od antibiotika, sulfonamidi i fluorohinoloni su najpostojaniji u životnoj sredini, zatim makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi i β-laktami (Huang *et al.* 2001).

2.4. UKLANJANJE LEKOVA U POSTROJENJIMA ZA PREČIŠĆAVANJE PIJAĆE VODE

Tretman podzemne vode za proizvodnju vode za piće obuhvata aeraciju, flokulaciju sa filtracijom ili filtraciju kroz pesak, i dezinfekciju. Ukoliko se prečišćava površinska voda, koristi se mnogo efikasnija flokulacija sa filtracijom. Savremene tehnologije za proizvodnju pijaće vode uključuju i ozonizaciju, kao i adsorpciju na granulisanom aktivnom uglju. Ipak, tragovi lekova u sirovoj vodi, koja se koristi za proizvodnju pijaće vode, teško se uklanjaju uobičajenim procesima prečišćavanja. Ispitivanja su pokazala da je za lekove, kao što su sulfametoksazol, karbamazepin, diklofenak i ibuprofen, uklanjanje flokulacijom manje od 20%. Ozonizacija i adsorpcija na aktivnom uglju su veoma efikasni, ali uklanjanje nije kvantitativno za sva jedinjenja (Zwiener 2007).

Podaci o transportu kroz procese prečišćavanja i konačnoj degradaciji lekova u životnoj sredini su prilično ograničeni. Razlog je činjenica da je ranije postojalo svega nekoliko analitičkih metoda koje su, sa ograničenom sigurnošću, mogle da detektuju niske koncentracije lekova u vodi (Jørgensen and Halling-Sørensen 2000).

2.5. PROBLEM PRISUSTVA LEKOVA U PRIRODNOJ I PIJAĆOJ VODI

Problemi vezani za prisustvo lekova u životnoj sredini uključuju poremećaje fizioloških procesa i reproduktivne funkcije organizama, razvoj rezistentnih bakterija i povećanje toksičnosti nekih farmaceutski aktivnih supstanci (Kolpin *et al.* 2002).

Pojava rezistentnosti mikroorganizama na antibiotike je svakako jedan od najznačajnijih problema. Antibiotici su u širokoj upotrebi u humanoj medicini i veterini u cilju sprečavanja ili tretiranja bakterijskih infekcija, a takođe se intenzivno koriste u uzgoju stoke i živine. Procenjena godišnja potrošnja antibiotika u Evropskoj Uniji (EU) i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je oko 20000 t. Konstantno izlaganje bakterija malim koncentracijama antibiotika uslovljava pojavu rezistentnosti, čime se ugrožava zdravlje čoveka jer se sve veći broj infekcija ne može lečiti postojećim antibioticima (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Poznato je, na primer, da se u bolnicama često javljaju infekcije izazvane *Klebsiellae* sojem bakterija. Istraživanja su pokazala da je 90% soja otporno na antibiotik ampicilin, a da 6% soja ispoljava višestruku rezistentnost (Hirsch *et al.* 1999). Ispitivanje prisustva bakterija u komunalnim otpadnim vodama je pokazalo da se više od 95% bakterija ukloni tokom procesa prečišćavanja, ali da većina preostalih bakterija ispoljava rezistentnost (Radtke and Gist 1989; Malik and Ahmad 1994). Ispitivana je kontaminacija reka i jezera koliformnim bakterijama i utvrđeno je da iako je količina bakterija mnogo manja nego u otpadnim vodama, izolovani sojevi pokazuju gotovo identičnu rezistentnost kao sojevi iz otpadnih voda (Alvero 1987; Al-Ghazali *et al.* 1988; Campeau *et al.* 1996). Zabrinjavajuća je činjenica da je više od 70% bakterijskih sojeva neosetljivo na barem jedan antibiotik, a mnogi pokazuju višestruku rezistentnost. Smatra se da je najviše rezistentnosti stvoreno prema penicilinima, posebno ampicilinu, a zatim tetraciklinima i makrolidima, kao što je eritromicin (Hirsch *et al.* 1999).

Pored antibiotika, prisustvo drugih lekova u vodi takođe može predstavljati problem. Ukoliko je čovek, putem vode za piće, neprekidno izložen malim koncentracijama raznovrsnih lekova, može doći do povećanja toksičnosti leka, tj. gubitka tolerancije čoveka prema toj hemijskoj supstanci i pojave negativnih simptoma. Posebno su značajni antiinflamatorni lekovi i regulatori masti, zbog učestalosti njihovog korišćenja (Petrović *et al.* 2005). Problem predstavljaju i lekovi koji se prepisuju za niz psiholoških poremećaja, jer mogu imati negativan uticaj na funkciju nervnog sistema. Mnoge studije su pokazale negativan uticaj otpadnih voda iz bolnica na vodene organizme i pojavu toksičnosti (Hernando *et al.* 2006). Tako je, na primer, uočena pojava toksičnosti leka diklofenaka pri konstantnom izlaganju riba koncentraciji od $500 \mu\text{g dm}^{-3}$ tokom 28 dana (Robinson *et al.* 2007).

Prisustvo hormona u vodenoj sredini izaziva ozbiljne posledice kod raznih vodenih organizama. Uočene su promene u razvoju i reproduktivnim funkcijama riba i vodozemaca, kao što su smanjenje plodnosti i feminizacija mužjaka, pri koncentracijama od nekoliko ng dm^{-3} (Jørgensen and Halling-Sørensen 2000).

Površinske i podzemne vode su glavni izvor pijaće vode širom sveta. Tragovi lekova koji se ne uklone kvantitativno u procesima prečišćavanja voda i koji prođu kroz prirodne procese prečišćavanja mogu se očekivati u vodi za piće. I pored toga, lekovi su veoma retko detektovani u pijaćoj vodi. Zbog ograničenog znanja o unosu, degradaciji i posledicama prisustva lekova u životnoj sredini, još uvek ne postoje zakonski regulisani maksimalno dozvoljeni nivoi za tragove lekova u pijaćoj vodi, niti zakonski propisi o njihovom monitoringu (Zwiener 2007).

2.6. LEKOVI DETEKTOVANI U PRIRODNOJ I PIJAĆOJ VODI

S obzirom na to da se u većim evropskim zemljama lekovi koriste u količinama od nekoliko stotina tona godišnje (Nikolaou *et al.* 2007), a da se tokom procesa prečišćavanja otpadnih voda lekovi nepotpuno eliminišu (Ternes 1998), zagađenje prirodnih voda antibioticima i drugim farmaceutskim proizvodima je očekivano. Istraživanja sprovedena tokom poslednje decenije su pokazala da je više od 80 aktivnih sastojaka različitih grupa lekova prisutno u prečišćenim otpadnim vodama, površinskim i podzemnim vodama, kao i vodi za piće, u koncentracijama od ng dm^{-3} do mg dm^{-3} (Halling-Sørensen *et al.* 1998; Ternes 1998; Sacher *et al.* 2001; Ternes *et al.* 2001; Heberer 2002; Kolpin *et al.* 2002; Hilton and Thomas 2003; Petrović *et al.* 2003; Carballa *et al.* 2004; Renew and Huang 2004).

U tabeli 1 su sumarno prikazani rezultati ispitivanja voda u svetu i koncentracije odabranih lekova, detektovanih u otpadnim vodama pre i posle prečišćavanja, kao i površinskim i podzemnim vodama. Najčešće detektovani lekovi u vodenoj sredini su antiepileptik karbamazepin, antibiotici sulfametoksazol i eritromicin, zatim trimetoprim, kao i analgoantipiretici ibuprofen, diklofenak, acetilsalicilna kiselina i paracetamol.

Prvi radovi o prisustvu lekova u otpadnim i površinskim vodama su objavljeni u Sjedinjenim Američkim Državama sedamdesetih godina (Tabak and Bunch 1970; Hignite and Azarnoff 1977). Međutim, tada se mnogo više pažnje posvećivalo hormonima kao zagađujućim supstancama u životnoj sredini. Tragovi lekova u životnoj sredini postali su predmet velikog interesovanja naučne javnosti tek kada je uspostavljena direktna veza između prisustva aktivnih supstanci leka u prirodnim vodama i poremećaja kod riba (Purdom *et al.* 1994; Jobling *et al.* 1998). Jedna od prvih studija o zastupljenosti tragova lekova u vodenoj sredini objavljena je 1985. godine (Richardson and Bowron 1985). Ipak, intenzivnija ispitivanja zagađenja prirodnih voda ostacima lekova, sa nedvosmislenom potvrdom, su sprovedena tokom poslednjih deset godina. Nacionalna studija o prisustvu lekova u vodenim tokovima SAD-a pokazala je da 80% analiziranih uzoraka sadrži tragove farmaceutskih jedinjenja (Kolpin *et al.* 2002). U 139 uzoraka površinskih voda detektovano je oko 95 farmaceutskih supstanci, uključujući antibiotike, analgetike, lekove za srce i steroide u koncentracijama manjim od mg dm^{-3} . Ispitivani vodeni tokovi su pod direktnim uticajem otpadnih voda, nizvodno od urbanih područja i stočnih farmi. U uzorcima površinskih voda u Ontariju, Kanadi, u koje se ulivaju gradske otpadne vode i vode sa poljoprivrednog zemljišta, pronađeni su karbamazepin, trimetoprim i eritromicin (Hao *et al.* 2006). Karbamazepin je detektovan u svim uzorcima voda. S obzirom na to da se ovaj lek isključivo koristi u humanoj medicini, jedino objašnjenje za njegovo prisustvo u vodi sa poljoprivrednog zemljišta je korišćenje aktivnog mulja iz procesa prečišćavanja otpadnih voda kao đubriva. Pored karbamazepina, u površinskim vodama u Kanadi često su detektuju i antiinflamatorni lekovi (acetilsalicilna kiselina, diklofenak i ibuprofen) u koncentracijama reda veličine ng dm^{-3} (Miao *et al.* 2002). U nedavnoj studiji, u vodi sa poljoprivrednog zemljišta koje je navodnjavano prečišćenom otpadnom vodom, pronađeni su antiinflamatorni lekovi (Pedersen *et al.* 2005). U 44% uzoraka rečne vode u Koreji detektovani su tragovi lekova, i to u 17% uzoraka uzvodno od izlivanja otpadnih voda i 53% nizvodno od izliva. U ove reke se ulivaju prečišćene otpadne industrijske vode. Najčešće su detektovani paracetamol, ibuprofen i karbamazepin, u više od 80% uzoraka (Kim *et al.* 2007). U reci Elbe u Nemačkoj detektovani su diklofenak, ibuprofen, karbamazepin i niz antibiotika, u opsegu koncentracija $20\text{--}140 \text{ ng dm}^{-3}$ (Weigel *et al.* 2004). Ibuprofen, diklofenak, trimetoprim, sulfametoksazol i karbamazepin su pronađeni u rekama u Švedskoj u koncentraciji od $0,12\text{--}2,2 \text{ } \mu\text{g dm}^{-3}$ (Benz *et al.* 2005).

Tabela 1. Lekovi detektovani u otpadnim, površinskim i podzemnim vodama.

LEK	KONCENTRACIJA LEKA (ng dm ⁻³)				LITERATURA	
	otpadne vode	prečišćene otpadne vode	površinske vode	podzemne vode		
SEDATIVI						
Karbamazepin		3700	25		Ternes 1998	
		100–800	30–250		Öllers <i>et al.</i> 2001	
				900	Sacher <i>et al.</i> 2001	
		2100	250		Ternes <i>et al.</i> 2001	
		870–1200			Andreozzi <i>et al.</i> 2003	
	426	367	0,7		Miao and Metcalfe 2003a	
			10–150	10–150	Stolker <i>et al.</i> 2004	
	420	410	30		Gros <i>et al.</i> 2006a	
			0,20–16		Hao <i>et al.</i> 2006	
			1		Lissemore <i>et al.</i> 2006	
	350	130			Gómez <i>et al.</i> 2007	
		226	4,5–61		Kim <i>et al.</i> 2007	
			9–37		Pedrouzo <i>et al.</i> 2007	
	Diazepam		40		Ternes 1998	
ANTIBIOTICI						
Sulfametoksazol			480		Hirsch <i>et al.</i> 1998	
		300–1500	30–85		Hartig <i>et al.</i> 1999	
		400		470	Hirsch <i>et al.</i> 1999	
				220	Lindsey <i>et al.</i> 2001	
				410	Sacher <i>et al.</i> 2001	
			1900		Kolpin <i>et al.</i> 2002	
		50–90			Andreozzi <i>et al.</i> 2003	
		243			Miao <i>et al.</i> 2004	
			10–100	10–100	Stolker <i>et al.</i> 2004	
		1300			Batt and Aga 2005	
	590	390	–		Gros <i>et al.</i> 2006a	
			2,8		Lissemore <i>et al.</i> 2006	
		95–320			Botitsi <i>et al.</i> 2007	
		136	20		Kim <i>et al.</i> 2007	
		18–23			Zhang and Zhou 2007	
	Trimetoprim			120		Hirsch <i>et al.</i> 1998
					870	Hirsch <i>et al.</i> 1999
			150		Kolpin <i>et al.</i> 2002	
		40–130			Andreozzi <i>et al.</i> 2003	
		128	12		Ashton <i>et al.</i> 2004	
		140			Batt and Aga 2005	
1172		290	11		Gros <i>et al.</i> 2006a	
			0,60–2,0		Hao <i>et al.</i> 2006	
			2,7		Lissemore <i>et al.</i> 2006	
		12–180			Botitsi <i>et al.</i> 2007	
		58	3,2–5,3		Kim <i>et al.</i> 2007	
Eritromicin			620		Hirsch <i>et al.</i> 1998	
				240	Hirsch <i>et al.</i> 1999	
				49	Sacher <i>et al.</i> 2001	
			1700		Kolpin <i>et al.</i> 2002	
		109	159		Ashton <i>et al.</i> 2004	
		80			Miao <i>et al.</i> 2004	
			10–100	10	Stolker <i>et al.</i> 2004	
	200	80	–		Yang and Carlson 2004	
			1,9–6,9		Hao <i>et al.</i> 2006	
			5,6		Lissemore <i>et al.</i> 2006	
		130	3,4		Kim <i>et al.</i> 2007	
Azitromicin	152	96	8	Gros <i>et al.</i> 2006a		
Doksiciklin		38		Miao <i>et al.</i> 2004		
		7,8		Lissemore <i>et al.</i> 2006		

Tabela 1. (nastavak)

LEK	KONCENTRACIJA LEKA (ng dm ⁻³)				LITERATURA
	otpadne vode	prečišćene otpadne vode	površinske vode	podzemne vode	
ANALGOANTIPIRETICI					
Ibuprofen				70	Ternes 1998
		870–85000	2700		Farré <i>et al.</i> 2001
		5–1500	5–80		Öllers <i>et al.</i> 2001
			200		Kolpin <i>et al.</i> 2002
		50–7110			Andreozzi <i>et al.</i> 2003
	3800				Hilton and Thomas 2003
		4201	1105		Ashton <i>et al.</i> 2004
	5533	–			Quintana and Reemtsma 2004
	516	266	60		Gros <i>et al.</i> 2006a
	84000	7100			Gómez <i>et al.</i> 2007
		65	28		Kim <i>et al.</i> 2007
			18–44		Pedrouzo <i>et al.</i> 2007
Diklofenak			150		Ternes 1998
			28–392		Ahrer <i>et al.</i> 2001
		100–700	20–150		Öllers <i>et al.</i> 2001
				590	Sacher <i>et al.</i> 2001
	3020	2510			Heberer 2002
		680–5450			Andreozzi <i>et al.</i> 2003
		599	154		Ashton <i>et al.</i> 2004
			10	10	Stolker <i>et al.</i> 2004
	2333	1561	272		Quintana and Reemtsma 2004
	250	215	29		Gros <i>et al.</i> 2006a
		40–110			Botitsi <i>et al.</i> 2007
	1500	900			Gómez <i>et al.</i> 2007
		40	3,0		Kim <i>et al.</i> 2007
			25–41		Pedrouzo <i>et al.</i> 2007
			3–68		Zhang and Zhou 2007
Acetilsalicilna kiselina		220	25		Ternes 1998
	13000				Farré <i>et al.</i> 2001
			25–100	25–100	Stolker <i>et al.</i> 2004
	1561	92	1098		Quintana and Reemtsma 2004
			13–19		Pedrouzo <i>et al.</i> 2007
Paracetamol			110		Kolpin <i>et al.</i> 2002
	10194	2102	42		Gros <i>et al.</i> 2006a
	84000	220			Gómez <i>et al.</i> 2007
		1,8–19	4,1–73		Kim <i>et al.</i> 2007
			12–30		Pedrouzo <i>et al.</i> 2007
Metamizol	14000	4900			Gómez <i>et al.</i> 2007

U komunalnim otpadnim vodama nakon prečišćavanja detektovani su tragovi sedativa, analgoantipiretika i antibiotika, u velikom broju istraživanja (Hirsch *et al.* 1999; Ahrer *et al.* 2001; Farré *et al.* 2001; Richardson 2002; Hilton and Thomas 2003; Miao and Metcalfe 2003c; Petrović *et al.* 2003; Göbel *et al.* 2004; Miao *et al.* 2004; Renew and Huang 2004; Batt and Aga 2005). Svega nekoliko radova se bavi prisustvom lekova u otpadnim vodama iz bolnica, pri čemu je najveća pažnja posvećena antibioticima (Lindberg *et al.* 2004), ali su u značajnijim koncentracijama detektovani i diklofenak i karbamazepin (Gómez *et al.* 2006).

Lekovi su takođe detektovani u podzemnoj i pijaćoj vodi, sedimentima i zemljištu (Ternes 1998, 2001; Miao and Metcalfe 2003a). Ipak, lekovi su mnogo više rasprostranjeni u površinskim vodama, nego u podzemnim, zbog toga što su površinske vode pod većim uticajem otpadnih voda (Zwiener 2007). U pijaćoj vodi, aktivne supstance lekova su detektovane veoma retko, u svega nekoliko slučajeva (Heberer 2002; Zwiener 2007). S obzirom na to da se lekovi u pijaćoj vodi javljaju u koncentracijama manjim od ng dm^{-3} , razlog retke detekcije može biti i nedovoljno niska granica detekcije korišćene analitičke metode. Farmaceutska jedinjenja koja su pronađena u vodi za piće su jedinjenja koja imaju veliku hemijsku stabilnost, nisku biodegradabilnost i niski koeficijent adsorpcije. Ova jedinjenja prolaze neizmenjena kroz procese biodegradacije i adsorpcije na aktivnom mulju u procesima prečišćavanja otpadnih voda, zatim kroz procese biodegradacije, fotolize i adsorpcije na suspendovanim česticama u površinskim vodama, biodegradaciju i adsorpciju tokom filtracije vode na rečnim obalama i kroz podzemni tok vode, kao i kroz razne stupnjeve prečišćavanja vode za piće. U pijaćoj vodi u Nemačkoj, Italiji, Engleskoj, SAD-u i Kanadi detektovani su antiepileptik karbamazepin (maksimalna koncentracija 258 ng dm^{-3}) i analgoantipiretici diklofenak (6 ng dm^{-3}) i ibuprofen (3 ng dm^{-3}) (Hummel *et al.* 2006; Dorne *et al.* 2007; Zwiener 2007). U pijaćoj vodi pronađeni su i acetilsalicilna kiselina ($25\text{--}100 \text{ ng dm}^{-3}$) i antibiotik sulfametoksazol (manje od 25 ng dm^{-3}) (Stolker *et al.* 2004).

Antiinflamatorni lekovi (analgetici i antipiretici) se konzumiraju u velikim količinama, zbog čega se često detektuju u vodenoj sredini u značajnim koncentracijama (Ternes 1998; Stumpf *et al.* 1999; Heberer 2002). Sa ekološkog stanovišta spadaju u najznačajnije farmaceutski aktivne supstance. Acetilsalicilna kiselina i paracetamol su dva najpopularnija analgoantipiretika, koji se godišnje prodaju u količinama od oko 500 t u većim evropskim zemljama. *Acetilsalicilna kiselina* se veoma lako degraduje u mnogo aktivniji oblik – salicilnu kiselinu, koja se zapravo detektuje u životnoj sredini. Međutim, salicilna kiselina ne mora isključivo poticati od acetilsalicilne kiseline. Naime, salicilna kiselina se često koristi za konzerviranje hrane, pa je ovo još jedan značajan izvor njene pojave u vodenoj sredini (Heberer 2002). *Paracetamol* (ili acetaminofen) se lako degraduje i uklanja u procesima prečišćavanja otpadnih voda. Uprkos velikom unosu, efikasnost prečišćavanja za paracetamol je izuzetno visoka – oko 99% (Gómez *et al.* 2007). U ispitivanjima otpadnih i površinskih voda u Nemačkoj detektovan je u manje od 10% otpadnih voda, a nije detektovan u rečnoj vodi (Ternes 1998). U ispitivanjima 139 uzoraka površinskih voda u SAD-u, pod uticajem gradskih otpadnih voda, paracetamol je pronađen u 17% uzoraka pri srednjoj koncentraciji od 110 ng dm^{-3} (Kolpin *et al.* 2002).

U većim evropskim zemljama se godišnje proda oko 75 t *diklofenaka* (Heberer 2002), dok se u svetu godišnje proizvede nekoliko stotina tona ovog leka (Botitsi *et al.* 2007). Ovaj analgoantipiretik se smatra jednim od najznačajnijih lekova u vodenoj sredini. Spada u lekove koji je najlošije uklanja u procesima prečišćavanja otpadnih voda (Tixier *et al.* 2003). Efikasnost eliminacije od svega 17% upućuje na njegovu postojanost tokom procesa prečišćavanja, što je potvrđeno istraživanjima koje su sprovedi Buser *et al.* (1998) i Stumpf *et al.* (1999). Diklofenak je često detektovan u otpadnim i površinskim vodama u Austriji

(Ahner *et al.* 2001), Brazilu (Stumpf *et al.* 1999), Nemačkoj (Ternes 1998), Španiji (Farré *et al.* 2001), Švajcarskoj (Öllers *et al.* 2001) i SAD-u (Kolpin *et al.* 2002), u maksimalnoj koncentraciji od nekoliko desetina $\mu\text{g dm}^{-3}$. Ipak, uočena je veoma brza i intenzivna fotolitička degradacija diklofenaka u prirodnim vodama (Buser *et al.* 1998), što su potvrdili i rezultati monitoringa površinskih voda u Nemačkoj (Sacher *et al.* 2001).

U Brazilu, Nemačkoj i Švajcarskoj, *ibuprofen* je detektovan u otpadnim i površinskim vodama u koncentracijama nižim od onih za diklofenak (Ternes 1998; Stumpf *et al.* 1999; Öllers *et al.* 2001). S obzirom na to da se u većim evropskim zemljama godišnje proda oko 180 t ovog leka (Heberer 2002), niže koncentracije mogu se objasniti efikasnom eliminacijom u procesima prečišćavanja otpadnih voda – do 75% (Ternes 1998; Stumpf *et al.* 1999). Iako su drugi autori utvrdili još viši procenat otklanjanja, oko 95% (Metcalf *et al.* 2003; Roberts and Thomas 2006; Gómez *et al.* 2007), koncentracije ibuprofena u tretiranim otpadnim vodama su i dalje veoma visoke, reda veličine $\mu\text{g dm}^{-3}$ (Gómez *et al.* 2007). Slične prosečne koncentracije su detektovali i drugi autori u prečišćenim otpadnim vodama (Metcalf *et al.* 2003; Ashton *et al.* 2004; Bendz *et al.* 2005; Santos *et al.* 2005). Ibuprofen se smatra jednim od najčešće detektovanih lekova u površinskim vodama (Ashton *et al.* 2004; Weigel *et al.* 2004; Comoretto and Chiron 2005; Roberts and Thomas 2006), iako se izluči u obliku polaznog jedinjenja u svega 15% i u najvećem procentu uklanja u procesu prečišćavanja (Tixier *et al.* 2003). Značajno prisustvo u prirodnim vodama može se objasniti velikim konzumiranjem ibuprofena i postojanošću u vodenj sredini (Ternes 1998; Buser *et al.* 1998; Farré *et al.* 2001; Öllers *et al.* 2001; Kolpin *et al.* 2002).

Metamizol (ili dipiron) je antiinflamatorni lek, zabranjen za upotrebu u SAD-u, Engleskoj i Švedskoj. U Nemačkoj, Italiji i Španiji je, međutim, u širokoj upotrebi. Često se koristi u bolnicama, zbog čega je jedan od lekova pronađenih u visokim koncentracijama u otpadnim bolničkim vodama. Visoka koncentracija metamizola u sirovoj, neprerađenoj otpadnoj vodi objašnjava se blizinom bolnica. Efikasnost eliminacije u procesima prečišćavanja iznosi oko 71%, a u prečišćenim otpadnim vodama detektovano je prosečno $4,9 \mu\text{g dm}^{-3}$ metamizola (Gómez *et al.* 2007).

O prisustvu i degradaciji **antibiotika** u otpadnim i površinskim vodama sprovedeno je nekoliko obimnih istraživanja u Nemačkoj (Hirsch *et al.* 1999), SAD-u (Lindsey *et al.* 2001; Kolpin *et al.* 2002) i Kanadi (Miao *et al.* 2004). Pronađeni su makrolidni antibiotici (eritromicin), sulfonamidi (sulfametoksazol) i trimetoprim, u koncentracijama od nekoliko $\mu\text{g dm}^{-3}$. U uzorcima površinskih, podzemnih i otpadnih voda u Nemačkoj nisu detektovani penicilini niti tetraciklini (Hirsch *et al.* 1999). Ovo nije iznenađujuće kada se zna da penicilini zbog hemijske nestabilnosti β -laktamskog prstena brzo hidrolizuju, a da se tetraciklini lako talože sa katjonima, kao što je Ca^{2+} (Vartanian *et al.* 1998) i akumuliraju u sedimentima i mulju. Ipak, Lindsey *et al.* (2001), Kolpin *et al.* (2002) i Miao *et al.* (2004) su detektovali tetracikline u otpadnim i površinskim vodama.

Posle penicilina, *makrolidi* su drugi najčešće korišćeni antibiotici u Kanadi, posebno klaritromicin, a zatim azitromicin i eritromicin. Eritromicin je detektovan u svim uzorcima prečišćenih otpadnih voda u Kanadi (Miao *et al.* 2004). S obzirom na to da eritromicin lako gubi jedan molekul vode, u životnoj sredini se uglavnom detektuje u obliku svog dehidratacionog proizvoda (Hirsch *et al.* 1999).

Sulfonamidi su otporni na degradaciju i dovoljno hidrofilni da dospeju u životnu sredinu. Sulfametoksazol je detektovan u svim ispitivanim otpadnim vodama u Kanadi (Miao *et al.* 2004), a u vodenim tokovima u SAD-u učestalost detekcije je bila 19% (Kolpin *et al.* 2002). Često je detektovan u prečišćenim otpadnim vodama u Nemačkoj, pri maksimalnoj koncentraciji od $2,0 \mu\text{g dm}^{-3}$ (Hirsch *et al.* 1999). U otpadnim i površinskim vodama u

Nemačkoj ispitivano je prisustvo 13 sulfonamida (Hartig *et al.* 1999). Sulfametoksazol je detektovan u koncentraciji od $1500 \mu\text{g dm}^{-3}$ u prečišćenim otpadnim vodama, i u koncentraciji od $0,030\text{--}0,085 \mu\text{g dm}^{-3}$ u površinskim vodama. Često je detektovan i u podzemnim vodama, u koncentraciji od $0,22 \mu\text{g dm}^{-3}$ u SAD-u (Lindsey *et al.* 2001) i $0,41\text{--}0,47 \mu\text{g dm}^{-3}$ u Nemačkoj (Hirsch *et al.* 1999; Sacher *et al.* 2001). Sulfametoksazol se veoma često koristi u kombinaciji sa trimetoprimom (lek Baktrim), zbog čega se i trimetoprim često detektuje u vodenoj sredini. *Trimetoprim* je jedan od najčešće detektovanih neutralnih lekova u životnoj sredini. Pronađen je u prečišćenim otpadnim vodama, kao i površinskoj vodi (Miao *et al.* 2004).

Pored otpadnih (Hirsch *et al.* 1999), površinskih i podzemnih voda (Sacher *et al.* 2001; Kolpin *et al.* 2002), antibiotici su detektovani i u sedimentima, zemljištu i stajskom đubrivu (Hamscher *et al.* 2002; Pfeifer *et al.* 2002).

Najčešće detektovan **sedativ** u komunalnim otpadnim i površinskim vodama i jedan od najrasprostranjenijih lekova u vodenoj sredini Evrope je antiepileptik *karbamazepin* (Ternes 1998; Ahrer *et al.* 2001; Öllers *et al.* 2001; Sacher *et al.* 2001; Tixier *et al.* 2003; Weigel *et al.* 2004; Comoretto and Chiron 2005). Ispitivanja su pokazala da se ne otklanja značajno tokom prečišćavanja otpadnih voda (manje od 10%) (Ternes 1998; Ternes *et al.* 2002a; Tixier *et al.* 2003). Mnoge studije su pokazale da se ne zadržava ni tokom prirodne filtracije na rečnim obalama, zbog čega je detektovan u brojnim uzorcima podzemnih voda u maksimalnoj koncentraciji od $1,1 \mu\text{g dm}^{-3}$ (Sacher *et al.* 2001). Iako se karbamazepin lako metaboliše i izluči svega 2–3% u neizmenjenom obliku, samo jedinjenje je definisano kao najpostojanije u procesima prečišćavanja otpadnih i površinskih voda i može se koristiti kao indikator urbanog zagađenja (Clara *et al.* 2004). Interesantno je da su neka istraživanja pokazala povećanje koncentracije karbamazepina nakon prečišćavanja otpadnih voda, što se može objasniti ponovnim formiranjem karbamazepina iz njegovih metabolita (Vieno *et al.* 2006). Od ostalih sedativa, *diazepam* je pronađen u površinskim vodama u Italiji (Calamari *et al.* 2003).

Konačno, postavlja se pitanje pouzdanosti navedenih podataka o prisustvu tragova lekova u vodama. Naime, u većini navedenih istraživanja analiti su detektovani prema kriterijumima koji se u poslednjih par godina smatraju nedovoljno pouzdanim. Problem „lažnih“ pozitivnih rezultata biće razmatran na konkretnim primerima nastalim tokom izrade ovog rada.

2.7. LEKOVI ODABRANI ZA ANALIZU

Za upotrebu u humanoj medicini i veterini registrovano je oko 3000 različitih farmaceutskih supstanci sa veoma različitim hemijskim strukturama (Ternes 2001; Hilton and Thomas 2003). S obzirom na ovako veliki broj jedinjenja, kojima treba dodati i ogroman broj metabolita, nemoguće je razviti metodu za posmatranje svih ovih supstanci u životnoj sredini. Zato je u razvoju analitičke metode neophodno napraviti izbor ekološki relevantnih jedinjenja, tj. odabir supstanci koje potencijalno predstavljaju problem u životnoj sredini. Farmaceutske supstance koje će biti analizirane odabrane su, pre svega, na osnovu velike količine koja se godišnje proda u beogradskim apotekama. Zatim, uzeta je u obzir i stabilnost posmatrane supstance tokom metabolizma, kao i otpornost na degradaciju u životnoj sredini. Na ovaj način odabrana su jedinjenja koja imaju veliki potencijal za ulazak u životnu sredinu u neizmenjenom obliku. Takođe, vodilo se računa o tome da u istraživanje budu uključeni predstavnici svih grupa antibiotika koje se najčešće koriste u našoj zemlji. Odabrano je devetnaest farmaceutski aktivnih supstanci, koje su osnovni sastojci lekova koji spadaju među najčešće korišćene u Srbiji. Iako je ovih 19 jedinjenja samo mali deo onoga što se koristi, ona predstavljaju početak za ovakva istraživanja. Odabrane supstance, kao i nazivi lekova u čiji sastav ulaze i farmakološke grupe kojima pripadaju, prikazane su u tabeli 2.

Antibiotici su jedinjenja koja inhibiraju rast ili uništavaju mikroorganizme, pre svega bakterije, u organizmu čoveka i životinja, a pritom su selektivno toksična, tj. ne oštećuju sam organizam. Pod antibioticima su se nekada podrazumevala isključivo prirodna jedinjenja, nastala kao proizvod metabolizma bakterija i gljivica. Nakon proizvodnje hemijski modifikovanih antibiotika, definicija je proširena i na polusintetske lekove. U antibiotike su se tako ubrajali penicilini, tetraciklini, makrolidi, aminoglikozidi i amfenikoli. Danas antibiotici uključuju i sintetske lekove (sulfonamide, hinoline, nitrofurane, nitroimidazole, itd.), pa se generalno antibiotikom smatra svaki antibakterijski lek (Gentili *et al.* 2005).

Postoji više načina klasifikacije antibiotika, ali sa analitičkog stanovišta najkorisnija je podela na osnovu hemijske strukture na sedam grupa, pri čemu prve četiri grupe spadaju u najčešće korišćene (Díaz-Cruz and Barceló 2005; Granelli and Branzell 2007):

1. β -laktami (penicilini, cefalosporini);
2. sulfonamidi;
3. makrolidi;
4. tetraciklini;
5. aminoglikozidi;
6. glikopeptidi;
7. linkozamidi.

β -Laktami predstavljaju važnu grupu antibiotika koja se intenzivno koristi u medicini i veterini za lečenje i prevenciju bakterijskih infekcija. Obuhvataju nekoliko podgrupa, od kojih su penicilini i cefalosporini najvažniji. Iako su urađene brojne studije o zastupljenosti penicilina u otpadnim (Ternes 2001), površinskim (Hirsch *et al.* 1998) i podzemnim vodama (Sacher *et al.* 2001), ovi lekovi nikada nisu detektovani. Ovo se može objasniti brzom degradacijom u životnoj sredini, uz pomoć enzima β -laktamaza (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Pošto je poznato da β -laktamski antibiotici često izazivaju alergijske reakcije kod osetljivih ljudi, neophodno je ispitivati postojanje tragova ovih lekova u vodi. Pored prirodnih penicilina, polusintetska jedinjenja su od velikog značaja, zbog toga što su manje podložna dejstvu β -laktamaza, i time stabilnija u životnoj sredini (Rabbolini *et al.* 1998).

Tabela 2. Odabrane farmaceutski aktivne supstance, nazivi lekova u čiji sastav ulaze i farmakološke grupe kojima pripadaju.

FARMACEUTSKI AKTIVNA SUPSTANCA	NAZIV LEKA	FARMAKOLOŠKA GRUPA
ANTIBIOTICI		
Ampicilin trihidrat	Ampicilin-Hemofarm, Panfarma; Pentrexyl-Galenika	Penicilinski antibiotik
Amoksicilin trihidrat	Amoksicilin-Hemofarm, Panfarma, Jugoremedija; Sinacilin-Galenika	Penicilinski antibiotik
Cefaleksin	Cefaleksin-Hemofarm, Panfarma; Palitrex-Galenika	Cefalosporinski antibiotik
Sulfametoksazol+trimetoprim	Trimosul-Hemofarm, Panfarma; Bactrim-Galenika	Kombinacije sulfonamida sa trimetoprimom
Eritromicin etilsukcinat	Eritromicin-Hemofarm, Zorka Pharma, Jugoremedija	Makrolidni antibiotik
Azitromicin	Hemomycin-Hemofarm	Makrolidni antibiotik
Doksiciklin	Doksiciklin-Hemofarm, Panfarma, Jugoremedija; Dovicin-Galenika	Tetraciklinski antibiotik
SEDATIVI		
Diazepam	Diazepam-Hemofarm, Panfarma, Jugoremedija; Bensedin-Galenika	Benzodiazepinski anksiolitik
Bromazepam	Bromazepam-Hemofarm	Benzodiazepinski anksiolitik i mišićni relaksant
Lorazepam	Lorazepam-Hemofarm, Zorka Pharma	Benzodiazepinski anksiolitik
Karbamazepin	Karbapin-Hemofarm, Panfarma; Galepsin-Galenika; Tegretol-Novartis	Antikonvulziv, antiepileptik
Fenobarbiton	Phenobarbiton-Hemofarm, Panfarma; Fenobarbiton-Galenika	Antikonvulziv, antiepileptik
ANALGOANTIPIRETICI		
Ibuprofen	Ibuprofen- Hemofarm, Panfarma, Jugoremedija; Brufen-Galenika	Nesteroidni antireumatik, analgoantipiretik
Paracetamol	Febricet-Hemofarm, Panfarma; Miralgin-Hemofarm; Paracetamol-Jugoremedija, Galenika; Caffetin-Galenika	Analgoantipiretik
Metamizol natrijum	Baralgin-Jugoremedija; Novalgetol-Galenika; Analgin-Alkaloid	Analgoantipiretik i spazmolitik
Flurbiprofen	Flugalin-Galenika	Antireumatik
Acetilsalicilna kiselina	Midol-Hemofarm, Panfarma; Acetysal-Jugoremedija; Acetisal pH 8, Anbol-Galenika	Analgoantipiretik
Diklofenak natrijum	Diklofenak-Hemofarm, Panfarma, Jugoremedija; Diklofen-Galenika	Nesteroidni antireumatik, antiinflamatorno sredstvo

Sulfonamidi su grupa sintetskih antibiotika koji se koriste u humanoj medicini i veterini za prevenciju i lečenje bolesti, ali i kao dodaci hrani da bi pospešili rast životinja. Spadaju u najčešće korišćene lekove u veterini, zbog niske cene, širokog spektra dejstva i efikasnosti u pospešivanju rasta. Široka upotreba sulfonamida dovela je do akumulacije u mesu, jajima i mleku, kao i ribi (Hartig *et al.* 1999). Prisustvo tragova ovih lekova u hrani ili vodi predstavlja ozbiljan toksikološki problem, jer neki od njih prouzrokuju alergijske reakcije (Gentili *et al.* 2005). Sulfonamidi su veoma otporni na degradaciju i dovoljno hidrofilni da dospeju u vodenu sredinu (Díaz-Cruz and Barceló 2005; Botitsi *et al.* 2007). U kombinaciji sa sulfametoksazolom veoma često se koristi *trimetoprim* (obično u odnosu 5:1), zbog čega je potrebno pratiti i tragove ovog leka u vodenoj sredini (Renew and Huang 2004).

Makrolidi su važna grupa prirodnih antibakterijskih supstanci koje se široko koriste u humanoj medicini i veterini. Primarno ih biosintetišu zemljišni mikroorganizmi, posebno *Streptomicee*, ali i gljivice i biljke. Antibiotik eritromicin je prvi put izolovan 1952. god. iz *Saccharopolyspora erythraea*, a potpuna hemijska sinteza je postignuta samo jednom, 1981. god. (Gates *et al.* 1999). Tragovi ovih lekova detektovani su u rečnoj i podzemnoj vodi, kao i u prečišćenim otpadnim vodama u nekoliko istraživanja sprovedenih u Nemačkoj (Hirsch *et al.* 1998, 1999; Sacher *et al.* 2001), Švajcarskoj (McArdell *et al.* 2003; Göbel *et al.* 2004), SAD-u (Kolpin *et al.* 2002; Yang and Carlson 2004) i Kanadi (Miao and Metcalfe 2003b; Miao *et al.* 2004). U našoj zemlji, ali i svetu, najviše se koriste eritromicin i azitromicin. Prilikom analize uzoraka površinskih voda eritromicin se često detektuje u obliku degradacionog proizvoda koji nastaje gubitkom jednog molekula vode. Naime, eksperimenti su pokazali da se ovaj gubitak javlja pri vrednosti $\text{pH} < 7$, a poznato je da nakon konzumiranja eritromicin prolazi kroz veoma kisele uslove u stomaku. Ipak, degradacioni proizvod više ne ispoljava antibiotička svojstva (Hirsch *et al.* 1999).

Tetraciklini su polusintetski antibiotici širokog spektra dejstva, koji se koriste u humanoj medicini i veterini za tretiranje mnogih oboljenja, ali i kao aditivi za pospešivanje rasta životinja (Gentili *et al.* 2005). Jako se adsorbuju na organskoj materiji, zbog čega dugo mogu ostati u zemljištu ili biti transportovani u površinske vode putem suspendovanih čestica (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Interes za tetracikline se povećao kada je otkriveno da se prilikom sinteze struktura može modifikovati bez smanjenja biološke aktivnosti, što je dovelo do intenzivnog traženja novih i efikasnijih modifikovanih tetraciklinskih antibiotika (Vartanian *et al.* 1998).

Sedativi su lekovi koji deluju kao depresori centralnog nervnog sistema i prouzrokuju pospanost i različite nivoe umirenja, u zavisnosti od primenjene doze. Po hemijskom sastavu dele se na benzodiazepinske i nebenzodiazepinske hipnotike, barbiturate i agoniste melatonin receptora. *Benzodiazepini* su supstance sa širokim spektrom terapeutskih upotreba koje prouzrokuju smanjenje psihičke prenapregnutosti i umirenje, uz otklanjanje straha. Koriste se kao sedativi, mišićni relaksanti, anksiolitici i antikonvulzanti (Smyth *et al.* 2000). Njihova upotreba je počela 1960. god. i od tada je konstantan razvoj novih lekova sa bržim delovanjem i manje aktivnim metabolitima (Smink *et al.* 2004). Najčešće korišćen benzodiazepin je diazepam. Bromazepam ima najveći potencijal u zloupotrebi zbog izuzetno brzog dejstva (Chèze *et al.* 2004). Karbamazepin je veoma važan lek za epilepsiju, jednu od najčešćih bolesti centralnog nervnog sistema. Izuzetno je efikasan i siguran kao antikonvulzant, zbog čega danas zamenjuje veoma često korišćeni fenobarbiton (Miao and Metcalfe 2003a).

Analgoantipiretici su lekovi protiv bolova, koji suzbijaju i povišenu telesnu temperaturu, a većina deluje i antiinflamatorno tj. stišava i zaustavlja proces zapaljenja. Nakon izolovanja salicilne kiseline 1829. god. u širokoj su upotrebi u humanoj medicini i prihvaćeni su kao sigurni lekovi, zbog čega se mogu kupiti i bez recepta (Heberer 2002).

2.8. ANALITIKA LEKOVA – ZAHTEVI I PROBLEMI

Izbor analitičke metode za detekciju lekova u nekom uzorku zavisi, pre svega, od očekivanih koncentracija. Tečna hromatografija visoke performanse (HPLC, engl. high performance liquid chromatography) u kombinaciji sa ultraljubičastim (UV, engl. ultraviolet) ili fluorescentnim detektorom obično se koristi za detekciju lekova u koncentracijama od $\mu\text{g dm}^{-3}$ do mg dm^{-3} . Za detektovanje nižih koncentracija, reda veličine ng dm^{-3} , koriste se hibridne tehnike kao što su gasna hromatografija-masena spektrometrija (GC-MS, engl. gas chromatography-mass spectrometry) i tečna hromatografija visoke performanse u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (HPLC-MS) ili samo LC-MS (Ternes *et al.* 2001). Za postizanje izuzetne osetljivosti i visoke selektivnosti očigledno je neophodna maseno-spektrometrijska detekcija. Međutim, gasna hromatografija se može uspešno primeniti u analizi ograničenog broja lekova. Zbog termičke nestabilnosti i polarnosti značajnog broja lekova, neophodna je njihova derivatizacija pre gasno-hromatografske analize. Na ovaj način, vreme analize se značajno produžava, metoda često nije reproduktivna pri niskim koncentracijama i nastaju neželjeni proizvodi (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Zato je HPLC-MS najpogodnija i najčešće primenjivana tehnika za analizu lekova pri koncentraciji reda veličine ng dm^{-3} . Izuzetno je osetljiva i zahteva manje od 1 pg analita (Miao and Metcalfe 2003a). Selektivnost i osetljivost se povećava korišćenjem tandem masene spektrometrije (MS/MS) koja omogućava nedvosmisleno razlikovanje analita (Lopez de Alda *et al.* 2003). Tako su, na primer, poslednjih godina impresivni napredak u razvoju i primeni doživele LC-MS i LC-MS/MS metode analize antiinflamatornih lekova, zahvaljujući velikoj polarnosti i kiselosti ovih analita, sa pK_a vrednostima u opsegu 4–4,5, i izbegavanju derivatizacionog koraka potrebnog za GC-MS analizu (Farré *et al.* 2007).

Svaki analitički postupak se sastoji od pripreme uzorka, razdvajanja i kvantifikacije analita i analize podataka. Priprema uzoraka je neophodna da bi se analiti izolovali iz matrice, prečistili i koncentrovali. Osnovni zahtevi koje jedna analitička metoda mora da ispunjava su visok prinos (min. 70%), niska granica detekcije (LOD, engl. limit of detection), niska granica kvantifikacije (LOQ, engl. limit of quantification) i visoka reproduktivnost tj. niska relativna standardna devijacija (RSD). Granica detekcije analitičke metode se definiše kao najmanja koncentracija analita koju je moguće pouzdano detektovati. To je uobičajeno ona koncentracija analita pri kojoj je odnos signala i šuma jednak 3, dok je granica kvantifikacije ona koncentracija analita pri kojoj je odnos signala i šuma jednak 10. Takođe je neophodno da odgovor detektora bude linearan, tj. da je dobijeni signal direktno proporcionalan prisutnoj koncentraciji analita. Danas se najčešće koriste tri metode kvantitativne analize: metoda sa eksternim standardima, metoda standardnog dodatka i metoda sa internim standardima (Ahmed 2001). Za multirezidualne metode, u kojima se analiziraju lekovi iz različitih grupa, neophodni su interni standardi za svaku od grupa lekova. Ovo može predstavljati problem, pošto za mnoge grupe lekova ne postoje izotopski analozi (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Zbog toga se u HPLC-MS analizi preporučuje korišćenje tzv. standarda koji odgovaraju matrici (engl. matrix-matched standards). Naime, poznato je da sastojci uzorka tj. matrice mogu značajno da utiču na odziv masenog detektora, u smislu smanjenja ili povećanja signala. Ova pojava se naziva uticaj matrice (engl. matrix effect). Smanjenje signala analita se objašnjava smanjenom jonizacijom analita zbog velikog prisustva sastojaka matrice (Fagerquist *et al.* 2005). Standardi koji odgovaraju matrici pripremaju se tako što slepa proba (uzorak u kojem nisu detektovani tragovi lekova) prolazi kroz proceduru

pripreme uzorka, i u konačno dobijeni ekstrakt (sa sastojcima matrice koji utiču na odgovor detektora) se dodaje standardni rastvor analita. Uticaj matrice se može odrediti kao odnos površine pika analita u „matrix-matched“ standardu i površine pika analita u rastvaraču (npr. metanolu).

U današnje vreme postoji veliki broj analitičkih metoda za određivanje specifičnih grupa lekova, ali postoji potreba za multirezidualnim metodama analize veoma različitih grupa lekova. Prednost metode za detekciju određene grupe analita, ili čak samo jednog analita, je u tome što je moguće optimizovati metodu radi dobijanja maksimalnog prinosa u specifičnoj matrici. Prilikom razvoja multirezidualnih metoda analize različitih grupa jedinjenja, osnovni cilj je analiza što većeg broja analita, dok je optimizacija prinosa metode važan, ali sekundarni cilj. Jedan od problema u razvoju multirezidualnih metoda jeste dobijanje veoma različitih prinosa za analite različitih hemijskih osobina. Kao posledica različite polarnosti, analiti će se različito zadržavati na adsorbensu prilikom pripreme uzorka, što može prouzrokovati gubitak preciznosti i ponovljivosti za neke od njih. Takođe, prisustvo velikog broja analita u jonskom izvoru, može prouzrokovati kompetitivnu jonizaciju. Ponovljivost analitičke metode biće dobra samo za jedinjenja koja su u tom procesu favorizovana. Što su analiti više hemijski različiti, to je teže razviti analitičku metodu za njihovu detekciju u matrici sa prihvatljivim prinosima. Zbog toga je jedan od zahteva u razvoju multirezidualnih analitičkih metoda kompromis u izboru eksperimentalnih uslova, što često znači nemogućnost dobijanja najboljih rezultata za svako od jedinjenja (Gros *et al.* 2006a). Ipak, razvoj multirezidualnih metoda je neophodan zbog toga što njihova primena u svakodnevnim, rutinskim analizama omogućava dobijanje velikih količine podataka nakon samo jedne analize (Díaz-Cruz and Barceló 2005).

Osnovni zahtev u HPLC analizi lekova je izbor odgovarajuće mobilne faze. Sastav mobilne faze mora biti takav da se mogu dobiti reproduktivna retenciona vremena, zadovoljavajući oblici pikova i efikasna jonizacija analita radi povećanja osetljivosti MS detektora. Acetonitril i metanol se najčešće biraju kao organske komponente mobilne faze. Kao aditivi, često se koriste isparljiva jedinjenja, kao što su amonijum-acetat ili mravlja kiselina (Díaz-Cruz and Barceló 2005; Farré *et al.* 2007). Tako se pri analizi anti-inflamatornih lekova, zbog njihovog kiselog karaktera, preporučuje korišćenje rastvora mravlje kiseline ili amonijum-formijata, da bi se dobili dobri oblici pikova analita i povećala retencija u reverzno-faznoj tečnoj hromatografiji. Korišćenjem mravlje ili sirćetne kiseline snižava se pH-vrednost mobilne faze i postiže da se slabo kiseli analiti nalaze u nedisosovanom obliku, što povećava njihovo zadržavanje na hromatografskoj koloni. Međutim, korišćenje kiseline prouzrokuje smanjenje intenziteta signala molekulskog anjona analita koji se koristi za njegovu MS detekciju. Zbog toga se umesto kiseline preporučuje dodatak amonijum-acetata ili amonijum-formijata. Jonski par nastao od amonijum-jona i anjona analita daje dobar oblik hromatografskog pika, a veoma lako disosuje u jonskom izvoru dajući molekulski anjon, zbog čega se intenzitet njegovog signala ne smanjuje (Gómez *et al.* 2006). Iako potpuno hromatografsko razdvajanje analita nije neophodno kada se koristi MS/MS detektor, određeni stepen razdvajanja poboljšava reproduktivnost metode i olakšava detekciju analita.

Jedna od najčešće korišćenih grupa lekova i najčešće korišćenih antibiotika su β -laktami. Razvijen je veliki broj metoda za detekciju pojedinačnih β -laktama ili određene β -laktamske grupe (penicilina ili cefalosporina) u raznim matricama (Bruno *et al.* 2001a; Riediker and Stadler 2001; De Baere *et al.* 2002; Holstege *et al.* 2002; Fagerquist and Lightfield 2003), a veoma su retke metode gde su pored β -laktama analizirane i druge grupe lekova. U ovim metodama se za određivanje samo jednog analita obično koristi LC-UV

tehnika, dok se u analizi specifične grupe lekova uobičajeno koriste LC-MS ili LC-MS/MS metode. U literaturi postoje analitičke metode za određivanje farmaceutskih jedinjenja u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama pri niskim koncentracijama, ali je većina fokusirana na specifičnu grupu lekova, posebno antibiotike zbog mogućnosti stvaranja rezistencije (Hirsch *et al.* 1999; Ternes *et al.* 2001; Gentili *et al.* 2005). Multirezidualne metode analize različitih grupa lekova su neophodne radi dobijanja pouzdanih informacija o njihovoj rasprostranjenosti u prirodi, mogućnostima uklanjanja, kao i konačnoj degradaciji u životnoj sredini (Sacher *et al.* 2001; Stolker *et al.* 2004; Kim and Carlson 2005).

Prilikom analize različitih grupa lekova mogu se javiti raznovrsni problemi. Tako, na primer, prilikom analize penicilina često nastaju epimeri, a proces je katalizovan katjonima teških metala, zbog čega se preporučuje silanizacija staklenog posuđa (Lopez de Alda *et al.* 2003; Díaz-Cruz and Barceló 2005). Generalno, β -laktamski antibiotici su jedinjenja sa ograničenom stabilnošću zbog prisustva četvoročlanog prstena u strukturi. Termički su nestabilni, izomerizuju u kiseljoj sredini i nestabilni su u prisustvu alkohola (Gentili *et al.* 2005). Analiza amoksicilina u kompleksnim matricama je posebno otežana njegovom amfoternom prirodom i visokom polarnošću (Menelaou *et al.* 1999). Sulfonamidi imaju amfoterna svojstva, sa pK_a vrednostima u opsegu 5,5–10,4 (Hartig *et al.* 1999), ali se više uzima u obzir bazni karakter (Gentili *et al.* 2005; Botitsi *et al.* 2007) i preporučuje dodatak kiseline mobilnoj fazi radi pospešivanja protonovanja za MS detekciju (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Makrolidni antibiotici su bazna i lipofilna jedinjenja sa laktamskim prstenom koji je nestabilan u kiseljoj sredini i prilično degradabilan (Gentili *et al.* 2005).

Danas se u ekološkim istraživanjima najveća pažnja posvećuje detektovanju farmaceutski aktivnih oblika jedinjenja, dok se metaboliti i proizvodi raznih transformacija manje analiziraju. Izuzetak je eritromicin, koji se u mnogim analitičkim metodama detektuje u obliku dehidroeritromicina, degradacionog proizvoda nastalog gubitkom jednog molekula vode (Hirsch *et al.* 1998; Ternes 2001; Kolpin *et al.* 2002; Yang and Carlson 2004). Iako se generalno smatra da do dehidratacije dolazi tokom jonizacije, eksperimenti su pokazali da se ovaj gubitak javlja već u vodenom rastvoru pri $pH < 7$, zbog čega se degradacioni proizvod delimično formira i u standardnom rastvoru. Ukoliko se pH-vrednost podese na 7, eritromicin se ne degraduje i moguće ga je lako odrediti u polaznom obliku. U analizama uzoraka površinskih voda utvrđeno je prisustvo samo degradovanog proizvoda, što ukazuje na to da se eritromicin već nalazi u ovom obliku u vodenoj sredini. Ovo se objašnjava činjenicom da nakon konzumiranja eritromicin prolazi kroz veoma kisele želudačne uslove (Hirsch *et al.* 1999). Tetraciklini su nestabilni u baznoj sredini i fotodegradabilni. Amfoterni su i lako formiraju metalne komplekse (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Značajan broj sedativa smatra se „neutralnim lekovima“ jer ne sadrže kisele funkcionalne grupe, zbog čega mogu da se analiziraju na neutralnim pH-vrednostima, kao i GC-MS tehnikom bez derivatizacije (Ternes 2001). Ovde spadaju karbamazepin, diazepam i bromazepam (Hummel *et al.* 2006). Pod „kiselim lekovima“ podrazumevaju se farmaceutska jedinjenja koja sadrže karboksilne ili hidrosilne grupe, i ovde se ubraja znatan broj analgoantipiretika, kao što su ibuprofen i acetilsalicilna kiselina. Prilikom analize ovih lekova neophodno je uzeti u obzir veliki uticaj pH-vrednosti. Na primer, na kiselim pH-vrednostima ($pH = 2-3$), karboksilne i hidrosilne grupe biće protonovane, što utiče na izbor adsorbensa za koncentrovanje analita, kao i način njihove detekcije (Ternes 2001). Prilikom razvoja analitičke metode za detekciju tragova lekova neophodno je uzeti u obzir prethodno navedena ograničenja i zahteve.

2.9. PRIPREMA UZORAKA

Priprema uzoraka je veoma važan deo svake analitičke metode za koju je uobičajeno potrebno oko 60% vremena trajanja analize. Idealna tehnika pripreme uzorka treba da bude jednostavna, efikasna, selektivna, jeftina i kompatibilna sa širokim spektrom instrumentalnih metoda. Međutim, još uvek nije pronađena metoda koja u potpunosti ispunjava navedene zahteve (Blasco *et al.* 2002). Pošto su uzorci iz životne sredine veoma kompleksni po sastavu i sadrže analite u niskim koncentracijama, nije moguće direktno injektovanje uzorka u hromatografski sistem. Neophodno je takav uzorak pripremiti, tj. izolovati, koncentrovati i prečistiti analit. Izbor metode pripreme uzorka zavisi od fizičko-hemijskih osobina analita (kiselo-baznih svojstava, stabilnosti, isparljivosti, rastvorljivosti u vodi i organskim rastvaračima), prirode uzorka (agregatnog stanja, čistoće, sadržaja masti i ulja) i instrumentalne metode analize uzorka (Robinson *et al.* 2007).

Za predkoncentrisanje tragova lekova iz vode mogu se koristiti tečno-tečna i tečno-čvrsta ekstrakcija. Tečno-tečna ekstrakcija se zasniva na raspodeli analita između dva rastvarača u kojima je njegova rastvorljivost različita (Pedersen *et al.* 2005). Ograničenja tečno-tečne ekstrakcije su lako stvaranje emulzija i upotreba velikih količina organskih rastvarača za ekstrakciju analita. Kod tečno-čvrste ekstrakcije analit se raspodeljuje između tečnog uzorka i čvrstog adsorbensa (Buchberger 2007). Jedna od najčešće korišćenih tečno-čvrstih ekstrakcija je ekstrakcija na čvrstoj fazi (SPE, engl. solid-phase extraction), koja se najviše koristi za izolovanje i predkoncentrisanje analita iz uzoraka voda (Lindsey *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2001; Yang and Carlson 2004). Zahvaljujući jednostavnosti, brzini, efikasnosti i manjoj potrošnji organskih rastvarača, ova tehnika je uzela primat nad klasičnom tečno-tečnom ekstrakcijom. Do zadržavanja analita dolazi tako što se uzorak vode propušta kroz poroznu čvrstu fazu sa velikim afinitetom prema analitu. Izborom odgovarajućeg rastvarača, analit se kasnije eluira sa čvrste faze. Ograničenja SPE tehnike su unošenje sastojaka matrice uzorka u ekstrakt i upotreba skupih kolona pakovanih čvrstom fazom koje se obično bacaju nakon jedne upotrebe. Odlična alternativa klasičnim metodama pripreme uzoraka je mikroekstrakcija na čvrstoj fazi (SPME, engl. solid-phase microextraction) (Arthur and Pawliszyn 1990; Zhang *et al.* 1994). U ovoj tehnici pripreme uzoraka koriste se silikatna vlakna obložena stacionarnom fazom i analit se raspodeljuje između stacionarne faze i matrice uzorka. Nakon uspostavljanja ravnoteže, adsorbovani analit se desorbuje organskim rastvaračem i analizira (Kumazawa *et al.* 2003). SPME metoda poseduje niz prednosti nad SPE tehnikom, kao što su brzina, upotreba minimalnih zapremina rastvarača (obično oko 100 puta manjih od prosečnih za SPE) i manjih zapremina uzorka (oko 25 cm³ za SPME, dok je za SPE potrebno oko 500 cm³). Vlakna koja se koriste u SPME se mogu koristiti nekoliko puta, dok su SPE kolone (kertridži) predviđeni za samo jednu upotrebu (Rodríguez *et al.* 2004; Kataoka 2005; Balakrishnan *et al.* 2006). Ipak, SPE se mnogo više koristi za određivanje raznih analita u uzorcima voda, zbog toga što je osetljivija tehnika od SPME, sa granicom detekcije 1000 do 20000 puta nižom od onih za SPME (Balakrishnan *et al.* 2006; Pedrouzo *et al.* 2007).

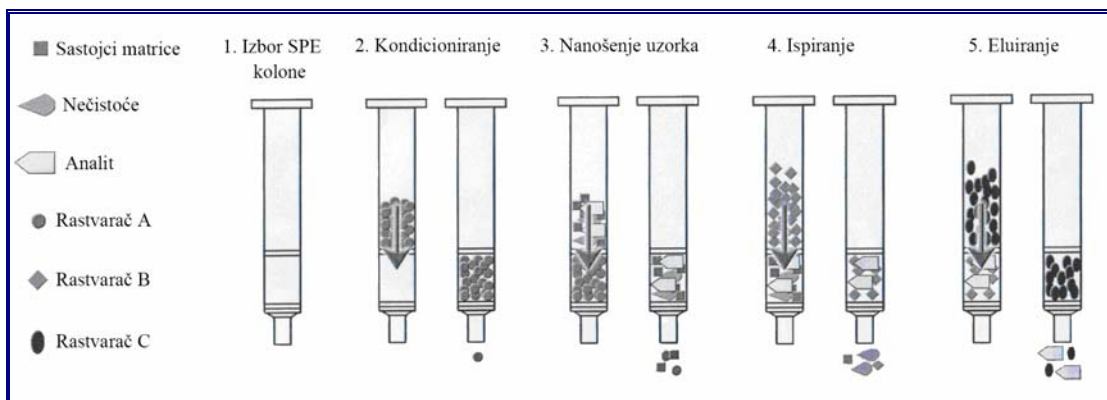
Ekstrakcija lekova iz čvrstih matrica iz životne sredine, kao što su zemljište i sedimenti, može se izvesti sonifikacijom, ili usitnjavanjem i homogenizacijom uzorka, u prisustvu rastvarača (Hamscher *et al.* 2002). Još jedna tehnika pripreme čvrstih uzoraka je disperzija matrice na čvrstoj fazi (MSPD, engl. matrix solid-phase dispersion) (Barker *et al.* 1989). Zasniva se na disperziji uzorka na adsorbensu i omogućava istovremeno razaranje, usitnjavanje i homogenizaciju čvrstih i polučvrstih uzoraka, kao i ekstrakciju, razdvajanje i

prečišćavanje analita u jednom koraku. U avanu sa tučkom, uzorak se usitnjava i homogenizuje zajedno sa adsorbensom (npr. SiO_2 , Al_2O_3 , Florisil – po sastavu magnezijum-silikat, ili C_{18} koji sadrži polimerno vezane oktadecil-grupe i oko 17% ugljenika), a zatim se ovom smešom pakuje kolona, u kojoj je uzorak ravnomerno dispergovan u celokupnom pakovanju (Barker 2000). MSPD je veoma brza i jednostavna metoda, sa značajno smanjenom upotrebom rastvarača, kod koje ne postoji mogućnost nastanka emulzija.

Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi, koja se najčešće koristi u pripremi uzoraka voda za analizu tragova lekova, prikazana je na slici 2. Nakon izbora odgovarajuće SPE kolone, eksperimentalna procedura sastoji se iz četiri koraka:

1. kondicioniranje kolone – propuštanje male zapremine odgovarajućeg rastvarača kroz pakovanje kolone radi pripreme adsorbensa za adsorpciju analita;
2. nanošenje uzorka – propuštanje uzorka vode kroz kolonu, pri čemu se analit adsorbuje na pakovanju kolone;
3. ispiranje kolone – propuštanje minimalne zapremine odgovarajućeg rastvarača (obično dejonizovane vode sa malim sadržajem organskog rastvarača) kroz kolonu radi uklanjanja polarnih nečistoća i soli iz uzorka vode koja su se zadržala na adsorbensu;
4. eluiranje – propuštanje odgovarajućeg rastvarača u kojem se analit dobro rastvara i desorpcija analita sa kolone.

Ako je eluent rastvarač koji se ne meša sa vodom, preporučuje se sušenje adsorbensa na vakuumu pre eluiranja.



Slika 2. Procedura ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Ekstrakcija na čvrstoj fazi izvodi se na kertridžima (špricevima, kolonama) određene zapremine ($1\text{--}60\text{ cm}^3$) koji su napunjeni adsorbensom (mase $0,1\text{--}10\text{ g}$, veličine čestica oko $50\text{ }\mu\text{m}$). Pakovanje kertridža je fiksirano sa donje i gornje strane teflonskim ili polietilenskim fritama (Fritz and Macka 2000). Kao adsorbensi se najčešće koriste silikatni materijali sa polarnim i nepolarnim funkcionalnim grupama koje omogućavaju selektivne i specifične interakcije sa analitima. Na osnovu interakcija između adsorbensa i analita, ekstrakcija na čvrstoj fazi može biti jonoizmenjivačka, normalno-fazna i reverzno-fazna. Jonoizmenjivačka ekstrakcija na čvrstoj fazi zasniva se na jonskoj interakciji između analita i adsorbensa. Adsorbens ima katjonske ili anjonske funkcionalne grupe i zadržava jone analita suprotnog naelektrisanja. Normalno-fazna ekstrakcija na čvrstoj fazi podrazumeva interakcije između polarnog analita i polarnog adsorbensa uz nepolarnu matricu uzorka. Kao adsorbensi najčešće se koriste silikatni materijali sa polarnim funkcionalnim grupama (npr. $-\text{CN}$, $-\text{NH}_2$).

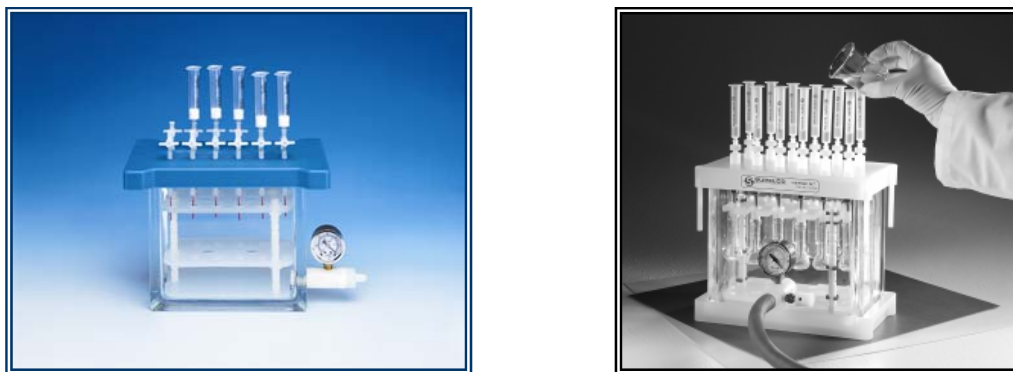
Reverzno-fazna ekstrakcija na čvrstoj fazi se odvija između nepolarnog ili slabo polarnog analita i nepolarnog adsorbensa uz polarnu matricu uzorka. Adsorbensi koji se najčešće koriste za reverzno-faznu ekstrakciju su silikatni materijali sa alkil (C_{18} i C_8) ili aril grupama. Pored silikatnih materijala, veliku primenu imaju i ugljeni materijali koji se uglavnom koriste za izolovanje polarnih jedinjenja (Dean 1998). Na slici 3 prikazani su razni kertridži koji se koriste za ekstrakciju na čvrstoj fazi.



Slika 3. Kertridži za izvođenje ekstrakcije na čvrstoj fazi.

Tokom devedesetih godina došlo je do razvoja novih polimernih adsorbensa sa poboljšanim karakteristikama, kao što su bolje zadržavanje kiselih analita bez zakišeljavanja uzorka, mogućnost dodatnih interakcija sa analitom i olakšano kvašenje. Jedna od najznačajnijih prednosti upotrebe polimernih pakovanja je izvođenje multirezidualne analize bez podešavanja pH-vrednosti uzorka (Gómez *et al.* 2006). Njihovom upotrebom priprema uzorka je pojednostavljena, smanjena je mogućnost kisele hidrolize drugih analita u multirezidualnoj analitičkoj proceduri i nije neophodno prečišćavanje uzorka radi uklanjanja huminskih i fulvo kiselina. Poslednjih godina većina metoda pripreme uzoraka se zasniva na upotrebi polimernih adsorbensa kao što su Oasis HLB kertridži (Waters, Milford, SAD) (Quintana and Reemtsma 2004) i Lichrolut[®]EN kertridži (Merck, Darmstadt, Nemačka) (Farré *et al.* 2001). Upotreba HLB (engl. hydrophilic-lipophilic balance) kertridža, sa uravnoteženim hidrofилnim i lipofilnim karakteristikama, omogućava ekstrakciju kiselih, neutralnih i baznih analita u širokom opsegu pH-vrednosti. Sastoji se iz umreženog polimera na bazi N-vinilpirolidona sa divinilbenzenom. Hidrofilna svojstva su posledica prisustva N-vinilpirolidona, a lipofilna svojstva potiču od divinilbenzena. Posедуje odlične mogućnosti kvašenja hidrofилnog N-vinilpirolidona, zbog čega sušenje pakovanja kertridža nema negativan efekat na prinos metode i nije neophodan kontinualan tok kroz kolonu (Öllers *et al.* 2001). Na HLB kertridžu je moguća ekstrakcija kiselih analita iz vode bez zakišeljavanja uzorka. Naime, većina antiinflamatornih lekova je po prirodi kisela, sa pK_a -vrednostima između 4 i 4,5, zbog čega u vodenom rastvoru postoje u jonizovanom obliku i slabo se zadržavaju na nepolarnim, lipofilnim adsorbensima. Da bi se ova grupa farmaceutskih jedinjenja zadržala na nepolarnim kertridžima, neophodno je podesiti pH-vrednost uzorka na 2–3. Zahvaljujući svom hemijskom sastavu, Oasis HLB kertridži omogućavaju ekstrakciju ovih analita bez zakišeljavanja uzorka (Gómez *et al.* 2006; Gros *et al.* 2006a). Lichrolut[®]EN kertridž ne poseduje tako dobre karakteristike kao HLB adsorbens, ali se preporučuje za ekstrakciju polarnih analita na niskim pH-vrednostima, kao i neutralnih lekova (kao što su karbamazepin i makrolidni antibiotici) na $pH = 7$ (Gros *et al.* 2006a). Prilikom ispitivanja efikasnosti raznih stacionarnih faza za ekstrakciju odabranih lekova, u mnogim radovima je utvrđeno da je Oasis HLB najbolji adsorbens za veliki broj analita (Ahrrer *et al.* 2001; Hilton and Thomas 2003; Quintana and Reemtsma 2004; Gómez *et al.* 2006; Gros *et al.* 2006a).

Na slici 4 je prikazana aparatura potrebna za izvođenje ekstrakcije na čvrstoj fazi koja omogućava istovremenu ekstrakciju većeg broja uzoraka. Aparatura se sastoji od staklene kade na kojoj se nalazi izvod sa manometrom za vezivanje vakuumpumpe, koja je često neophodna. Staklena kada se zatvara perforiranim poklopcem na koji se postavljaju kertridži, tj. SPE kolone sa adsorbensima. U kadu se stavlja stalak sa kivetama, koje se nalaze neposredno ispod svakog kertridža i služe za sakupljanje ekstrakta prilikom eluiranja kolona rastvaračem.



Slika 4. Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi.

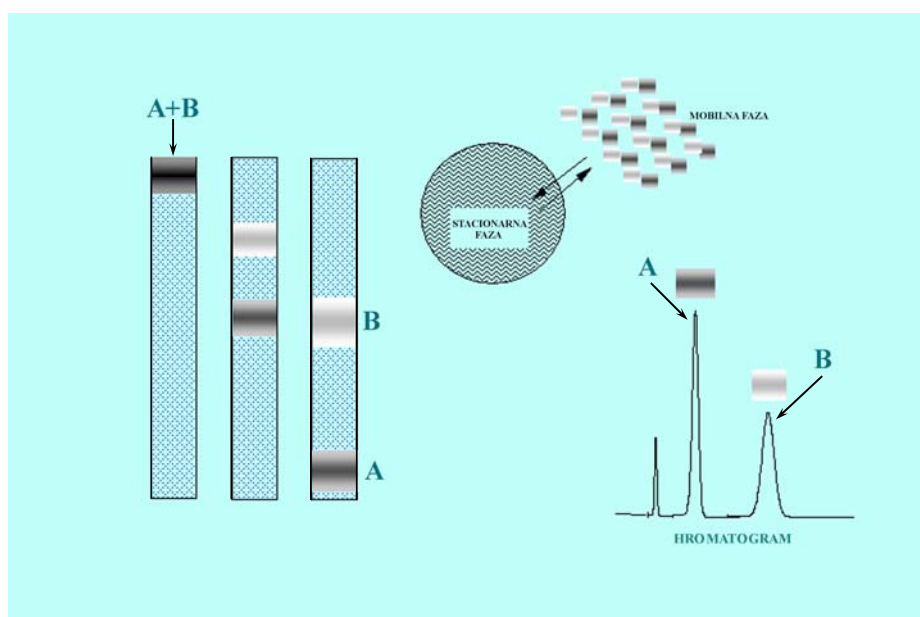
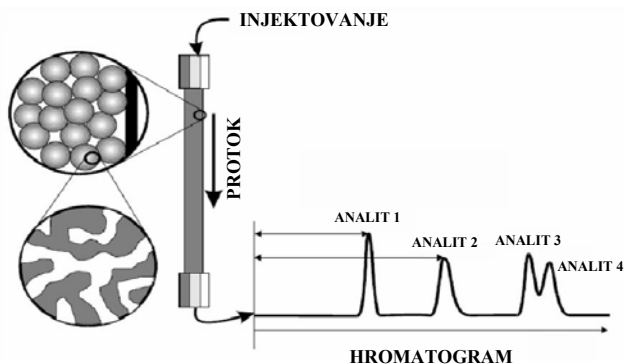
Veoma važan parametar koji utiče na efikasnost ekstrakcije na čvrstoj fazi je pH-vrednost rastvora, tj. uzorka vode, pošto određuje hemijski oblik analita, njegovu stabilnost i interakciju sa adsorbensom (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Tako, na primer, zakišeljavanje rastvora prouzrokuje smanjenje disocijacije slabo kiselih analita, što vodi povećanju efikasnosti ekstrakcije, ako se nedisosovani oblik analita vezuje za SPE kertridž (Zhang and Zhou 2007). Takođe je primećeno da je ekstrakcija sastojaka matrice uzorka manja na $\text{pH} = 7$, u poređenju sa nižim pH-vrednostima (Pichon *et al.* 1996; Sørensen and Elbæk 2005). Naime, najčešći problem prilikom ekstrakcije organskih analita iz kompleksnih matrica je velika količina prirodne organske supstance, kao što su huminske i fulvo kiseline. Prisustvo ovih kompleksnih organskih jedinjenja u ispitivanom uzorku može uticati na smanjenje adsorpcije analita, zbog kompetitivnog vezivanja za adsorbens, kao i na probijanje (engl. breakthrough) kapaciteta kertridža. Pored umanjene efikasnosti ekstrakcije, može doći do ometanja detekcije analita, zbog smanjenja efikasnosti jonizacije analita. Tako je prilikom kvantifikacije tetraciklina uočeno smanjenje signala za 30–70% u prisustvu huminskih kiselina (Hao *et al.* 2006). Do smanjenja efikasnosti ekstrakcije tetraciklinskih antibiotika može doći i zbog ireverzibilnog vezivanja za silanolne grupe stakla. Zbog toga se pri radu sa staklenim posuđem preporučuje silanizacija, ispiranjem staklenog posuđa rastvorom dimetildihlorsilana. Na ovaj način se sprečava vezivanje tetraciklina za stakleno posuđe i poboljšava efikasnost njihove ekstrakcije (Lopez de Alda *et al.* 2003). Takođe je poznato da tetraciklini imaju veliki afinitet ka helatnom vezivanju katjona metala. Ukoliko se pre ili tokom pripreme uzorka doda jako helatno sredstvo, kao što su oksalna kiselina (Cherlet *et al.* 2003) ili Na_2EDTA (Niessen 1998; Ternes 2001; Di Corcia and Nazzari 2002), može se umanjiti vezivanje i ekstrakcija metala prisutnih u površinskim vodama (Hirsch *et al.* 1998, 1999; Lindsey *et al.* 2001; Ternes 2001; Zhu *et al.* 2001; Yang and Carlson 2004). Međutim, prisustvo ovih neisparljivih supstanci može prouzrokovati brzo zaprljanje jonskog izvora i drastično smanjenje osetljivosti MS detektora (Gentili *et al.* 2005).

U poslednjoj deceniji, najčešći način pripreme uzoraka za određivanje tragova lekova u vodi je ekstrakcija na čvrstoj fazi praćena HPLC-MS analizom, posebno kada se analiziraju termički nestabilni i slabo isparljivi analiti. Obično se koriste zapremine uzorka između 50 i 500 cm³ (Lindsey *et al.* 2001; Göbel *et al.* 2004; Yang and Carlson 2004; Buchberger 2007), a nakon predkoncentrisanja se postižu granice detekcije između 1 i 200 ng dm⁻³, u zavisnosti od zapremine uzorka i korišćenog masenog detektora. Ukoliko se koristi MS/MS detektor, mogu se postići niže granice detekcije i smanjiti zapremina uzorka za pripremu (Pozo *et al.* 2006). Međutim, većina razvijenih SPE-HPLC-MS/MS analitičkih metoda fokusirana je na jednu ili dve grupe lekova. Zbog toga je pravi izazov uporedna ekstrakcija i analiza nekoliko grupa lekova različitih polarnosti, rastvorljivosti, pK_a-vrednosti i stabilnosti.

2.10. TEČNA HROMATOGRAFIJA VISOKE PERFORMANSE

Hromatografija je fizička metoda razdvajanja supstanci iz smeša, koja se zasniva na različitoj raspodeli analita između dve faze, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna) faza. Mobilna faza može biti tečnost, gas ili superkritični fluid, dok stacionarna faza može biti čvrsta, tečna ili gel. Kod tečne hromatografije, mobilna faza je tečna, a stacionarna faza je čvrsta ili tečna i predstavlja pakovanje hromatografske kolone. Do hromatografskog razdvajanja dolazi usled različitog stepena interakcije analita iz smeše sa mobilnom i/ili stacionarnom fazom, zbog čega je različito vreme prolaska analita od mesta unošenja uzorka do mesta detekcije. Vreme zadržavanja analita u hromatografskom sistemu predstavlja retenciono vreme (Ardrey 2003).

Tečna hromatografija visoke performanse koristi se, pre svega, za analizu neisparljivih i termički nestabilnih polarnih analita. Kod ove metode mobilna faza je pod visokim pritiskom (do oko 400 bar ili 4·10⁷ Pa), da bi se ostvario neprekidan protok mobilne faze i reproduktivna hromatografija (Ardrey 2003). Mobilna faza mora biti visoke čistoće, male viskoznosti, hemijski inertna i kompatibilna sa detektorom, i u njoj analit mora biti rastvoran. Pakovanje hromatografske kolone se sastoji od čestica veoma malih dimenzija, čime se obezbeđuje velika kontaktna površina, a time i visoka rezolucija, tj. visoki stepen razdvajanja, po čemu je metoda i dobila naziv. Pakovanje kolone sadrži čestice ujednačene veličine (3–10 μm), sa veličinom pora od 70 do 300 Å, površinom od 50 do 250 m² g⁻¹ i 1–5 adsorpcionih centara po 1 nm² (Pryde and Gilbert 1979). Na slici 5 prikazani su osnovni principi tečne hromatografije.

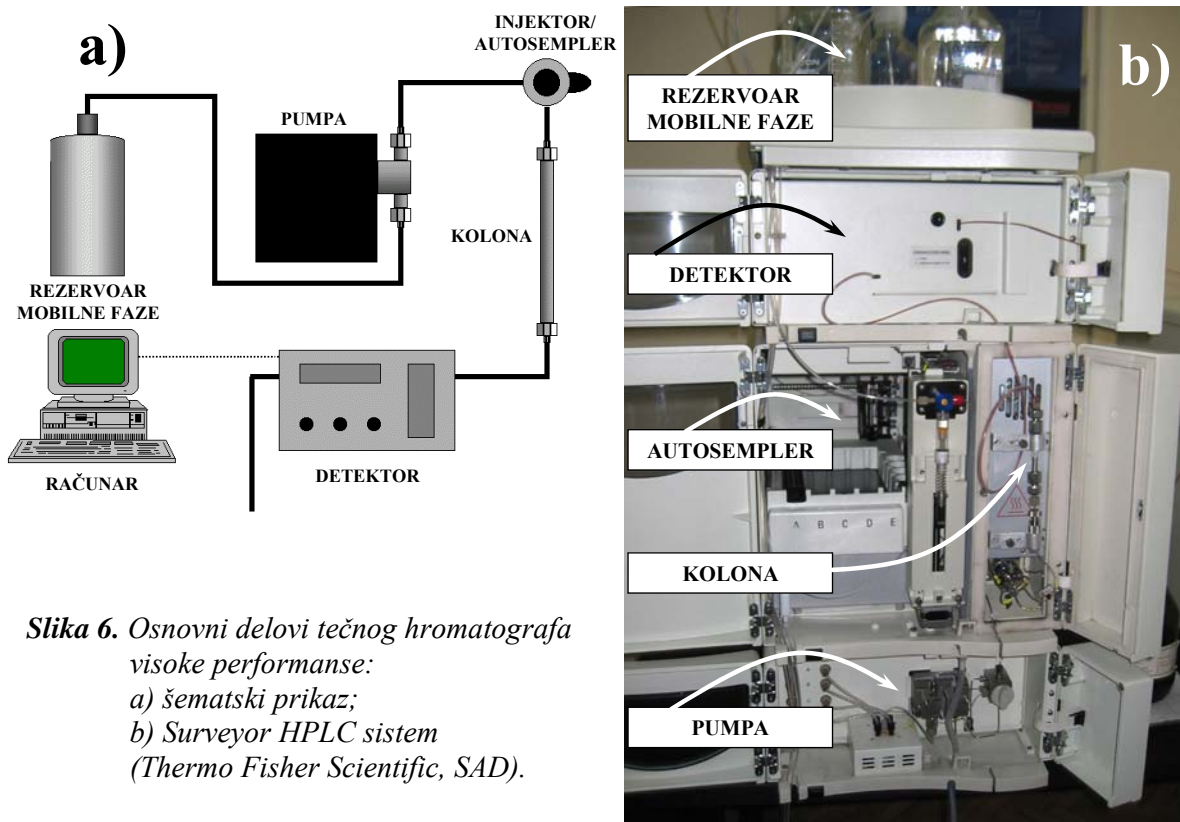


Slika 5. Osnovni principi tečne hromatografije.

Prema polarnosti hromatografskog sistema razlikuju se normalno-fazna i reverzno-fazna tečna hromatografija. Kod normalno-fazne hromatografije stacionarna faza je polarna, a mobilna faza je nepolarna, pa se polarni analiti duže zadržavaju na koloni i eluiraju sa većim retencionim vremenom. Reverzno-fazna hromatografija podrazumeva nepolarnu stacionarnu fazu i pretežno polarnu mobilnu fazu, pa se na koloni duže zadržavaju manje polarni analiti i eluiraju sa kolone sa većim retencionim vremenom. Protok mobilne faze može biti izokratski ili gradijentan. Pri izokratskom protoku, kroz hromatografsku kolonu protiče mobilna faza konstantnog sastava, dok se kod gradijentnog protoka sastav mobilne faze postepeno menja tokom analize (Ardrey 2003).

Tečni hromatograf visoke performanse sastoji se iz sledećih delova (slika 6):

1. rezervoar mobilne faze (staklene boce sa rastvaračima koji sačinjavaju mobilnu fazu);
2. pumpa (za postizanje visokih pritisaka i stabilnog protoka mobilne faze);
3. sistem za unošenje uzorka (injektor i/ili autosempler);
4. kolona (dužine 10–25 cm, unutrašnjeg prečnika 3–5 mm, veličine čestica 3–10 μm);
5. detektor (UV, fluorescentni, maseni i dr.);
6. računar (za sakupljanje i obradu rezultata).



Slika 6. Osnovni delovi tečnog hromatografa visoke performanse:
 a) šematski prikaz;
 b) Surveyor HPLC sistem (Thermo Fisher Scientific, SAD).

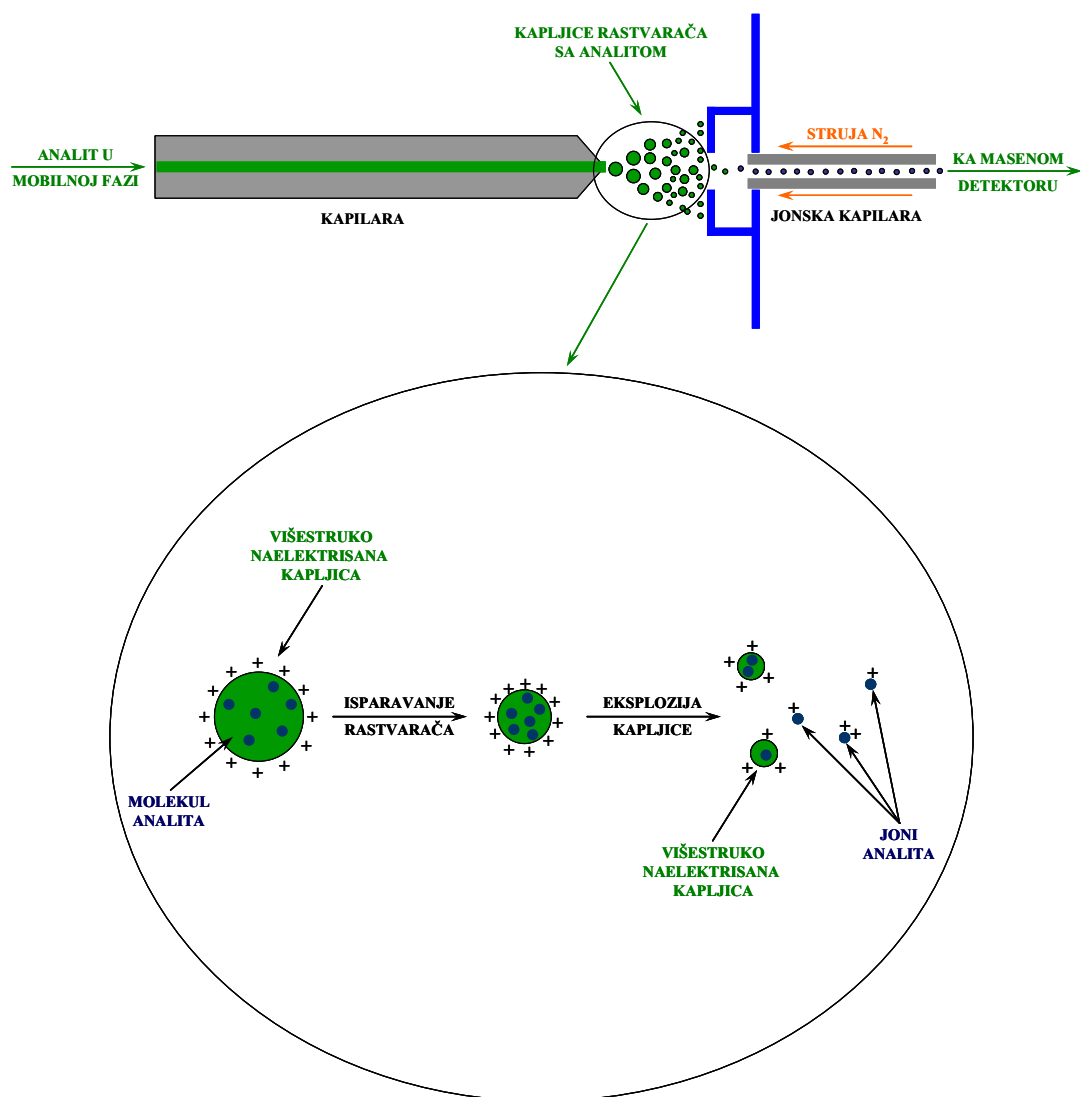
2.11. MASENA SPEKTROMETRIJA

Masena spektrometrija (MS) je analitička metoda koja se zasniva na jonizovanju uzorka i razdvajanju nastalih jona prema odnosu mase i naelektrisanja (m/z). Ova metoda omogućava identifikaciju analita na osnovu informacija o molekulskoj masi i strukturi jedinjenja. Prednost metode je izuzetna osetljivost, jer se potrebne informacije mogu dobiti analizom svega 1 pg analita (Ardrey 2003).

Maseni spektrometar se sastoji iz jonskog izvora, analizatora, detektora i vakuum sistema. U jonskom izvoru dolazi do jonizacije molekula analita. Nastali joni se zatim u analizatoru razdvajaju prema odnosu mase i naelektrisanja. Nakon razdvajanja, detektor registruje signale svih jona. Analizator i maseni detektor nalaze se pod vakuumom da bi se međusobna interakcija jona svela na minimum. U jonskom izvoru, jonizacija uzorka se može izvesti na više načina (Ardrey 2003): jonizacija elektronskim udarom (EI, engl. electron impact ionization), termosprej jonizacija (TS, engl. thermospray ionization), hemijska jonizacija (CI, engl. chemical ionization), hemijska jonizacija na atmosferskom pritisku (APCI, engl. atmospheric pressure chemical ionization), elektrosprej jonizacija (ESI, engl. electrospray ionization) i dr. U poslednjoj deceniji, APCI i ESI su postale najčešće korišćene tehnike jonizacije prilikom HPLC-MS analize zagađujućih supstanci u životnoj sredini (Reemtsma 2003; Zwiener and Frimmel 2004). APCI se koristi za analizu jedinjenja srednje i male polarnosti (Horimoto *et al.* 2000; Pfeifer *et al.* 2002; Lopez de Alda *et al.* 2003). ESI se pretežno koristi za analizu polarnih analita, ali se može koristiti i u analizi manje polarnih jedinjenja, zbog čega se većina autora opredeljuje za ovu tehniku. Takođe, za značajan broj lekova, npr. β -laktame (Díaz-Cruz and Barceló 2005), karbamazepin (Petrović *et al.* 2005) i antiinflamatorne lekove (Ahrer *et al.* 2001), ESI tehnika je mnogo osetljivija od APCI jonizacione tehnike.

Nastanak jona elektrosprej jonizacijom (slika 7) opisan je nastankom finog spreja tečnosti u prisustvu jakog električnog polja (Fenn *et al.* 1989; Fenn 1993), pri čemu dolazi do desolvatacije jona analita na atmosferskom pritisku. Naime, analit rastvoren u polarnom i isparljivom rastvaraču se raspršuje u struji azota kroz kapilaru čiji je vrh pod visokim naponom (Bruins *et al.* 1987). Pod dejstvom električnog polja, na atmosferskom pritisku, aerosol sastavljen od višestruko naelektrisanih kapljica napušta kapilaru u obliku finog spreja. Kapljice se polako smanjuju usled isparavanja rastvarača i, kada gustina naelektrisanja prevaziđe površinski napon, dolazi do eksplozije kapljica, pri čemu nastaje veliki broj malih kapljica. Proces se ponavlja i kao rezultat nastaju desolvatisani joni analita koji kroz jonsku kapilaru stižu do masenog analizatora pod vakuumom (Constantopoulos *et al.* 1999).

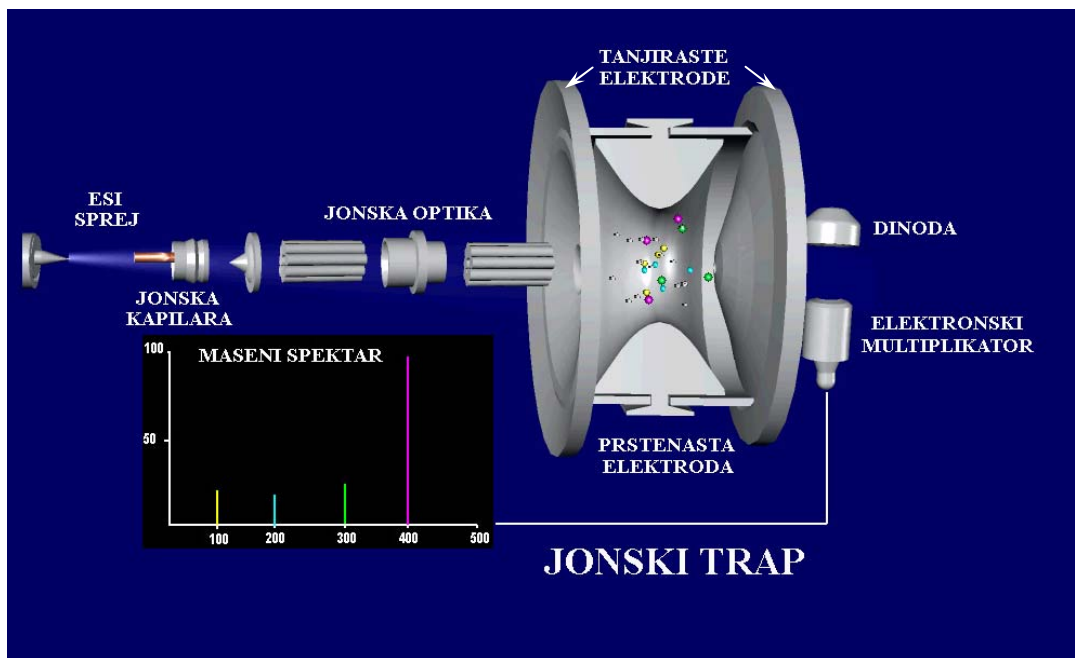
Faktori koji utiču na nastanak jona elektrosprej jonizacijom su: pH-vrednost rastvora, pK_a analita, temperatura, protok i sastav mobilne faze, kao i koncentracija aditiva i analita (Kamel *et al.* 1999; Zhao *et al.* 2002; Mathis and McCord 2005). Sa povećanjem pK_a -vrednosti analita, povećava se intenzitet signala protonovanog molekula (Kamel *et al.* 1999). Sastav mobilne faze utiče na stabilnost elektrospreja. Sa povećanjem udela organskog rastvarača u mobilnoj fazi, potpomaže se nastanak stabilnog elektrospreja (Cech and Enke 2001). Veći udeo organskog rastvarača u mobilnoj fazi utiče i na povećanje osetljivosti, tj. povećanje odgovora ESI-MS detektora (Straub and Voyksner 1993; Kamel *et al.* 1999). Utvrđeno je da je intenzitet signala jona polarnih analita veći u mobilnoj fazi sa metanolom, nego u mobilnoj fazi koja kao organsku komponentu sadrži acetonitril (Mathis and McCord 2005).



Slika 7. Prikaz elektrosprej jonizacije.

Mnogi tradicionalni puferi i aditivi mogu imati negativan uticaj na ESI proces, zbog toga što prisustvo konkurentnih vrsta u rastvoru smanjuje efikasnost jonizacije analita (Borges and Henion 2005). Preporučene koncentracije aditiva u mobilnoj fazi su do 20 mM (Constantopoulos *et al.* 1999; Storm *et al.* 1999; Zhao *et al.* 2002). Neisparljive, teško rastvorljive soli, kao što su fosfati ili sulfati, trebalo bi izbegavati, jer mogu da kristališu u jonskom izvoru, prouzrokuju koroziju, kao i da utiču na nastanak kompleksnih masenih spektara. Iako je određeni sastav mobilne faze, sadržaj aditiva i pH-vrednost rastvora, optimalan za ESI jonizaciju analita, on ne mora biti optimalan i za hromatografsko razdvajanje analita. Zbog toga je pri razvoju LC-ESI-MS metode potrebno pronaći ravnotežu između potreba tačne hromatografije i efikasne elektrosprej jonizacije (Jeanville *et al.* 2003).

ESI je „meki“ jonizacijski postupak kojim se dobijaju protonovani ($[M+H]^+$) ili deprotonovani ($[M-H]^-$) molekuli analita, što zavisi od polarosti električnog polja. Često dolazi do pojave višestruko naelektrisanih jona ($[M+nH]^{n+}$), kao i adukata molekula analita sa rastvaračem ($[M+R+H]^+$, odnosno $[M+R-H]^-$). Zbog stvaranja višestruko naelektrisanih jona, ESI omogućava LC-MS analizu jedinjenja sa velikom molarnom masom (do $4000000 \text{ g mol}^{-1}$), jer se njihov signal pojavljuje na m/z vrednostima (Di Corcia and Nazzari 2002; Ardrey 2003; Gentili *et al.* 2005). Da bi se potpomoglo protonovanje molekula baznih analita, obično se u mobilnu fazu dodaju organske kiseline (mravlja ili sirćetna). Za neutralne analite, koji teško jonizuju, kao aditivi se koriste organske soli (npr. amonijum-acetat ili amonijum-formijat), čime se pospešuje formiranje adukata sa katjonima (NH_4^+ , Na^+ ili K^+) ili anjonima (acetatni ili formijatni) u rastvoru (Zhu and Cole 2000).



Slika 8. Prikaz ESI-MS sistema sa jonskim trapom.

Najčešće korišćeni maseni analizatori u LC-MS analizi tragova lekova u životnoj sredini su trostruki kvadrupol (QqQ, engl. triple quadrupole) i jonski trap (IT, engl. ion trap) (Hernández *et al.* 2004). QqQ analizator je znatno osetljiviji i precizniji od jonskog trapa, ali visoka cena ovog instrumenta ograničava njegovu dostupnost. Jonski trap poseduje jedinstvenu mogućnost da izvodi više stupnjeva masene analize (MS^n), zbog čega je veoma selektivan, što može poboljšati odnos signala i šuma tako da granica detekcije jonskog trapa bude prihvatljiva za kvantifikaciju niskih koncentracija analita u kompleksnim uzorcima iz životne sredine (Wieboldt *et al.* 1998; Bartolucci *et al.* 2000). Uvođenjem novih jonskih trapova, kao što je linearni jonski trap, poboljšane su osetljivost i granica detekcije (Hager and Le Blanc 2003; Batt and Aga 2005). Jonski trap izvodi masenu analizu tandemski u vremenu, a QqQ tandemski u prostoru (Niessen 2003; Gentili *et al.* 2005).

Jonski trap se sastoji od jedne prstenaste i dve tanjiraste elektrode (slika 8) koje zatvaraju prsten sa obe strane (Ardrey 2003). U LC-MS analizi se koriste jonski trapovi sa eksternom jonizacijom, gde joni nastaju u jonskom izvoru, a zatim se unose u jonski trap. Pod uticajem radiofrekventnog polja, joni se u trapu kreću po stabilnim putanjama i mogu da se čuvaju u trapu od nekoliko milisekundi do nekoliko sati (Picó *et al.* 2004). Za maksimalnu efikasnost joni treba da su fokusirani oko centra trapa gde je polje najbliže idealnom. Ovo se postiže uvođenjem helijuma koji sudarajući se sa jonima smiruje njihove oscilacije i na taj način ih stabilizuje. Povećanjem radiofrekventnog napona joni analita se šalju iz trapa ka detektoru, pri čemu se snima maseni spektar. Kod MSⁿ analize, izolovanje jona analita koji treba dalje da se fragmentiše postiže se povećanjem napona, pri čemu se iz trapa izbacuju svi ostali joni osim onih sa traženim *m/z* odnosom. Nakon fragmentacije joni dospevaju do detektora koji registruje njihovo prisustvo i relativnu koncentraciju. Praćenjem odgovora masenog detektora u toku vremena dobija se hromatogram. U toku rada može se izabrati snimanje celog masenog spektra i na taj način se dobija ukupni jonski hromatogram (TIC, engl. total ion chromatogram). Ukoliko se odabere registrovanje određenog jona dobija se hromatogram odabranog jona (SIM, engl. selected ion monitoring). Može se odabrati detektovanje jona nastalog fragmentacijom određenog jona i kao rezultat se dobija hromatogram odabrane reakcije (SRM, engl. selected reaction monitoring).

2.12. SPREGA TEČNE HROMATOGRAFIJE SA MASENOM SPEKTROMETRIJOM

Veliko ograničenje hromatografije je nemogućnost precizne identifikacije komponenata smeše, čak i kada su potpuno hromatografski razdvojene. Identifikacija se zasniva na poređenju retencionih vremena nepoznatih sastojaka i standardnih supstanci pod istim eksperimentalnim uslovima. Međutim, čak i kada su retencionna vremena identična, to ne mora biti siguran pokazatelj da je u pitanju isto jedinjenje. Moć masene spektrometrije je u tome da su maseni spektri većine supstanci dovoljno specifični da omoguće njihovu identifikaciju sa visokim stepenom sigurnosti. Kombinovanje separacionih mogućnosti hromatografije sa identifikacionim mogućnostima masenog spektrometra omogućava razlikovanje supstanci sa istim ili sličnim retencionim vremenima na osnovu njihovih različitih masenih spektara. Savremene hibridne tehnike za detekciju niskih koncentracija analita, reda veličine ng dm^{-3} , su gasna hromatografija u kombinaciji sa masenom spektrometrijom i tečna hromatografija visoke performanse u kombinaciji sa masenom spektrometrijom (Hirsch *et al.* 1998; Ahrer *et al.* 2001; Farré *et al.* 2001; Öllers *et al.* 2001; Sacher *et al.* 2001; Ternes *et al.* 2001; Kolpin *et al.* 2002; Lopez de Alda *et al.* 2003). GC-MS se rutinski koristi tokom poslednjih 40 godina u analizi velikog broja jedinjenja u raznim matricama. Međutim, mnogi analiti su izuzetno polarni i termički nestabilni, zbog čega je neophodna njihova derivatizacija pre GC analize (Hartig *et al.* 1999; Di Corcia and Nazzari 2002; Ternes *et al.* 2002a). Derivatizacija veoma različitih, kiselih i baznih, jedinjenja tokom analize je veoma teška i zahteva puno vremena, zbog čega se za analizu kompleksnih smeša analita koristi LC-MS tehnika. Prednost ove metode je i mogućnost analize jedinjenja sa velikom molarnom masom koja nisu pogodna za GC-MS. Osamdesetih godina je došlo do razvoja LC-MS tehnike, a njena široka instrumentalna primena nastupila je tokom devedesetih godina. Do promene u analitičkoj metodologiji došlo je sa promenom kontrole kvaliteta voda sa tradicionalnih zagađujućih supstanci ograničene polarnosti, koje su analizirane pomoću GC-MS, na polarnija jedinjenja za koja je LC-MS odgovarajuća tehnika analize (Reemtsma 2001a; Miao and Metcalfe 2003b).

Tek nakon razvoja **tandem masene spektrometrije** (MS/MS ili MS²) polovinom devedesetih godina postala je moguća precizna i pouzdana detekcija veoma niskih koncentracija analita u kompleksnim matricama. U tandem masenoj spektrometriji prvo se izoluju prekursor joni analita, a zatim se izaziva njihova fragmentacija sudarima sa inertnim gasom, obično argonom ili helijumom, i vrši analiza dobijenih fragmentnih jona. Tandem masena analiza može biti tandemska u vremenu ili tandemska u prostoru. Kada postoje tri prostorno odvojena masena spektrometra, pri čemu se u prvom vrši izolovanje prekursor jona, u drugom njegova fragmentacija, a u trećem analiza jona nastalih fragmentacijom, oni izvode masenu analizu istovremeno, kao tandem u prostoru. Kod tandema u vremenu, masena analiza se izvodi u istom prostoru, ali u različito vreme, kao kod jonskog trapa (Picó *et al.* 2004). Tandem masena spektrometrija omogućava identifikaciju i kvantifikaciju analita koji imaju istu molekulsku masu, ali različite fragmentne jone, kao i onih jedinjenja koja nisu potpuno hromatografski razdvojena (Bruno *et al.* 2001b). Ipak, određeni stepen razdvajanja je potreban radi smanjenja uticaja matrice i poboljšanja odnosa signala i šuma, čime se postiže povećanje signala analita (Díaz-Cruz and Barceló 2005). Kombinovanjem tačne hromatografije sa tandem masenom spektrometrijom (LC-MS/MS) dobijena je visoko selektivna i osetljiva tehnika za nedvosmisleno razlikovanje analita, čak i u kompleksnim matricama, čime je značajno pojednostavljena priprema uzorka (Lopez de Alda *et al.* 2003; Gentili *et al.* 2005; Petrović *et al.* 2005). Ipak, ograničenje ove tehnike je u tome što biblioteke masenih spektara analita nisu dovoljno razvijene, pogotovo u slučaju elektrosprej jonizacije, zbog čega je njihova identifikacija znatno otežana (Ferrer and Thurman 2003).

Iako se LC-ESI-MS/MS tehnika uspešno koristi u kvantitativnoj analizi tragova analita, njen veliki nedostatak je pojava *uticaja matrice* ili *matriks efekta*, koja može dovesti do pogrešne kvantifikacije. Naime, uočeno je smanjenje, a u ređim slučajevima i povećanje, intenziteta signala analita u prisustvu sastojaka matrice koji se koeluiraju sa analitom (Matuszewski *et al.* 1998; Gros *et al.* 2006a), što nepovoljno utiče na reproduktivnost i preciznost analize. U nekim slučajevima je uočeno smanjenje signala analita i do 90% (Gros *et al.* 2006a; Hummel *et al.* 2006). Tačan mehanizam putem kojeg sastojci matrice ometaju elektrosprej jonizaciju analita još uvek nije poznat, ali je poznato da se ovaj efekat javlja u kompleksnim matricama (Hummel *et al.* 2006). Smanjena jonizacija analita, prilikom analize kompleksnih matrica, može se objasniti visokom koncentracijom neisparljivih supstanci u spreju koja smanjuju efikasnost nastanka ili isparavanja kapljica, što dalje utiče na količinu naelektrisanih jona u gasnoj fazi koja stiže do detektora (King *et al.* 2000; Becker *et al.* 2004; Lindberg *et al.* 2004; Renew and Huang 2004; Sørensen and Elbaek 2005). Takođe, adsorpcija analita na organskoj materiji uzorka može umanjiti koncentraciju rastvorenog analita koji se jonizuje (Sterner *et al.* 2000; Gómez *et al.* 2006). Uticaj matrice je teško predvideti, jer su sastojci matrice drugačiji kod svakog uzorka. Ipak, primećeno je da lekovi iz iste grupe antibiotika pokazuju slično smanjenje intenziteta signala (Renew and Huang 2004).

Postoji nekoliko načina da se smanji uticaj matrice u LC-ESI-MS/MS analizi i dobiju ispravni kvantitativni rezultati. Najbolji način za postizanje maksimalne osetljivosti i reproduktivnosti signala je smanjenje količine sastojaka matrice primenom selektivne ekstrakcije i poboljšanjem prečišćavanja uzorka. Takođe, poboljšanjem hromatografskog razdvajanja moguće je umanjiti uticaj matrice (Stüber and Reemtsma 2004). Naime, uočeno je da je matriks efekat više izražen sa povećanjem retencionog vremena, što se objašnjava time da se i matrica uzorka hromatografski razdvaja, a uglavnom je sastavljena od manje polarnih jedinjenja (King *et al.* 2000; Petrović *et al.* 2005). Veoma efikasan način za eliminisanje uticaja matrice je primena odgovarajuće kalibracione metode, a najčešće

korišćene su eksterna kalibracija sa standardima koji odgovaraju matrici, zatim metoda standardnog dodatka, kao i upotreba internog standarda (Gros *et al.* 2006a). Primena odgovarajućeg internog standarda (strukturno sličnog jedinjenja ili izotopski označenog standarda) je posebno korisna, ali je često potrebno više internih standarda koji odgovaraju različitim analitima u smeši, a koji nisu uvek komercijalno dostupni ili su skupi (King *et al.* 2000; Petrović *et al.* 2005). Metoda standardnog dodatka je pouzdana metoda, koja značajno poboljšava preciznost određivanja, ali zahteva dosta vremena (Reemtsma 2001b; Becker *et al.* 2004). Zato se za kvantifikaciju preporučuje primena standarda koji odgovaraju matrici. Ovi standardi se pripremaju tako što se standardni rastvor analita dodaje u ekstrakt uzorka dobijen nakon njegove pripreme, na primer, SPE procedurom (Gentili *et al.* 2005).

Prilikom detektovanja analita u realnim uzorcima pomoću LC-ESI-MS mogu se dobiti lažni pozitivni rezultati. Nesigurnost je posebno velika kada se veći broj analita detektuje sa ograničenim hromatografskim razdvajanjem, kao i kada je matrica uzorka kompleksna. Radi izbegavanja lažnih pozitivnih rezultata potrebna je potvrda prisustva analita u uzorku. Za potvrdu prisustva analita prilikom LC-MS analize neophodno je da retenciono vreme analita ne odstupa više od 5% od retencionog vremena standarda, kao i da odnos intenziteta signala fragmentnih jona analita iz uzorka ne odstupa više od 20% od njihovog odnosa u standardu (Li *et al.* 1996; Reemtsma 2001b). Evropska Unija je definisala neophodne uslove za potvrdu prisustva tragova organskih zagađujućih supstanci masenom spektrometrijom na osnovu sistema identifikacionih poena (Commission Decision 2002/657/EC), pri čemu se potreban broj identifikacionih poena može postići posmatranjem dva ili više prelaza, tj. reakcija fragmentacije, za svaki analit. Pozitivni rezultati za tragove lekova u vodi u literaturi su potvrđeni posmatranjem dva karakteristična SRM prelaza za svaki analit (Hernández *et al.* 2004; Renew and Huang 2004; Pozo *et al.* 2006). Potvrдна analiza se izvodi ponovljenim injektovanjem pozitivnog uzorka uz korišćenje proširene MS metode sa dodatnim SRM prelazima. U slučajevima kada prekursor jon fragmentacijom daje samo jedan produkt jon, potvrda se može postići daljom fragmentacijom fragmentnog jona, tj. MS³ analizom (Díaz-Cruz and Barceló 2005).

2.12.1. Tandem masena spektrometrija odabranih grupa lekova

Putevi fragmentacije *penicilina* i *cefalosporina* objašnjeni su početkom devedesetih godina (Voyksner and Pack 1991; Straub and Voyksner 1993). U procesu elektrosprej jonizacije, ovi antibiotici mogu da formiraju i pozitivne (ESI+) i negativne (ESI-) jone. Međutim, za peniciline je intenzivniji signal pozitivnih jona, kao i njihova fragmentacija, dok je za cefalosporine intenzivniji signal negativnih jona (Blanchflower *et al.* 1994). Naime, ESI- obično ima manje hemijskog šuma (Becker *et al.* 2004). Penicilinski, β-laktamski antibiotici se fragmentišu uz otvaranje i cepanje β-laktamskog prstena. Fragmentacijom prekursor jona, tj. protonovanog molekula, nastaje intenzivni fragmentni jon *m/z* 160, koji se smatra specifičnim za β-laktamsku grupu (Hirsch *et al.* 1998, 1999; Díaz-Cruz and Barceló 2005). β-Laktamski antibiotici lako formiraju adukte sa katjonima, kao što su Na⁺, K⁺ i NH₄⁺. Vezivanjem katjona za organske molekule nastaju kompleksi koji su veoma stabilni i teško se fragmentišu. Nastanak adukata sa katjonima može biti koristan prilikom analiza u kojima je poželjno izbeći fragmentaciju nekih analita (Faye *et al.* 2000).

Sulfonamidi se mogu detektovati kao pozitivni i kao negativni joni. Protonovani i deprotonovani molekuli sulfonamida tokom MS/MS fragmentacije daju isti produkt jon m/z 156, tj. $[\text{NH}_2\text{PhSO}_2]^+$ ili $[\text{NH}_2\text{PhSO}_2]^-$ (Hao *et al.* 2006). U procesu fragmentacije nastaju i drugi fragmenti specifični za sulfonamide, kao što su m/z 108 (usled daljeg gubitka SO) i m/z 92 (od gubitka SO₂) (Hirsch *et al.* 1998, 1999; Díaz-Cruz and Barceló 2005). *Makrolidni antibiotici* se mogu lako protonovati i analizirati kao pozitivni joni. Fragmentni joni makrolida nastaju gubitkom dva karakteristična šećera, dezoamina (175 Da) i kladinoze (176 Da), kao i vode (Hirsch *et al.* 1998; Miao *et al.* 2004; Yang and Carlson 2004). Šećeri se mogu dalje fragmentisati, pri čemu nastaju joni m/z 158 ($[\text{dezoamin}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^+$) i m/z 116 ($[\text{kladinoza}+\text{H}-\text{CH}_3]^+$) (Miao *et al.* 2004). Međutim, ovi fragmentni joni se ne mogu detektovati, jer je najmanja masa fragmentnog jona koja se može detektovati pri radu sa jonskim trapom definisana kao trećina mase prekursor jona koji se fragmentiše (Díaz-Cruz and Barceló 2005). *Tetraciklinski antibiotici* se lako protonuju i analiziraju kao pozitivni joni, mada je moguća analiza i negativnih jona. Za fragmentaciju protonovanog molekula tetraciklina dominantan je gubitak molekula H₂O i NH₃, pri čemu nastaje $[\text{M}+\text{H}-\text{H}_2\text{O}-\text{NH}_3]^+$ (Hirsch *et al.* 1998, 1999; Zhu *et al.* 2001; Hamscher *et al.* 2002; Kamel *et al.* 2002).

Kiseli *antiinflamatorni lekovi*, kao što su ibuprofen i acetilsalicilna kiselina, detektuju se kao negativni joni. Acetilsalicilna kiselina se veoma lako i brzo degraduje u salicilnu kiselinu, zbog čega je prekursor jon zapravo deprotonovani molekul salicilne kiseline (m/z 137) (Heberer 2002). Pri MS/MS fragmentaciji prekursor joni gube molekul CO₂ (44 Da). Za ove lekove je karakteristično da je fragmentni jon nastao otpuštanjem CO₂ jedini produkt jon, što znači da nema dodatnih jona za potvrdu prisustva ovih analita (Stolker *et al.* 2004; Petrović *et al.* 2005). Neutralni *antiinflamatorni lekovi*, kao što je paracetamol, se analiziraju kao pozitivni joni, pri čemu je prekursor jon protonovani molekul. Za antiepileptik karbamazepin karakterističan je gubitak NHCO grupe (43 Da) (Petrović *et al.* 2005).

3. EKSPERIMENTALNI DEO

3.1. RASTVORI ODABRANIH LEKOVA I REAGENSI

Hemijske strukture i relativne molekulske mase odabranih analita, iz grupa antibiotika, sedativa i analgoantipiretika, prikazane su u tabeli 3.

Tabela 3. Hemijske strukture i relativne molekulske mase odabranih lekova.

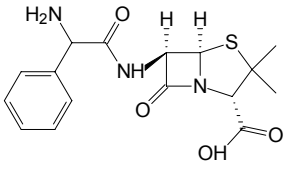
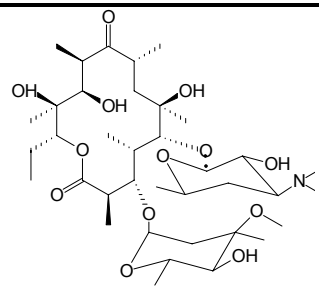
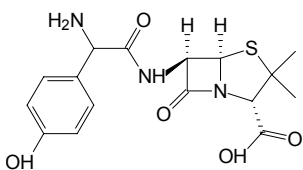
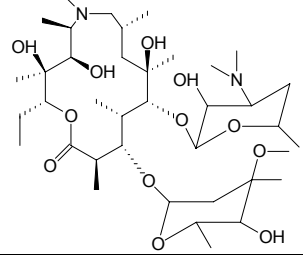
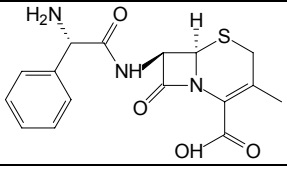
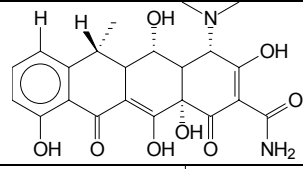
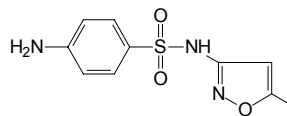
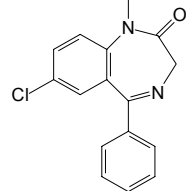
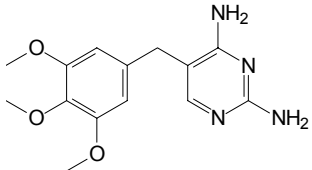
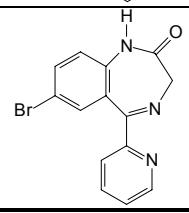
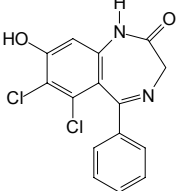
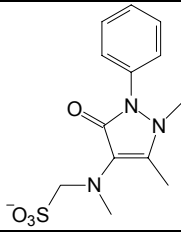
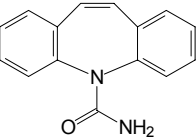
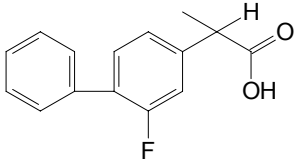
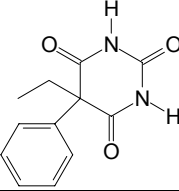
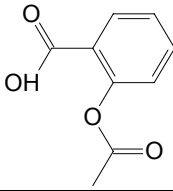
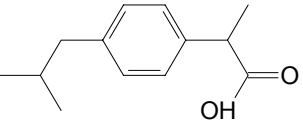
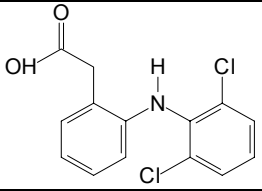
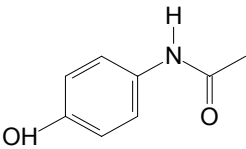
LEK	HEMIJSKA STRUKTURA	M_r	LEK	HEMIJSKA STRUKTURA	M_r
Ampicilin		349	Eritromicin		733
Amoksicilin		365	Azitromicin		748
Cefaleksin		347	Doksiciklin		444
Sulfametoksazol		253	Diazepam		284
Trimetoprim		290	Bromazepam		315

Tabela 3. (nastavak)

LEK	HEMIJSKA STRUKTURA	M_r	LEK	HEMIJSKA STRUKTURA	M_r
Lorazepam		320	Metamizol		310
Karbamazepin		236	Flurbiprofen		244
Fenobarbiton		232	Acetilsalicilna kiselina		180
Ibuprofen		206	Diklofenak		295
Paracetamol		151			

Analitički standardi lekova visoke čistoće (> 90%) su dobijeni od domaćih farmaceutskih kompanija (Hemofarm i Zorka-Pharma). Standardni rastvor svakog analita pripremljen je u metanolu pri koncentraciji $300 \mu\text{g cm}^{-3}$. Naime, prethodnim eksperimentima je utvrđeno da neki od odabranih analita nisu rastvorni u vodi (eritromicin, azitromicin, flurbiprofen), ili u acetonitrilu (ampicilin, amoksicilin, cefaleksin), zbog čega je metanol odabran kao najbolji rastvarač za sve analite. Mešanjem određenih zapremina pojedinačnih standardnih rastvora i razblaživanjem metanolom, pripremljen je rastvor svih lekova koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, a zatim i 100ng cm^{-3} . Svi rastvori su čuvani na -4°C .

Za podešavanje pH-vrednosti uzoraka voda korišćeni su koncentrovana sirćetna kiselina i amonijak, analitičke čistoće, proizvođača Roth (Karlsruhe, Nemačka). Ostali reagensi, kao npr. trihlorsirćetna kiselina (TCA) i natrijum-etilendiamintetraacetat (Na_2EDTA), bili su analitičke čistoće, proizvođača Riedel-de Haën (Seelze, Nemačka). Svi korišćeni rastvarači bili su HPLC čistoće, od proizvođača Fluka (Buchs, Švajcarska) ili Sigma-Aldrich (Steinheim, Nemačka). Ultračista voda je dobijena primenom GenPure sistema (TKA, Niederelbert, Nemačka) za dobijanje vode HPLC čistoće.

3.2. SNIMANJE MASENIH SPEKTARA ANALITA

Maseni spektri analita dobijeni su korišćenjem LCQ Advantage (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) jonskog trapa, kao masenog spektrometra. Kao jonizaciona tehnika korišćena je elektrosprej jonizacija. Unošenjem standardnog rastvora svakog analita koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ u tok mobilne faze, koja sadrži jednake delove metanola i vode, podešena je osetljivost masenog spektrometra za odabrani jon svakog ispitivanog analita. Utvrđeno je da su za detektovanje svih lekova koji se analiziraju kao pozitivni joni, optimalni sledeći parametri jonskog izvora: temperatura kapilare ($290 \text{ }^\circ\text{C}$), protok azota (25 au, tj. 25 arbitrary units, jedinica na skali opsega 0–100 koji je definisan LCQ Advantage sistemom) i napon izvora (4,5 kV). Za analite koji se analiziraju kao negativni joni, optimalni parametri jonskog izvora su sledeći: temperatura kapilare ($290 \text{ }^\circ\text{C}$), protok azota (23 au) i napon izvora (4,5 kV).

Za svaki analit odabran je prekursor jon, najčešće protonovani ili deprotonovani molekul, zatim je optimizovana kolizijska energija, tj. energija sudara sa atomima helijuma u jonskom trapu, za reakciju fragmentacije prekursor jona, i konačno je odabrana reakcija fragmentacije, tj. izabran je najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon. U daljim MS^n reakcijama fragmentacije, uz optimizaciju kolizijske energije, dobijeni su stabilni i intenzivni fragmentni joni. Obrada rezultata izvršena je pomoću softverskog paketa Xcalibur v. 1.3 (Thermo Fisher Scientific, SAD).

3.3. OPTIMIZACIJA HROMATOGRFSKOG RAZDVAJANJA ANALITA

Za tačno-hromatografsku analizu visoke performanse korišćen je Surveyor HPLC sistem (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Reverzno-fazno razdvajanje analita je izvršeno na Zorbax Eclipse[®] XDB-C18 koloni (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, SAD), dimenzija $4,6 \text{ mm} \times 75 \text{ mm} \times 3,5 \mu\text{m}$. Ispred hromatografske kolone postavljena je predkolona istog proizvođača, dimenzija $4,6 \text{ mm} \times 12,5 \text{ mm} \times 5 \mu\text{m}$. Za hromatografsko razdvajanje analita koji se detektuju kao pozitivni joni, mobilna faza se sastojala od ultračiste vode (A), metanola (B) i 10% (v/v) vodenog rastvora sirćetne kiseline (C). Za analite koji se detektuju kao negativni joni, u mobilnoj fazi je izostavljena sirćetna kiselina da bi se izbeglo protonovanje analita i time smanjenje signala. Isprobavanjem različitih gradijenata mobilne faze, utvrđeno je da se optimalno hromatografsko razdvajanje analita postiže korišćenjem gradijenata prikazanih u tabeli 4. Nakon hromatografskog razdvajanja analita, početni uslovi su uspostavljeni tokom 15 min. Zapremina od $0,01 \text{ cm}^3$ ($10 \mu\text{l}$) konačno dobijenog ekstrakta je injektovana u HPLC sistem.

Tabela 4. Sastav i gradijent mobilne faze za hromatografsko razdvajanje pozitivnih (ESI+) i negativnih (ESI-) jona analita.

VREME (min)	PROTOK (cm ³ min ⁻¹)	H ₂ O (%)	CH ₃ OH (%)	10% CH ₃ COOH (%)
ESI(+)				
0,00	0,600	65,0	33,0	2,0
12,00	0,600	0,0	98,0	2,0
15,00	0,600	0,0	98,0	2,0
15,10	0,600	65,0	33,0	2,0
30,00	0,600	65,0	33,0	2,0
ESI(-)				
0,00	0,600	60,0	40,0	0,0
7,00	0,600	0,0	100,0	0,0
10,00	0,600	0,0	100,0	0,0
10,10	0,600	60,0	40,0	0,0
25,00	0,600	60,0	40,0	0,0

3.4. OPTIMIZACIJA HPLC-MS/MS PARAMETARA

Nakon izbora mobilne faze, ponovo je podešena osetljivost masenog spektrometra i optimizovani su instrumentalni uslovi za nedvosmislenu identifikaciju tragova odabranih lekova. Standardni rastvor svakog analita koncentracije 10 µg cm⁻³ unosen je u tok mobilne faze sastava 65/33/2 (A/B/C), prilikom analize pozitivnih jona, odnosno 60/40 (A/B), pri analizi negativnih jona, uz protok mobilne faze od 0,6 cm³ min⁻¹. Za svaki analit su snimljeni maseni spektri pozitivnih i negativnih jona u opsegu *m/z* 50–1000. Najintenzivniji joni u MS spektru su dalje fragmentisani, uz optimizaciju energije sudara za dobijanje najintenzivnijeg i najstabilnijeg fragmentnog jona. Na osnovu rezultata MSⁿ analize, izabrane su karakteristične reakcije fragmentacije za kvantitativno određivanje svakog analita u konačno razvijenoj HPLC-MS/MS metodi. SRM detekcija pozitivnih jona je podeljena na pet vremenskih segmenata, a u svakom segmentu su sakupljeni podaci za maksimalno četiri analita. Naime, osetljivost MS detekcije se smanjuje sa povećanjem broja uporedo snimanih spektara. Da bi se masena detekcija mogla podeliti na vremenske segmente, neophodno je bilo postići određeni nivo hromatografskog razdvajanja analita.

3.5. EKSTRAKCIJA ANALITA NA ČVRSTOJ FAZI

3.5.1. Izbor SPE kertridža

Za ekstrakciju lekova iz vode koristi se veliki broj raznovrsnih SPE kertridža, različitih proizvođača, pri čemu se obično određeni adsorbensi, tj. pakovanja kertridža, preporučuju za određenu farmakološku grupu lekova, ili za lekove iste polarosti. Pregledom literature, za ispitivanje efikasnosti ekstrakcije veoma različitih, odabranih analita iz vode, izabrani su sledeći SPE kertridži (Bruno *et al.* 2001b; Sacher *et al.* 2001; Ternes 2001; Miao *et al.* 2002; Miao *et al.* 2004; Batt and Aga 2005; Yang *et al.* 2005):

1. a) Oasis HLB (30 mg/1 cm³),
b) Oasis MCX (30 mg/1 cm³)
od proizvođača Waters (Milford, Massachusetts, SAD);
2. a) Supelclean ENVI-18 (500 mg/6 cm³),
b) Supelclean ENVI-Chrom P (250 mg/6 cm³),
c) Supelclean ENVI-Carb (500 mg/6 cm³),
d) Supelclean LC-SCX (500 mg/3 cm³)
od proizvođača Supelco (Bellefonte, Pennsylvania, SAD);
3. a) BAKERBOND Speedisk Octadecyl C₁₈ (20 mg/1 cm³),
b) BAKERBOND SDB-1 (200 mg/3 cm³),
c) BAKERBOND Arom. Sulf. Acid (100 mg/1 cm³),
d) BAKERBOND Speedisk H₂O-Phylic DVB (50 mg/3 cm³)
od proizvođača J.T. Baker (Mallinckrodt Baker B.V., Deventer, Holandija).

Pored komercijalno dostupnih kertridža, za ekstrakciju na čvrstoj fazi korišćeni su i kertridži pripremljeni pakovanjem dijatomejske zemlje (Sigma-Aldrich), koja je tretirana različitim reagensima, u prazne SPE kolone.

Oasis HLB kertridž, sa polimernim pakovanjem koje se sastoji od hidrofilnog poli(N-vinilpirolidona) i lipofilnog divinilbenzena, poseduje uravnotežene hidrofilne i lipofilne karakteristike. Specifičan sastav povećava sposobnost za reverzno-fazno zadržavanje polarnih analita, u poređenju sa tradicionalnim reverzno-faznim adsorbensima, kao što je silikatni materijal sa C₁₈ grupama. Za razliku od reverzno-faznih C₁₈ pakovanja, poseduje odlične mogućnosti kvašenja vodom, zbog čega sušenje pakovanja kolone nema negativan efekat na prinos metode. Po preporuci proizvođača, može se primenjivati za ekstrakciju kiselih, baznih i neutralnih jedinjenja, u celokupnom opsegu pH-vrednosti.

Oasis MCX kertridž predstavlja kombinaciju katjenskog izmjenjivača i reverzno-faznog adsorbensa koja se preporučuje za ekstrakciju baznih jedinjenja, u celom opsegu pH-vrednosti.

Supelclean ENVI-18 je kertridž namenjen za reverzno-faznu ekstrakciju iz vodenih rastvora. Sadrži polimerno vezane oktadecil-grupe (C₁₈) i oko 17% ugljenika. Pakovanje je otporno na ekstremne pH-vrednosti, pa je moguće vršiti ekstrakciju u širokom opsegu pH. Preporučuje se za prečišćavanje, ekstrakciju i koncentrovanje zagađujućih supstanci iz uzoraka vode iz životne sredine.

Supelclean ENVI-Chrom P kertridž sadrži kopolimer stirena i divinilbenzena, pogodan za adsorpciju ili reverzno-faznu ekstrakciju iz vodenih rastvora, u širokom opsegu pH. Koristi se za zadržavanje hidrofobnih jedinjenja sa delimično hidrofilnim karakteristikama. Proizvođač posebno preporučuje ovaj kertridž za ekstrakciju aromatičnih i fenolnih jedinjenja iz vodenih matrica u životnoj sredini.

Supelclean ENVI-Carb je kertridž pakovan grafitnim neporoznim ugljenikom koji je namenjen za reverzno-faznu ekstrakciju iz vodenih rastvora. Zbog velikog afiniteta pakovanja prema polarnim i nepolarnim organskim jedinjenjima, moguće ih je ekstrahovati i iz polarnih i iz nepolarnih matrica.

Supelclean LC-SCX kertridž sadrži katjonski jonoizmenjivač, tj. adsorbens sa anjonskim funkcionalnim grupama koje potiču od alifatične sulfonske kiseline. Preporučuje se za jonoizmenjivačku ekstrakciju baznih analita.

BAKERBOND Speedisk Octadecyl C₁₈ je kertridž koji se preporučuje za reverzno-faznu ekstrakciju slabo polarnih i nepolarnih analita.

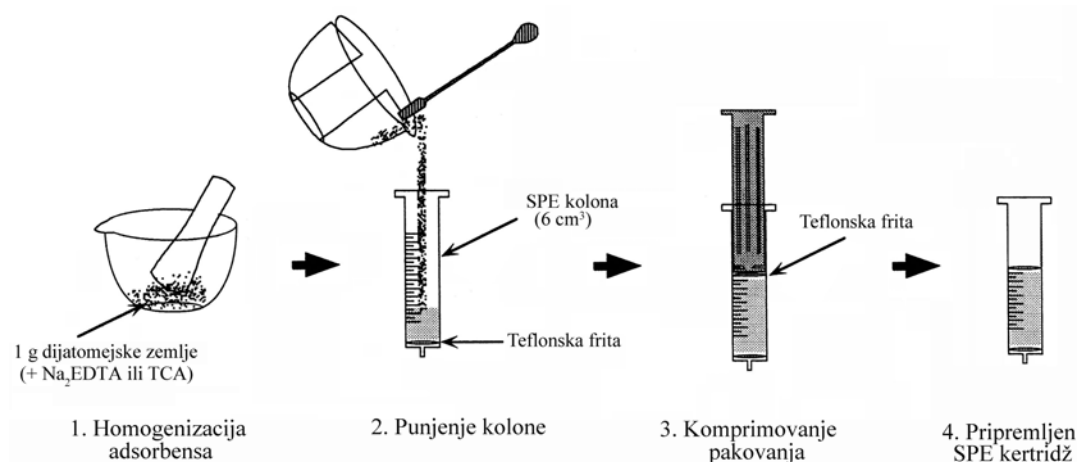
BAKERBOND SDB-1 kertridž je pakovan kopolimerom stirena i divinilbenzena, sa velikim kapacitetom za polarne analite. Preporučuje se za ekstrakciju aromatičnih i fenolnih jedinjenja iz vode.

BAKERBOND Arom. Sulf. Acid je kertridž koji sadrži jak katjonski izmenjivač, na bazi aromatične sulfonske kiseline.

BAKERBOND Speedisk H₂O-Phylic DVB je kertridž sa pakovanjem na bazi divinilbenzena koji se može koristiti za adsorpciju hidrofobnih i slabo hidrofilnih jedinjenja.

Dijatomejska zemlja, poznata i kao dijatomit, je prirodna sedimentna stena nastala od fosilnih ostataka diatoma, važne grupe eukariotskih algi i najčešće vrste fitoplanktona. Karakterističan hemijski sastav dijatomita je: oko 89% SiO₂, 3,8% Al₂O₃, 1% Fe₂O₃, 2,5% Na₂O, 2,5% K₂O, 0,5% CaO, 0,5% MgO i 0,2% TiO₂. Zbog mekoće, lako se usitnjava do finog praška, koji ima abrazivna svojstva i veoma je lagan zbog velike poroznosti. Zbog odličnih adsorpcionih svojstava, često se koristi za adsorpciju toksičnih tečnosti, kao npr. za čišćenje naftnih mrlja.

Kertridži sa dijatomitom su pripremljeni punjenjem prazne SPE kolone (zapremine 6 cm³) tretiranim adsorbensom (mase 500 mg) i komprimovanjem pakovanja između dve porozne frite, na način prikazan na slici 9. Pripremljena su tri različita pakovanja kolone: čist dijatomit, dijatomit tretiran rastvorom Na₂EDTA i dijatomit tretiran trihlorsirćetnom kiselinom. Rastvor Na₂EDTA je pripremljen rastvaranjem 0,15 g ove soli u 0,2 cm³ ultračiste vode. Zatim je ovaj rastvor dodat u 1 g dijatomejske zemlje, smeša je homogenizovana i ostavljena da se suši na vazduhu 24 časa. Polovina ove smeše korišćena je za pakovanje kolone. Rastvor TCA je dobijen razblaživanjem 0,1 cm³ koncentrovane kiseline sa 1,5 cm³ ultračiste vode. U 1 g dijatomita dodato je 0,5 cm³ pripremljenog rastvora TCA, smeša je promešana i ostavljena da se suši na vazduhu 24 časa. Polovina ove smeše korišćena je za pakovanje kolone.

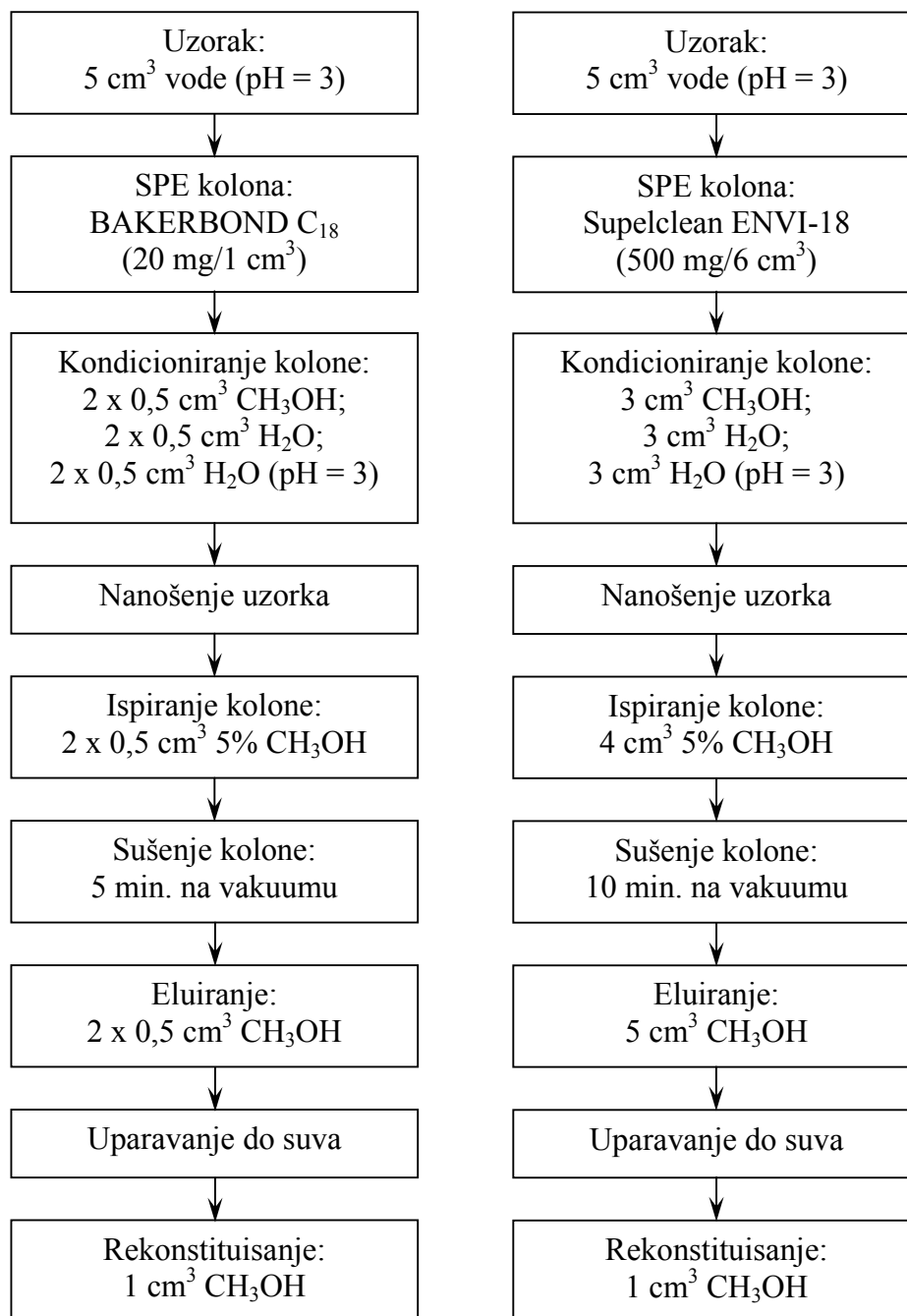


Slika 9. Priprema SPE kertridža pakovanih dijatomejskom zemljom.

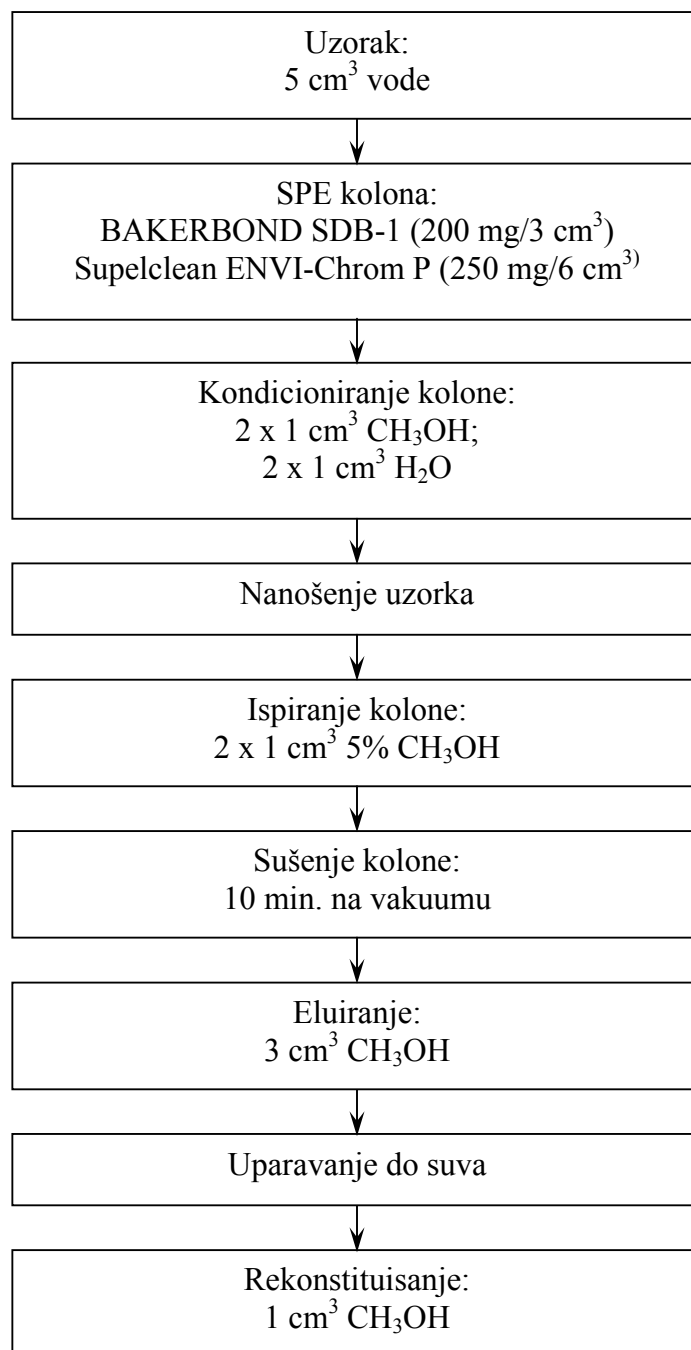
Na osnovu literature i prema predloženim procedurama proizvođača kertridža, definisano je devet različitih SPE procedura za pripremu uzoraka vode, uz korišćenje trinaest SPE kertridža. Naime, pojedini kertridži različitih proizvođača imaju sličan sastav pakovanja i preporučuju se za ekstrakciju istih grupa analita, zbog čega mogu biti deo iste SPE procedure. Prilikom izbora optimalnog SPE kertridža za ekstrakciju veoma različitih lekova iz vode, korišćene su sledeće SPE metode (šeme 1–8):

1. SPE-C₁₈ (Hirsch *et al.* 1999; Sacher *et al.* 2001; Ternes 2001; Ternes *et al.* 2001; Zhu *et al.* 2001; Miao *et al.* 2002; Hernando *et al.* 2004; Zuehlke *et al.* 2004);
2. SPE-SDB/CHROM (Hirsch *et al.* 1999; Ternes 2001);
3. SPE-UGLJENIČNI (Bruno *et al.* 2001b);
4. SPE-KATJONSKI (Stolker *et al.* 2004);
5. SPE-HLB I (Miao and Metcalfe 2003a; Miao *et al.* 2004);
6. SPE-HLB II (Farré *et al.* 2001; Öllers *et al.* 2001; González-Barreiro *et al.* 2003; Hilton and Thomas 2003; Quintana and Reemtsma 2004);
7. SPE-HLB III (Miao *et al.* 2004; Yang and Carlson 2004; Yang *et al.* 2004, 2005; Batt and Aga 2005; Batt *et al.* 2006);
8. SPE-DIJATOMIT I;
9. SPE-DIJATOMIT II.

Uzorci vode za SPE procedure pripremljeni su dodatkom smeše svih lekova koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$, tako da očekivana koncentracija svakog analita, nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi, iznosi 100 ng cm^{-3} . Svi konačno dobijeni ekstrakti su filtrirani kroz poli(viniliden fluorid) (PVDF) filter (Roth, Karlsruhe, Germany), veličine pora $0,45 \mu\text{m}$.

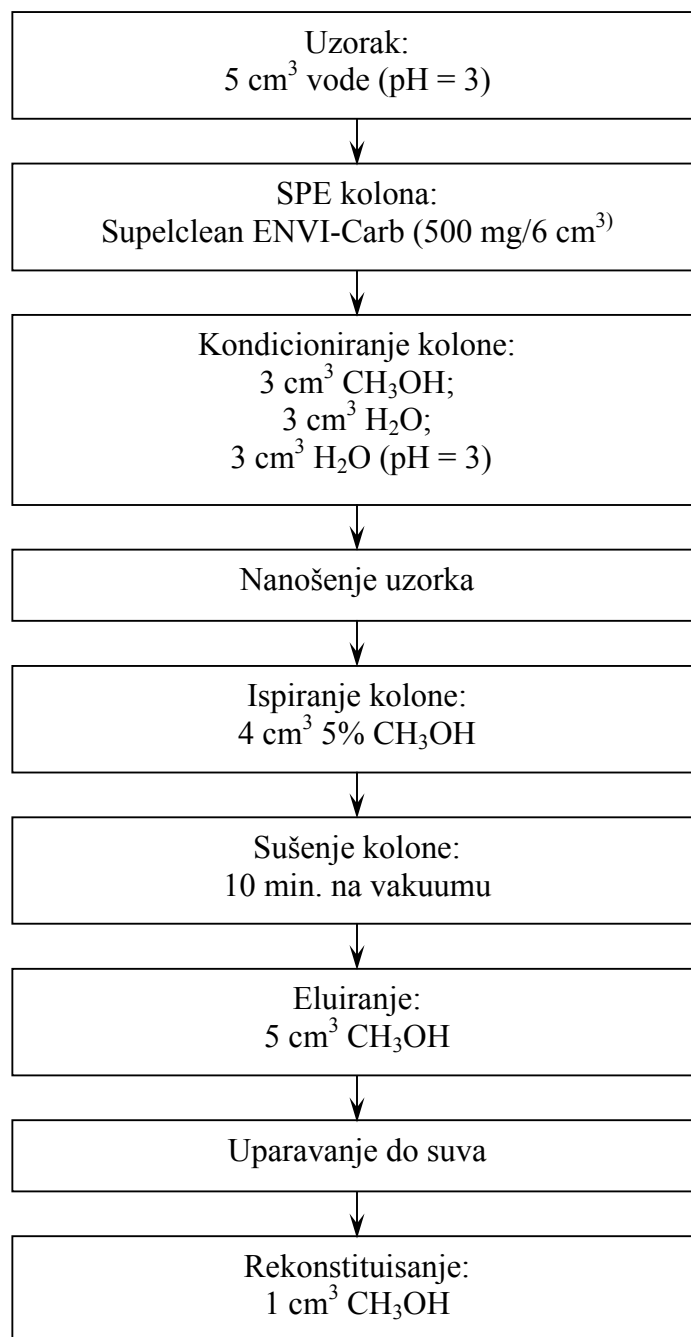
SPE-C₁₈Šema 1. Priprema uzorka vode metodom SPE-C₁₈.

SPE-SDB/CHROM



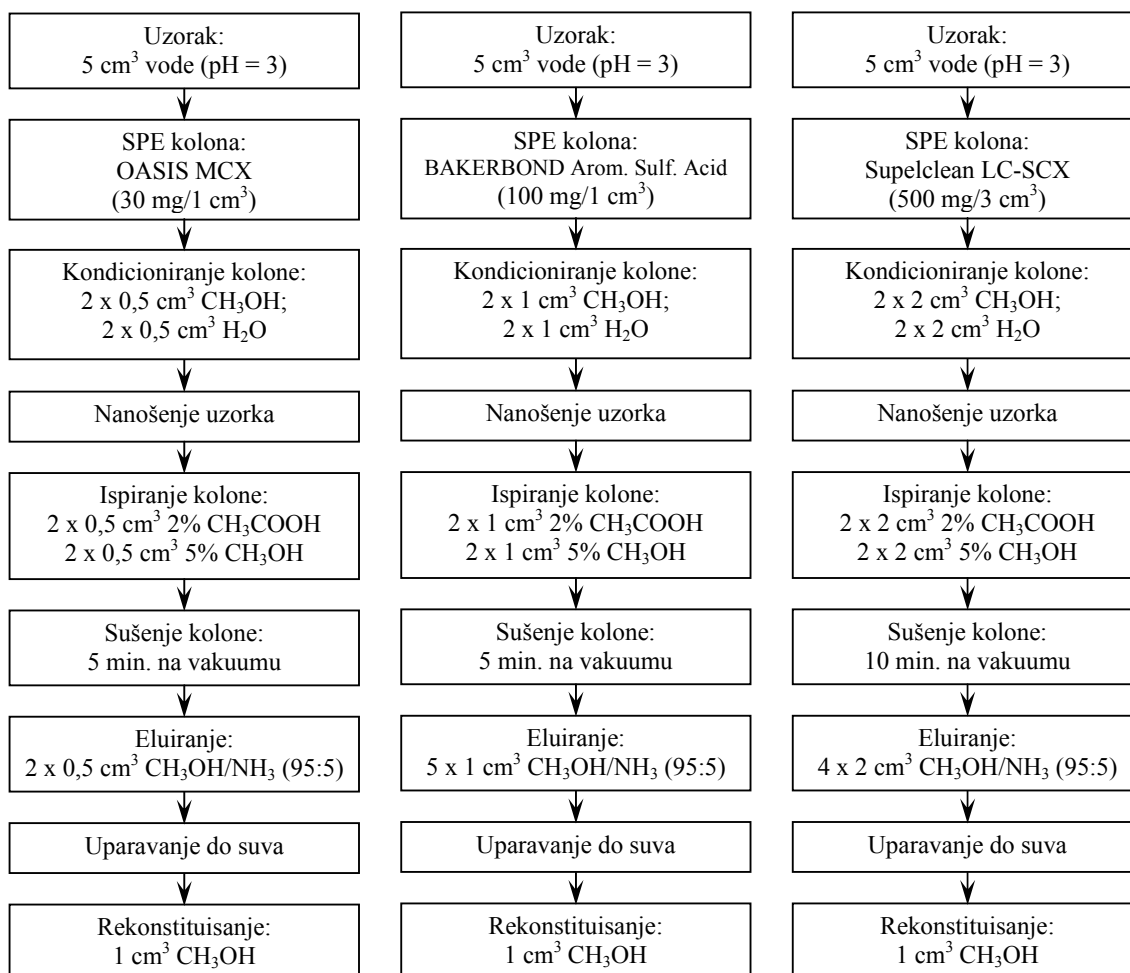
Šema 2. Priprema uzorka vode metodom SPE-SDB/CHROM.

SPE-UGLJENIČNI

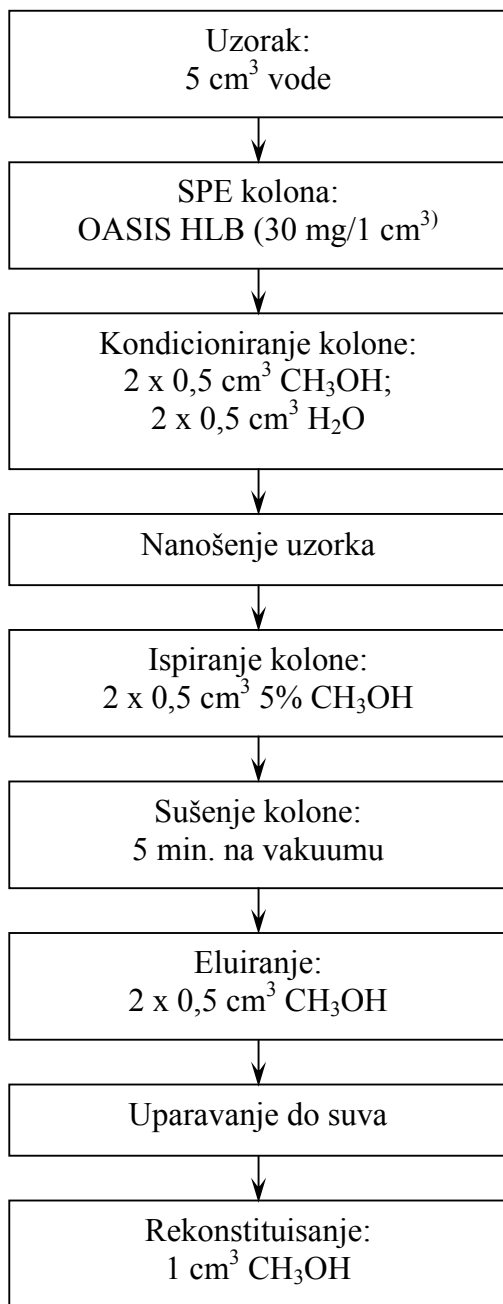


Šema 3. Priprema uzorka vode metodom SPE-UGLJENIČNI.

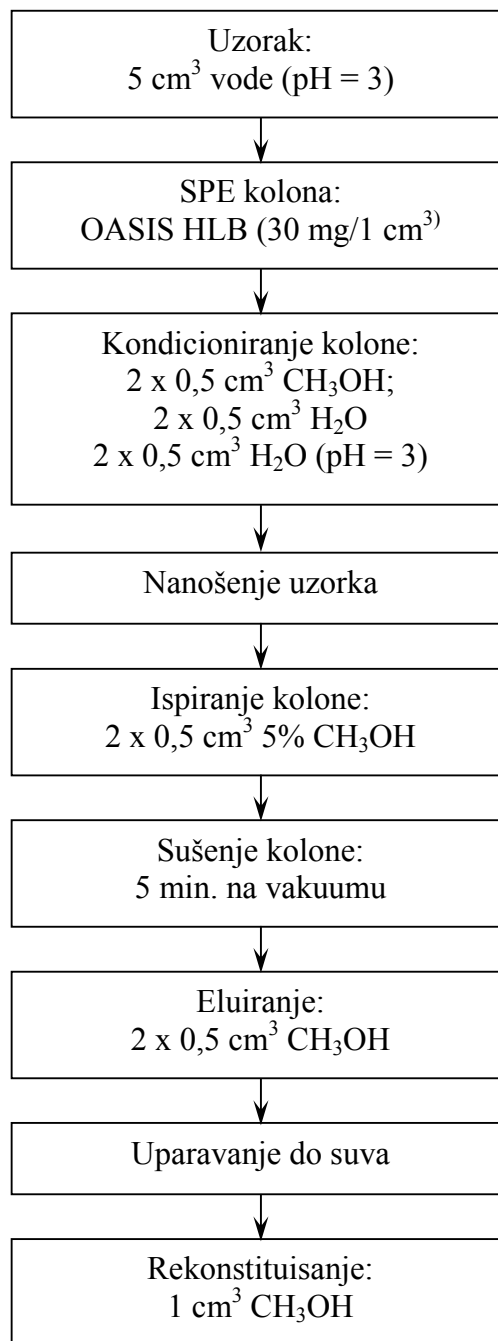
SPE-KATJONSKI



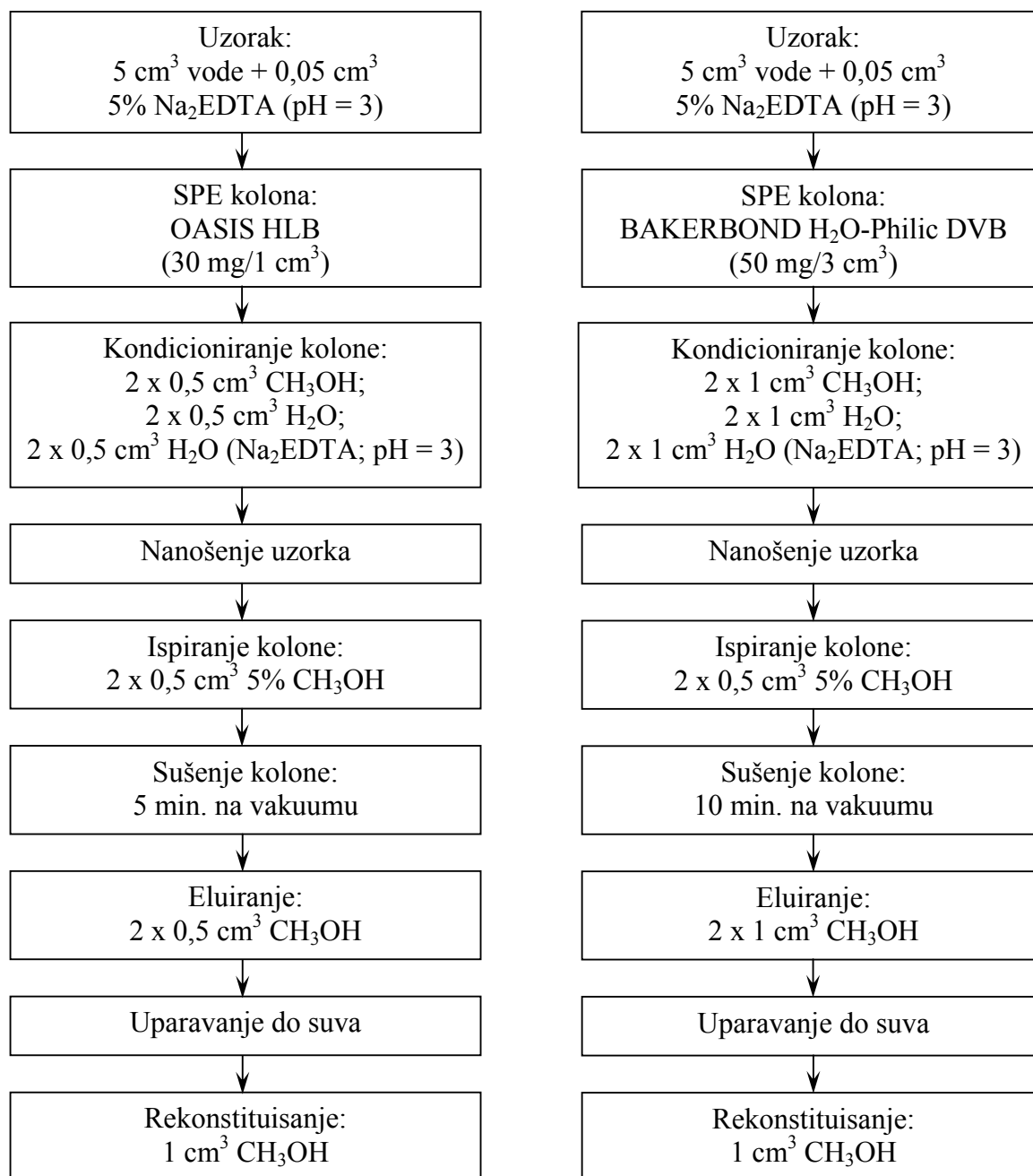
Šema 4. Priprema uzorka vode metodom SPE-KATJONSKI.

SPE-HLB I

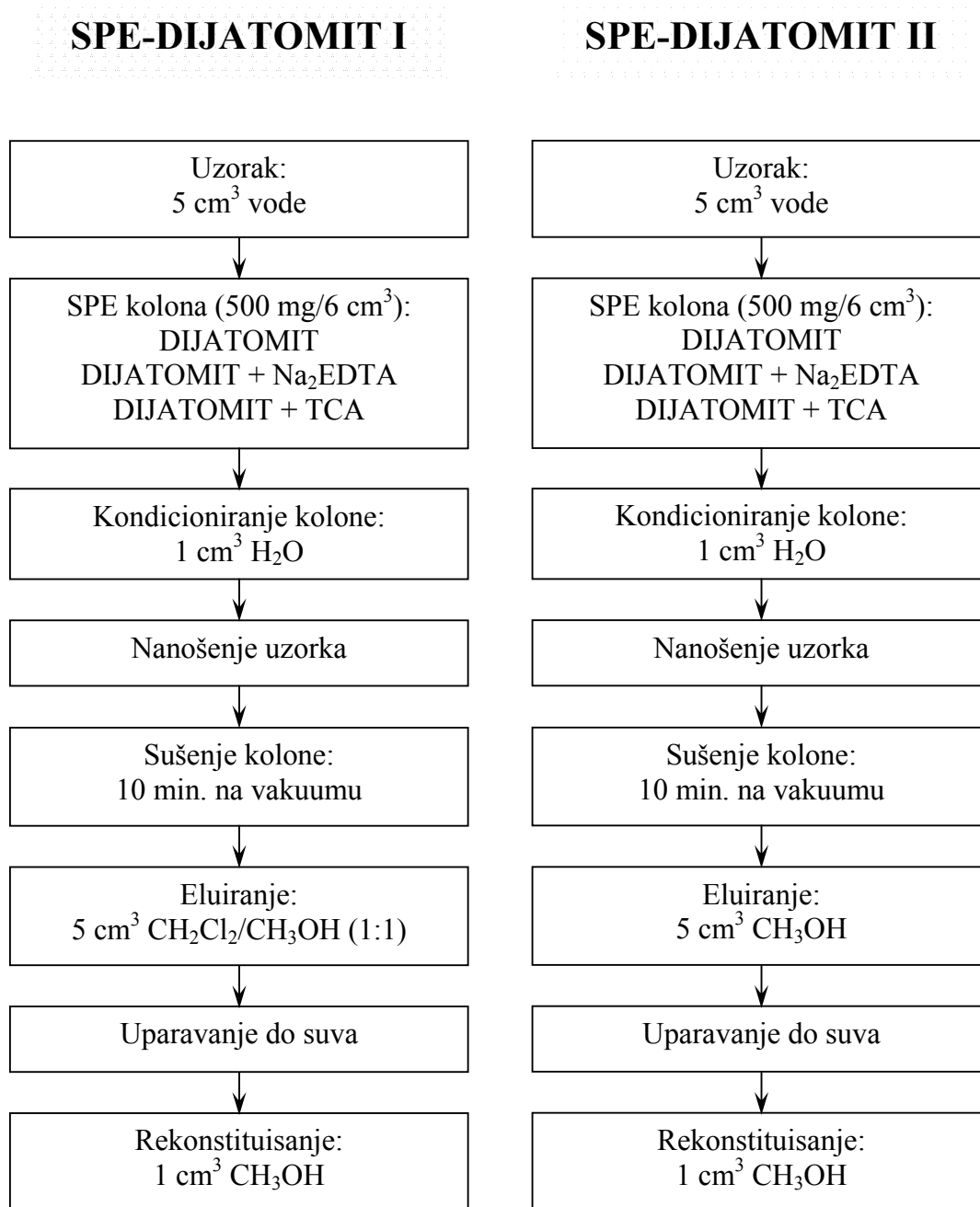
Šema 5. Priprema uzorka vode metodom SPE-HLB I.

SPE-HLB II

Šema 6. Priprema uzorka vode metodom SPE-HLB II.

SPE-HLB III

Šema 7. Priprema uzorka vode metodom SPE-HLB III.



Šema 8. Priprema uzorka vode metodama SPE-DIJATOMIT I i SPE-DIJATOMIT II.

3.5.2. Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka vode

Nakon izbora kertridža za ekstrakciju odabranih lekova iz vode, optimizovana je pH-vrednost uzorka vode pri kojoj je najveći prinos ekstrakcije svakog analita. Za eksperiment su odabrane sledeće pH-vrednosti: 3,0, 4,5, 6,0 i 7,5. Uzorci vode su pripremljeni dodatkom smeše svih lekova koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ ultračistoj vodi, tako da očekivana koncentracija svakog analita, nakon ekstrakcije na čvrstoj fazi, iznosi 100 ng cm^{-3} . Pre nanošenja pripremljenog uzorka vode, pakovanje kolone je kondicionirano sa 5 cm^3 metanola, zatim 5 cm^3 ultračiste vode, i konačno 5 cm^3 ultračiste vode sa pH-vrednošću podešenom tako da odgovara pH-vrednosti pripremljenog uzorka vode. Na kondicionirani kertridž je nanesen pripremljeni uzorak vode, zapremine 100 cm^3 , sa pH-vrednostima podešenim na 3,0, 4,5, 6,0 i 7,5. Nakon nanošenja pripremljenog uzorka, kolona je isprana sa 5 cm^3 5% rastvora metanola. Potom je pakovanje sušeno 10 min. na vakuumu. Za eluiranje analita korišćeno je 10 cm^3 metanola. Zatim je ekstrakt uparavan do suva u struji azota u vodenom kupatilu na temperaturi od $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Nakon rekonstituisanja sa 1 cm^3 metanola, ekstrakt je filtriran kroz PVDF filter i analiziran.

3.5.3. Izbor optimalne zapremine eluenta

Za određivanje optimalne zapremine rastvarača, koja je potrebna za potpuno eluiranje analita sa SPE kolone, korišćen je uzorak vode, zapremine 100 cm^3 , prethodno pripremljen dodatkom smeše svih lekova ultračistoj vodi tako da koncentracija svakog analita u konačno dobijenom ekstraktu iznosi 100 ng cm^{-3} . Zbog pojednostavljenja, eksperiment je izveden bez podešavanja pH, tj. na $\text{pH} = 4,5$, što je pH-vrednost ultračiste vode. SPE kertridž je kondicioniran dodatkom 5 cm^3 metanola, a zatim 5 cm^3 ultračiste vode. Pripremljen uzorak vode je nanesen na kolonu, kolona je isprana sa 5 cm^3 5% rastvora metanola, a zatim sušena na vakuumu 10 min. Eluiranje je prvo izvedeno sa 7 cm^3 metanola. Zatim je kertridž eluiran sa dodatna 3 cm^3 metanola. Onda su sakupljeni inkrementi od po još 3 cm^3 i 2 cm^3 eluata. Ekstrakti su upareni do suva, rekonstituisani sa 1 cm^3 metanola, filtrirani kroz PVDF filter i analizirani.

3.5.4. Izbor optimalne zapremine uzorka vode

Za optimizaciju zapremine uzorka vode koja se nanosi na kertridž, vršen je odabir između 50, 100, 250 i 500 cm^3 uzorka. Različite zapremine uzorka vode pripremljene su dodatkom smeše svih lekova ultračistoj vodi tako da koncentracija svakog analita u konačno dobijenom ekstraktu iznosi 100 ng cm^{-3} . Ovaj eksperiment je izveden na $\text{pH} = 3,0$, s obzirom na to da je većina analita ekstrahovana sa najvećim prinosom na ovoj pH-vrednosti. Pakovanje kolone je kondicionirano sa 5 cm^3 metanola, zatim 5 cm^3 ultračiste vode, i konačno 5 cm^3 ultračiste vode sa pH-vrednošću podešenom na 3. Nakon nanošenja različitih zapremina uzorka, kolona je isprana sa 5 cm^3 5% rastvora metanola i sušena 10 min. na vakuumu. Za eluiranje analita korišćeno je 15 cm^3 metanola. Ekstrakt je uparen do suva, rekonstituisan sa 1 cm^3 metanola, filtriran kroz PVDF filter i analiziran.

3.5.5. Validacija metode

Razvijena i optimizovana metoda je konačno testirana na realnom uzorku podzemne vode koji je pripremljen tako da sadrži odabrane lekove u koncentraciji 100 i 500 ng dm⁻³. U konačno dobijenim ekstraktima očekuju se koncentracije od 10 i 50 ng cm⁻³. Prethodnom analizom uzorka podzemne vode utvrđeno je da ne sadrži tragove posmatranih analita. Pre dodatka smeše lekova, uzorak podzemne vode je filtriran kroz filter sa staklenim vlaknima (Whatman GmbH, Dassel, Nemačka), veličine pora < 1 μm. Pripremljeni uzorak vode je analiziran prema optimizovanoj SPE proceduri. Eksperiment je izveden bez podešavanja pH i na pH = 3, koristeći 100 cm³ uzorka vode i 15 cm³ metanola kao eluenta.

3.6. KALIBRACIJA

Prilikom detekcije analita pomoću ESI masenog spektrometra, pouzdana kalibracija se može postići korišćenjem internog standarda (Batt and Aga 2005; Gómez *et al.* 2006), eksternom kalibracijom sa standardima koji odgovaraju matrici (Gros *et al.* 2006b; Kang *et al.* 2007) ili metodom standardnog dodatka (Conley *et al.* 2008). Tradicionalna eksterna kalibracija sa standardima u rastvaraču nije pouzdana zbog uticaja matrice koji se javlja u ESI procesu. Interni standard je obično jedinjenje strukturno slično analitu ili izotopski obeležen analit. Prilikom analize smeša različitih jedinjenja, teško je pronaći interni standard koji bi odgovarao većini analita. Smatra se da je metoda standardnog dodatka komplikovana za rad i da zahteva previše vremena. Zbog toga je kao kalibraciona metoda odabrana metoda eksterne kalibracije sa standardima koji odgovaraju matrici uzorka. Za eksperimente optimizacije analitičke metode, standard je pripremljen tako što je ultračista voda prolazila kroz SPE proceduru, uporedo sa uzorkom, a nakon uparavanja do suva, ekstrakt je rekonstituisan sa 1 cm³ smeše svih lekova koncentracije 100 ng cm⁻³.

Za eksperimente sa realnim uzorcima voda, za svaku vrstu vode (podzemnu i površinsku) je napravljeno pet kalibracionih rastvora, koncentracija 10, 25, 50, 100 i 250 ng cm⁻³, na osnovu kojih je dobijena eksterna kalibraciona kriva sa pet tačaka. Standardi su pripremljeni dodatkom rastvora svih lekova u ekstrakte slepe probe nakon SPE procedure. Pre pripreme kalibracionih rastvora, utvrđeno je da slepe probe ne sadrže tragove odabranih analita.

3.7. UZIMANJE UZORAKA VODE

Analizirano je ukupno 26 uzoraka vode, od čega 15 uzoraka površinske, 9 uzoraka podzemne i 2 uzorka otpadne vode (tabela 5). Iz reke Dunav uzeto je 9 uzoraka u 9 gradova nizvodno od ušća Save u Dunav (slika 10): Beograd, Smederevo, Ram, Veliko Gradište, Donji Milanovac, Tekija, Kladovo, Kusjak i Radujevac. Ispitivana su tri uzorka savske vode, uzeta u blizini Ušća, neposredno pre ulivanja u Dunav, kao i po jedan uzorak rečne vode iz Nišave (Niš), Tamiša (Pančevo) i uzorak vode iz jezera Očaga (Lazarevac) (slika 11). Gradovi u kojima su uzeti uzorci vode nemaju postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Da bi se ispitao direktan uticaj otpadnih voda na podzemne, kao i površinske vode, uzeta su dva uzorka otpadnih voda iz kanala Surčin i Galovica (slika 12), zatim tri uzorka podzemnih voda iz dva pijezometra u neposrednoj blizini kanala, i dva uzorka iz reke Save nizvodno od izlivanja kanala u reku (uzorci Sava-Sajam i Sava-Brankov most). U kanale Surčin i Galovica ulivaju se otpadne vode sa poljoprivrednih dobara i farmi životinja. Uzorci podzemnih voda su sakupljeni iz pijezometra 5 (slika 12) koji se nalazi odmah pored kanala Surčin i pijezometra 4 koji se nalazi na samoj obali, pre izlivanja kanala u reku Savu. Iz pijezometra 4 uzeta su dva uzorka sa različitim dubina koji su označeni kao 4 i 4p, pri čemu 4p označava uzorak sa manje dubine, tj. pličići. Takođe je uzet uzorak iz pijezometra 2 (slika 12) koji se nalazi na samoj farmi životinja.

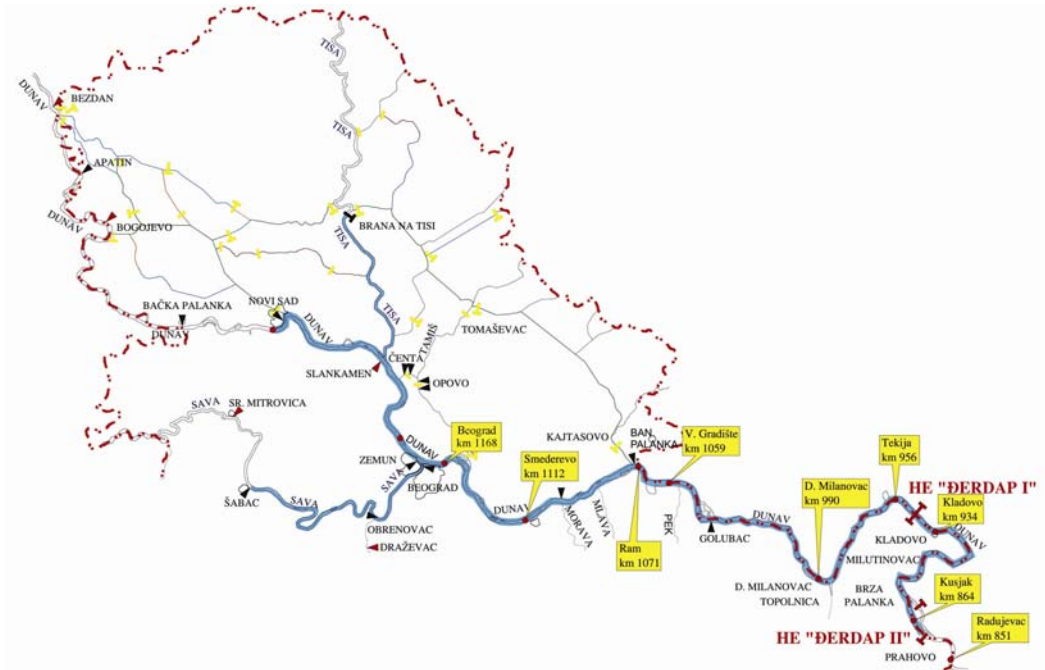
Konačno, analizirani su uzorci iz reni bunara i pogona za preradu vode Bežanija, kao i česmenska voda, u cilju ispitivanja prisustva tragova lekova u vodi koja se koristi za piće, kao i mogućnosti njihovog uklanjanja u procesima prečišćavanja. U sklopu javnog komunalnog preduzeća „Beogradski vodovod i kanalizacija“ postoji pet postrojenja za preradu i prečišćavanje vode: Bežanija, Banovo brdo, Bele vode, Makiš i Vinča. Postrojenja Bežanija, Banovo brdo i deo pogona Bele vode prerađuju podzemnu vodu. Drugi deo postrojenja Bele vode i pogon Makiš prerađuju savsku vodu, dok se u postrojenju Vinča prerađuje dunavska rečna voda. Odnos podzemne i površinske vode koja se prerađuje je 70:30, što znači da se grad Beograd pretežno snabdeva vodom iz podzemnih izvora, tj. reni bunara izgrađenih u priobalju reke Save. U pogonu za preradu vode Bežanija osnovu sistema za obezbeđenje sirove podzemne vode čini 60 reni bunara, a voda se doprema iz dva pravca – Progara i Ušća (slika 13). U ovom postojenju, uobičajena tehnologija pripreme vode, kojom se obezbeđuje kvalitet prečišćene vode u skladu sa zakonskom regulativom, obuhvata procese aeracije, taloženja, filtracije i dezinfekcije. Aeracijom se uklanjaju rastvorna jedinjenja gvožđa i mangana, usled oksidacije do slabo rastvorljivih $\text{Fe}(\text{OH})_3$ i MnO_2 , kao i nepoželjni rastvorljivi gasovi vodonik-sulfid, amonijak i drugi. Ispod površine za aeraciju nalazi se taložni bazen u kojem se razdvajaju čvrsta i tečna faza pod uticajem gravitacije. Zatim se tečna faza pod pritiskom propušta kroz filtere koji se sastoje iz sloja peska i sloja antracita. Konačno, voda se dezinfikuje hlorom radi uklanjanja patogenih mikroorganizama. U pogonu za preradu vode Bežanija uzeta su tri uzorka vode: po jedan uzorak iz dva aeratora – Progar i Ušće u kojima se nalazi sirova voda sakupljena iz reni bunara iz pravca Progara i iz pravca Ušća, kao i uzorak iz bazena čiste vode, nakon faze dezinfekcije. Takođe je uzet po jedan uzorak vode iz reni bunara kod Progara (RB-92) i reni bunara na Ušću (RB-4).

Svi uzorci su sakupljeni u plastičnim bocama zapremine 500 cm^3 i čuvani u zamrzivaču, bez dodatka konzervansa, do analize, obično 1–2 dana nakon uzimanja uzoraka.

Tabela 5. Opis analiziranih uzoraka vode.

UZORAK VODE	OPIS UZORKA VODE
Beograd	Rečna voda iz Dunava kod Beograda
Smederevo	Rečna voda iz Dunava kod Smedereva
Ram	Rečna voda iz Dunava kod Rama
Veliko Gradište	Rečna voda iz Dunava kod Velikog Gradišta
Donji Milanovac	Rečna voda iz Dunava kod Donjeg Milanovca
Tekija	Rečna voda iz Dunava kod Tekije
Kladovo	Rečna voda iz Dunava kod Kladova
Kusjak	Rečna voda iz Dunava kod Kusjaka
Radujevac	Rečna voda iz Dunava kod Radujevca
Sava	Rečna voda iz Save kod Ušća u Beogradu
Nišava	Rečna voda iz Nišave kod Niša
Tamiš	Rečna voda iz Tamiša kod Pančeva
Očaga	Jezerska voda iz jezera Očaga kod Lazarevca
Kanal Surčin	Otpadna voda sa poljoprivrednih dobara i farmi životinja
Kanal Galovica	Otpadna voda sa poljoprivrednih dobara i farmi životinja
Pijezometar 5	Podzemna voda pored kanala Surčin
Pijezometar 4p	Podzemna voda pre izlivanja kanala u Savu, sa manje dubine
Pijezometar 4	Podzemna voda pre izlivanja kanala u Savu, sa veće dubine
Pijezometar 2	Podzemna voda sa farme životinja
Sava (Sajam)	Rečna voda iz Save kod Sajma, nizvodno od kanala
Sava (Brankov most)	Rečna voda iz Save kod Brankovog mosta, nizvodno od kanala
RB-92 (Progar)	Podzemna voda iz reni bunara 92 kod Progara
Aerator-Progar	Sirova podzemna voda iz niza reni bunara iz pravca Progara
RB-4 (Ušće)	Podzemna voda iz reni bunara 4 na Ušću
Aerator-Ušće	Sirova podzemna voda iz niza reni bunara iz pravca Ušća
Bazen čiste vode	Prečišćena voda, nakon faze dezinfekcije

↓
Dunav nizvodno



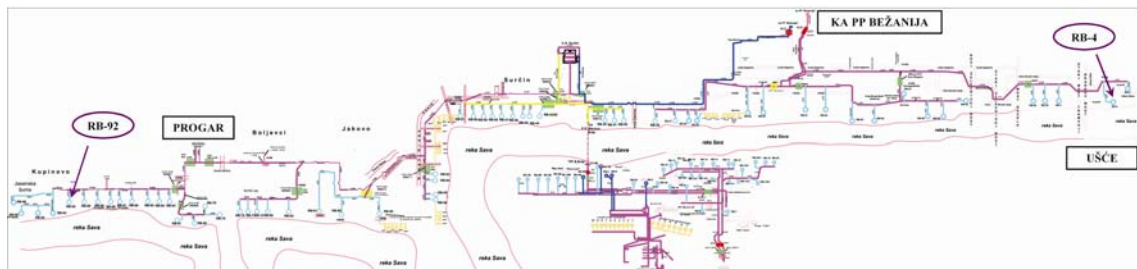
Slika 10. Prikaz mesta uzorkovanja iz reke Dunav.



Slika 11. Prikaz mesta uzorkovanja površinske vode u Srbiji.



Slika 12. Prikaz mesta uzorkovanja vode iz otpadnih kanala i podzemne vode iz pijezometara.



Slika 13. Raspored reni bunara beogradskog izvorišta podzemne vode u sistemu za transport sirove vode.

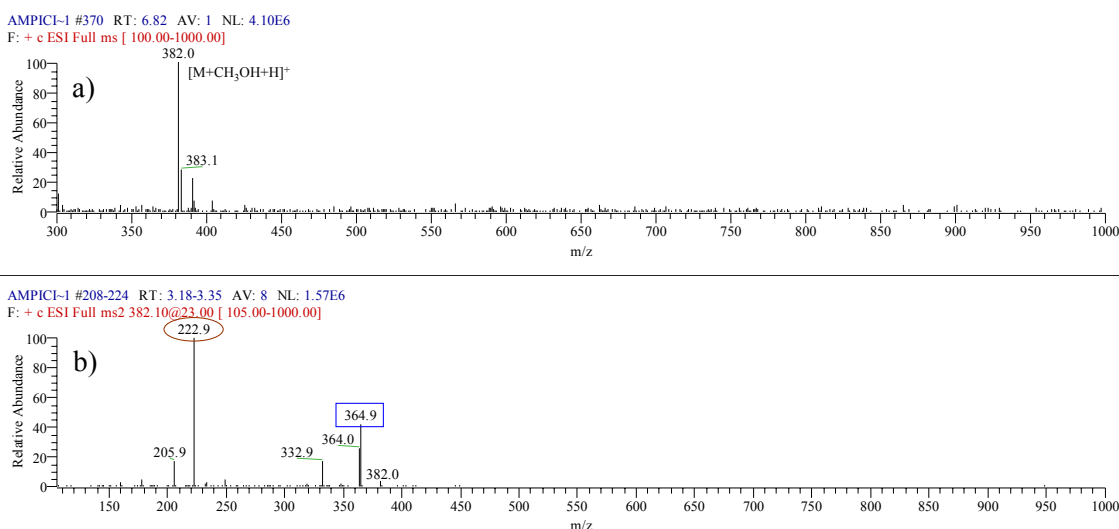
4. REZULTATI I DISKUSIJA

4.1. MASENI SPEKTRI ANALITA

Maseni spektri pozitivnih (ESI+) ili negativnih (ESI-) jona analita, na osnovu kojih su odabrani prekursor joni i reakcije fragmentacije u najintenzivnije i najstabilnije fragmentne jone, prikazani su na slikama 14–32. Na spektrima su crvenom elipsom (○) označeni fragmentni joni odabrani za kvantifikaciju svakog analita, dok su plavim pravougaonikom (□) označeni joni odabrani za potvrdu prisustva analita. Za potvrdu su odabrani dodatni fragmentni joni prekursor jona ili joni nastali daljom fragmentacijom fragmentnih jona odabranih za kvantifikaciju analita. U Prilogu (slike 54–65) su dati ostali MSⁿ spektri odabranih lekova dobijeni MSⁿ reakcijama fragmentacije analita u jonskom trapu.

Rezultati su pokazali da u procesu elektrosprej jonizacije trimetoprima (slika 18), eritromicina (slika 19), azitromicina (slika 20), diazepama (slika 22), bromazepama (slika 23), karbamazepina (slika 25) i paracetamola (slika 28) nastaju samo pozitivni joni. Kod ovih jedinjenja u MS spektrima dominiraju protonovani molekuli ($[M+H]^+$), dok su kod makrolida – eritromicina i azitromicina (slike 19 i 20) veoma intenzivni i adukti sa katjonom natrijuma ($[M+Na]^+$). Maseni spektar bromazepama (slika 23) karakterističan je za jedinjenja koja sadrže brom. U spektru se uočavaju dva, podjednako zastupljena jona, koji odgovaraju protonovanom molekulu bromazepama (m/z 316) i protonovanom molekulu koji sadrži izotop broma (m/z 318). Za navedene analite je utvrđeno da ih je potrebno analizirati kao pozitivne jone i da se njihova identifikacija i kvantifikacija treba zasnivati na izolovanju protonovanog molekula, kao prekursor jona za dalju MSⁿ analizu.

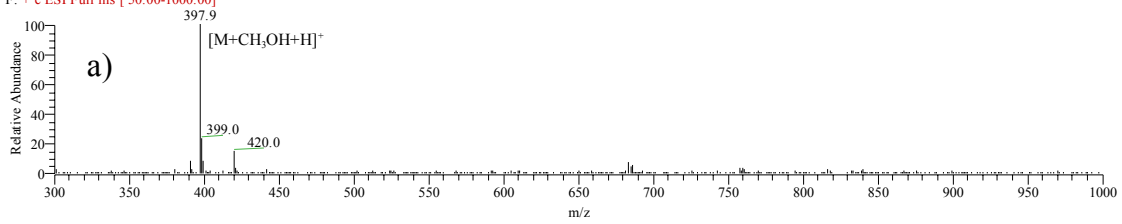
Farmaceutska jedinjenja koja u procesu elektrosprej jonizacije stvaraju samo negativne jone su: fenobarbiton (slika 26), ibuprofen (slika 27), metamizol (slika 29), flurbiprofen (slika 30) i acetilsalicilna kiselina (slika 31). Izuzev acetilsalicilne kiseline, u MS spektrima ovih analita dominiraju deprotonovani molekuli ($[M-H]^-$), koji su odabrani kao prekursor joni za MSⁿ dalju analizu navedenih analita.



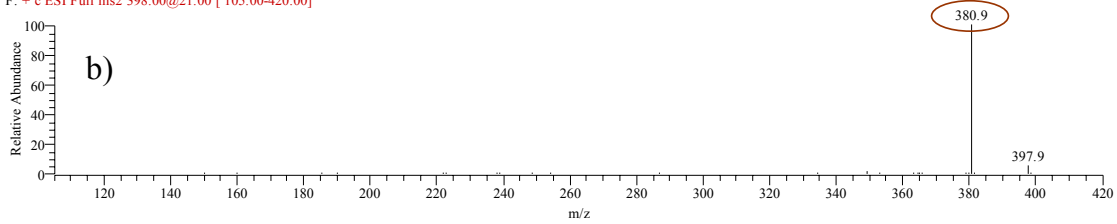
Slika 14. Maseni spektri ampicilina: a) ESI(+)MS; b) ESI(+)MS² $[M+CH_3OH+H]^+$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

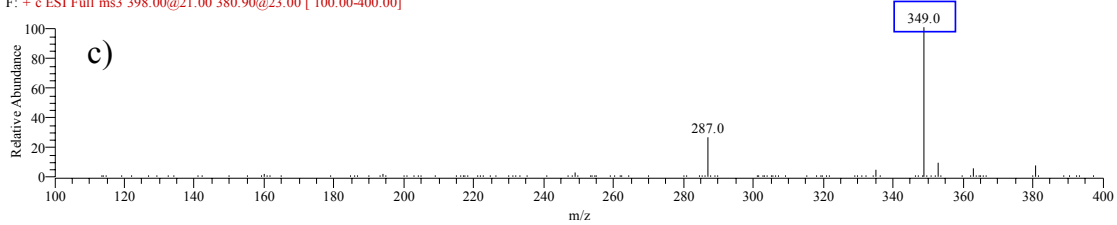
AMOXIC-1 #329 RT: 6.76 AV: 1 NL: 1.08E7
F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



AMOXIC-1 #95 RT: 1.70 AV: 1 NL: 1.30E7
F: + c ESI Full ms2 398.00@21.00 [105.00-420.00]

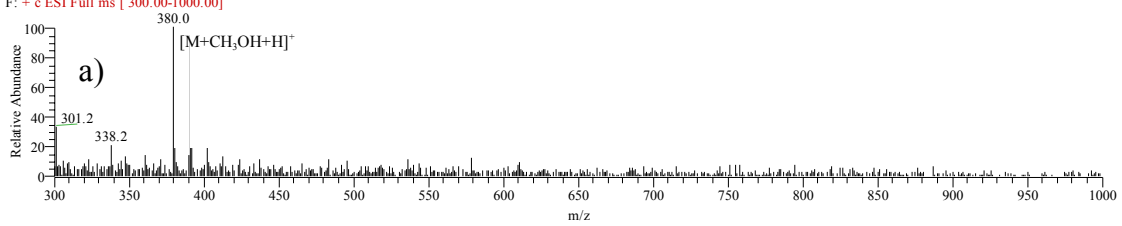


AMOXIC-1 #132-150 RT: 2.37-2.63 AV: 16 NL: 6.54E6
F: + c ESI Full ms3 398.00@21.00 380.90@23.00 [100.00-400.00]

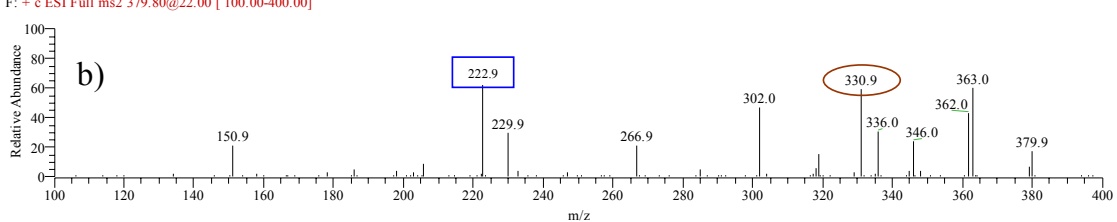


Slika 15. Maseni spektri amoksicilina: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) $MS^2 [M+CH_3OH+H]^+$; c) ESI(+) $MS^3 [M+CH_3OH+H]^+$.

CEFALE-1 #52 RT: 0.74 AV: 1 NL: 1.31E6
F: + c ESI Full ms [300.00-1000.00]



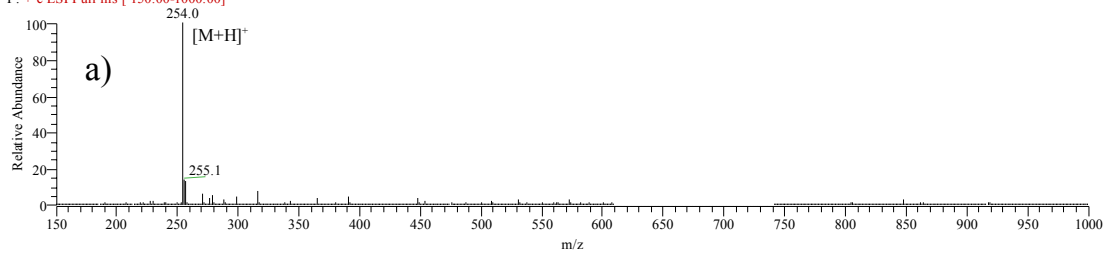
CEFALE-1 #166-221 RT: 3.15-4.32 AV: 13 NL: 8.55E4
F: + c ESI Full ms2 379.80@22.00 [100.00-400.00]



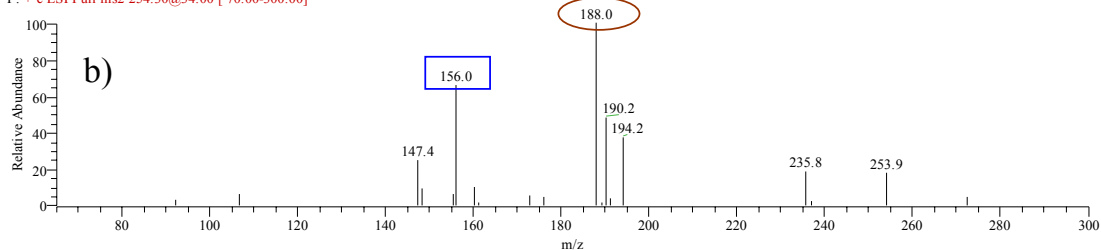
Slika 16. Maseni spektri cefaleksina: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) $MS^2 [M+CH_3OH+H]^+$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

SULFAM-2 #36 RT: 3.25 AV: 1 NL: 5.54E5
 F: + c ESI Full ms [150.00-1000.00]

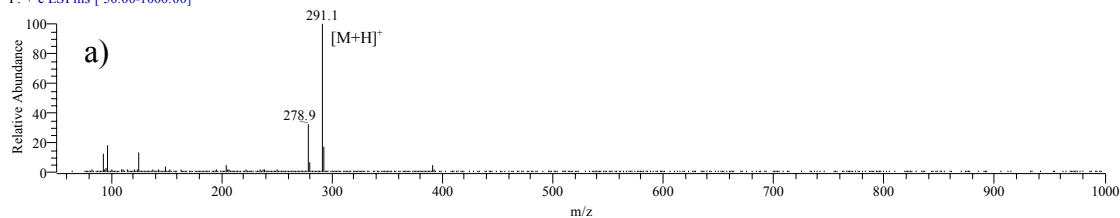


SULFAM-2 #74 RT: 1.26 AV: 1 NL: 4.44E4
 F: + c ESI Full ms2 254.30@34.00 [70.00-300.00]

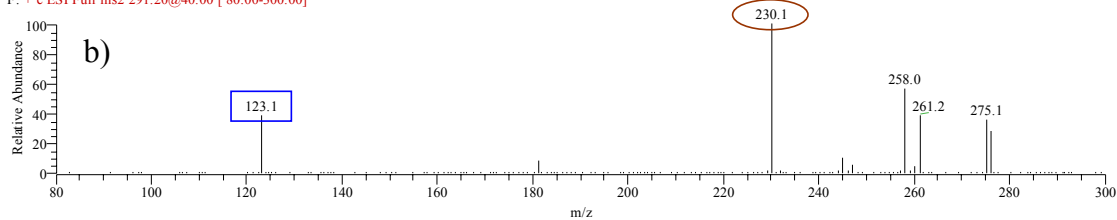


Slika 17. Maseni spektri sulfametoksazola: a) ESI(+)*MS*; b) ESI(+)*MS*² [M+H]⁺.

TRIMET-1 #48 RT: 0.76 AV: 1 NL: 2.41E7
 T: + c ESI ms [50.00-1000.00]



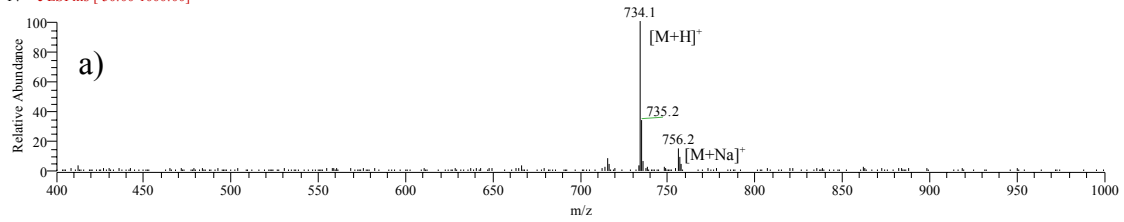
TRIMET-1 #101-190 RT: 1.43-2.50 AV: 71 NL: 3.54E6
 F: + c ESI Full ms2 291.20@40.00 [80.00-300.00]



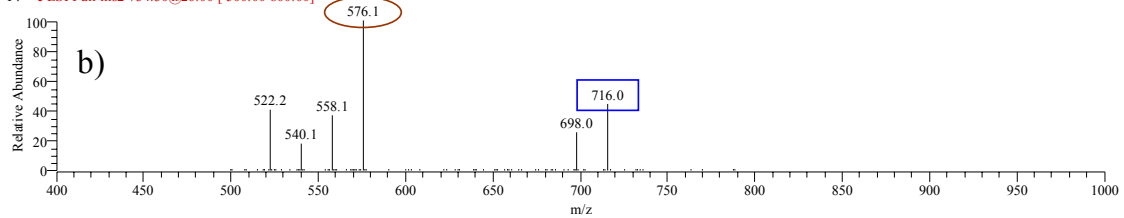
Slika 18. Maseni spektri trimetoprima: a) ESI(+)*MS*; b) ESI(+)*MS*² [M+H]⁺.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

ERITRO-1 #6 RT: 0.09 AV: 1 NL: 5.39E6
F: + c ESI ms [50.00-1000.00]

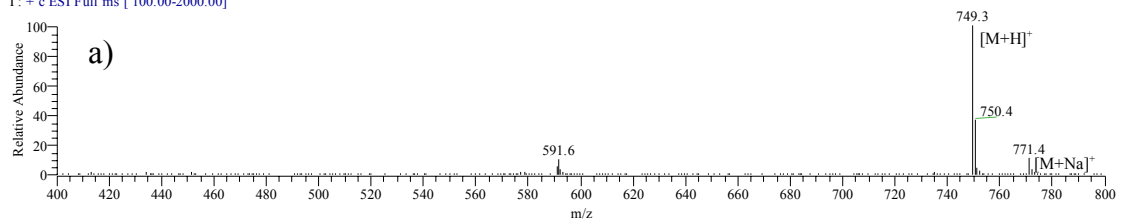


ERITRO-1 #133-243 RT: 2.61-3.57 AV: 76 NL: 5.20E6
F: + c ESI Full ms2 734.30@26.00 [500.00-800.00]

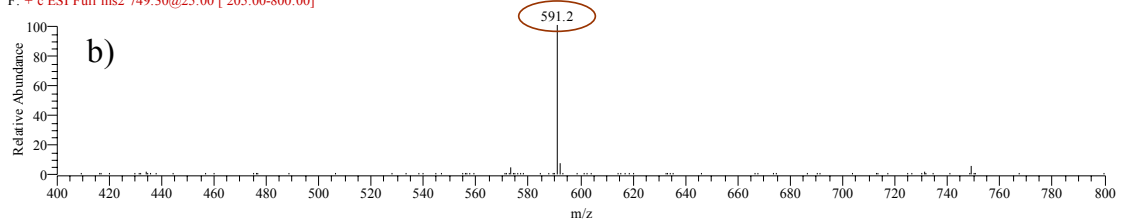


Slika 19. Maseni spektri eritromicina: a) ESI(+)*MS*; b) ESI(+)*MS*² [M+H]⁺.

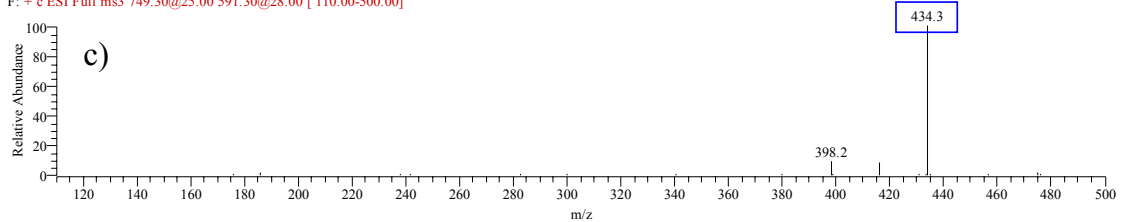
AZITRO-1 #676 RT: 14.37 AV: 1 NL: 1.35E7
T: + c ESI Full ms [100.00-2000.00]



AZITRO-1 #152-188 RT: 2.92-3.50 AV: 36 NL: 8.69E6
F: + c ESI Full ms2 749.30@25.00 [205.00-800.00]



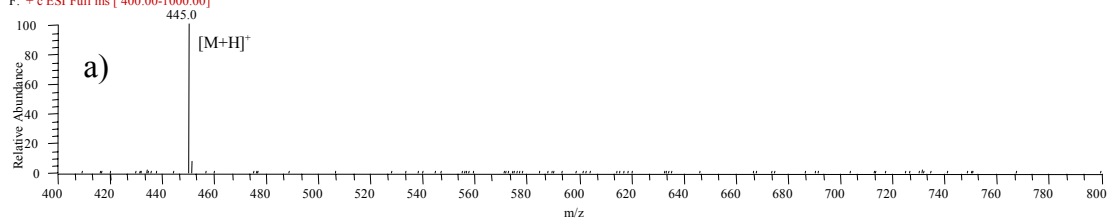
AZITRO-1 #402 RT: 7.90 AV: 1 NL: 2.50E6
F: + c ESI Full ms3 749.30@25.00 591.30@28.00 [110.00-500.00]



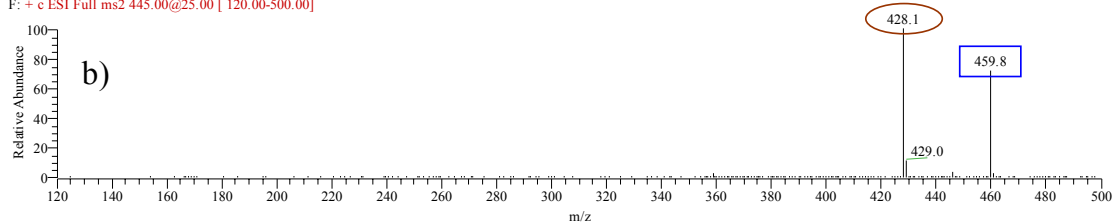
Slika 20. Maseni spektri azitromicina: a) ESI(+)*MS*; b) ESI(+)*MS*² [M+H]⁺; c) ESI(+)*MS*³ [M+H]⁺.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

DOXICI-1 #13-60 RT: 3.35-3.52 AV: 10 NL: 6.73E6
 F: + c ESI Full ms [400.00-1000.00]

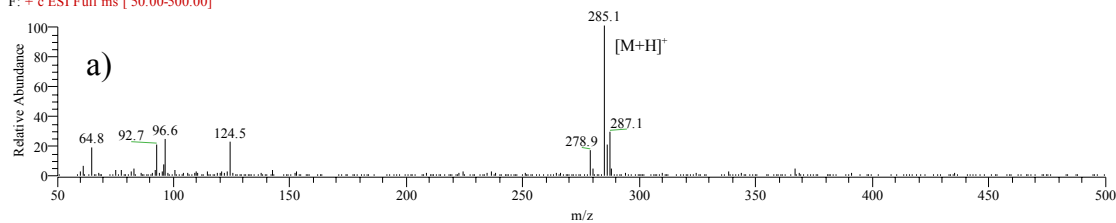


DOXICI-1 #26-50 RT: 0.52-0.98 AV: 24 NL: 3.48E6
 F: + c ESI Full ms2 445.00@25.00 [120.00-500.00]

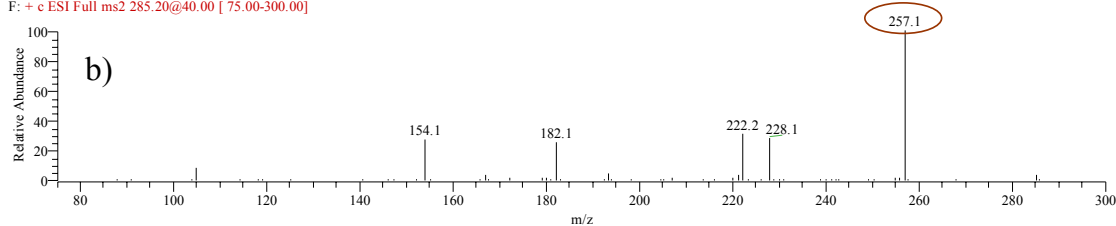


Slika 21. Maseni spektri doksiciklina: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$.

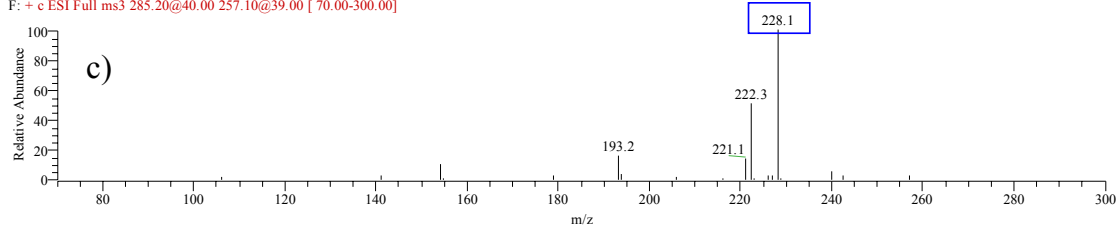
diazepam #319 RT: 5.14 AV: 1 NL: 3.55E7
 F: + c ESI Full ms [50.00-500.00]



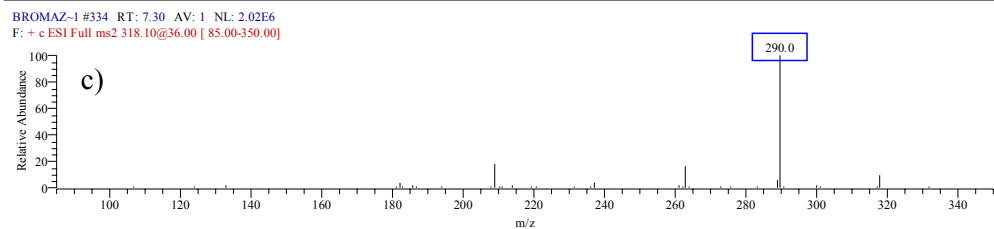
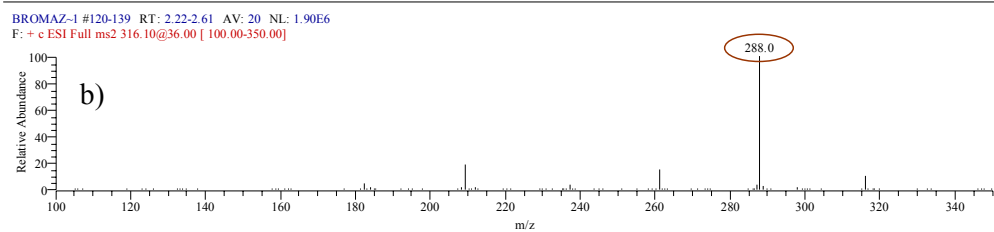
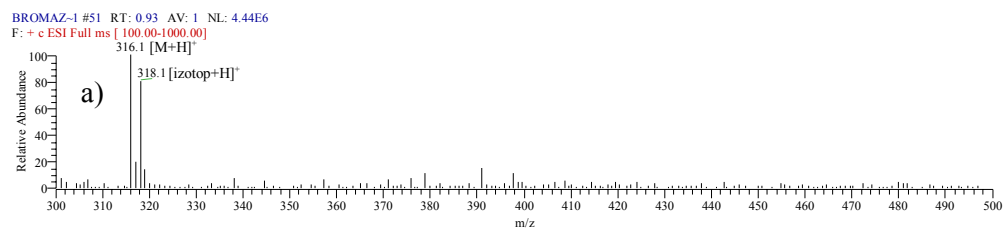
diazepam #106 RT: 1.44 AV: 1 NL: 6.02E6
 F: + c ESI Full ms2 285.20@40.00 [75.00-300.00]



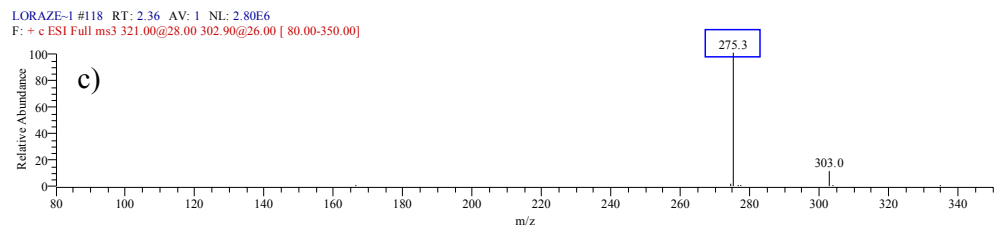
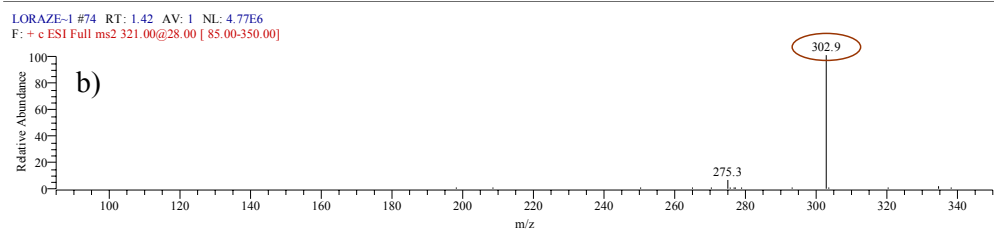
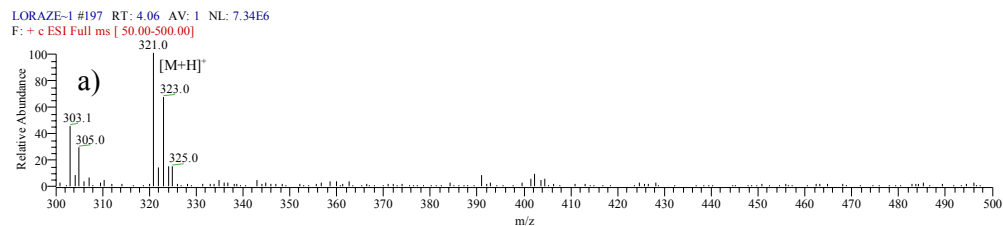
diazepam #171 RT: 2.45 AV: 1 NL: 1.16E6
 F: + c ESI Full ms3 285.20@40.00 257.10@39.00 [70.00-300.00]



Slika 22. Maseni spektri diazepama: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$.



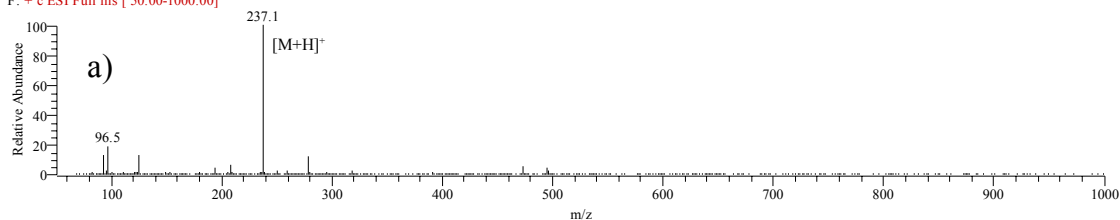
Slika 23. Maseni spektri bromazepama: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^2 $[izotop+H]^+$.



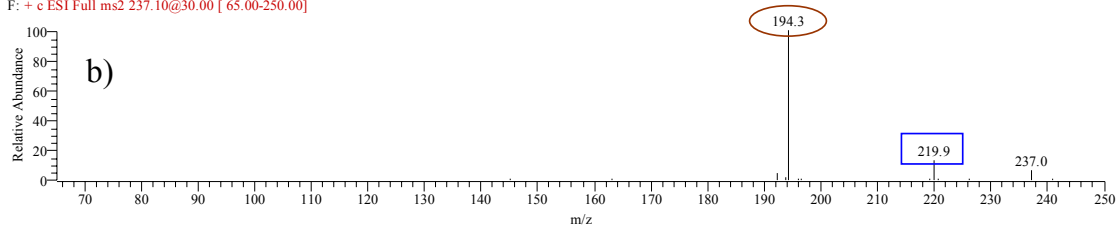
Slika 24. Maseni spektri lorazepama: a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^3 $[M+H]^+$.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

KARBAM-1 #306 RT: 4.56 AV: 1 NL: 3.27E7
 F: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]

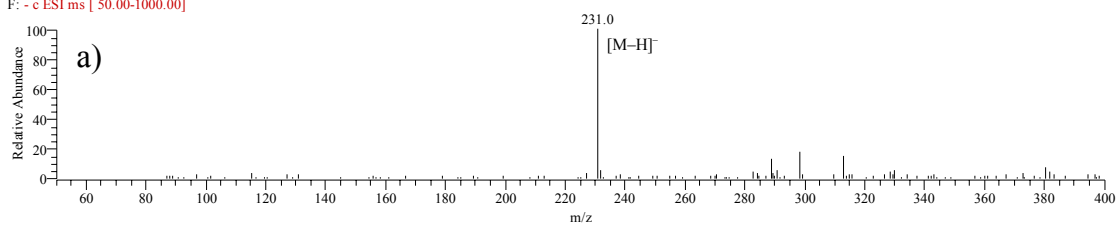


KARBAM-1 #75 RT: 1.11 AV: 1 NL: 1.05E7
 F: + c ESI Full ms2 237.10@30.00 [65.00-250.00]

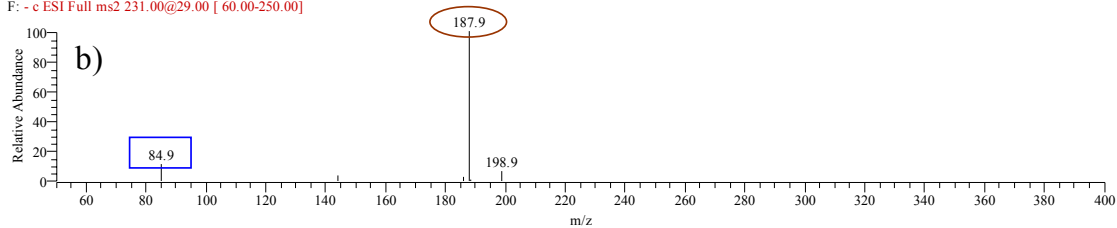


Slika 25. Maseni spektri karbamazepina: a) ESI(+)*MS*; b) ESI(+)*MS*² [M+H]⁺.

FENOBA-1 #7 RT: 0.13 AV: 1 NL: 3.56E5
 F: - c ESI ms [50.00-1000.00]



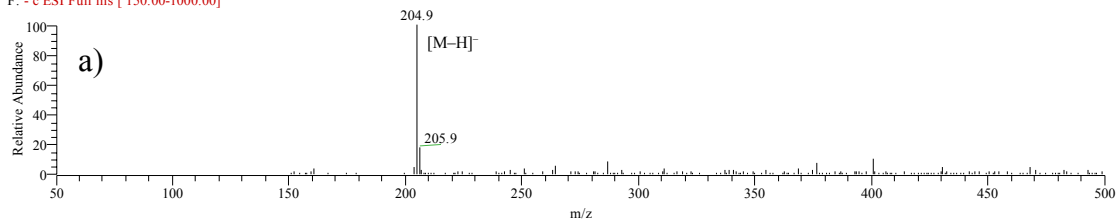
FENOBA-1 #96 RT: 1.96 AV: 1 NL: 4.33E4
 F: - c ESI Full ms2 231.00@29.00 [60.00-250.00]



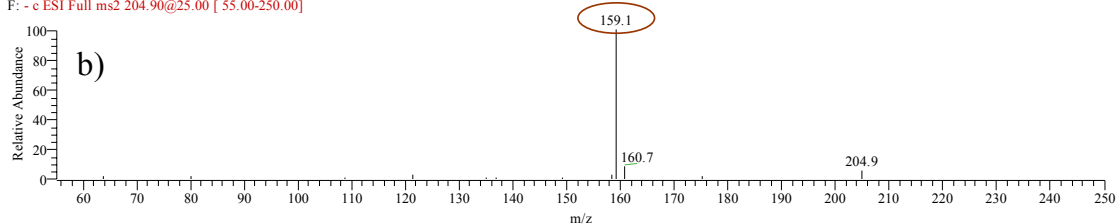
Slika 26. Maseni spektri fenobarbitona: a) ESI(-)*MS*; b) ESI(-)*MS*² [M-H]⁻.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

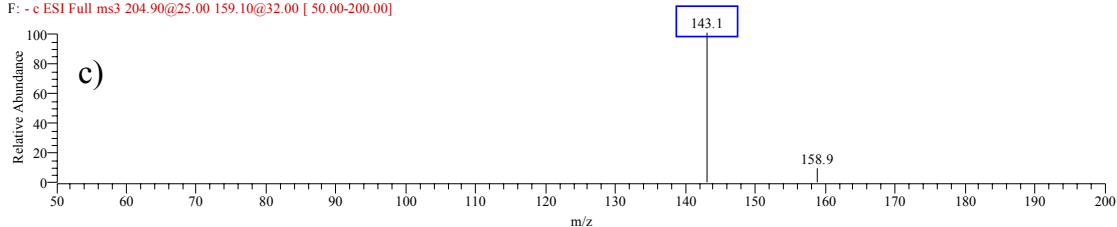
IBUPRO-1 #8 RT: 0.19 AV: 1 NL: 8.05E5
F: - c ESI Full ms [150.00-1000.00]



IBUPRO-1 #198 RT: 3.72 AV: 1 NL: 1.68E5
F: - c ESI Full ms2 204.90@25.00 [55.00-250.00]

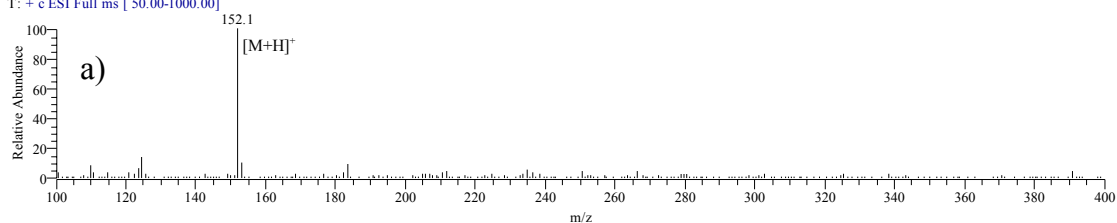


IBUPRO-1 #392 RT: 7.88 AV: 1 NL: 2.16E4
F: - c ESI Full ms3 204.90@25.00 159.10@32.00 [50.00-200.00]

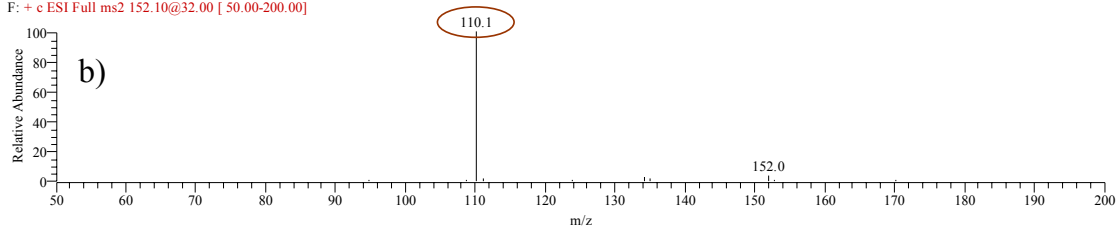


Slika 27. Maseni spektri ibuprofena: a) ESI(-)MS; b) ESI(-)MS² [M-H]⁻; c) ESI(-)MS³ [M-H]⁻.

PARACE-1 #335 RT: 4.42 AV: 1 NL: 1.37E7
T: + c ESI Full ms [50.00-1000.00]



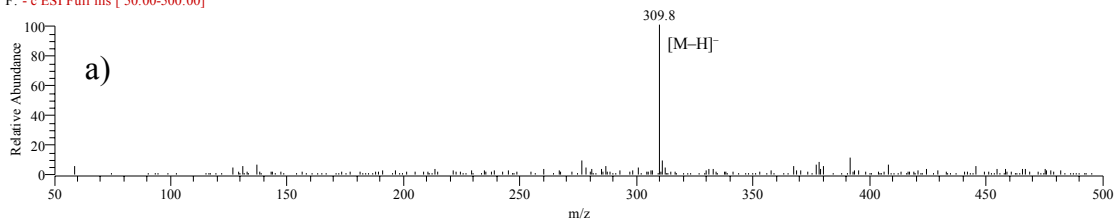
PARACE-1 #100 RT: 1.48 AV: 1 NL: 2.27E6
F: + c ESI Full ms2 152.10@32.00 [50.00-200.00]



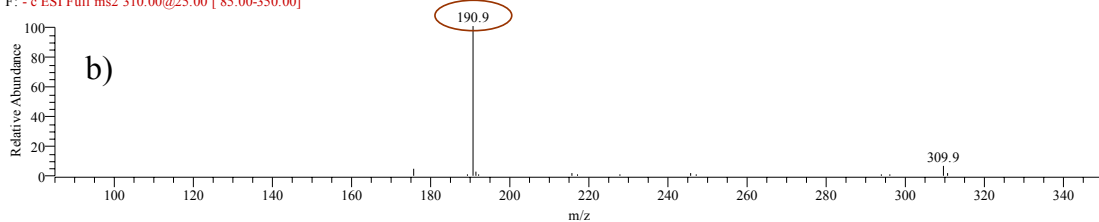
Slika 28. Maseni spektri paracetamola: a) ESI(+)MS; b) ESI(+)MS² [M+H]⁺.

4. REZULTATI I DISKUSIJA

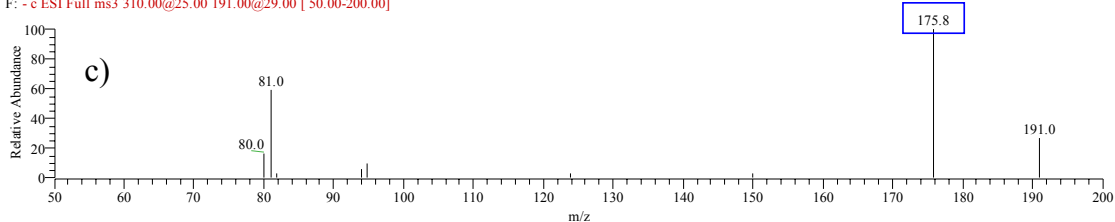
METAMI-1 #23 RT: 0.49 AV: 1 NL: 2.90E5
F: - c ESI Full ms [50.00-500.00]



METAMI-1 #110 RT: 2.32 AV: 1 NL: 2.58E5
F: - c ESI Full ms2 310.00@25.00 [85.00-350.00]

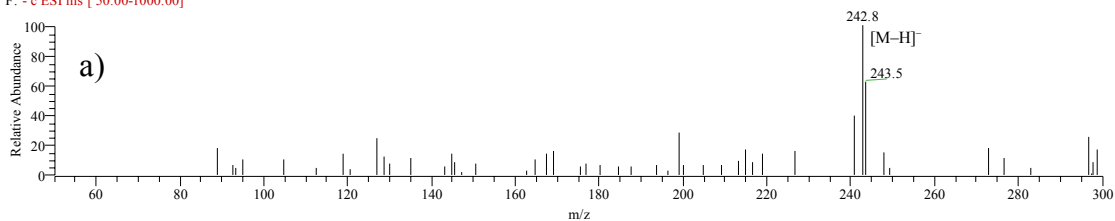


METAMI-1 #182 RT: 3.87 AV: 1 NL: 5.83E4
F: - c ESI Full ms3 310.00@25.00 191.00@29.00 [50.00-200.00]

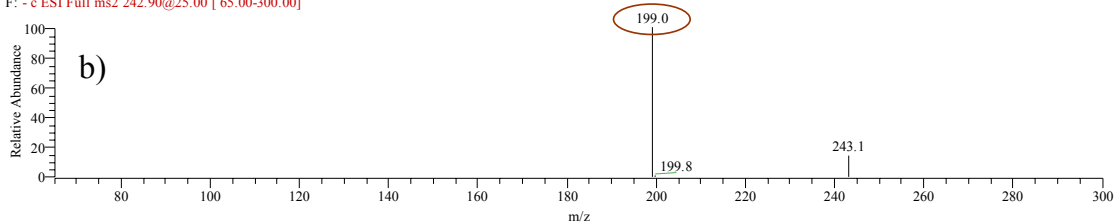


Slika 29. Maseni spektri metamizola: a) ESI(-)MS; b) ESI(-)MS² [M-H]⁻; c) ESI(-)MS³ [M-H]⁻.

FLURBI-1 #9 RT: 0.20 AV: 1 NL: 2.25E4
F: - c ESI ms [50.00-1000.00]

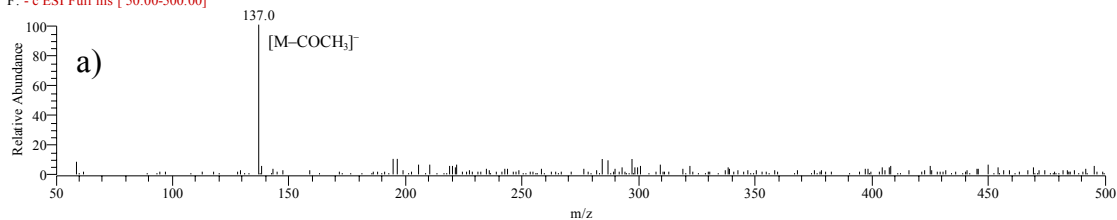


FLURBI-1 #206 RT: 4.37 AV: 1 NL: 3.00E4
F: - c ESI Full ms2 242.90@25.00 [65.00-300.00]

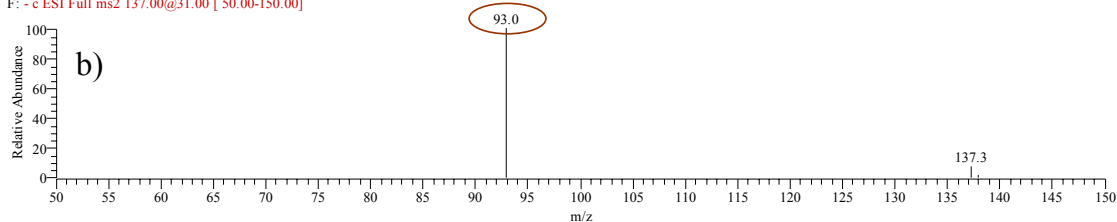


Slika 30. Maseni spektri flurbiprofena: a) ESI(-)MS; b) ESI(-)MS² [M-H]⁻.

ACETIL-1 #8 RT: 0.17 AV: 1 NL: 1.82E5
F: - c ESI Full ms [50.00-500.00]

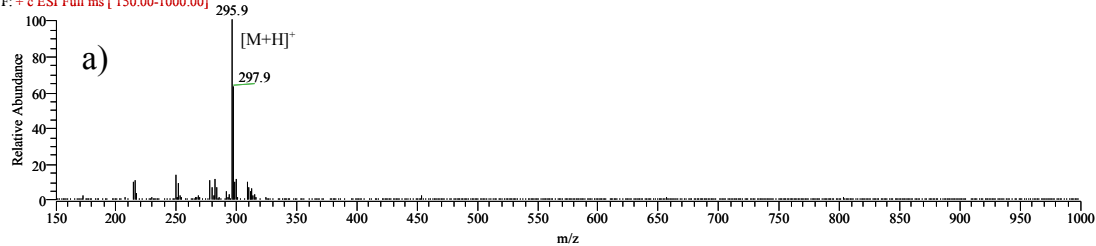


ACETIL-1 #115 RT: 2.28 AV: 1 NL: 6.05E4
F: - c ESI Full ms2 137.00@31.00 [50.00-150.00]

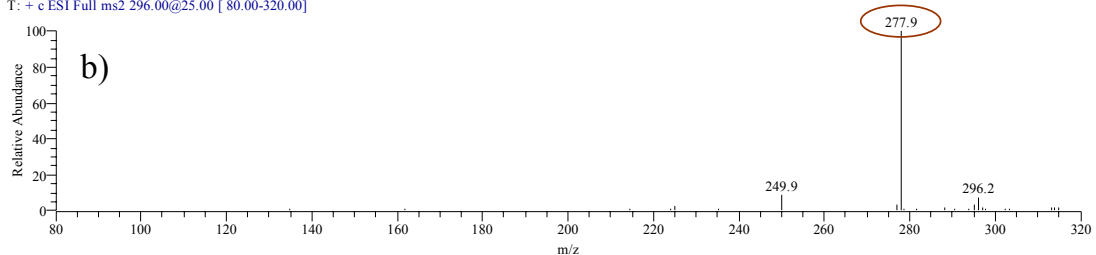


Slika 31. Maseni spektri acetilsalicilne kiseline: a) ESI(-)MS; b) ESI(-)MS² $[M-COCH_3]^-$.

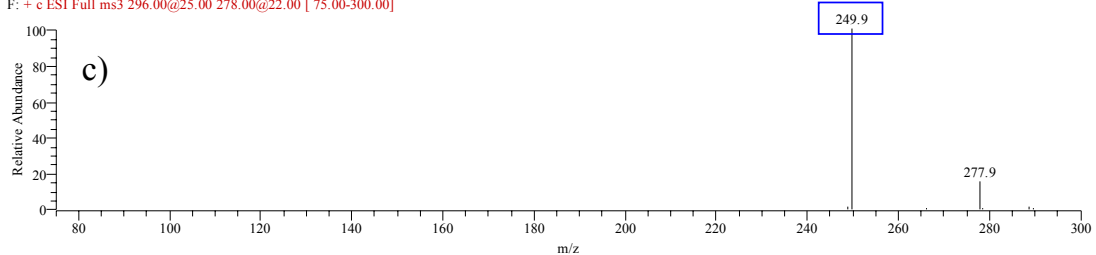
DIKLOF-1#7 RT: 0.55 AV: 1 NL: 1.70E6
F: + c ESI Full ms [150.00-1000.00]



DIKLOF-1 #19 RT: 0.38 AV: 1 NL: 3.67E5
T: + c ESI Full ms2 296.00@25.00 [80.00-320.00]

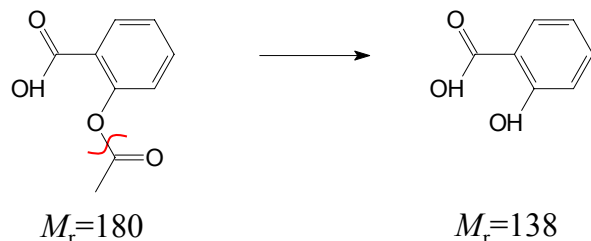


DIKLOF-1 #36 RT: 0.77 AV: 1 NL: 2.62E5
F: + c ESI Full ms3 296.00@25.00 278.00@22.00 [75.00-300.00]



Slika 32. Maseni spektri diklofenaka: a) ESI(+)MS; b) ESI(+)MS² $[M+H]^+$; c) ESI(+)MS³ $[M+H]^+$.

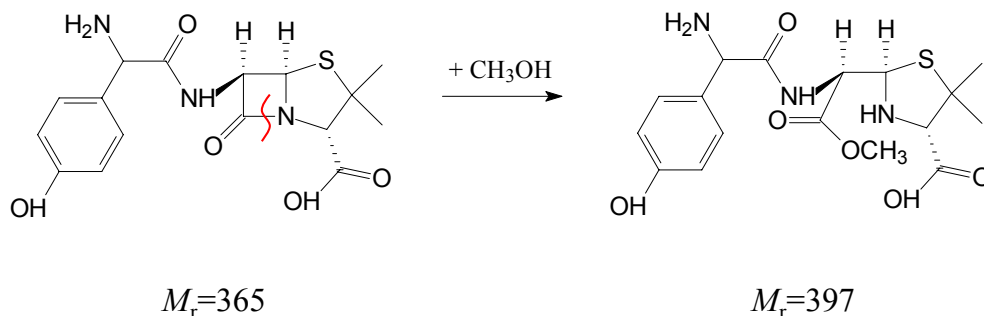
U MS spektru acetilsalicilne kiseline (slika 31) dominira jon m/z 137. Ovaj jon predstavlja deprotonovani molekul salicilne kiseline. Naime, poznato je da se u rastvoru acetilsalicilna kiselina ($M_r = 180$) veoma brzo degraduje (slika 33) u salicilnu kiselinu ($M_r = 138$) (Heberer 2002). Zbog toga se identifikacija i kvantifikacija acetilsalicilne kiseline zasniva na izolovanju deprotonovanog molekula salicilne kiseline, kao prekursor jona za dalju MSⁿ analizu.



Slika 33. Degradacija acetilsalicilne kiseline u salicilnu kiselinu.

Ampicilin (slike 14 i 55), amoksicilin (slike 15 i 56), cefaleksin (slike 16 i 57), sulfametoksazol (slike 17 i 58), doksiciklin (slike 21 i 62), lorazepam (slike 24 i 64) i diklofenak (slike 32 i 66) u procesu jonizacije stvaraju i pozitivne i negativne jone. Međutim, u MS spektrima navedenih analita se uočava da je intenzitet pozitivnih jona značajno veći od intenziteta negativnih jona. Zbog toga je odabrano da se dalje izvodi MSⁿ analiza pozitivnih jona.

U MS spektrima β -laktama – ampicilina, amoksicilina i cefaleksina (slike 14–16) se ne mogu uočiti protonovani molekuli, ali zato dominiraju veoma intenzivni protonovani adukti sa metanolom ($[M+CH_3OH+H]^+$). Poznato je da penicilini reaguju sa alkoholima, pri čemu nastaju peniciloil estri (Bruno *et al.* 2001b). Zbog prisustva nestabilnog četveročlanog prstena u β -laktamskoj strukturi, ovi antibiotici su podložni degradaciji u prisustvu alkohola i toplote (Rabbolini *et al.* 1998). Cepanjem β -laktamskog prstena (slika 34) u molekul se uvodi dodatna bazna grupa (sekundarni amin) čime se povećava sposobnost vezivanja protona. Za navedene analite, protonovani adukt sa metanolom je odabran kao prekursor jon za dalju MSⁿ analizu.



Slika 34. Nastanak adukta amoksicilina sa metanolom.

Nakon odabira prekursor jona za svaki analit, u daljoj MSⁿ analizi je optimizovana kolizijska energija, tj. energija sudara sa atomima helijuma, za dobijanje stabilnih i intenzivnih fragmentnih jona. Vrednosti kolizijske energije, preciznije normalizovane kolizijske energije, izražene su u procentima, na skali 0–100% koja je definisana LCQ sistemom. Dobijeni MSⁿ spektri su prikazani na slikama 14–32 i u Prilogu (slike 55–66), a rezultati optimizacije ESI-MSⁿ analize su sumarno dati u tabeli 6. Za većinu odabranih analita je karakteristično da MS/MS fragmentacijom nastaje više od jednog fragmentnog jona, koji se dalje fragmentišu (MS³ analiza), pri čemu se dobijaju stabilni fragmenti. Značajan broj analita daje i MS⁴ spektar. Na osnovu dobijenih rezultata, za svaki analit je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon. Dodatne MSⁿ reakcije mogu se koristiti za potvrdu prisustva odabranih analita, tj. za potvrdu pozitivnih rezultata u realnim uzorcima. Međutim, u slučaju paracetamola, flurbiprofena i acetilsalicilne kiseline, nije bilo moguće dobiti više od jednog fragmentnog jona u MS² analizi, niti stabilan MS³ fragment. Jedini stabilan fragmentni jon paracetamola u jonskom trapu nastaje reakcijom fragmentacije m/z 152 → m/z 110, iako se u literaturi pominju i druge MS² fragmentacije, kao m/z 152 → m/z 93 za pozitivne jone (Gros *et al.* 2006b) i m/z 150 → m/z 107 za negativne jone (Gómez *et al.* 2006). Ovi rezultati su dobijeni korišćenjem trostrukog kvadrupola. Smatra se da je, u ovakvim slučajevima, dovoljan dokaz prisustva leka ukoliko retenciono vreme pozitivnog rezultata u SRM hromatogramu ne odstupa više od 3% od retencionog vremena analitičkog standarda (Gros *et al.* 2006b).

Tabela 6. MSⁿ reakcije fragmentacije odabranih lekova u jonskom trapu.

LEK	MS	Kolizijska energija (%)	MS ²	Kolizijska energija (%)	MS ³	Kolizijska energija (%)	MS ⁴
Ampicilin	382 [M+CH ₃ OH+H] ⁺	23	223	25	206	25	178
			365	25	259	–	–
			333	–	–	–	–
Amoksisicilin	380 [M+CH ₃ OH-H] ⁻	22	302	28	270	–	–
	398 [M+CH ₃ OH+H] ⁺	21	381	23	349	30	255
	420 [M+Na] ⁺	26	342	–	–	–	–
	396 [M+CH ₃ OH-H] ⁻	24	318	25	224	27	192
Cefaleksin	380 [M+CH ₃ OH+H] ⁺	22	223	24	206	23	178
			302	–	–	–	–
			331	–	–	–	–
			363	–	–	–	–
	402 [M+Na] ⁺	–	–	–	–	–	–
378 [M+CH ₃ OH-H] ⁻	–	–	–	–	–	–	
Sulfametoksazol	254 [M+H] ⁺	34	188	25	160	–	–
			156	24	108	–	–
			156	–	–	–	–
Trimetoprim	291 [M+H] ⁺	40	230	40	201	–	–
			123	–	–	–	–
			258	30	230	35	202
			275	35	257	35	229

Tabela 6. (nastavak)

Eritromicin	734 [M+H] ⁺	26	576	22	558	22	540
			716	20	522	–	–
	756 [M+Na] ⁺	32	598	33	580	33	466
Azitromicin	749 [M+H] ⁺	25	591	28	434	29	416
	771 [M+Na] ⁺	29	613	30	438	–	–
			595	31	479	–	–
Doksiciklin	445 [M+H] ⁺	25	428	27	410	28	339
			460	28	428	–	–
	443 [M–H] [–]	25	399	–	–	–	–
Diazepam	285 [M+H] ⁺	40	257	39	228	36	193
					222	–	–
Bromazepam	316 [M+H] ⁺	36	288	35	261	35	182
					209	–	–
	318 [izotop+H] ⁺	36	290	35	263	35	182
					209	–	–
Lorazepam	321 [M+H] ⁺	28	303	26	275	–	–
	319 [M–H] [–]	26	283	–	–	–	–
Karbamazepin	237 [M+H] ⁺	30	220	23	192	–	–
			194	–	–	–	–
Fenobarbiton	231 [M–H] [–]	29	188	–	–	–	–
			85	–	–	–	–
Ibuprofen	205 [M–H] [–]	25	159	32	143	–	–
			161	–	–	–	–
Paracetamol	152 [M+H] ⁺	32	110	–	–	–	–
Metamizol	310 [M–H] [–]	25	191	29	176	–	–
					81	–	–
Flurbiprofen	243 [M–H] [–]	25	199	–	–	–	–
Acetilsalicilna kiselina	137 [M–COCH ₃] [–]	31	93	–	–	–	–
Diklofenak	296 [M+H] ⁺	25	278	22	250	26	215
	294 [M–H] [–]	25	250	37	214	–	–

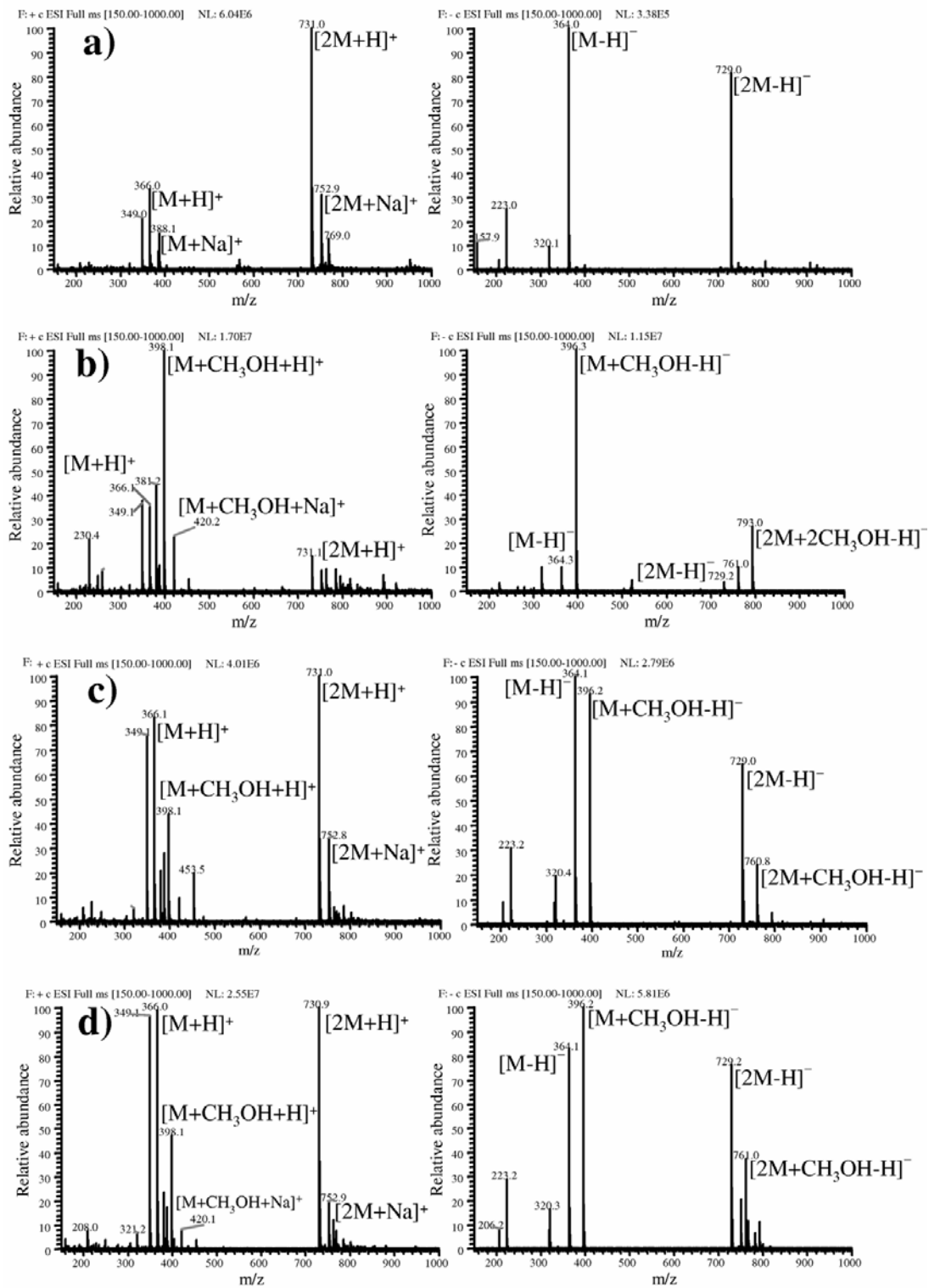
4.2. FORMIRANJE ADUKTA AMOKSICILINA SA METANOLOM

Za identifikaciju i kvantifikaciju tragova β -laktamskih antibiotika, kao što su ampicilin, amoksicilin i cefaleksin, u različitim matricama obično se koriste protonovani molekuli ovih analita (Riediker and Stadler 2001; De Baere *et al.* 2002; Holstege *et al.* 2002; Fagerquist and Lightfield 2003; Becker *et al.* 2004; Bogialli *et al.* 2004; Lindberg *et al.* 2004; Cha *et al.* 2005; Fagerquist *et al.* 2005; De Baere and De Backer 2007; Granelli and Branzell 2007). U svega nekoliko radova (Bruno *et al.* 2001b) za određivanje β -laktama korišćeni su protonovani adukti sa rastvaračem. Preliminarni eksperimenti su pokazali da se u masenim spektrima β -laktama pojavljuju veoma intenzivni protonovani adukti sa metanolom (slike 14–16). Stvaranje ovih adukata nije moguće izbeći kada je metanol prisutan u sistemu, ili kao rastvarač uzorka ili kao sastojak mobilne faze. Zbog toga su ispitivane mogućnosti korišćenja adukta sa metanolom za kvantitativno određivanje β -laktama, na primeru amoksicilina, pomoću elektrosprej tandem masene spektrometrije sa jonskim trapom (Grujić *et al.* 2008). Takođe je ispitivan uticaj nekoliko uobičajenih rastvarača, kao i aditiva mobilne faze, na efikasnost jonizacije amoksicilina i formiranje adukta sa metanolom.

4.2.1. Uticaj sastava rastvarača na ESI masene spektre amoksicilina

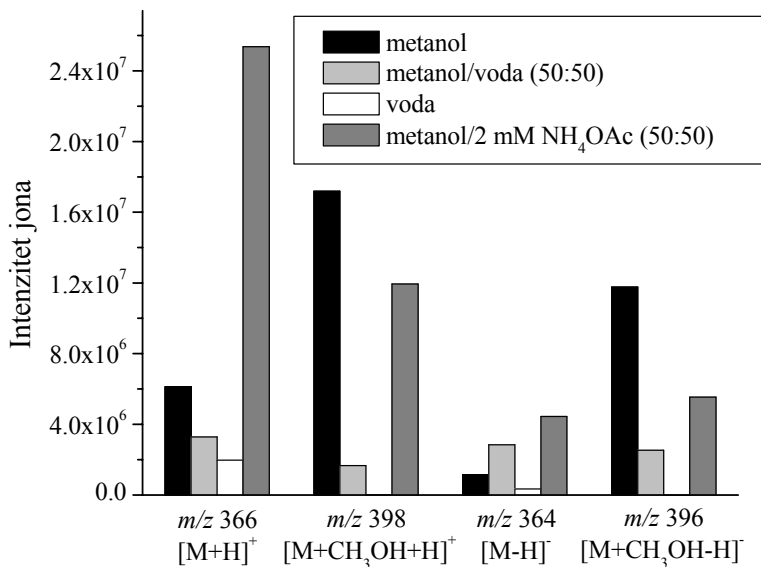
U hemijskoj strukturi amoksicilina (tabela 3) nalaze se jako kisela i jako bazna grupa. Zbog toga u elektrosprej jonizacionom procesu nastaju i pozitivni i negativni joni. Međutim, intenzitet pozitivnih jona (slika 35) je nekoliko puta veći od intenziteta odgovarajućih negativnih jona, nezavisno od sastava rastvarača. Na slici 35 su prikazani maseni spektri amoksicilina rastvorenog u četiri različita rastvarača: vodi, metanolu, smeši metanol/voda (50:50) i smeši metanol/2 mM amonijum-acetat (50:50).

Za maseni spektar pozitivnih jona amoksicilina u vodi (slika 35a) karakterističan je protonovani molekul i adukt sa katjonom natrijuma, kao i intenzivni dimeri. Kada se amoksicilin rastvori u čistom metanolu, dimeri su suzbijeni i u spektru dominiraju monomolekulske vrste (slika 35b). U prisustvu metanola se javlja jak signal protonovanog adukta sa amoksicilinom ($[M+CH_3OH+H]^+$, m/z 398). Kao posledica uvođenja dodatne bazne grupe u molekul (slika 34) i povećane sposobnosti vezivanja protona, intenzitet signala takvih protonovanih adukata je mnogo veći od intenziteta protonovanih molekula amoksicilina (slika 35b).



Slika 35. Maseni spektri pozitivnih i negativnih jona amoksicilina ($c = 100 \mu\text{g cm}^{-3}$) u rastvaraču: a) vodi; b) metanolu; c) smeši metanol/voda (50:50); d) smeši metanol/2 mM amonijum-acetat (50:50).

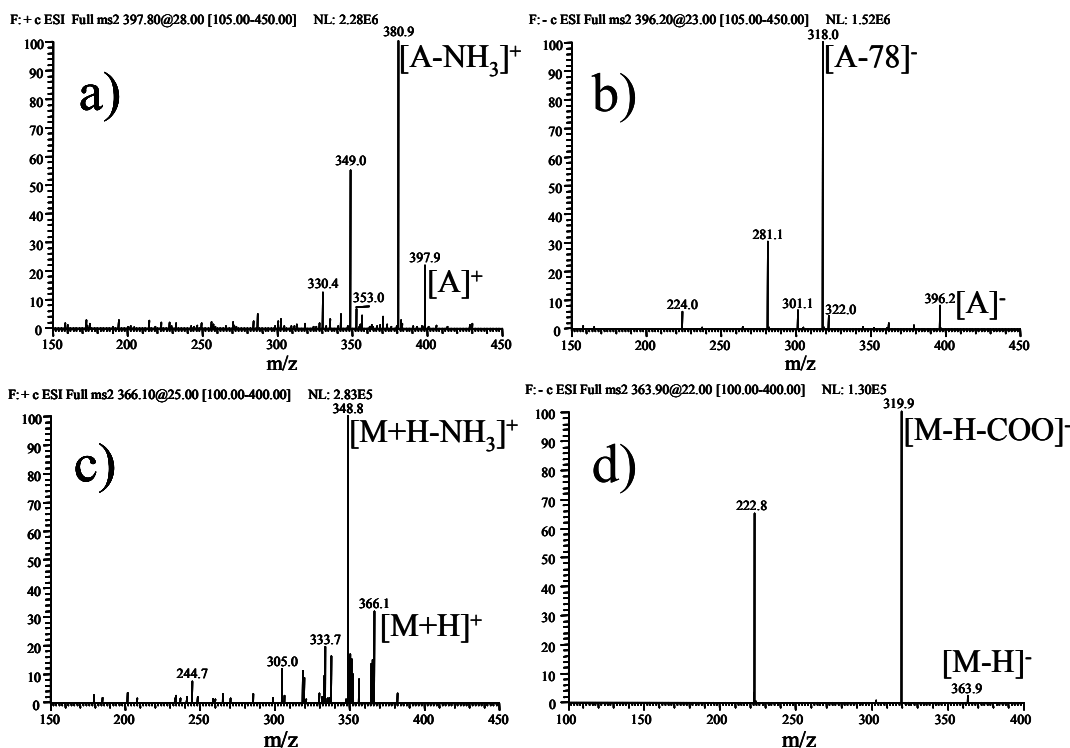
Na slici 36 je grafički predstavljen intenzitet protonovanih i deprotonovanih molekula amoksicilina i adukata sa metanolom.



Slika 36. Intenzitet protonovanih i deprotonovanih molekula i metanol-adukta amoksicilina u različitim rastvaračima pri koncentraciji $100 \mu\text{g cm}^{-3}$.

Takođe je ispitivan uticaj smeše rastvarača metanol/voda, kao i metanol/amonijum-acetat, na izgled masenih spektara amoksicilina (slike 35c i 35d). Iako je protonovani molekul intenzivan, amoksicilin i dalje teži da formira adukt sa metanolom, kao i dimere. Izgleda da je nemoguće potpuno suzbiti formiranje ovog adukta kada je metanol prisutan u sistemu. Najintenzivniji signal je dobijen dodatkom amonijum-acetata smeši metanol/voda (slike 35d i 36). Poznato je da amonijum-soli pospešuju reakcije protonovanja u gasnoj fazi i povećavaju intenzitet $[M+H]^+$ -jona (Kamel *et al.* 1999; Mathis and McCord 2005). Elektrosprej jonizacijom nastaje i određena količina (20–30%) adukata sa natrijumom, $[M+Na]^+$ (m/z 388, slika 35a) i $[M+CH_3OH+Na]^+$ (m/z 420, slike 35b i 35d). Naime, katjoni Na^+ i K^+ su prisutni kao nečistoće u organskim rastvaračima. Oni su takođe prisutni u uzorcima i teško se uklanjaju. Adukti sa natrijumom se često uočavaju u ESI masenim spektrima zbog kontaminacije iz staklenog posuđa. Formiranje ovih adukata ukazuje na osetljivost ESI-MS spektara na katjonske nečistoće (Kamel *et al.* 1999). S obzirom na to da intenzitet adukata sa alkalnim katjonima u masenim spektrima zavisi od stepena kontaminacije sistema (Bruno *et al.* 2001b) koja se ne može kontrolisati, ovi adukti ne mogu koristiti u identifikaciji i kvantifikaciji analita.

Za negativni jonski spektar (ESI⁻) amoksicilina (slika 35) karakteristični su deprotonovani molekul i deprotonovani adukt sa metanolom. Takođe su prisutni odgovarajući dimeri. Dodatak vode ima nepovoljan efekat na nastanak negativnih jona i njihov intenzitet se značajno smanjuje (slike 35 i 36). Formiranje adukata pored protonovanih molekula je generalno neželjeni proces, jer se njihovom fragmentacijom ne dobijaju strukturno značajni fragmentni joni, koji su neophodni za identifikaciju analita (Bruno *et al.* 2001b). Međutim, fragmentacijom adukata amoksicilina sa metanolom (slika 37) dobijeni su stabilni i intenzivni fragmentni joni.

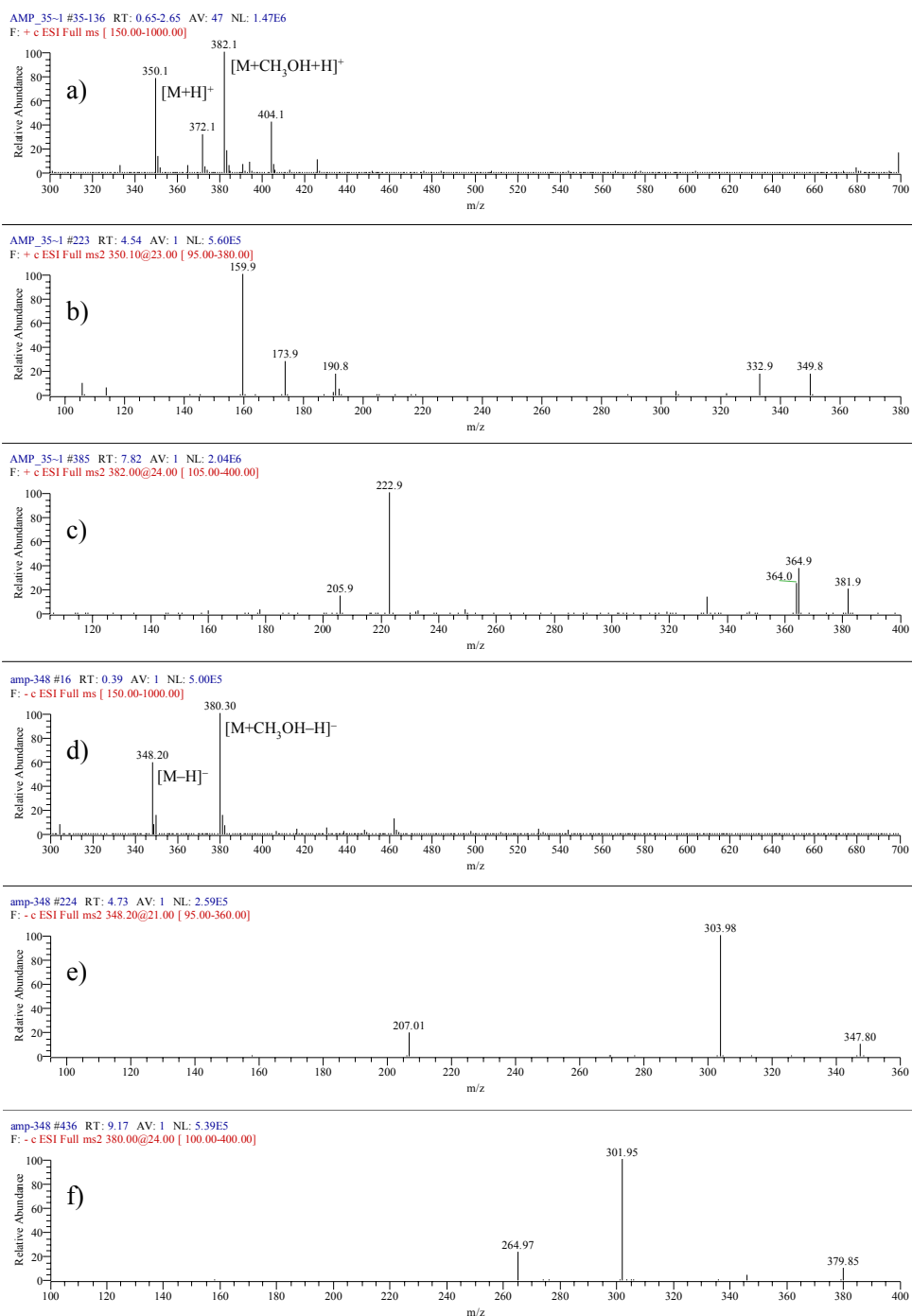


Slika 37. MS/MS spektri amoksicilina ($c = 10 \mu\text{g cm}^{-3}$):

- a) protonovanog metanol-adukta $[A]^+$; b) deprotonovanog metanol-adukta $[A]^-$; c) protonovanog molekula $[M+H]^+$; d) deprotonovanog molekula $[M-H]^-$.

U oba masena spektra pozitivnih jona (slike 37a i 37c) uočava se gubitak molekula amonijaka (De Baere *et al.* 2002). U spektru deprotonovanog molekula vidi se karakterističan gubitak CO_2 , pri čemu nastaje fragmentni jon m/z 320. MS/MS spektar deprotonovanog adukta sa metanolom $[A]^-$ pokazuje gubitak mase od 78 Da, pri čemu nastaje fragmentni jon m/z 318.

Slično amoksicilinu, i drugi β -laktami, kao ampicilin i cefaleksin, formiraju stabilne adukte sa metanolom. Na slici 38 su prikazani maseni spektri ampicilina rastvorenog u smeši metanola i vode (50:50).

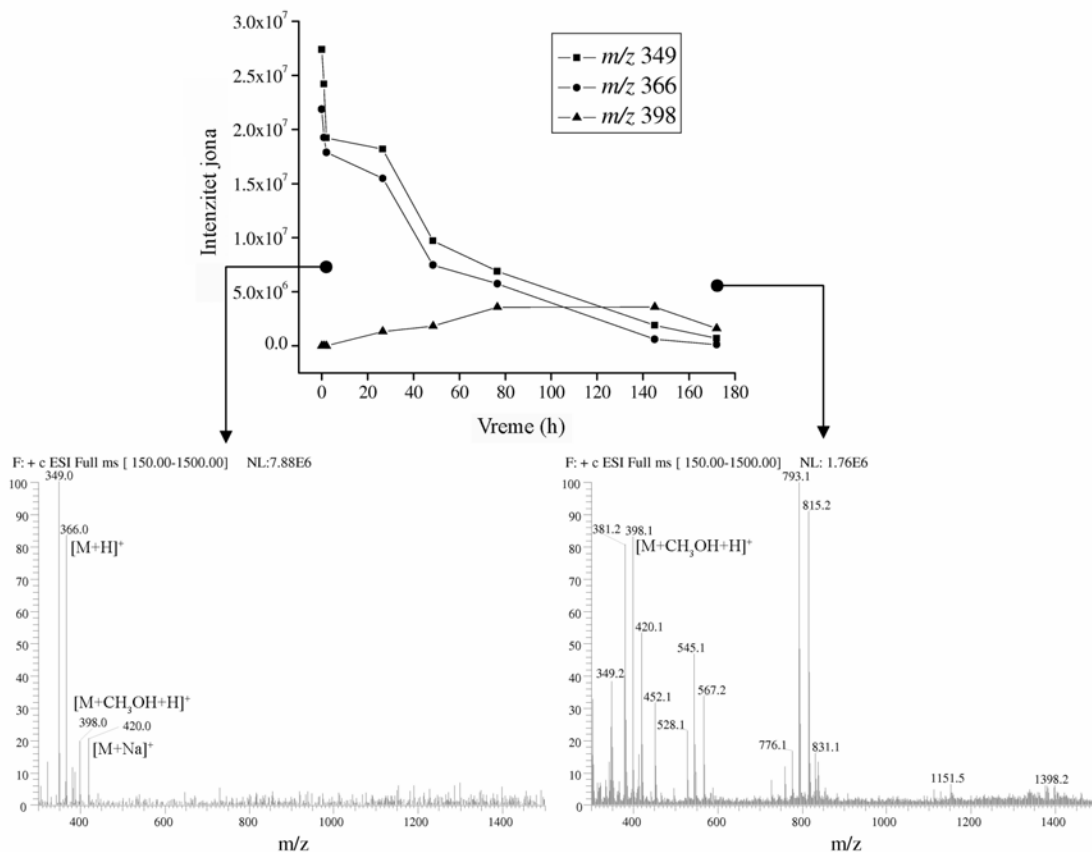


Slika 38. Maseni spektri ampicilina ($c = 10 \mu\text{g cm}^{-3}$) u smeši metanol/voda (50:50):
 a) ESI(+) MS ; b) ESI(+) MS^2 $[M+H]^+$; c) ESI(+) MS^2 $[M+CH_3OH+H]^+$;
 d) ESI(-) MS ; e) ESI(-) MS^2 $[M-H]^-$; f) ESI(+) MS^2 $[M+CH_3OH-H]^-$.

Uočava se postojanje intenzivnog protonovanog metanol-adukta (slika 38, m/z 382), kao i protonovanog molekula (m/z 350), kao u slučaju amoksicilina. Daljom fragmentacijom se dobijaju stabilni i intenzivni fragmentni joni koji se mogu koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju ampicilina.

4.2.2. Formiranje adukta amoksicilina sa metanolom tokom vremena

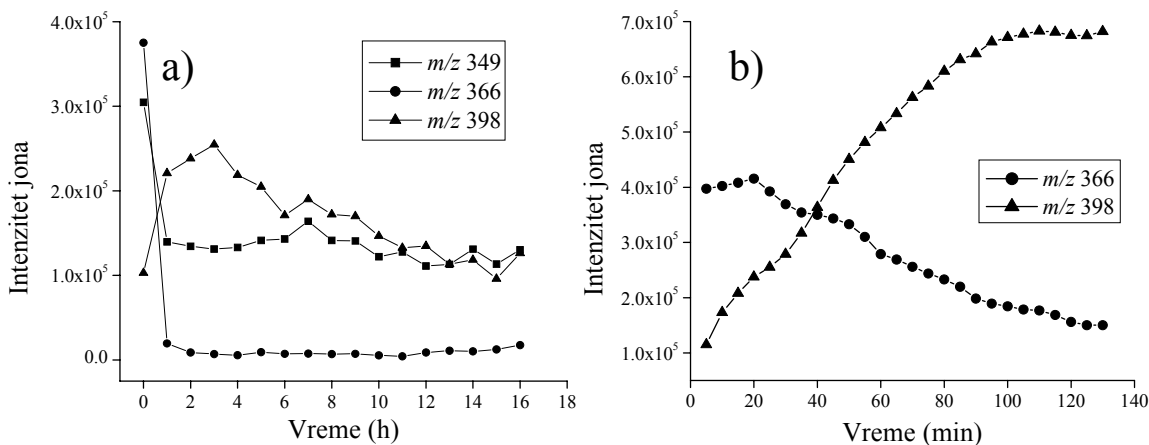
S obzirom na to da se metanol često koristi kao rastvarač za analitičke standarde lekova, sam ili u smeši sa vodom, kao i da je uobičajen sastojak mobilne faze, formiranje adukta amoksicilina sa metanolom nije lako izbeći. Problem se može prevazići upotrebom acetonitrila, drugog često korišćenog organskog rastvarača u tečnoj hromatografiji. Međutim, preliminarni eksperimenti su pokazali da su monomolekulske vrste u masenom spektru amoksicilina mnogo intenzivnije kada se koristi metanol umesto acetonitrila. U cilju detaljnog ispitivanja procesa nastanka adukta amoksicilina sa metanolom, ovaj proces je praćen tokom vremena. Sveže pripremljen rastvor amoksicilina u metanolu, koncentracije $100 \mu\text{g cm}^{-3}$, je injektovan direktno u ESI izvor, bez protoka mobilne faze, uz detekciju pozitivnih jona. Stabilnost rastvora amoksicilina je posmatrana tokom perioda od sedam dana. Rezultati su grafički prikazani na slici 39, zajedno sa MS spektrima na početku eksperimenta i nakon sedam dana.



Slika 39. Nastanak metanol-adukta (m/z 398) i preuređenih dimera amoksicilina tokom perioda od sedam dana pri koncentraciji od $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ u metanolu.

U sveže pripremljenom rastvoru amoksicilina u metanolu (slika 39) proces derivatizacije započinje odmah, i adukt sa metanolom lako i brzo nastaje. Na početku eksperimenta je najintenzivniji jon m/z 349, koji nastaje fragmentacijom protonovanog molekula m/z 366 (slika 37c). Raspadanje amoksicilina je takođe veoma izraženo i započinje odmah po rastvaranju analita. Tokom vremena, intenzitet jona m/z 349 i m/z 366 se drastično smanjuje. Na kraju eksperimenta, nakon sedam dana, protonovani molekul m/z 366 je potpuno degradovan, a dolazi do uravnoteženja intenziteta metanol-adukt jona m/z 398 i njegovog fragmentnog jona m/z 381 (slika 37a).

Pošto se najizraženije promene dešavaju tokom prvih 20 sati (slika 39), eksperiment je ponovljen sa sveže pripremljenim rastvorom amoksicilina manje koncentracije ($10 \mu\text{g cm}^{-3}$), a intenzitet različitih jona je posmatran tokom perioda od 16 sati. Naime, za podešavanje osetljivosti masenog spektrometra i posmatranje različitih uticaja na intenzitet signala pogodnija je, prema literaturi, koncentracija od $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. Takođe, uzевši u obzir da određivanje tragova lekova podrazumeva koncentracije reda veličine ng cm^{-3} , prethodna koncentracija amoksicilina od $100 \mu\text{g cm}^{-3}$ je prilično visoka. Rezultati ponovljenog eksperimenta su prikazani na slici 40a.

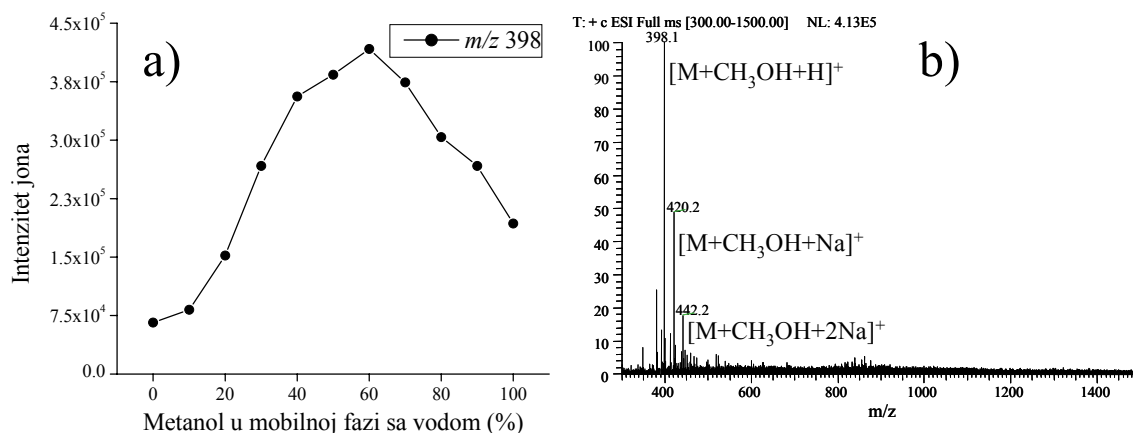


Slika 40. Nastanak adukta amoksicilina sa metanolom, pri koncentraciji od $10 \mu\text{g cm}^{-3}$: a) tokom perioda od 16 sati; b) tokom prva dva sata.

Uočava se da se najveće promene u intenzitetu dva najvažnija jona, m/z 366 i m/z 398, dešavaju tokom prvih dva sata. Zbog toga je eksperiment ponovljen, a promene intenziteta jona su registrovane na svakih 5 min. Rezultati su prikazani na slici 40b. Jasno se uočava da formiranje adukta sa metanolom započinje odmah po pripremi svežeg rastvora. Sa smanjenjem intenziteta protonovanog molekula m/z 366, povećava se intenzitet protonovanog metanol-adukta m/z 398. Nakon 40 min, protonovani adukt postaje intenzivniji od protonovanog molekula. Nakon dva sata, intenziteti ovih jona postaju konstantni i ne menjaju se značajnije tokom narednih 14 sati (slika 40a), ukazujući na to da konverzija molekula amoksicilina u adukt sa metanolom dostiže ravnotežu.

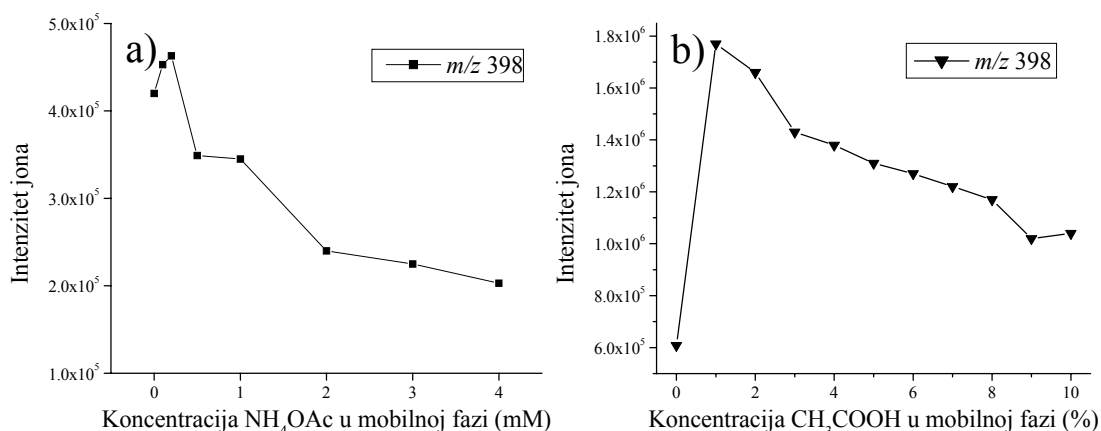
4.2.3. Uticaj aditiva mobilne faze na efikasnost jonizacije amoksicilina

U cilju ispitivanja uticaja sastava mobilne faze, tj. aditiva koji se često dodaju, na efikasnost ESI procesa, rastvor amoksicilina u metanolu koncentracije $10 \mu\text{g cm}^{-3}$ ostavljen je jedan dan na sobnoj temperaturi da bi se molekul u potpunosti konvertovao u adukt sa metanolom. Na početku eksperimenta je optimizovan odnos metanola i vode u mobilnoj fazi, bez aditiva, a rezultati su prikazani na slici 41.



Slika 41. a) Zavisnost intenziteta protonovanog metanol-adukta (m/z 398) od sadržaja metanola u mobilnoj fazi;
b) MS spektar pri sadržaju metanola od 60%.

Utvrđeno je da se najveći intenzitet signala jona m/z 398 postiže pri odnosu metanola i vode 60:40 (slika 41a). Maseni spektar pri ovom sastavu mobilne faze (slika 41b) je veoma čist, bez klaster-jona, kao što su dimeri ili trimeri. U MS spektru dominira metanol-adukt jon, kao i dva dodatna adukta sa natrijumom. Pri optimalnom odnosu metanol/voda sprovedeni su dalji eksperimenti da bi se procenio uticaj amonijum-acetata i sirćetne kiseline, dva najčešće korišćena aditiva mobilne faze, na efikasnost jonizacije amoksicilina. Aditivi se često dodaju mobilnoj fazi da bi pospešili nastanak jona u ESI procesu, povećali rastvorljivost analita i poboljšali hromatografsko razdvajanje kompleksnih smeša (Constantopoulos *et al.* 1999; Kamel *et al.* 1999; King *et al.* 2000). Rezultati eksperimenata su predstavljeni na slici 42.



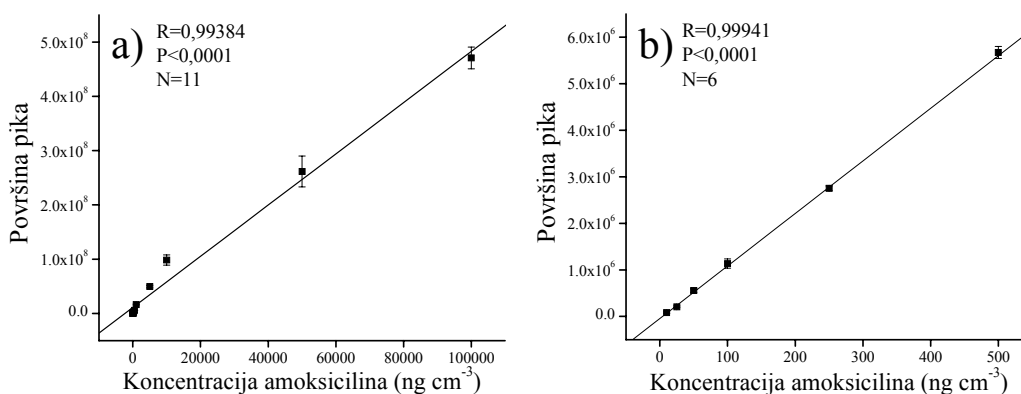
Slika 42. Zavisnost intenziteta protonovanog metanol-adukta (m/z 398) od koncentracije aditiva u mobilnoj fazi: a) amonijum-acetata; b) sirćetne kiseline, pri odnosu metanol/voda 60:40.

Amonijum-acetat se često dodaje mobilnoj fazi da bi pospešio jonizaciju analita (Kamel *et al.* 1999; Mathis and McCord 2005). Takođe se koristi za stabilizaciju retencionih vremena analita. Međutim, ovaj aditiv može i smanjiti signal analita (Hilton and Thomas 2003). U literaturi se kao optimalne navode koncentracije od 4 mM (Hilton and Thomas 2003), kao i 2 mM (Mathis and McCord 2005). Pri većim koncentracijama intenzitet signala analita se smanjuje zbog potiskivanja jonizacije (Constantopoulos *et al.* 1999; King *et al.* 2000; Mathis and McCord 2005). U eksperimentu je ispitivan uticaj koncentracije amonijum-acetata na intenzitet signala analita (slika 42a). Različiti procenti 20 mM rastvora amonijum-acetata u vodi, sa pH-vrednošću podešenom na 5,5 pomoću mravlje kiseline, mešani su sa metanolom i vodom, održavajući u mobilnoj fazi optimalan odnos metanol/voda 60:40. Utvrđeno je da je optimalna koncentracija amonijum-acetata u mobilnoj fazi 0,2 mM ($2 \cdot 10^{-4}$ mol dm⁻³), što odgovara sadržaju od 1% 20 mM amonijum-acetata u mobilnoj fazi. Intenzitet protonovanog metanol-adukta m/z 398 u prisustvu amonijum-acetata je svega 10% veći od intenziteta signala bez aditiva. Može se zaključiti da amonijum-acetat ne poboljšava značajnije intenzitet signala amoksicilina i da je efekat potiskivanja jonizacije više izražen, jer sa povećanjem sadržaja ovog aditiva u mobilnoj fazi intenzitet signala analita opada (slika 42a). Ovaj rezultat je u suprotnosti sa prethodnim zapažanjem da amonijum-acetat značajno povećava intenzitet metanol-adukta amoksicilina (slike 35d i 36). Međutim, prethodno zapažanje je uočeno za veoma visoku koncentraciju amoksicilina od 100 µg cm⁻³. Za određivanje tragova amoksicilina, amonijum-acetat bi trebalo izbegavati kao aditiv mobilnoj fazi.

Takođe je ispitivan uticaj sirćetne kiseline, kao aditiva mobilne faze, na intenzitet signala amokcicilina (slika 42b). Poznato je da dodatak kiseline mobilnoj fazi poboljšava oblik hromatografskog pika analita i pospešuje protonovanje, tj. nastanak $[M+H]^+$ -jona u procesu jonizacije. Molekuli analita se protonuju sa visokom efikasnošću čak i kada rastvor sadrži malu količinu protona. U ovu svrhu se često koristi sirćetna kiselina, u širokom opsegu koncentracija u zavisnosti od prirode analita (Bruno *et al.* 2001b). U eksperimentu je menjan sadržaj 10% sirćetne kiseline u mobilnoj fazi, održavajući optimalan odnos metanol/voda 60:40, pri koncentraciji amokcicilina od $10 \mu\text{g cm}^{-3}$. Najveći intenzitet signala amokcicilina je dobijen sa 0,1% sirćetne kiseline u mobilnoj fazi, što je 4,3 puta veće od intenziteta signala analita bez aditiva. Utvrđeno je da sirćetna kiselina značajno povećava intenzitet protonovanog metanol-adukta amokcicilina, zbog čega je neophodna kao aditiv mobilne faze pri kvantifikaciji tragova amokcicilina.

4.2.4. Linearnost detektora za određivanje amokcicilina

Linearnost ESI-MS/MS detektora za kvantifikaciju tragova amokcicilina, koristeći reakciju fragmentacije protonovanog metanol-adukta, ispitana je u širokom opsegu koncentracija od 10 ng cm^{-3} do $100 \mu\text{g cm}^{-3}$. Rastvori amokcicilina različitih koncentracija ostavljeni su jedan dan na sobnoj temperaturi da bi se molekul u potpunosti konvertovao u adukt sa metanolom. Rastvori su unošeni u injektor masenog detektora kroz koji je uspostavljen konstantan protok mobilne faze, brzine $0,2 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$ i sastava metanol:voda:10% sirćetna kiselina 60:39:1. Za svaku koncentraciju je izvedeno po pet merenja, na osnovu kojih je konstruisana kriva zavisnosti srednje površine pika analita od koncentracije. Rezultati su prikazani na slici 43. Utvrđeno je da je odgovor detektora linearan u posmatranom opsegu koncentracija sa koeficijentom korelacije (R) 0,99384. Međutim, linearnost je bila mnogo bolja za niže koncentracije, do 500 ng cm^{-3} , pošto je R za ovaj opseg iznosio 0,99941. Na ovaj način je potvrđeno da je nastanak metanol-adukta amokcicilina linearna funkcija koncentracije analita za širok opseg koncentracija, i da se metanol-adukt može pouzdano koristiti za identifikaciju i kvantifikaciju tragova amokcicilina (Grujic *et al.* 2008).



Slika 43. Linearnost masenog detektora za reakciju fragmentacije m/z 398 \rightarrow m/z 381 u opsegu koncentracija: a) 10 ng cm^{-3} – $100 \mu\text{g cm}^{-3}$; b) 10 – 500 ng cm^{-3} .

4.3. OPTIMIZACIJA HROMATOGRAFSKOG RAZDVAJANJA ANALITA I HPLC-MS/MS PARAMETARA

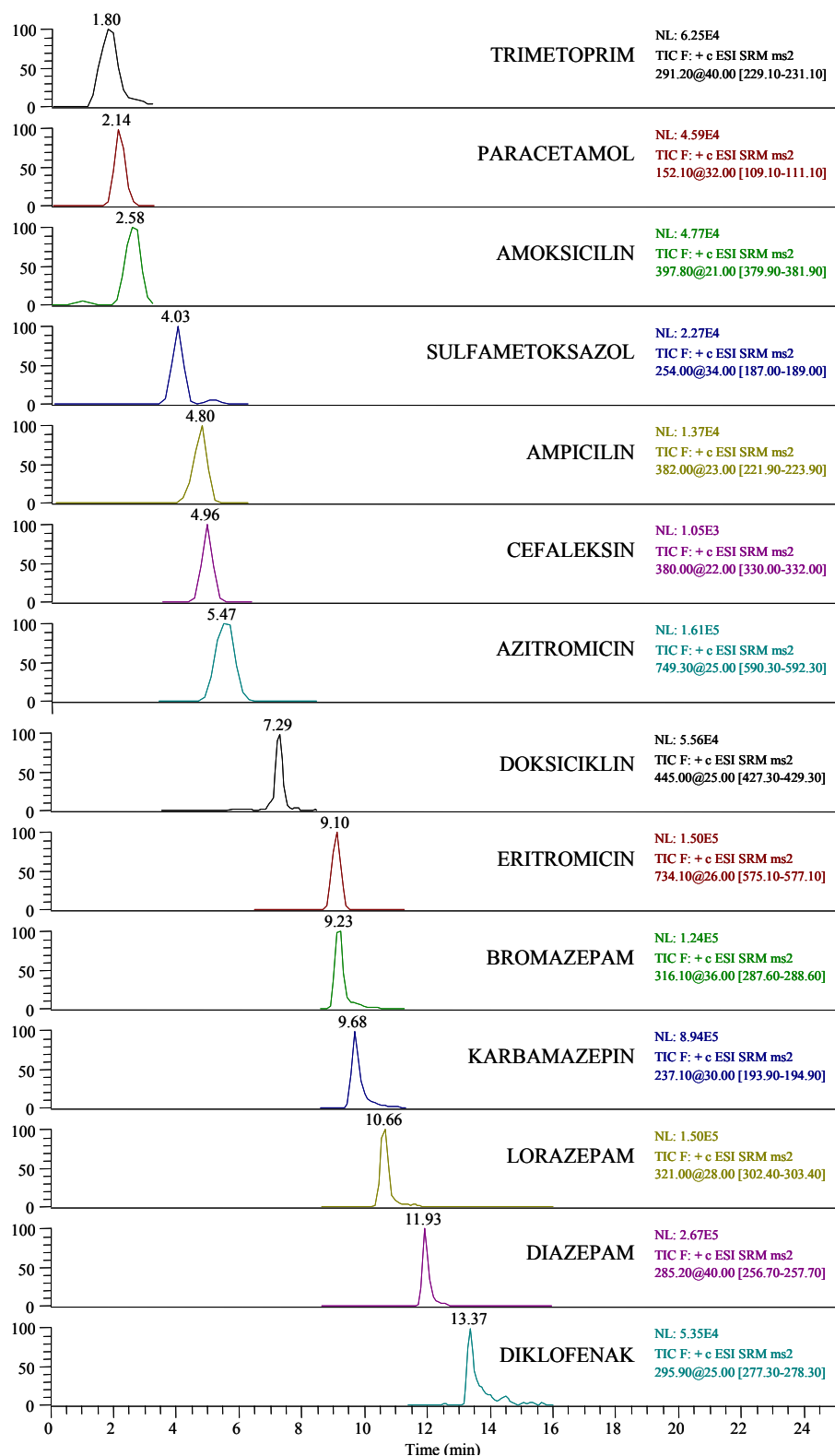
Na osnovu rezultata MSⁿ analize, za kvantifikaciju svakog analita je odabrana karakteristična reakcija fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon. Rezultati su prikazani u tabeli 7. Detektovanjem odabranih fragmentnih jona tokom HPLC-MS/MS analize dobijeni su hromatogrami proizvoda odabranih reakcija fragmentacije. SRM detekcija je podeljena na više vremenskih segmenata da bi se zadržala osetljivost detekcije. Detekcija pozitivnih jona (ESI(+))MS je podeljena na pet vremenskih segmenata, a u svakom segmentu su sakupljeni podaci za maksimalno četiri analita (tabela 7). SRM detekcija negativnih jona (ESI(-))MS je podeljena na dva vremenska segmenta. Kvantifikacija je izvršena na osnovu površina pikova analita u SRM hromatogramima.

Tipični maseni hromatogrami dobijeni analizom standardne smeše lekova koji se analiziraju kao pozitivni joni pri koncentraciji 250 ng cm⁻³ prikazani su na slici 44. Na slici 45, prikazani su hromatogrami dobijeni analizom standardne smeše lekova koji se analiziraju kao negativni joni pri koncentraciji 500 ng cm⁻³.

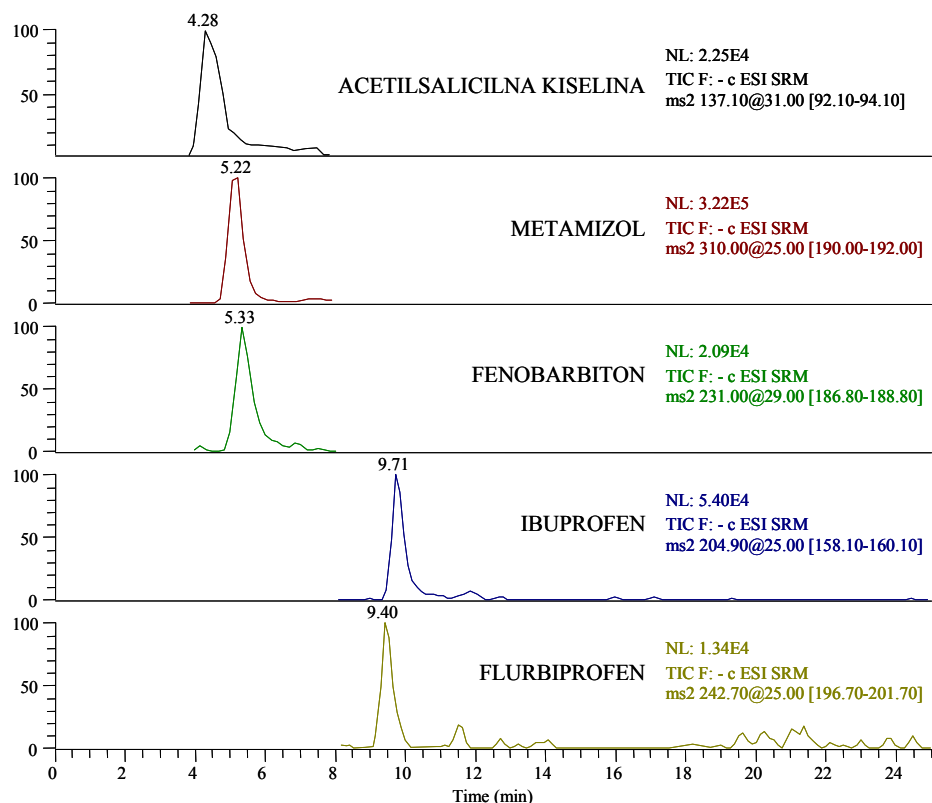
Tabela 7. HPLC–MS i MS/MS parametri za kvantitativno određivanje odabranih lekova.

LEK	VREMENSKI SEGMENT (min)	PREKURSOR JON (m/z)	I.W.*	KOLIZIONA ENERGIJA (%)	FRAGMENTNI JON (m/z)	I.W.*
ESI(+))MS						
Trimetoprim		291	1,5	40	230	2
Paracetamol	0,0–3,4	152	1,5	32	110	2
Amoksisicilin		398	2	21	381	2
Sulfametoksazol		254	1,5	34	188	2
Ampicilin	3,4–6,2	382	1,5	23	223	2
Cefaleksin		380	1,2	22	331	2
Azitromicin		749	2	25	591	2
Doksiciklin	6,2–8,2	445	2	25	428	2
Eritromicin		734	3	26	576	2
Bromazepam	8,2–11,2	316	1	36	288	1
Karbamazepin		237	1	30	194	1
Lorazepam		321	1	28	303	1
Diazepam	11,2–15,0	285	1	40	257	1
Diklofenak		296	1,5	25	278	1
ESI(-))MS						
Acetilsalicilna kis.		137	2	31	93	2
Metamizol	0,0–8,0	310	2,5	25	191	2
Fenobarbiton		231	2	29	188	2
Ibuprofen	8,0–12,0	205	2,5	25	159	2
Flurbiprofen		243	5	25	199	2,5

* I.W. (engl. isolation width) – maseni opseg detekcije jona (Da) oko posmatranog jona.



Slika 44. Maseni hromatogrami standardne smeše lekova koji se analiziraju kao pozitivni joni pri koncentraciji 250 ng cm^{-3} .



Slika 45. Maseni hromatogrami standardne smeše lekova koji se analiziraju kao negativni joni pri koncentraciji 500 ng cm^{-3} .

4.4. EKSTRAKCIJA ANALITA NA ČVRSTOJ FAZI

4.4.1. Izbor SPE kertridža

Rezultati ispitivanja efikasnosti deset komercijalno dostupnih kertridža za ekstrakciju odabranih lekova iz vode, kao i tri kertridža pripremljena punjenjem tretiranom dijatomejskom zemljom, prikazani su u tabeli 8. U tabeli su za svaki analit zasenčena tri najbolja rezultata, tj. prinosi najbliži vrednosti od 100%.

Na osnovu prinosa metoda datih u tabeli 8, može se uočiti da nijedan testirani adsorbens ne omogućava efikasnu ekstrakciju svih odabranih analita. Uzevši u obzir da je potrebno efikasno ekstrahovati veoma hemijski različite analite, u literaturi se dobrim smatraju prinosi metode veći od 70%. Utvrđeno je da su najveći prinosi za većinu analita (81–112%) dobijeni korišćenjem OASIS HLB kertridža, bez podešavanja pH-vrednosti uzorka. Od četrnaest analita, na ovom adsorbensu su sa najnižim prinosima (55–81%) ekstrahovani β -laktamski antibiotici – amoksicilin, ampicilin i cefaleksin. Međutim, sa izuzetkom cefaleksina, ove vrednosti su među najvećim za prinose β -laktama na svim testiranim SPE kolonama. Cefaleksin je jedini analit ekstrahovan na HLB kertridžu sa niskim prinosom od 55%. S obzirom na to da je većina veoma različitih lekova efikasno ekstrahovana iz vode upotrebom HLB adsorbensa, ovaj kertridž je odabran za dalji razvoj SPE metode.

Tabela 8. Prinosi metoda na različitim kertridžima pri koncentraciji lekova od 100 ng cm⁻³.

		PRINOS METODE (%)													
SPE METODA	KERTRIDŽ	Trimetoprim	Paracetamol	Amoksisilin	Sulfametoksazol	Ampicilin	Cefaleksin	Azitromicin	Doksiciklin	Eritromicin	Bromazepam	Karbamazepin	Lorazepam	Diazepam	Diklofenak
SPE-C₁₈															
	C ₁₈ Bakerbond	71	3	14	58	38	68	61	4	4	75	89	84	85	83
	ENVI-18 Supelclean	73	2	9	34	30	34	52	19	5	79	88	89	76	84
SPE-SDB/CHROM															
	SDB-1 Bakerbond	5	82	3	74	3	29	5	4	5	58	90	68	4	58
	ENVI-Chrom P Supelclean	74	110	32	80	44	108	80	44	32	66	82	87	16	69
SPE-UGLJENIČNI															
	ENVI-Carb Supelclean	52	17	1	1	1	7	70	63	1	3	90	50	68	1
SPE-KATJONSKI															
	MCX Oasis	82	73	34	78	36	61	112	120	2	80	91	90	86	90
	Arom. Sulf. Acid Bakerbond	88	1	73	110	28	38	80	66	2	70	84	106	86	48
	LC-SCX Supelclean	78	2	15	99	12	39	68	46	3	102	93	98	96	89
SPE-HLB I															
	HLB Oasis	103	88	77	115	81	55	112	85	100	84	98	102	93	100
SPE-HLB II															
	HLB Oasis (pH = 3)	102	86	47	81	36	58	91	65	4	89	91	93	89	93
SPE-HLB III															
	HLB Oasis (pH = 3; Na ₂ EDTA)	85	62	45	72	66	82	18	5	3	92	93	94	92	80
	H ₂ O-Philib DVB Bakerbond (pH = 3; Na ₂ EDTA)	89	85	76	110	107	83	61	4	3	93	98	92	89	90
SPE-DIJATOMIT I															
	DIJATOMIT I	78	33	12	16	7	19	14	17	34	54	49	24	41	69
	DIJATOMIT I (Na ₂ EDTA)	55	17	13	11	5	13	25	17	35	20	23	22	50	13
	DIJATOMIT I (TCA)	27	14	15	9	17	17	19	3	24	22	30	21	43	39
SPE-DIJATOMIT II															
	DIJATOMIT II	108	28	15	12	11	38	9	57	78	43	40	35	63	24
	DIJATOMIT II (Na ₂ EDTA)	32	18	11	19	8	3	30	9	15	18	46	43	85	27
	DIJATOMIT II (TCA)	46	23	17	5	17	5	12	58	1	17	46	38	92	40

Nakon HLB kertridža, sledeći po efikasnosti ekstrakcije odabranih lekova iz vode je H₂O-Philic DVB kertridž. Iako su prinosi metode na ovom adsorbensu prilično visoki za većinu analita (76–110%), u slučaju doksiciklina i eritromicina su dobijeni veoma niski prinosi (4% i 3%). Korišćenjem SDB-1 Bakerbond SPE kolone dobijeni su niski prinosi metode za značajan broj analita. Iako su adsorbensi SDB-1 Bakerbond i ENVI-Chrom P Supelclean sličnog sastava, ekstrakcija lekova je bila znatno uspešnija na ENVI-Chrom P adsorbensu. Paracetamol i cefaleksin su najefikasnije ekstrahovani upotrebom ovog kertridža. Međutim, značajan broj ostalih analita nije uspešno ekstrahovan, kao npr. diazepam (16%), amoksicilin i eritromicin (po 32%), ampicilin i doksiciklin (po 44%), zbog čega ovaj kertridž nije odabran za dalji razvoj SPE procedure.

Iako katjonski adsorbensi omogućavaju efikasnu ekstrakciju trimetoprima (78–88%), sulfametoksazola (78–100%), bromazepama (70–102%), karbamazepina (84–93%), lorazepama (90–106%) i diazepama (86–96%), zbog veoma niske ekstrakcije eritromicina (2–3%), kao i paracetamola, nisu odabrani za dalji razvoj SPE metode.

Utvrđeno je da C₁₈-kertridži, kao i ugljenični kertridž, nisu pogodni za ekstrakciju odabranih lekova iz vode, pošto se mnogo bolji prinosi dobijaju upotrebom drugih testiranih adsorbenasa. Slični rezultati dobijeni su i za ekstrakciju na dijatomejskoj zemlji, posebno prema proceduri DIJATOMIT I. Prinosi ekstrakcija na dijatomejskoj zemlji su generalno niski za većinu odabranih analita. Postoji svega nekoliko izuzetaka, kao što su ekstrakcija trimetoprima i eritromicina na netretiranoj dijatomejskoj zemlji, prema SPE proceduri DIJATOMIT II, kao i ekstrakcija diazepama prema istoj proceduri na dijatomejskoj zemlji tretiranoj trihlorsirćetnom kiselinom. Ipak, rezultati ukazuju na to kertridži pakovani dijatomejskom zemljom nisu prihvatljivi za ekstrakciju odabranih lekova iz vode.

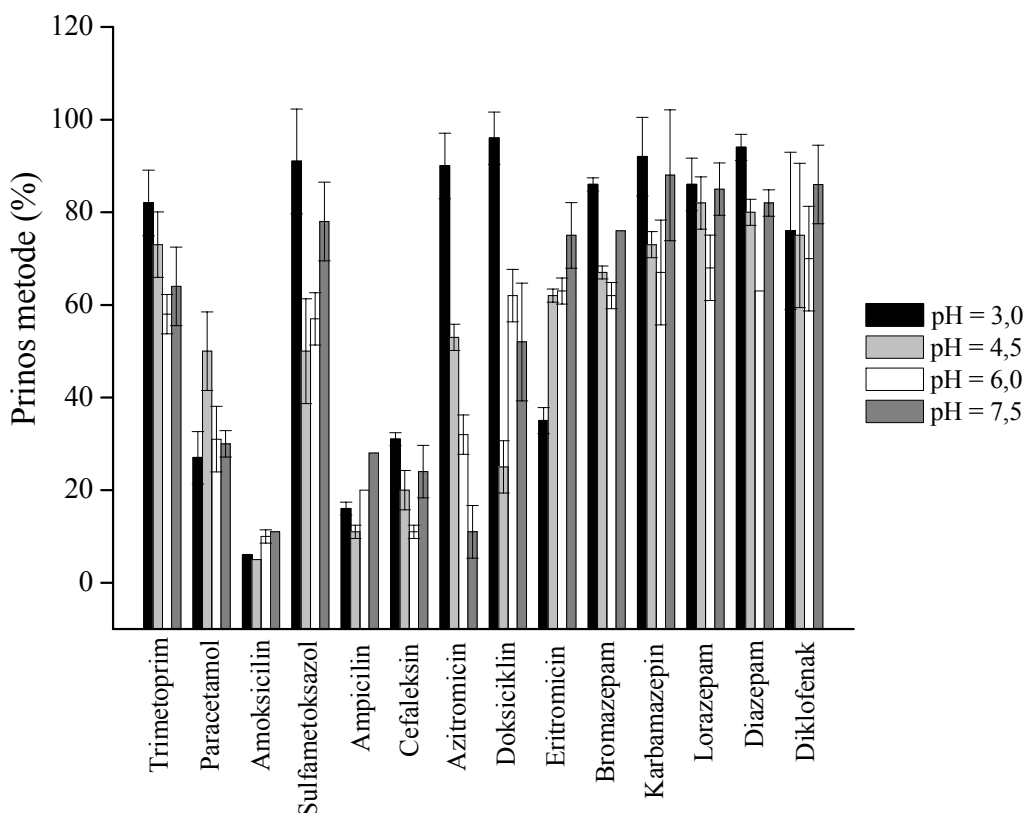
4.4.2. Izbor optimalne pH-vrednosti uzorka vode

Za optimizaciju pH-vrednosti uzorka vode u cilju dobijanja najboljih prinosa metode za ispitivane lekove odabrane su sledeće vrednosti: 3,0, 4,5, 6,0 i 7,5. Vrednost pH od 7,5 odgovara prosečnoj pH-vrednosti prirodnih voda. Rezultati eksperimenta su predstavljeni u tabeli 9 i grafički na slikama 46 i 47.

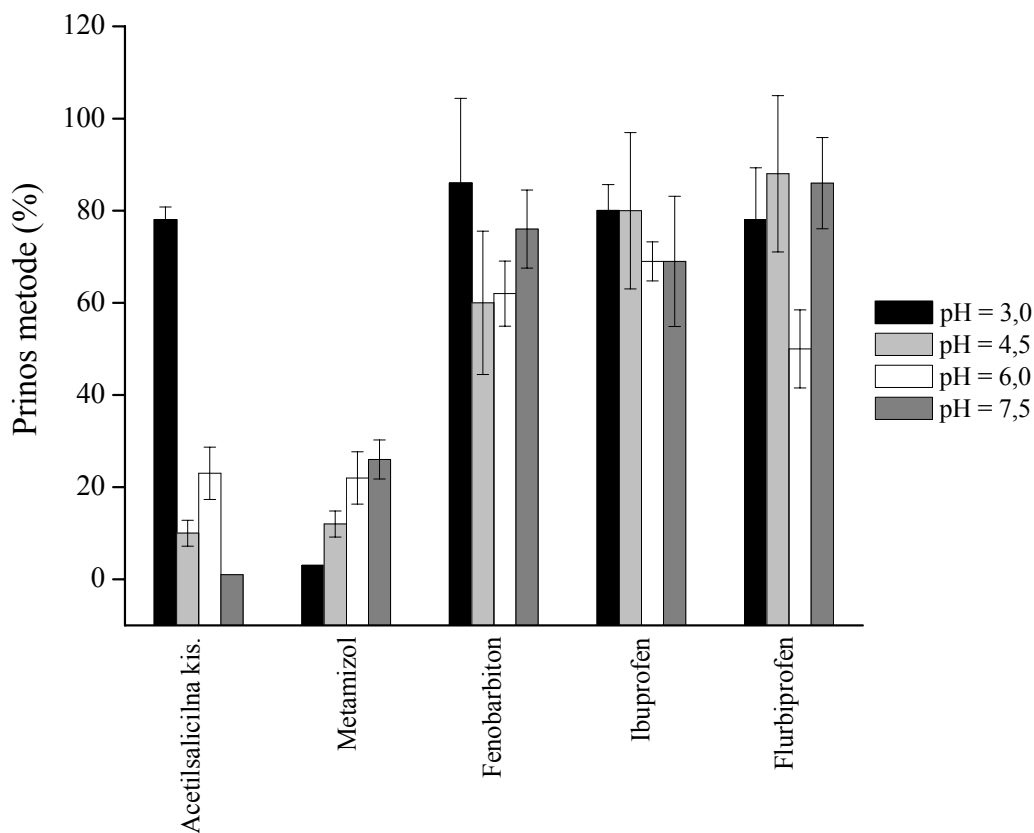
Tabela 9. Prinosi i ponovljivosti metoda za različite pH-vrednosti uzorka vode.

LEK	PRINOS METODE, % (RSD)			
	pH-vrednost uzorka vode			
	pH = 3,0	pH = 4,5	pH = 6,0	pH = 7,5
	ESI(+)MS			
Trimetoprim	82 (7)	73 (7)	58 (4)	64 (8)
Paracetamol	27 (6)	50 (8)	31 (7)	30 (3)
Amoksisicilin	6 (0)	5 (0)	10 (1)	11 (0)
Sulfametoksazol	91 (11)	50 (11)	57 (6)	78 (8)
Ampicilin	16 (1)	11 (1)	20 (0)	28 (0)
Cefaleksin	31 (1)	20 (4)	11 (1)	24 (6)
Azitromicin	90 (7)	53 (3)	32 (4)	11 (6)
Doksiciklin	96 (6)	25 (6)	62 (6)	52 (13)
Eritromicin	35 (3)	62 (2)	63 (3)	75 (7)
Bromazepam	86 (1)	67 (2)	62 (3)	76 (0)
Karbamazepin	92 (8)	73 (3)	67 (11)	88 (14)
Lorazepam	86 (6)	82 (6)	68 (7)	85 (6)
Diazepam	94 (3)	80 (3)	63 (0)	82 (3)
Diklofenak	76 (17)	75 (16)	70 (11)	86 (8)
	ESI(-)MS			
Acetilsalicilna kis.	78 (3)	10 (3)	23 (6)	1 (0)
Metamizol	3 (0)	12 (3)	22 (6)	26 (4)
Fenobarbiton	86 (18)	60 (16)	62 (7)	76 (8)
Ibuprofen	80 (6)	80 (17)	69 (4)	69 (14)
Flurbiprofen	78 (11)	88 (17)	50 (8)	86 (10)

Rezultati su pokazali da za sve odabrane lekove postoji zavisnost prinosa metode od pH-vrednosti. Ovo je posebno izraženo za azitromicin, doksiciklin i acetilsalicilnu kiselinu (slike 46 i 47). Da bi se ovi lekovi ekstrahovali sa visokom efikasnošću neophodna je jako kisela sredina (pH = 3,0). S druge strane, niske pH-vrednosti treba izbegavati pri ekstrakciji eritromicina i metamizola. Za većinu analita (63%), prinosi metode su bili najveći na pH = 3,0. Na pH = 7,5 značajnih 26% analita je predkoncentrisano sa najvećim prinosima. Za samo dva analita, paracetamol i flurbiprofen, pH = 4,5 je bila optimalna pH-vrednost. Međutim, flurbiprofen je ekstrahovan sa visokim prinosom i na pH-vrednostima 3,0 i 7,5 (slika 47). Za paracetamol (slika 46), pH-vrednost 4,5 je izgleda jedini izbor, pošto je prinos metode bio 20% veći nego na drugim pH-vrednostima. Ni u jednom slučaju, vrednost pH = 6,0 nije bila optimalna za ekstrakciju ispitivanih analita. Utvrđeno je da ekstrakciju odabranih lekova iz vode treba izvoditi na dve pH-vrednosti, tj. bez podešavanja pH uzorka vode (pH ~ 7,5) i na pH = 3.



Slika 46. Prinosi metode odabranih lekova koji se analiziraju kao pozitivni joni na različitim pH-vrednostima.



Slika 47. Prinosi metode odabranih lekova koji se analiziraju kao negativni joni na različitim pH-vrednostima.

4.4.3. Izbor optimalne zapremine eluenta

Sledeći korak u razvoju SPE metode bila je optimizacija zapremine rastvarača koja je potrebna za potpuno eluiranje analita sa SPE adsorbensa. U preliminarnim eksperimentima, kao eluenti su testirani metanol, dihlormetan, acetonitril i njihove smeše. Najbolji rezultati, tj. dobri prinosi i čisti ekstrakti, dobijeni su sa metanolom, zbog čega je odabran kao ekstrakcioni eluent, bez dodatka drugih rastvarača. Manji prinosi metode, dobijeni korišćenjem acetonitrila ili dihlormetana kao eluenta, mogu se objasniti slabom rastvorljivošću pojedinih analita u ovim rastvaračima. Tako su, na primer, β -laktami nerastvorni u acetonitrilu. Za eluiranje lekova sa HLB SPE kertridža testirane su zapremine metanola od 7, 10, 13 i 15 cm³. Rezultati, prikazani u tabeli 10, su pokazali da je za većinu odabranih lekova zapremina od 7 cm³ metanola dovoljna za potpuno eluiranje sa kolone. Izuzetak su makrolidi, eritromicin i azitromicin. Naime, sa sledeća 3 cm³ metanola eluirano je dodatnih 2% eritromicina, ukazujući na to da je 10 cm³ metanola potrebno za potpuno eluiranje ovog leka sa SPE kertridža. Azitromicin je eluiran sa kolone tek sa poslednja 2 cm³ metanola, što predstavlja 15 cm³ ekstrakcionog rastvarača potrebnog za njegovo eluiranje sa kolone. Konačno je utvrđeno da je 15 cm³ metanola optimalna zapremina rastvarača za eluiranje svih odabranih analita sa SPE adsorbensa.

Tabela 10. Prinosi metoda za različite zapremine eluenta (pH = 4,5).

LEK	PRINOS METODE (%)			
	Zapremina eluenta			
	7 cm ³	+3 cm ³	+3 cm ³	+2 cm ³
ESI(+)MS				
Trimetoprim	83	–	–	–
Paracetamol	85	–	–	–
Amoksisicilin	38	–	–	–
Sulfametoksazol	78	–	–	–
Ampicilin	68	–	–	–
Cefaleksin	59	–	–	–
Azitromicin	–	–	–	64
Doksiciklin	15	–	–	–
Eritromicin	80	2	–	–
Bromazepam	66	–	–	–
Karbamazepin	95	–	–	–
Lorazepam	84	–	–	–
Diazepam	85	–	–	–
Diklofenak	96	–	–	–
ESI(-)MS				
Acetilsalicilna kis.	25	–	–	–
Metamizol	10	–	–	–
Fenobarbiton	105	–	–	–
Ibuprofen	68	–	–	–
Flurbiprofen	91	–	–	–

4.4.4. Izbor optimalne zapremine uzorka vode

Poslednji korak u razvoju i optimizaciji SPE procedure bio je izbor zapremine uzorka vode koja će, pre svega, omogućiti što veći faktor predkoncentrisanja uzorka. Međutim, ukoliko je zapremina uzorka prevelika, postoji mogućnost ispiranja i gubitka analita sa kolone pre eluiranja rastvaračem. Takođe je potrebno uzeti u obzir da analiza manjih zapremina uzorka značajno skraćuje vreme analize. Testirane su zapremine od 50, 100, 250 i 500 cm³ uzorka vode. Rezultati su prikazani u tabeli 11. Za većinu analita, najveći prinosi su dobijeni u slučaju predkoncentrisanja 100 cm³ ili 250 cm³ uzorka vode. Polovina ovih analita je pokazivala i do 30% veće prinose za zapreminu uzorka od 250 cm³. Međutim, sa izuzetkom eritromicina, njihovi prinosi pri analizi 100 cm³ uzorka bili su i dalje visoki

(> 80%) i prihvatljivi. Najizraženija razlika u prinosima dobijena je za azitromicin, koji pokazuje smanjenje prinosa od skoro 70% kada se umesto 100 cm³ analizira 250 cm³ uzorka vode. Zapremina uzorka od 500 cm³ je prevelika, u smislu vremena analize i značajnog gubitka analita. Ovo je posebno izraženo za doksiciklin koji pokazuje smanjenje prinosa od 61% u poređenju sa prinosom za 250 cm³ uzorka. Samo za dva analita, lorazepam i ibuprofen, zapremina od 500 cm³ bila je optimalna. Međutim, njihovi prinosi za 100 cm³ uzorka bili su oko 100%. Nekoliko analita za koje je optimalna zapremina od 50 cm³, izuzev paracetamola, pokazuju nešto manje prinose prilikom analize 100 cm³ uzorka vode. Konačno je utvrđeno da je za analizu optimalna zapremina uzorka od 100 cm³, jer omogućava visoke prinose metode za većinu odabranih lekova i značajno skraćuje vreme SPE procedure.

Tabela 11. Prinosi metoda za različite zapremine uzorka vode (pH = 3).

LEK	PRINOS METODE (%)			
	Zapremina uzorka vode			
	50 cm ³	100 cm ³	250 cm ³	500 cm ³
ESI(+)-MS				
Trimetoprim	136	115	85	61
Paracetamol	57	34	18	15
Amoksicilin	25	24	15	16
Sulfametoxazol	68	108	85	75
Ampicilin	37	52	2	6
Cefaleksin	65	60	21	10
Azitromicin	97	117	48	–
Doxiciklin	66	82	101	40
Eritromicin	16	18	26	22
Bromazepam	84	99	107	71
Karbamazepin	90	103	105	99
Lorazepam	94	100	98	105
Diazepam	86	93	105	99
Diklofenak	64	81	111	96
ESI(-)-MS				
Acetilsalicilna kis.	88	110	96	85
Metamizol	3	12	3	–
Fenobarbiton	88	100	110	90
Ibuprofen	54	102	90	115
Flurbiprofen	55	120	112	89

4.4.5. Validacija razvijene metode

Razvijena i optimizovana metoda je konačno testirana na uzorku podzemne vode u koji je dodata smeša svih odabranih lekova tako da koncentracija u ispitivanom uzorku iznosi 100 i 500 ng dm⁻³. Prinosi metode i ponovljivost, izražena kao relativna standardna devijacija (RSD), su određeni analizom tri probe svakog uzorka, u tri dana. Rezultati su prikazani u tabeli 12.

Tabela 12. Prinosi i ponovljivost razvijene metode sa vrednostima granice detekcije i kvantifikacije za ispitivane lekove.

LEK	PRINOS METODE, % (RSD)				LOD (ng dm ⁻³)	LOQ (ng dm ⁻³)
	<i>c</i> = 100 ng dm ⁻³		<i>c</i> = 500 ng dm ⁻³			
	pH = 3,0	pH ~ 7,5	pH = 3,0	pH ~ 7,5		
ESI(+)-MS						
Trimetoprim	87 (13)	82 (8)	92 (6)	111 (10)	0,34	1,14
Paracetamol	35 (12)	80 (19)	23 (18)	97 (8)	0,50	1,67
Amoksicilin	22 (13)	51 (6)	17 (8)	55 (6)	0,79	2,63
Sulfametoksazol	91 (8)	94 (3)	85 (3)	103 (14)	1,24	4,13
Ampicilin	17 (21)	74 (14)	28 (10)	70 (16)	1,73	5,77
Cefaleksin	44 (19)	48 (6)	38 (7)	52 (5)	1,63	5,44
Azitromicin	90 (9)	65 (22)	86 (8)	41 (15)	2,58	8,59
Doksiciklin	98 (11)	62 (6)	118 (14)	43 (7)	8,06	26,88
Eritromicin	23 (16)	96 (4)	14 (16)	90 (13)	1,65	5,48
Bromazepam	100 (3)	94 (8)	97 (7)	112 (3)	1,35	4,52
Karbamazepin	89 (17)	108 (16)	92 (12)	114 (8)	0,27	0,90
Lorazepam	110 (6)	96 (13)	104 (5)	109 (2)	0,55	1,82
Diazepam	90 (24)	92 (5)	94 (15)	95 (10)	0,76	2,54
Diklofenak	96 (9)	102 (5)	92 (18)	120 (6)	0,15	0,49
ESI(-)-MS						
Acetilsalicilna kis.	100 (11)	7 (11)	82 (3)	14 (20)	3,33	11,10
Metamizol	23 (27)	65 (15)	16 (22)	67 (17)	7,66	25,54
Fenobarbiton	95 (5)	96 (9)	89 (15)	83 (5)	0,99	3,32
Ibuprofen	82 (10)	87 (17)	80 (7)	72 (14)	3,28	10,93
Flurbiprofen	98 (12)	93 (5)	80 (18)	98 (7)	12,46	41,53

RSD su generalno bile manje od 20%, sa nekoliko izuzetaka. Nije uočena zavisnost ponovljivosti metode od koncentracije analita ili pH-vrednosti. Utvrđeno je da azitromicin, doksiciklin i acetilsalicilna kiselina moraju biti ekstrahovani u kiseloj sredini, pošto su njihovi prinosi, npr. za 500 ng dm⁻³ i pH = 3 bili značajno veći (82–118%) u poređenju sa vrednostima za pH ~ 7,5, tj. bez podešavanja pH (14–43%). Vrednosti pH analiziranih

uzoraka prirodne vode bile su u opsegu 6,70–8,39 za površinske i 7,20–7,70 za podzemne vode, što daje prosečnu vrednost od 7,5. Ekstrakcija i predkoncentrisanje paracetamola, ampicilina, eritromicina i metamizola su bili mnogo uspešniji bez podešavanja pH-vrednosti uzorka vode, pošto su njihovi prinosi (67–97%) bili značajno veći nego u kiseloj sredini (14–28%). Iako je za ekstrakciju β -laktama, amoksicilina i cefaleksina, povoljnija pH-vrednost oko 7,5, prinosi metode od 55% za amoksicilin i 52% za cefaleksin smatraju se niskim.

Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) razvijene metode za svaki analit su izračunate koristeći odnos signala i šuma (S/N, engl. signal to noise) iz SRM masenih hromatograma za uzorak podzemne vode sa dodatom smešom lekova. Granica detekcije metode je izračunata kao koncentracija pri kojoj bi vrednost S/N iznosila 3, dok vrednost granice kvantifikacije odgovara vrednosti S/N = 10. Rezultati LOD i LOQ su prikazani u tabeli 12. Izračunate vrednosti LOD su bile u opsegu od 0,15 ng dm⁻³ do 12,46 ng dm⁻³, dok su odgovarajuće vrednosti LOQ bile u opsegu 0,49–41,53 ng dm⁻³. Utvrđeno je da najnižu granicu detekcije i kvantifikacije imaju trimetoprim, karbamazepin i diklofenak, a najvišu doksiciklin, metamizol i flurbiprofen.

Takođe je testirana linearnost razvijene metode za detekciju odabranih lekova u opsegu koncentracija 10–250 ng cm⁻³ u konačno dobijenom ekstraktu. U Prilogu su date krive zavisnosti površine pika svakog analita od koncentracije u ekstraktu (slika 66). Za lekove koji se detektuju kao pozitivni joni, koeficijenti korelacije, tj. linearnosti (R), bili su u opsegu od 0,98308 za paracetamol i diklofenak do 0,99939 za lorazepam. Za detekciju negativnih jona, koeficijenti korelacije su bili niži, od 0,98282 za flurbiprofen do 0,99155 za acetilsalicilnu kiselinu.

4.5. KALIBRACIJA I UTICAJ MATRICE

Kao kalibraciona metoda korišćena je metoda eksterne kalibracije sa standardima koji odgovaraju matrici uzorka, a koji su pripremljeni za koncentracije 10, 25, 50, 100 i 250 ng cm⁻³. Za svaki odabrani lek je ispitana linearnost kalibracione krive. Rezultati su pokazali da su kalibracione krive linearne, sa koeficijentima korelacije u opsegu od 0,98717 za metamizol do 0,99980 za ampicilin. Standardi koji odgovaraju matrici su korišćeni da bi se eliminisao uticaj matrice, tj. smanjenje ili povećanje signala analita u prisustvu sastojaka matrice. Uticaj matrice se može izračunati kao odnos površine pika analita u standardu koji odgovara matrici i površine pika analita u rastvaraču. Za većinu odabranih lekova, pri koncentraciji od 100 ng cm⁻³, uticaj matrice nije bio značajno izražen, pošto je smanjenje ili povećanje signala analita bilo manje od 20%. Međutim, za cefaleksin i metamizol je uočeno značajno smanjenje signala do 35%, koje bi moglo dovesti do netačne kvantifikacije, ukoliko se ne koriste standardi koji odgovaraju matrici.

4.6. ANALIZA REALNIH UZORAKA

Razvijena i optimizovana analitička metoda je primenjena na realne uzorke površinskih i podzemnih voda, pri čemu je dobijena studija o stanju zagađenosti voda lekovima koji spadaju u najčešće korišćene u našoj zemlji. Rezultati analize, prikazani u tabeli 13, podeljeni su u četiri grupe prema grupama uzoraka. U prvoj grupi uzoraka vode nalazi se 9 uzoraka iz reke Dunav koji su uzeti u 9 gradova nizvodno od ušća Save u Dunav. Drugu grupu čine uzorci vode uzeti iz nekoliko reka i jezera u Srbiji. Treću grupu sačinjavaju uzorci vode iz otpadnih kanala, zatim uzorci podzemne vode iz pijezometara u blizini otpadnih kanala, kao i uzorci savske vode nizvodno od izlivanja kanala u reku. U četvrtoj grupi se nalaze uzorci vode iz reni bunara i pogona za preradu vode Bežanija. U pogonu za preradu vode Bežanija uzeta su tri uzorka vode: po jedan uzorak iz dva aeratora – Progar i Ušće u kojima se nalazi sirova voda sakupljena iz reni bunara iz pravca Progara i iz pravca Ušća, kao i uzorak iz bazena čiste vode, nakon faze dezinfekcije. Takođe je uzet po jedan uzorak vode iz reni bunara kod Progara (RB-92) i reni bunara na Ušću (RB-4).

Ispitivanje je pokazalo da je oko 80% ispitivanih uzoraka voda sadržalo tragove lekova. Odabrani lekovi nisu detektovani u dva uzorka podzemne vode iz pijezometara 5 i 2, zatim u uzorku vode iz reni bunara 4, niti u rečnoj vodi iz Nišave. Posebno je značajno da uzorak iz bazena čiste vode, nakon faze dezinfekcije u pogonu za preradu vode Bežanija, nije sadržao tragove ispitivanih lekova, što je u skladu sa rezultatom analize uzorka česmenske vode koji nije sadržao tragove analita.

Od devetnaest traženih lekova, u uzorcima voda su detektovana četiri leka – trimetoprim, paracetamol, azitromicin i karbamazepin. U 80% analiziranih uzoraka vode pronađeni su tragovi *karbamazepina*, u opsegu koncentracija 6–130 ng dm⁻³. Karbamazepin je jedan od najčešće detektovanih lekova u vodenoj sredini, iako se izlučuje u aktivnom obliku u svega nekoliko procenata (Ternes 1998). Koncentracija ovog antiepileptika u površinskim i podzemnim vodama u Srbiji je slična vrednostima koje su pronađene u površinskoj vodi u Švajcarskoj (30–250 ng dm⁻³, Öllers *et al.* 2001), Španiji (9–37 ng dm⁻³, Pedrouzo *et al.* 2007; do 110 ng dm⁻³, Gros *et al.* 2006b), Kanadi (0,20–16 ng dm⁻³, Hao *et al.* 2006) i Južnoj Koreji (4,5–61 ng dm⁻³, Kim *et al.* 2007). Učestalost detekcije karbamazepina u površinskim vodama se obično objašnjava malim procentom uklanjanja (< 10%) u procesima prečišćavanja otpadnih voda (Ternes 1998; Gros *et al.* 2006b). U životnoj sredini, karbamazepin je veoma otporan i prolazi kroz prirodne procese prečišćavanja i filtracije vode na rečnim obalama, zbog čega se detektuje u podzemnim vodama u koncentracijama do 900 ng dm⁻³ (Sacher *et al.* 2001). Takođe je potrebno uzeti u obzir da terapija ovim lekom obično traje čitav život, za razliku od terapije antibioticima ili analgoantipireticima, zbog čega postoji konstantan unos karbamazepina u prirodne vode. Karbamazepin je detektovan u svim uzorcima dunavske vode, ali nije uočen pravilan trend promene koncentracije karbamazepina u uzorcima nizvodno od Beograda, kao grada sa najvećim brojem stanovnika.

Tabela 13. Tragovi odabranih lekova u realnim uzorcima voda.

UZORCI VODE	KONCENTRACIJA (ng dm ⁻³)																			
	Trimetoprim	Paracetamol	Amoksicilin	Sulfametoksazol	Ampicilin	Cefaleksin	Azitromicin	Doksiciklin	Eritromicin	Bromazepam	Karbamazepin	Lorazepam	Diazepam	Diklofenak	Acetilsalicilna kis.	Metamizol	Fenobarbiton	Ibuprofen	Flurbiprofen	
DUNAV																				
Beograd	29										20									
Smederevo											24									
Ram						55					15									
V. Gradište											8,0									
D. Milanovac											14									
Tekija	170										130									
Kladovo	78										20									
Kusjak											16									
Radujevac											16									
Sava		610									50									
Nišava																				
Tamiš	24	310				36					30									
Očaga (Lazarevac)	174					81					30									
Kanal Surčin											12									
Kanal Galovica						150					15									
Pijezometar 5																				
Pijezometar 4p											13									
Pijezometar 4											14									
Pijezometar 2																				
Sava (Sajam)											29									
Sava (B. most)											43									
RB-92 (Progar)						25					10									
Aerator-Progar						140					6,0									
RB-4 (Ušće)																				
Aerator-Ušće											15									
Bazen čiste vode																				

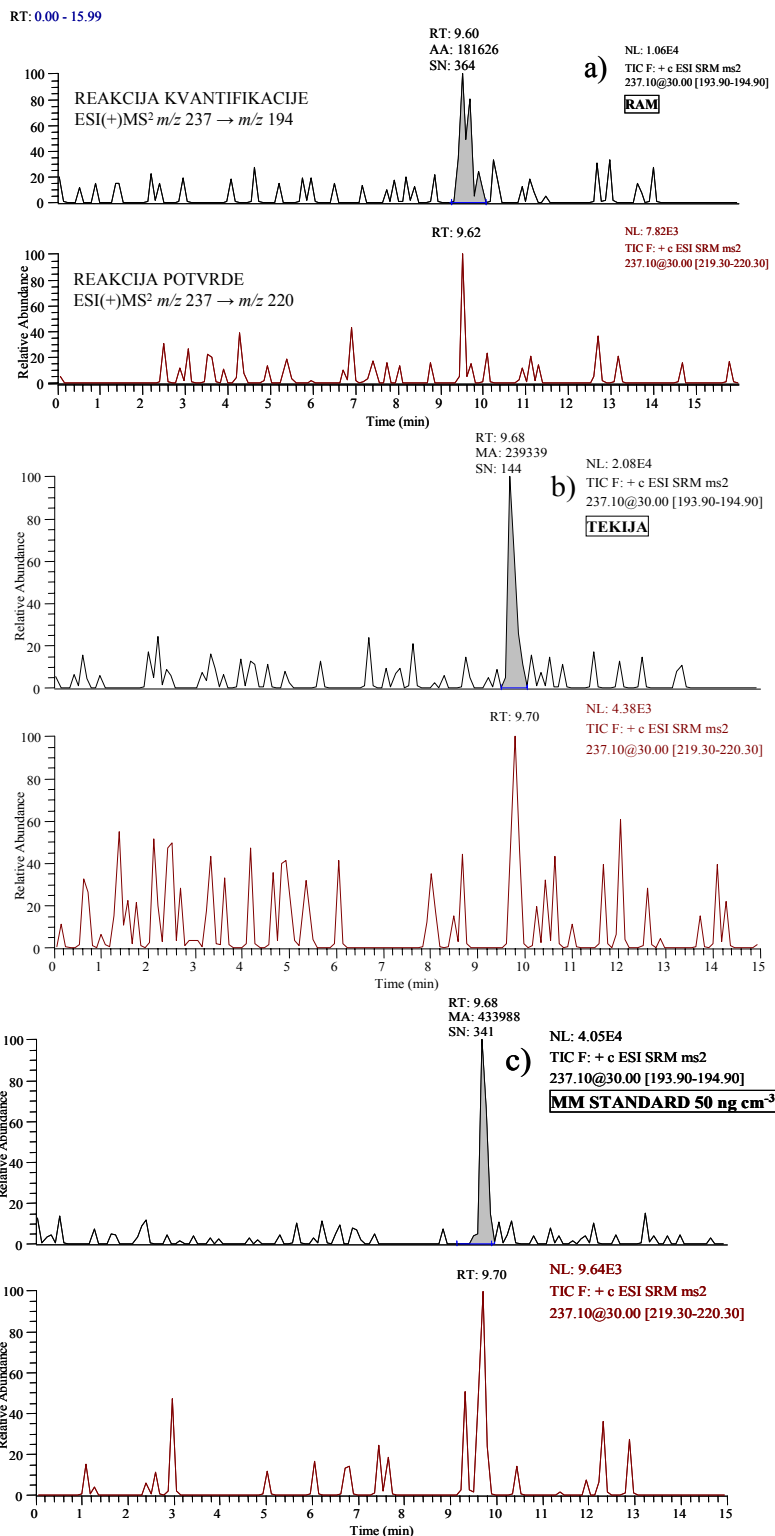
Antibiotik *azitromicin* je detektovan u 22% analiziranih uzoraka vode. Prisustvo ovog leka u prirodnim vodama predstavlja veliki problem, zbog mogućnosti pojave rezistentnosti bakterijskih sojeva na ovaj antibiotik. Koncentracije azitromicina detektovane u površinskim i podzemnim vodama u Srbiji (25–140 ng dm⁻³) su veće od koncentracija u rečnoj vodi Španije (do 20 ng dm⁻³, Gros *et al.* 2006b) i SAD-a (do 77 ng dm⁻³, Jones-Lepp 2006). Posebno zabrinjava njegovo prisustvo u reni bunaru 92 kod Progara (25 ng dm⁻³), a zatim i značajno povećana koncentracija u vodi iz aeratora u kome se sakuplja voda iz većeg broja reni bunara iz pravca Progara (140 ng dm⁻³). Povećanje koncentracije azitromicina ukazuje na to da su i ostali reni bunari iz pravca Progar najverovatnije kontaminirani ovim antibiotikom. Ipak, u procesu prečišćavanja pijaće vode dolazi do njegovog potpunog uklanjanja, što je potvrđeno činjenicom da ovaj lek nije detektovan u uzorku iz bazena čiste vode, niti u česmenskoj vodi. Azitromicin je takođe detektovan u koncentraciji od 150 ng dm⁻³ u vodi iz otpadnog kanala Galovica. S obzirom na to da u podzemnoj vodi iz pijezometara u blizini kanala nije pronađen azitromicin, može se zaključiti da nije došlo do spiranja ovog antibiotika iz otpadnog kanala do podzemnih voda.

Paracetamol je pronađen u 15% ispitivanih uzoraka voda, tj. u četiri uzorka rečne vode, u opsegu koncentracija 78–610 ng dm⁻³. Ovo su prilično visoke koncentracije, u poređenju sa koncentracijama detektovanim u rečnoj vodi u Španiji (12–30 ng dm⁻³, Pedrouzo *et al.* 2007; do 250 ng dm⁻³, Gros *et al.* 2006b), Južnoj Koreji (4,1–73 ng dm⁻³, Kim *et al.* 2007) i SAD-u (110 ng dm⁻³, Kolpin *et al.* 2002). U procesima prečišćavanja otpadnih voda ovaj lek se uklanja sa veoma visokom efikasnošću od 99% (Gómez *et al.* 2007). Visoki nivoi ovog analgetika u rečnoj vodi u Srbiji mogu se objasniti činjenicom da gradovi u kojima su uzorci rečne vode uzeti nemaju postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda. Paracetamol se lako degraduje i uklanja u prirodnim procesima prečišćavanja voda, zbog čega nije detektovan u podzemnim vodama u Srbiji, niti u uzorcima vode uzetim u postrojenju za preradu vode za piće, uprkos značajnom konzumiranju ovog leka i visokoj koncentraciji u rečnoj vodi.

Trimetoprim, obično u kombinaciji sa sulfametoksazolom, sačinjava lek koji se koristi kao antibiotik. Iako sulfametoksazol nije detektovan u ispitivanim uzorcima voda, trimetoprim je pronađen u 15% ispitivanih uzoraka, u opsegu koncentracija 24–174 ng dm⁻³. Slično paracetamolu, detektovan je samo u površinskim vodama. U poređenju sa koncentracijama pronađenim u površinskim vodama u Španiji (do 20 ng dm⁻³, Gros *et al.* 2006b), Engleskoj (do 42 ng dm⁻³, Ashton *et al.* 2004) i Južnoj Koreji (3,2–5,3 ng dm⁻³, Kim *et al.* 2007), nivoi detektovani u površinskim vodama u Srbiji su značajno veći, što se ponovo može objasniti nepostojanjem postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda.

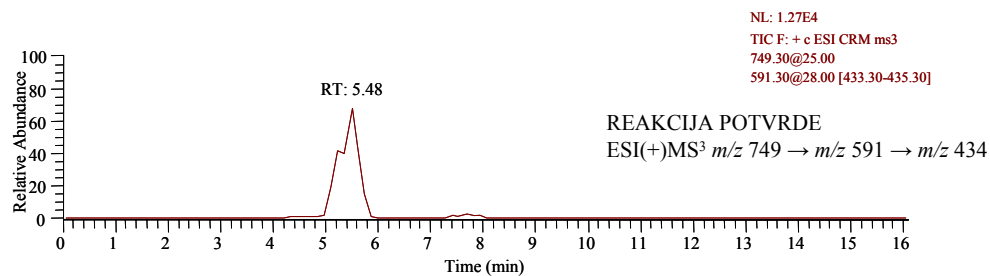
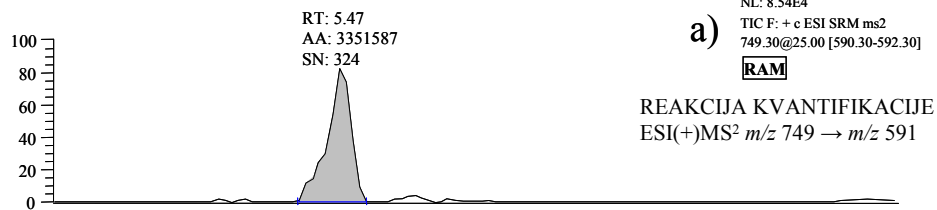
4.7. POTVRDA PRISUSTVA ANALITA

Potvrda pozitivnih rezultata je izvedena ponovnom analizom ekstrakta uzorka vode uz proširenu analitičku metodu sa dodatnim SRM prelazima odabranim iz tabele 6. Na slikama 48–52 prikazani su karakteristični maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva detektovanih lekova, i to: karbamazepina (slika 48), azitromicina (slike 49 i 51), paracetamola (slika 50) i trimetoprima (slika 52). Prema sistemu identifikacionih poena, pomoću kojeg je Evropska Unija definisala neophodne uslove za potvrdu prisustva organskih zagađujućih supstanci masenom spektrometrijom (Commission Decision 2002/657/EC), za potvrdu je neophodan minimum od 3 identifikaciona poena. Kod masenog spektrometra niske rezolucije, kakav je jonski trap, prekursor jon ima vrednost jednog identifikacionog poena, a svaki fragmentni jon ima vrednost 1,5 identifikacionih poena. Zbog toga se najmanje dva fragmentna jona moraju koristiti za potvrdu prisustva analita. Ovo je posebno značajno u eliminisanju lažnih pozitivnih rezultata kada se kvantifikacija zasniva na SIM analizi ili jednom SRM prelazu. Zbog toga su za svaki analit odabrana dva SRM prelaza između prekursor jona i dva najintenzivnija fragmentna jona, što ukupno ima vrednost 4 identifikaciona poena. Međutim, za paracetamol postoji samo jedan SRM prelaz (tabela 6), i ne postoje dodatne MSⁿ fragmentacije koje bi se mogle iskoristiti za potvrdu. Potvrda prisustva paracetamola je postignuta poređenjem retencionih vremena analita i standarda paracetamola u SRM hromatogramima (slika 50). Smatra se da je dovoljan dokaz prisustva ovog analita razlika u retencionim vremenima manja od 3% (Gros *et al.* 2006b).

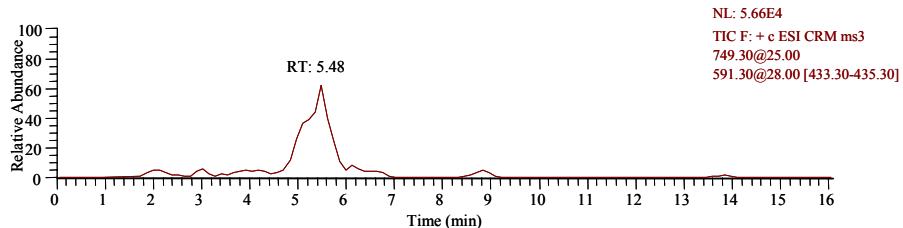
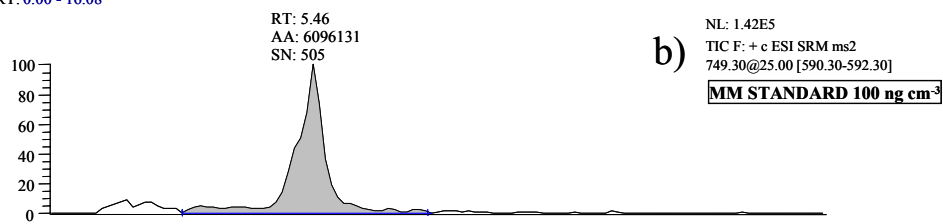


Slika 48. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva karbamazepina: a) uzorka RAM; b) uzorka TEKLIJA; c) standarda koncentracije 50 ng cm⁻³.

RT: 0.00 - 16.08

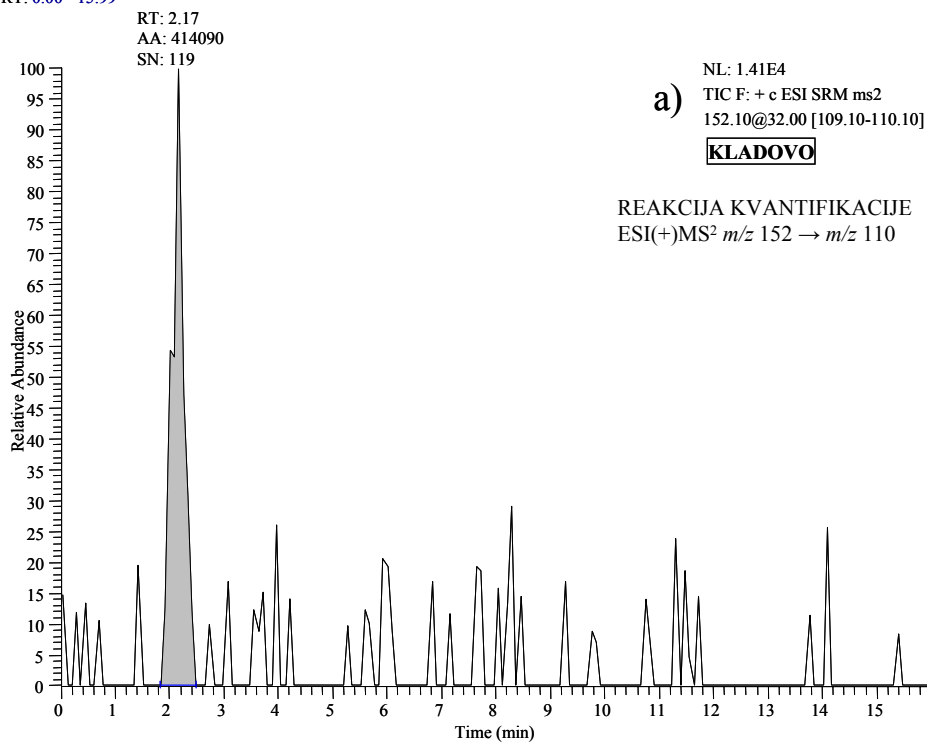


RT: 0.00 - 16.08

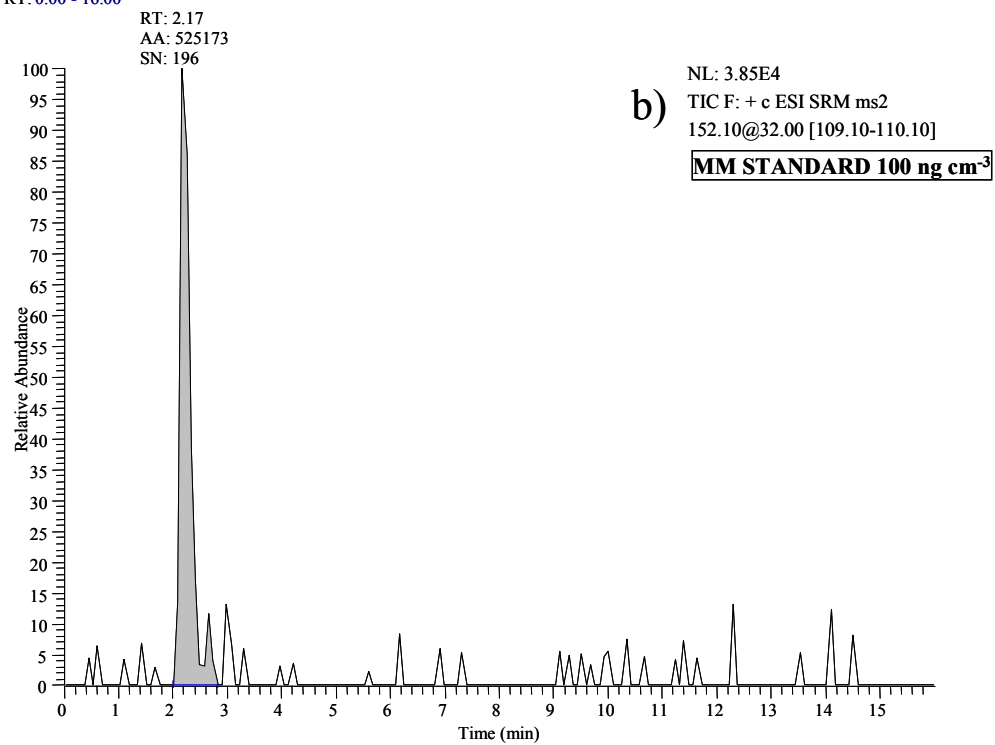


*Slika 49. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva azitromicina:
a) uzorka RAM; b) standarda koncentracije 100 ng cm⁻³.*

RT: 0.00 - 15.99



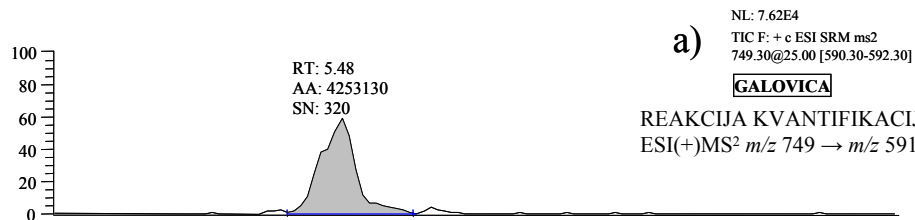
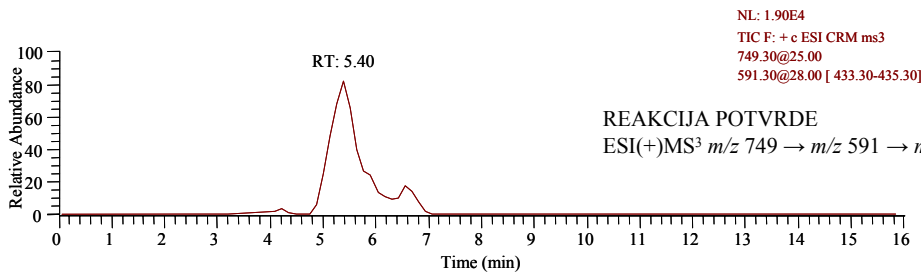
RT: 0.00 - 16.00



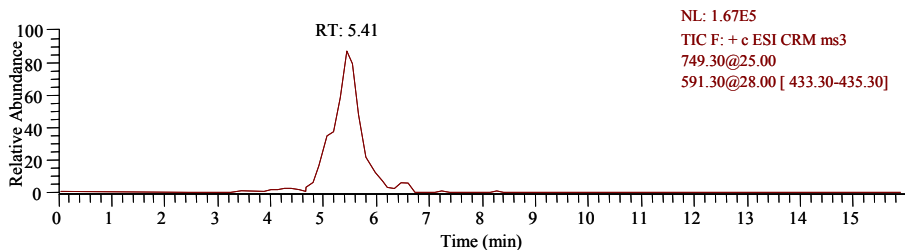
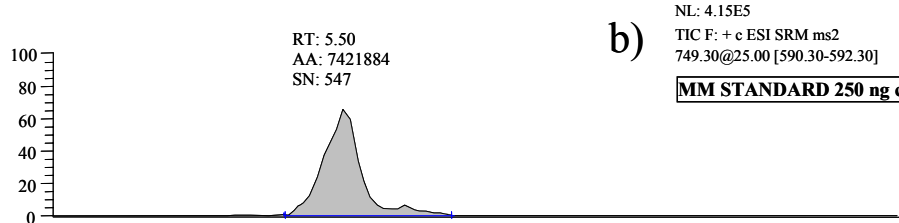
Slika 50. Maseni hromatogrami paracetamola:

a) uzorka KLADOVO; b) standarda koncentracije 100 ng cm⁻³.

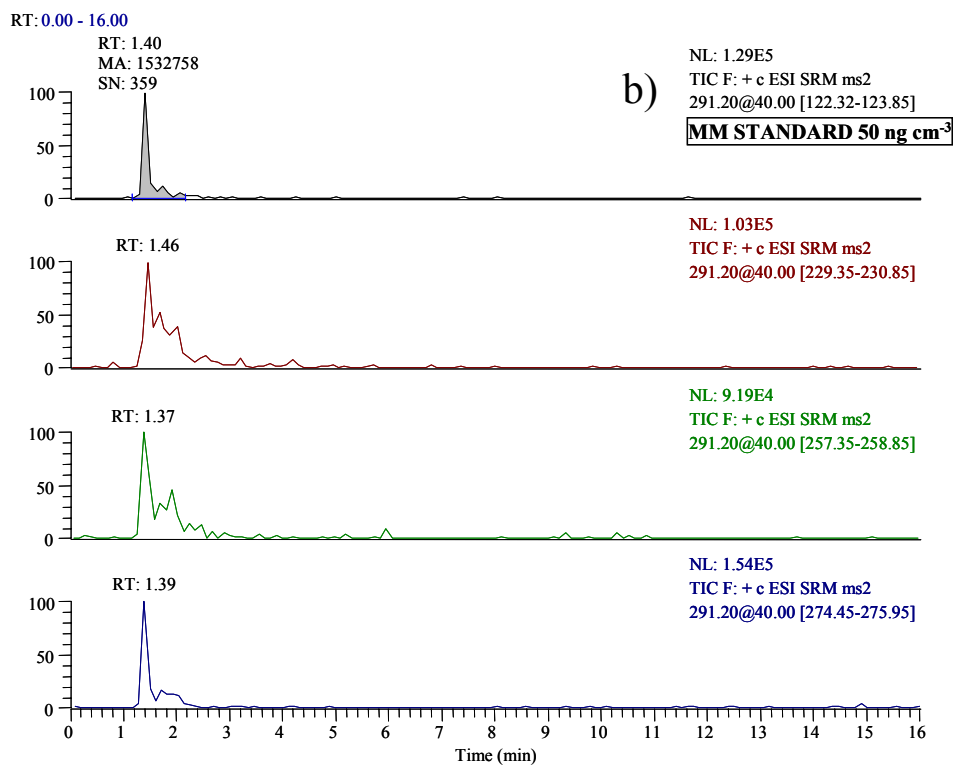
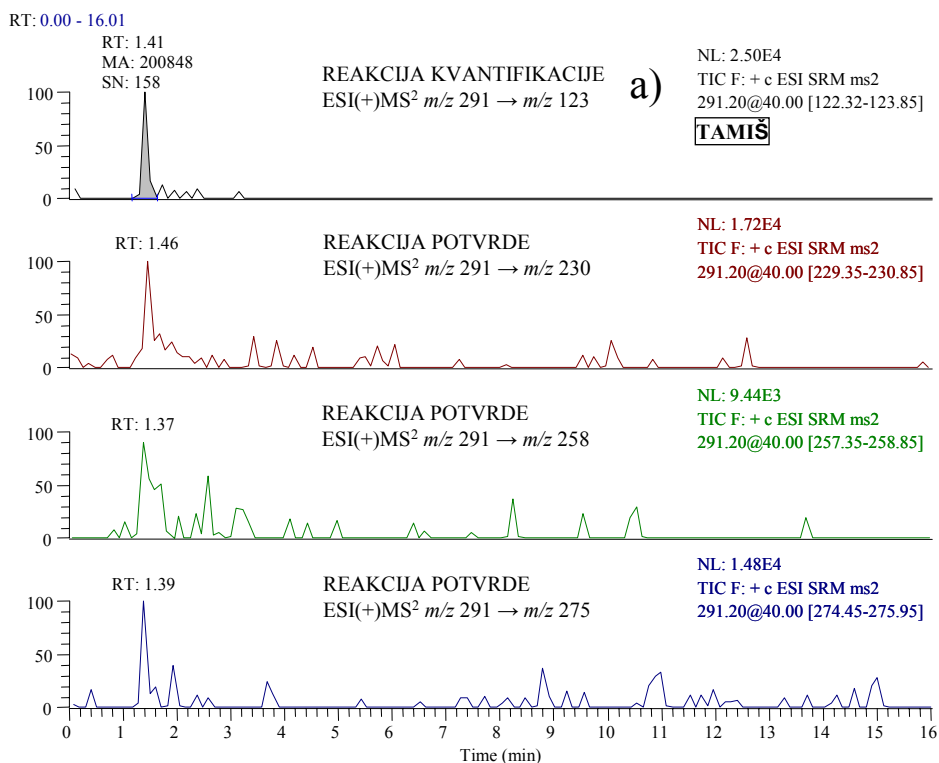
RT: 0.00 - 16.00

REAKCIJA KVANTIFIKACIJE
ESI(+)MS² m/z 749 → m/z 591REAKCIJA POTVRDE
ESI(+)MS³ m/z 749 → m/z 591 → m/z 434

RT: 0.00 - 15.97

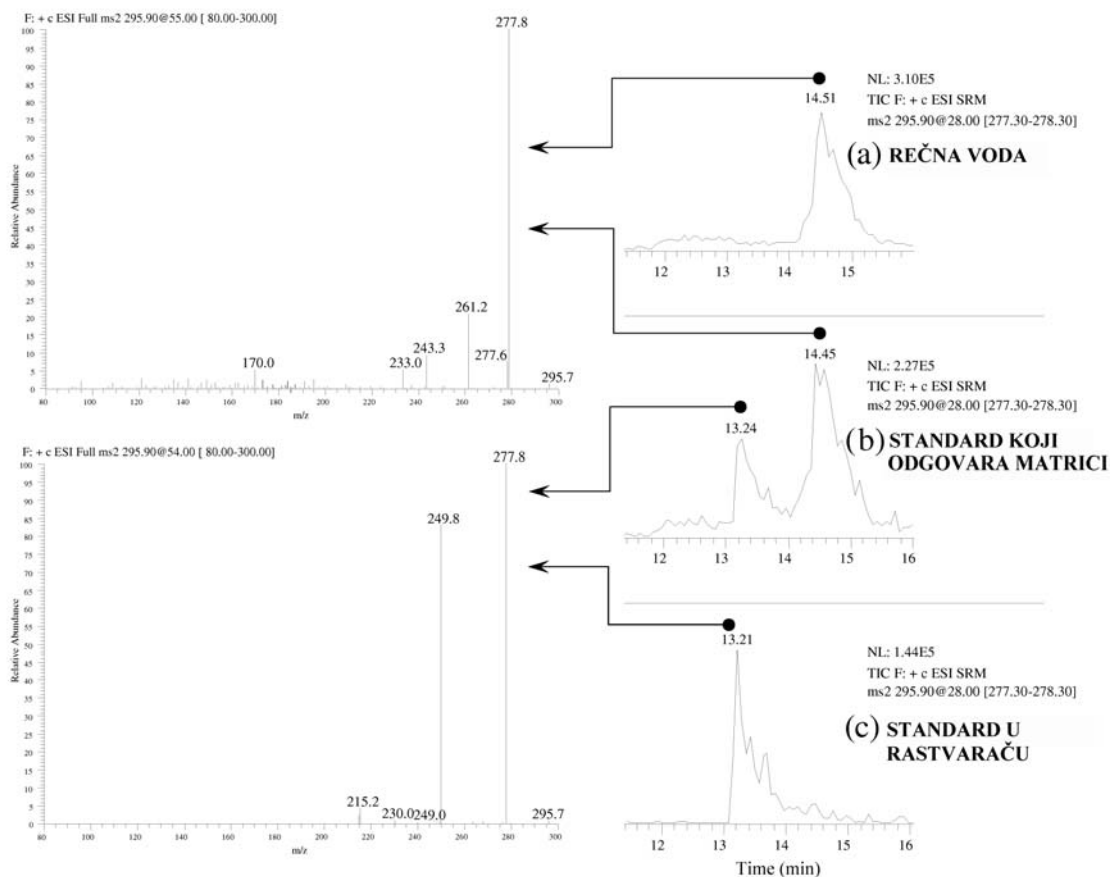


Slika 51. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva azitromicina:
a) uzorka GALOVICA; b) standarda koncentracije 250 ng cm⁻³.



Slika 52. Maseni hromatogrami sa potvrdom prisustva trimetoprima:
a) uzorka Tamiš; b) standarda koncentracije 50 ng cm⁻³.

Prilikom analize uzoraka voda uočeno je nekoliko lažnih pozitivnih rezultata, od kojih je najizraženiji bio lažni pozitivni rezultat za diklofenak u svakom analiziranom uzorku vode (slika 53). U cilju identifikacije ovog jedinjenja snimljen je MS² spektar fragmentacije nepoznatog jona. Masa nepoznatog jona je m/z 296 i javlja se na istoj m/z vrednosti kao i diklofenak. Kao što se može videti na slici 53a, fragmentacijom jona m/z 296 nastaje najintenzivniji jon m/z 278 (kao u slučaju diklofenaka), kao i manje zastupljeni joni m/z 261, 243, 233 i 170. Dodatni fragmentni joni diklofenaka (slika 53c) su m/z 250 i slabo zastupljeni m/z 215, 230 i 249. Maseni hromatogram standarda koji odgovara matrici uzorka (slika 53b) jasno pokazuje prisustvo dva jedinjenja sa istom reakcijom fragmentacije m/z 296 → m/z 278. Nepoznato jedinjenje se eluira sa hromatografske kolone oko 1,2 min. nakon diklofenaka, zbog čega nema sumnje da je maseni hromatogram prikazan na slici 53a lažni pozitivni rezultat. Činjenica da je promenom gradijenta mobilne faze moguće uticati na pomeranje retencionog vremena ovog jedinjenja i njegovo eluiranje zajedno sa diklofenakom, ukazuje na neophodnost potvrde pozitivnih rezultata.



Slika 53. Maseni hromatogrami za reakciju fragmentacije m/z 296 → m/z 278: a) uzorka rečne vode sa lažnim pozitivnim rezultatom; b) standarda diklofenaka u matrici; c) standarda diklofenaka u rastvaraču, sa MS² spektrima jona m/z 296.

5. ZAKLJUČNA RAZMATRANJA

Cilj ovog rada bio je razvoj i primena nove, brze i osetljive multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova odabranih antibiotika, sedativa i analgoantipiretika u vodi. U radu je razvijen postupak za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje veoma različitih analita, optimizovano je hromatografsko razdvajanje analita i uspostavljeni su protokoli za potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora. Posebna pažnja je posvećena izboru reakcija za pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova lekova i razvoju novih načina identifikacije i nedvosmislene potvrde prisustva analita. Razvijena metoda je primenjena na realne uzorke površinskih i podzemnih voda, pri čemu je dobijena prva studija o stanju zagađenosti vode lekovima koji spadaju među najčešće korišćene u našoj zemlji (Grujić *et al.* 2009).

Na osnovu rezultata dobijenih u ovom radu može se zaključiti sledeće:

- o optimalnim uslovima za ekstrakciju na čvrstoj fazi i predkoncentrisanje tragova devetnaest najčešće korišćenih lekova iz vode:
- Ⓜ Veoma različiti analiti, iz farmakoloških grupa antibiotika (β -laktami, cefalosporini, sulfonamidi, makrolidi i tetraciklini), benzodiazepina, antiepileptika i analgoantipiretika, najefikasnije se mogu ekstrahovati iz vode upotrebom OASIS[®] HLB SPE kertridža.
- Ⓜ Ekstrakciju odabranih lekova iz vode neophodno je izvesti na dve pH-vrednosti, u kiseloj sredini (pH = 3) i bez podešavanja pH (pH ~ 7,5). Za ekstrakciju azitromicina, doksiciklina i acetilsalicilne kiseline potrebna je jako kisela sredina, a treba je izbegavati pri ekstrakciji paracetamola, ampicilina, eritromicina i metamizola.
- Ⓜ Najpogodniji rastvarač za eluiranje odabranih lekova sa kolone je metanol. Za potpuno eluiranje većine odabranih lekova sa SPE kolone (OASIS[®] HLB, 200 mg/ 6 cm³) dovoljno je 7 cm³ metanola. Izuzetak su makrolidi – eritromicin i azitromicin, za čije je potpuno eluiranje potrebno 10 cm³, odnosno 15 cm³ metanola.
- Ⓜ Optimalna zapremina uzorka vode za analizu je 100 cm³, što značajno skraćuje vreme pripreme uzorka i daje faktor predkoncentrisanja 100.
- Ⓜ Za većinu ispitivanih analita dobijeni su visoki prinosi razvijene metode, uglavnom veći od 80%. Jedino se prinosi od 55% za amoksicilin i 52% za cefaleksin smatraju niskim.
- Ⓜ Granice detekcije razvijene metode su u opsegu 0,15–12,46 ng dm⁻³, dok su odgovarajuće granice kvantifikacije u opsegu 0,49–41,53 ng dm⁻³. Najnižu granicu detekcije i kvantifikacije imaju trimetoprim, karbamazepin i diklofenak, a najvišu doksiciklin, metamizol i flurbiprofen. S obzirom na to da su vrednosti granica detekcije i kvantifikacije reda veličine onih koje se očekuju u uzorcima prirodnih voda, razvijena i optimizovana metoda je primenljiva u analizi realnih uzoraka voda.
- Ⓜ Ponovljivost razvijene metode je dobra, sa vrednostima RSD uglavnom manjim od 20%. Metoda je linearna, sa koeficijentima korelacije od 0,98308 za paracetamol i diklofenak do 0,99939 za lorazepam, za lekove koji se detektuju kao pozitivni joni. Za detekciju negativnih jona, koeficijenti korelacije su niži, od 0,98282 za flurbiprofen do 0,99155 za acetilsalicilnu kiselinu.

- Ⓜ Za većinu odabranih lekova uticaj matrice nije izražen, pošto je smanjenje ili povećanje signala analita manje od 20%. Međutim, za cefaleksin i metamizol je uočeno značajno smanjenje signala do 35%, koje bi moglo dovesti do pogrešne kvantifikacije. Uticaj matrice se može uspešno eliminisati upotrebom standarda koji odgovaraju matrici.
- ▣ o maseno-spektrometrijskoj detekciji, identifikaciji, kvantifikaciji i nedvosmislenoj potvrdi prisustva tragova devetnaest najčešće korišćenih lekova:
 - Ⓜ Lekovi koji se analiziraju kao pozitivni joni, čija identifikacija i kvantifikacija se zasniva na izolovanju protonovanog molekula, kao prekursor jona za dalju MSⁿ analizu, su sledeći: trimetoprim, eritromicin, azitromicin, diazepam, bromazepam, karbamazepin i paracetamol. Farmaceutska jedinjenja koja se analiziraju kao negativni joni su: fenobarbiton, ibuprofen, metamizol, flurbiprofen i acetilsalicilna kiselina. Za ampicilin, amoksisicilin, cefaleksin, sulfametoksazol, doksiciklin, lorazepam i diklofenak, koji u procesu jonizacije stvaraju i pozitivne i negativne jone, intenzitet pozitivnih jona je značajno veći od intenziteta negativnih jona, zbog čega je dalje potrebno izvoditi MSⁿ analizu pozitivnih jona.
 - Ⓜ Za pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju tragova β-laktama – ampicilina, amoksisicilina i cefaleksina, može se koristiti protonovani adukt sa metanolom, kao prekursor jon za dalju MSⁿ analizu (Grujić *et al.* 2008).
 - Ⓜ Kvantifikacija odabranih analita može se uspešno izvesti na osnovu jednog SRM prelaza, tj. karakteristične reakcije fragmentacije prekursor jona u najintenzivniji i najstabilniji fragmentni jon.
 - Ⓜ Dodatne MSⁿ reakcije se mogu iskoristiti za potvrdu prisustva analita, tj. za potvrdu pozitivnih rezultata u realnim uzorcima, ponovnom analizom pozitivnih uzoraka uz proširenu metodu sa dodatnim SRM prelazima, u skladu sa sistemom koji je definisala Evropska Unija. Potvrda prisustva analita je veoma važna zbog eliminisanja lažnih pozitivnih rezultata, koji su posebno uočeni za diklofenak u svakom analiziranom uzorku vode. U slučaju paracetamola, flurbiprofena i acetilsalicilne kiseline, za koje nije moguće dobiti više od jednog fragmentnog jona u MS/MS analizi, niti stabilnu MS³ fragmentaciju, potvrda se može postići poređenjem retencionih vremena pozitivnih rezultata i analitičkih standarda u SRM hromatogramima, pri čemu odstupanje treba biti manje od 3%.
 - Ⓜ Pri kvantifikaciji tragova analita koji se analiziraju kao pozitivni joni neophodno je koristiti sirćetnu kiselinu kao aditiv mobilne faze, jer značajno povećava intenzitet protonovanih molekula analita, dok bi amonijum-acetat trebalo izbegavati.

6. ZAKLJUČAK

- Multirezidualna analitička metoda razvijena i optimizovana u ovom radu je brza, osetljiva, precizna i pouzdana za određivanje i potvrdu tragova odabranih lekova iz farmakoloških grupa antibiotika (β -laktama, cefalosporina, sulfonamida, makrolida i tetraciklina), benzodiazepina, antiepileptika i analgoantipiretika u vodi, koji spadaju među najčešće korišćene u našoj zemlji.
- Razvijen je postupak za efikasnu ekstrakciju i predkoncentrisanje veoma različitih analita iz vode. Odabrani lekovi se najefikasnije mogu ekstrahovati iz vode upotrebom OASIS[®] HLB SPE kolone. Optimalna zapremina uzorka vode za analizu je 100 cm³. Ekstrakciju je neophodno izvesti na dve pH-vrednosti, u kiseloj sredini (pH = 3) i bez podešavanja pH (pH ~ 7,5). Za potpuno eluiranje odabranih lekova sa kolone potrebno je 15 cm³ metanola.
- U radu je optimizovano hromatografsko razdvajanje analita i uspostavljeni su protokoli za potvrdu prisustva analita pomoću masenog detektora. Posebna pažnja je posvećena izboru reakcija za pouzdanu maseno-spektrometrijsku detekciju tragova lekova i razvoju novih načina identifikacije i nedvosmislene potvrde prisustva analita. Tako se za pouzdanu identifikaciju i kvantifikaciju tragova β -laktama može koristiti protonovani adukt sa metanolom, kao prekursor jon za dalju MSⁿ analizu.
- Primenom metode u analizi realnih uzoraka površinskih i podzemnih voda dobijena je prva studija o stanju zagađenosti vode lekovima u našoj zemlji. Od devetnaest traženih lekova, detektovani su tragovi četiri leka – trimetoprima, paracetamola, azitromicina i karbamazepina. Karbamazepin je detektovan u 80% analiziranih uzoraka voda, u opsegu koncentracija 6–130 ng dm⁻³. Antibiotik azitromicin je detektovan u 22% uzoraka (25–140 ng dm⁻³), dok su paracetamol (78–610 ng dm⁻³) i trimetoprim (24–174 ng dm⁻³) pronađeni u 15% uzoraka površinske i podzemne vode. U poređenju sa koncentracijama ovih lekova detektovanim u vodama evropskih zemalja, koncentracije u vodama u Srbiji su prilično visoke, što se može objasniti činjenicom da gradovi u kojima su uzorci vode uzeti nemaju postrojenja za prečišćavanje otpadnih voda.
- Od svih pronađenih lekova, prisustvo azitromicina predstavlja najveći problem, zbog mogućnosti pojave rezistentnosti bakterijskih sojeva na ovaj antibiotik. Posebno zabrinjava njegovo prisustvo u vodi iz reni bunara, a zatim i značajno veća koncentracija u vodi iz aeratora u kome se sakuplja voda iz velikog broja reni bunara. Ipak, u procesu prečišćavanja pijaće vode dolazi do njegovog potpunog uklanjanja, što je potvrđeno činjenicom da azitromicin nije detektovan u uzorku iz bazena čiste vode, niti u česmenkoj vodi. Zapravo, uzorak iz bazena čiste vode i uzorak česmenke vode nisu sadržali tragove nijednog od ispitivanih lekova.

LITERATURA

1. Ahmed F.E. (2001): Analyses of pesticides and their metabolites in foods and drinks, *Trends Anal. Chem.*, **11**, 649–661.
2. Ahrer W., Scherwenk E. and Buchberger W. (2001): Determination of drug residues in water by the combination of liquid chromatography or capillary electrophoresis with electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **910**, 69–78.
3. Al-Ghazali M.R., Jazrawi S.F. and Al-Doori Z.A. (1988): Antibiotic resistance among pollution indicator bacteria isolated from Al-Khair River, Baghdad, *Water Res.*, **22**, 641–644.
4. Alvero C.C. (1987): Antibiotic resistance of heterotrophic bacterial flora of two lakes, *System Appl. Microbiol.*, **9**, 169–172.
5. Andreozzi R., Raffaele M. and Nicklas P. (2003): Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, **50**, 1319–1330.
6. Ardrey R.E. (2003): *Liquid chromatography–mass spectrometry: an introduction*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, England.
7. Arthur C.L. and Pawliszyn J. (1990): Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers, *Anal. Chem.*, **62**, 2145–2148.
8. Ashton D., Hilton M. and Thomas K.V. (2004): Investigating the environmental transport of human pharmaceuticals to streams in the United Kingdom, *Sci. Total Environ.*, **333**, 167–184.
9. Balakrishnan V.K., Terry K.A., Toito J. (2006): Determination of sulfonamide antibiotics in wastewater: A comparison of solid phase microextraction and solid phase extraction methods, *J. Chromatogr. A*, **1131**, 1–10.
10. Barker S.A, Long A.R. and Short C.R. (1989): Isolation of drug residues from tissues by solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A*, **475**, 353–361.
11. Barker S.A. (2000): Matrix solid-phase dispersion, *J. Chromatogr. A*, **885**, 115–127.
12. Bartolucci G., Pieraccini G., Villanelli F., Moneti G. and Triolo A. (2000): Liquid chromatography tandem mass spectrometric quantitation of sulfamethazine and its metabolites: direct analysis of swine urine by triple quadrupole and by ion trap mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 967–973.
13. Batt A.L. and Aga D.S. (2005): Simultaneous analysis of multiple classes of antibiotics by ion trap LC/MS/MS for assessing surface water and groundwater contamination, *Anal. Chem.*, **77**, 2940–2947.
14. Batt A.L., Bruce I.B, Aga D.S. (2006): Evaluating the vulnerability of surface waters to antibiotic contamination from varying wastewater treatment plant discharges, *Environ. Pollut.*, **142**, 295–302.
15. Becker M., Zittlau E. and Petz M. (2004): Residue analysis of 15 penicillins and cephalosporins in bovine muscle, kidney and milk by liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **520**, 19–32.
16. Bendz D., Paxeus N.A., Ginn T.R. and Loge F.J. (2005): Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Høje River in Sweden. *J. Hazard. Mater.*, **122**, 195–204.
17. Blanchflower W.J., Hewitt S.A. and Kennedy D.G. (1994): Confirmatory assay for the simultaneous detection of five penicillins in muscle, kidney and milk using liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Analyst*, **199**, 2595–2601.

18. Blasco C., Font G. and Picó Y. (2002): Comparison of microextraction procedures to determine pesticides in oranges by liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **970**, 201–212.
19. Bogialli S., Capitolino V., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M. and Sergi M. (2004): Simple and rapid liquid chromatography-tandem mass spectrometry confirmatory assay for determining amoxicillin and ampicillin in bovine tissues and milk, *J. Agric. Food Chem.*, **52**, 3286–3291.
20. Borges V. and Henion J. (2005): Determination of pharmaceutical compounds in aqueous dimethyl sulfoxide by electrospray ionization mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **19**, 415–423.
21. Botitsi E., Frosyni C. and Tsiipi D. (2007): Determination of pharmaceuticals from different therapeutic classes in wastewaters by liquid chromatography–electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1317–1327.
22. Bruins A.P., Covey T.R. and Henion J.D. (1987): Ion spray interface for combined liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **59**, 2642–2646.
23. Bruno F., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M. and Samperi R. (2001a): Solid-phase extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry for trace determination of β -lactam antibiotics in bovine milk, *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 3463–3470.
24. Bruno F., Curini R., Di Corcia A., Nazzari M. and Samperi R. (2001b): Method development for measuring trace levels of penicillins in aqueous environmental samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **15**, 1391–1400.
25. Buchberger W.W. (2007): Novel analytical procedures for screening of drug residues in water, waste water, sediment and sludge, *Anal. Chim. Acta*, **593**, 129–139.
26. Buser H.R., Poiger T. and Müller M.D. (1998): Occurrence and fate of the pharmaceutical drug diclofenac in surface waters: rapid photodegradation in a lake, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 3449–3456.
27. Calamari D., Zuccato E., Castiglioni S., Bagnati R. and Fanelli R. (2003): Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1241–1248.
28. Campeau R.C., Gulli L.F. and Graves J.F. (1996): Drug resistance in Detroit River Gram-negative bacilli, *Microbios*, **88**, 205–212.
29. Carballa M., Omil F., Lema J.M., Llompart M., Garcia-Jares C., Rodriguez I., Gomez M. and Ternes T. (2004): Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and hormones in a sewage treatment plant, *Water Res.*, **38**, 2918–2926.
30. Cech N.B. and Enke C.G. (2001): Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 362–387.
31. Cha J.M., Yang S. and Carlson K.H. (2005): Rapid analysis of trace levels of antibiotic polyether ionophores in surface water by solid-phase extraction and liquid chromatography with ion trap tandem mass spectrometric detection, *J. Chromatogr. A*, **1065**, 187–198.
32. Cherlet M., Schelkens M., Croubels S. and De Baker P. (2003): Quantitative multi-residue analysis of tetracyclines and their 4-epimers in pig tissues by high-performance liquid chromatography combined with positive-ion electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, **492**, 199–213.
33. Chèze M., Villain M. and Pépin G. (2004): Determination of bromazepam, clonazepam and metabolites after a single intake in urine and hair by LC–MS/MS Application to forensic cases of drug facilitated crimes, *Forensic Sci. Int.*, **145**, 123–130.

34. Clara M., Strenn B. and Kreuzinger N. (2004): Carbamazepine as a possible anthropogenic marker in the aquatic environment: investigations on the behaviour of Carbamazepine in wastewater treatment and during groundwater infiltration, *Water Res.*, **38**, 947–954.
35. Commission Decision 2002/657/EC of 12 August 2002, implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results, *Official Journal of the European Communities*, **L221**, 8–36.
36. Comoretto L. and Chiron S. (2005): Comparing pharmaceutical and pesticide loads into a small Mediterranean river, *Sci. Total Environ.*, **349**, 201–210.
37. Conley J.M., Symes S.J., Kindelberger S.A. and Richards S.M. (2008): Rapid liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for the determination of a broad mixture of pharmaceuticals in surface water, *J. Chromatogr. A*, **1185**, 206–215.
38. Constantopoulos T.L., Jackson G.S. and Enke C.G. (1999): Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **10**, 625–634.
39. De Baere S. and De Backer P. (2007): Quantitative determination of amoxicillin in animal feed using liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection, *Anal. Chim. Acta* **586**, 319–325.
40. De Baere S., Cherlet M., Baert K. and De Backer P. (2002): Quantitative analysis of amoxicillin and its major metabolites in animal tissues by liquid chromatography combined with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **74**, 1393–1401.
41. Dean J.R. (1998): *Extraction methods for environmental analysis*, John Wiley & Sons Ltd., Chichester, West Sussex, England.
42. Di Corcia A. and Nazzari M. (2002): Review. Liquid chromatographic–mass spectrometric methods for analyzing antibiotic and antibacterial agents in animal food products, *J. Chromatogr. A*, **974**, 53–89.
43. Díaz-Cruz M.S. and Barceló D. (2005): LC–MS² trace analysis of antimicrobials in water, sediment and soil, *Trends Anal. Chem.*, **24**, 645–657.
44. Dorne J.L.C.M., Ragas A.M.J., Frampton G.K., Spurgeon D.S. and Lewis D.F. (2007): Trends in human risk assessment of pharmaceuticals, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1167–1172.
45. Fagerquist C.K. and Lightfield A.R. (2003): Confirmatory analysis of β -lactam antibiotics in kidney tissue by liquid chromatography/electrospray ionization selective reaction monitoring ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **17**, 660–671.
46. Fagerquist C.K., Lightfield A.R. and Lehotay S.J. (2005): Confirmatory and quantitative analysis of β -lactam antibiotics in bovine kidney tissue by dispersive solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **77**, 1473–1482.
47. Farré M., Ferrer I., Ginebreda A., Figueras M., Olivella L., Tirapu L., Vilanova M. and Barceló D. (2001): Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography–mass spectrometry: methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*, *J. Chromatogr. A*, **938**, 187–197.
48. Farré M., Petrovic M. and D. Barceló (2007): Recently developed GC/MS and LC/MS methods for determining NSAIDs in water samples, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1203–1214.

49. Faye T., Brunot A., Sablier M., Tabet J.C. and Fujii T. (2000): Sodium ion attachment reactions in an ion trap mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 1066–1073.
50. Fenn J.B. (1993): Ion formation from charged droplets: roles of geometry, energy, and time, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **4**, 524–535.
51. Fenn J.B., Mann M., Meng C.K., Wong S.F. and Whitehouse C.M (1989): Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules, *Science*, **246**, 64–71.
52. Ferrer I. and Thurman E.M. (2003): Liquid chromatography/time-of-flight/mass spectrometry (LC/TOF/MS) for the analysis of emerging contaminants, *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **22** (10), 750–756.
53. Fritz J.S. and Macka M. (2000): Solid-phase trapping of solutes for further chromatographic or electrophoretic analysis, *J. Chromatogr. A*, **902**, 137–166.
54. Gates P.J., Kearney G.C., Jones R., Leadlay P.F. and Staunton J. (1999): Structural elucidation studies of erythromycins by electrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 242–246.
55. Gentili A., Perret D. and Marchese S. (2005): Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for performing confirmatory analysis of veterinary drugs in animal-food products, *Trends Anal. Chem.*, **24**, 704–733.
56. Göbel A., McArdell C.S., Suter M.J. and Giger W. (2004): Trace determination of macrolide and sulfonamide antimicrobials, a human sulfonamide metabolite, and trimethoprim in wastewater using liquid chromatography coupled to electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **76**, 4756–4764.
57. Gómez M.J., Martínez Bueno M.J., Lacorte S., Fernández-Alba A.R. and Agüera A. (2007): Pilot survey monitoring pharmaceuticals and related compounds in a sewage treatment plant located on the Mediterranean coast, *Chemosphere*, **66**, 993–1002.
58. Gómez M.J., Petrović M., Fernández-Alba A.R. and Barceló D. (2006): Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters, *J. Chromatogr. A*, **1114**, 224–233.
59. González-Barreiro C., Lores M., Casais M.C. and Cela R. (2003): Simultaneous determination of neutral and acidic pharmaceuticals in wastewater by high-performance liquid chromatography–post-column photochemically induced fluorimetry, *J. Chromatogr. A*, **993**, 29–37.
60. Granelli K. and Branzell C. (2007): Rapid multi-residue screening of antibiotics in muscle and kidney by liquid chromatography-electrospray ionization–tandem mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta* **586**, 289–295.
61. Gros M., Petrović M. and Barceló D. (2006a): Multi-residue analytical methods using LC-tandem MS for the determination of pharmaceuticals in environmental and wastewater samples: a review, *Anal. Bioanal. Chem.*, **386**, 941–952.
62. Gros M., Petrović M. and Barceló D. (2006b): 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*, **70**, 678–690.
63. Grujic S., Vasiljevic T., Lausevic M. and Ast T. (2008): Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22**, 67–74.
64. Grujic S., Vasiljevic T. and Lausevic M. (2009): Determination of multiple pharmaceutical classes by liquid chromatography-ion trap-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1216**, 4989–5000.

65. Hager J.W. and Le Blanc Y.J.C. (2003): High-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry with a new quadrupole/linear ion trap instrument, *J. Chromatogr. A*, **1020**, 3–9.
66. Halling-Sørensen B., Nielsen S.N., Lanzky P.F., Ingerslev F., Lützhøft H.C.H. and Jørgensen S.E. (1998): Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment– a review, *Chemosphere*, **36**, 357–393.
67. Hamscher G., Sczesny S., Höper H. and Nau H. (2002): Determination of persistent tetracycline residues in soil fertilized with liquid manure by high-performance liquid chromatography with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **74**, 1509–1518.
68. Hao C., Lissemore L., Nguyen B., Kleywegt S., Yang P. and Solomon K. (2006): Determination of pharmaceuticals in environmental waters by liquid chromatography/electrospray ionization/tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, **384**, 505–513.
69. Hartig C., Storm T. and Jekel M. (1999): Detection and identification of sulphonamide drugs in municipal waste water by liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **854**, 163–173.
70. Heberer T. (2002): Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicol. Lett.*, **131**, 5–17.
71. Hernández F., Ibáñez M., Sancho J.V. and Pozo Ó.J. (2004): Comparison of different mass spectrometric techniques combined with liquid chromatography for confirmation of pesticides in environmental water based on the use of identification points, *Anal. Chem.*, **76**, 4349–4357.
72. Hernando M.D., Mezcuca M., Fernández-Alba A.R. and Barceló D. (2006): Environmental risk assessment of pharmaceutical residues in wastewater effluents, surface waters and sediments, *Talanta*, **69**, 334–342.
73. Hernando M.D., Petrovic M., Fernández-Alba A.R. and Barceló D. (2004): Analysis by liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry and acute toxicity evaluation for β -blockers and lipid-regulating agents in wastewater samples, *J. Chromatogr. A*, **1046**, 133–140.
74. Hignite C. and Azarnoff D.L. (1977): Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent, *Life Sci.*, **20**, 337–341.
75. Hilton M.J. and Thomas K.V. (2003): Determination of selected human pharmaceutical compounds in effluent and surface water samples by high-performance liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1015** (1-2), 129–141.
76. Hirsch R., Ternes T., Haberer K. and Kratz K-L. (1999): Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Sci. Total Environ.*, **225**, 109–118.
77. Hirsch R., Ternes T.A., Haberer K., Mehlich A., Ballwanz F. and Kratz K. (1998): Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **815**, 213–223.
78. Holstege D.M., Puschner B., Whitehead G. and Galey F.D. (2002): Screening and mass spectral confirmation of β -lactam antibiotic residues in milk using LC-MS/MS, *J. Agric. Food Chem.*, **50**, 406–411.

79. Horimoto S., Mayumi T., Aoe K. and Nishimura N. (2000): Identification of FC/TA-891 and its metabolite, FCE22101 by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry using bromoform, *Chromatographia*, **52**, 741–744.
80. Huang C.H., Renew J.E., Smeby K.L., Pinkerston K. and Sedlak D.L. (2001): Assessment of potential antibiotic contaminants in water and preliminary occurrence analysis, *Water Resour. Update*, **120**, 30–40.
81. Hummel D., Löffler D., Fink G. and Ternes T.A. (2006): Simultaneous determination of psychoactive drugs and their metabolites in aqueous matrices by liquid chromatography mass spectrometry, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 7321–7328.
82. Jeanville P.M., Estapé E.S. and Torres-Negrón de Jeanville I. (2003): The effect of liquid chromatography eluents and additives on the positive ion responses of cocaine, benzoylecgonine and ecgonine methyl ester using electrospray ionization, *Int. J. Mass Spectrom.*, **227**, 247–258.
83. Jobling S., Noylan M., Tyler C.R., Brighty G. and Sumpter J.P. (1998): Widespread sexual disruption in wild fish, *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 2498–2506.
84. Jones-Lepp T.L. (2006): Chemical markers of human waste contamination: analysis of urobilin and pharmaceuticals in source waters, *J. Environ. Monit.*, **8**, 472–478.
85. Jørgensen S.E. and Halling-Sørensen B. (2000): Drugs in the environment, *Chemosphere*, **40**, 691–699.
86. Kamel A.M., Brown P.R. and Munson B. (1999): Effects of mobile-phase additives, solution pH, ionization constant and analyte concentration on the sensitivities and electrospray ionization mass spectra of nucleoside antiviral agents, *Anal. Chem.*, **71**, 5481–5492.
87. Kamel A.M., Fouda H.G., Brown P.R. and Munson B. (2002): Mass spectral characterization of tetracyclines by electrospray ionization, H/D exchange, and multiple stage mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **13**, 543–557.
88. Kang J., Hick L.A. and Price W.E. (2007): Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **21**, 4065–4072.
89. Kataoka H. (2005): Recent advances in solid-phase microextraction and related techniques for pharmaceutical and biomedical analysis, *Curr. Pharm. Anal.*, **1**, 65–84.
90. Kim S. and Carlson K. (2005): LC–MS² for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices, *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **24** (7), 635–644.
91. Kim S.D., Cho J., Kim I.S., Vanderford B.J. and Snyder S.A. (2007): Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters, *Water Res.*, **41**, 1013–1021.
92. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., Miller-Stein C. and Olah T. (2000): Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 942–950.
93. Kolpin D.W., Furlong E.T., Meyer M.T., Thurman E.M., Zaugg S.D., Barber L.B. and Buxton H.T. (2002): Pharmaceuticals, hormones, and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999–2000: a national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 1202–1211.
94. Kumazawa T., Lee X., Sato K. and Suzuki O. (2003): Review. Solid-phase microextraction and liquid chromatography/mass spectrometry in drug analysis, *Anal. Chim. Acta*, **492** (1-2), 49–67.

95. Li L.Y.T., Campbell D.A., Bennet P.K. and Henion J. (1996): Acceptance criteria for ultratrace HPLC-tandem mass spectrometry: quantitative and qualitative determination of sulfonylurea herbicides in soil, *Anal. Chem.*, **68**, 3397–3404.
96. Lindberg R., Jarnheimer P., Olsen B., Johansson M. and Tysklind M. (2004): Determination of antibiotic substances in hospital sewage water using solid phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry and group analogue internal standards, *Chemosphere*, **57**, 1479–1488.
97. Lindsey M., Meyer M. and Thurman E.M. (2001): Analysis of trace levels of sulphonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **73**, 4640–4646.
98. Lissemore L., Hao C., Yang P., Sibley P.K., Mabury S. and Solomon K.R. (2006): An exposure assessment for selected pharmaceuticals within a watershed in Southern Ontario, *Chemosphere*, **64**, 717–729.
99. Lopez de Alda M.J., Díaz-Cruz S., Petrovic M. and Barceló D. (2003): Review. Liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment, *J. Chromatogr. A*, **1000** (1-2), 503–526.
100. Malik A. and Ahmad M. (1994): Incidence of drug and metal resistance in *E. coli* strains from sewage water and soil, *Chem. Environ. Res.*, **3**, 3–11.
101. Mathis J.A. and McCord B.R. (2005): Mobile phase influence on electrospray ionization for the analysis of smokeless powders by gradient reverse phase high-performance liquid chromatography-ESIMS, *Forensic Sci. Int.*, **154**, 159–166.
102. Matuszewski B.K., Constanzer M.L. and Chavez-Eng C.M. (1998): Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: a method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations, *Anal. Chem.*, **70**, 882–889.
103. McArdell C.S., Molnar E., Suter M.J. and Giger W. (2003): Occurrence and fate of macrolide antibiotics in wastewater treatment plants and in the Glatt Valley watershed, Switzerland, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 5479–5486.
104. Menelaou A., Somogyi A.A., Barclay M.L. and Bochner F.J. (1999): Simultaneous quantification of amoxicillin and metronidazole in plasma using high-performance liquid chromatography with photodiode array detection, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 261–266.
105. Metcalfe C.D., Koenig B.G., Bennie D.T., Servos M., Ternes T.A. and Hirsch R. (2003): Occurrence of neutral and acidic drugs in the effluents of Canadian sewage treatment plants, *Environ. Toxicol. Chem.*, **22**, 2872–2889.
106. Miao X. and Metcalfe C.D. (2003a): Determination of carbamazepine and its metabolites in aqueous samples using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **75**, 3731–3738.
107. Miao X. and Metcalfe C.D. (2003b): Determination of pharmaceuticals in aqueous samples using positive and negative voltage switching microbore liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.*, **38**, 27–34.
108. Miao X. and Metcalfe C.D. (2003c): Determination of cholesterol-lowering statin drugs in aqueous samples using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **998**, 133–141.

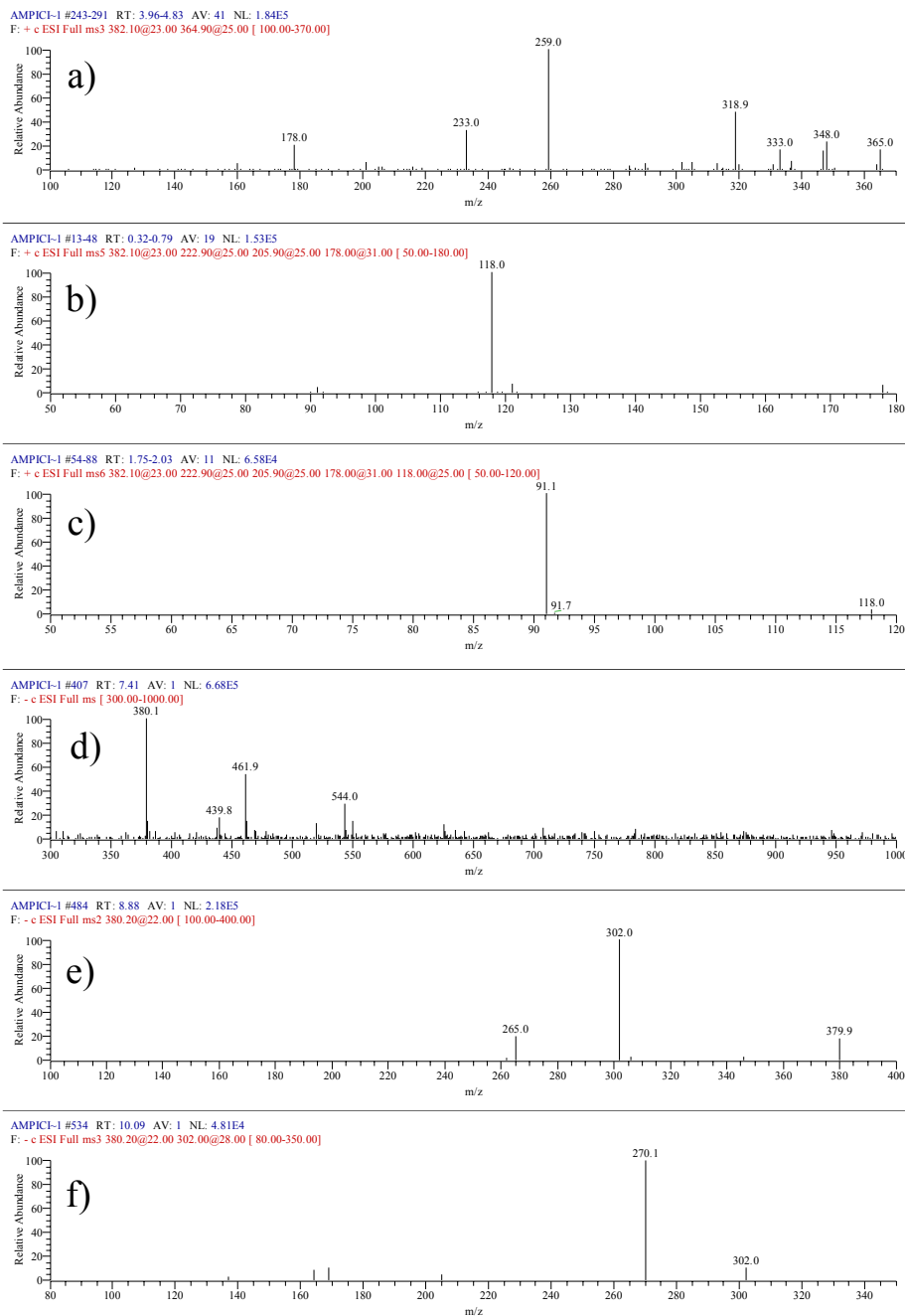
109. Miao X., Bishay F., Chen M. and Metcalfe C.D. (2004): Occurrence of antimicrobials in the final effluents of wastewater treatment plants in Canada, *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 3533–3541.
110. Miao X., Koenig B.G. and Metcalfe C.D. (2002): Analysis of acidic drugs in the effluents of sewage treatment plants using liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **952**, 139–147.
111. Niessen W.M.A. (1998): Review. Analysis of antibiotics by liquid chromatography–mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **812** (1-2), 53–75.
112. Niessen W.M.A. (2003): Review. Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. *J. Chromatogr. A*, **1000** (1-2), 413–436.
113. Nikolaou A., Meric S. and Fatta D. (2007): Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1225–1234.
114. Öllers S., Singer H.P., Fässler P. and Müller S.R. (2001): Simultaneous quantification of neutral and acidic pharmaceuticals and pesticides at the low-ng/l level in surface and waste water, *J. Chromatogr. A*, **911**, 225–234.
115. Pedersen J.A., Soliman M. and Suffet I.H. (2005): Human pharmaceuticals, hormones, and personal care product ingredients in runoff from agricultural fields irrigated with treated wastewater, *J. Agric. Food Chem.*, **53**, 1625–1632.
116. Pedrouzo M., Reverté S., Borrull F., Pocurull E. and Marcé R.M. (2007): Pharmaceutical determination in surface and wastewaters using high-performance liquid chromatography-(electrospray)-mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **30**, 297–303.
117. Petrović M., Gonzalez S. and Barceló D. (2003): Analysis and removal of emerging contaminants in wastewater and drinking water, *Trends Anal. Chem.*, **22**, 685–696.
118. Petrović M., Hernando M.D., Díaz-Cruz M.S. and Barceló D. (2005): Liquid chromatography–tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: a review, *J. Chromatogr. A*, **1067**, 1–14.
119. Pfeifer T., Tuerk J., Bester K. and Spiteller M. (2002): Determination of selected sulfonamide antibiotics and trimethoprim in manure by electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 663–669.
120. Pichon V., Cau Dit Coumes C., Chen L., Guenu S., Hennion M.C. (1996): Simple removal of humic and fulvic acid interferences using polymeric sorbents for the simultaneous solid-phase extraction of polar acidic, neutral and basic pesticides, *J. Chromatogr. A*, **737**, 25–33.
121. Picó Y., Blasco C. and Font G. (2004): Environmental and food applications of LC–tandem mass spectrometry in pesticide-residue analysis: an overview, *Mass Spectrom. Rev.*, **23**, 45–85.
122. Pozo O.J., Guerrero C., Sancho J.V., Ibáñez M., Pitarch E., Hogendoorn E., Hernández F. (2006): Efficient approach for the reliable quantification and confirmation of antibiotics in water using on-line solid-phase extraction liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1103**, 83–93.
123. Pryde A. and Gilbert M.T. (1979): *Application of high performance liquid chromatography*, Chapman & Hall Ltd., London-New York.
124. Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R. and Sumpter J.P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works, *Chem. Ecol.*, **8**, 275–285.
125. Quintana J.B. and Reemtsma T. (2004): Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 765–774.

126. Rabbolini S., Verardo E., Da Col M., Gioacchini A. and Traldi P. (1998): Negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry in the structural characterization of penicillins, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 1820–1826.
127. Radtke T.M. and Gist G.L. (1989): Wastewater sludge disposal- antibiotic resistant bacteria may pose health hazard, *J. Environ. Health*, **52**, 102–105.
128. Reemtsma T. (2001a): The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis – Part I: Achievements, *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **20** (9), 500–517.
129. Reemtsma T. (2001b): The use of liquid chromatography-atmospheric pressure ionization-mass spectrometry in water analysis – Part II: Obstacles, *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **20** (10), 533–542.
130. Reemtsma T. (2003): Review. Liquid chromatography–mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. *J. Chromatogr. A*, **1000**, 477–501.
131. Renew J.E. and Huang C.H. (2004): Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1042**, 113–121.
132. Richardson M.L. and Bowron J.M. (1985): The fate of pharmaceutical chemicals in the aquatic environment: A review, *J. Pharm. Pharmacol.*, **37**, 1–12.
133. Richardson S.D. (2002): Environmental mass spectrometry: emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.*, **74**, 2719–2742.
134. Riediker S. and Stadler R.H. (2001): Simultaneous determination of five β -lactam antibiotics in bovine milk using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **73**, 1614–1621.
135. Roberts P.H. and Thomas K.V. (2006): The occurrence of selected pharmaceuticals in wastewaters effluent and surface waters of lower Tyne catchment, *Sci. Total Environ.*, **356**, 143–153.
136. Robinson I., Junqua G., Van Coillie R. and Thomas O. (2007): Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1143–1151.
137. Rodríguez I., Carpinteiro J., Quintana J.B., Carro A.M., Lorenzo R.A. and Cela R. (2004): Solid-phase microextraction with on-fiber derivatization for the analysis of anti-inflammatory drugs in water samples, *J. Chromatogr. A*, **1024**, 1–8.
138. Sacher F., Lange F.T., Brauch H. and Blankenhorn I. (2001): Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Württemberg, Germany, *J. Chromatogr. A*, **938**, 199–210.
139. Santos J.L., Aparicio I., Alonso E. and Callejón M. (2005): Simultaneous determination of pharmaceutically active compounds in wastewater samples by solid phase extraction and high-performance liquid chromatography with diode array and fluorescence detectors, *Anal. Chim. Acta*, **550**, 116–122.
140. Smink B.E., Brandsma J.E., Dijkhuizen A., Lusthof K.J., de Gier J.J., Egberts A.C.G. and Uges D.R.A. (2004): Quantitative analysis of 33 benzodiazepines, metabolites and benzodiazepine-like substances in whole blood by liquid chromatography–(tandem) mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **811**, 13–20.
141. Smyth W.F., McClean S. and Ramachandran V.N. (2000): A study of the electrospray ionisation of pharmacologically significant 1,4-benzodiazepines and their subsequent fragmentation using an ion-trap mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 2061–2069.

142. Sørensen L.K. and Elbæk T.H. (2005): Determination of mycotoxins in bovine milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. B*, **820**, 183–196.
143. Sterner J.L., Johnston M.V., Nicol G.R. and Ridge D.P. (2000): Signal suppression in electrospray ionization Fourier transform mass spectrometry of multi-component samples, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 385–391.
144. Stolker A.A.M., Niesing W., Hogendoorn E.A., Versteegh J.F.M., Fuchs R. and Brinkman U.A.Th. (2004): Liquid chromatography with triple-quadrupole or quadrupole-time of flight mass spectrometry for screening and confirmation of residues of pharmaceuticals in water, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 955–963.
145. Storm T., Reemtsma T. and Jekel M. (1999): Use of volatile amines as ion-pairing agents for the high-performance liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of aromatic sulfonates in industrial wastewater, *J. Chromatogr. A*, **854**, 175–185.
146. Straub R.F. and Voyksner R.D. (1993): Determination of penicillin G, ampicillin, amoxicillin, cloxacillin and cephapirin by high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **647**, 167–181.
147. Stüber M. and Reemtsma T. (2004): Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 910–916.
148. Stumpf M., Ternes T.A., Wilken R.D., Rodrigues S.V. and Baumann W. (1999): Polar drug residues in sewage and natural waters in the state of Rio de Janeiro, Brazil, *Sci. Total. Environ.*, **225**, 135–141.
149. Tabak H.H. and Bunch R.L. (1970): Steroid hormones as water pollutants. I. Metabolism of natural and synthetic ovulation inhibiting hormones by microorganisms of activated sludge and primary settled sewage, *Dev. Ind. Microbiol.*, **11**, 367–376.
150. Ternes T., Bonerz M. and Schmidt T. (2001): Determination of neutral pharmaceuticals in wastewater and rivers by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **938**, 175–185.
151. Ternes T.A. (1998): Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers, *Wat. Res.*, **32** (11), 3245–3260.
152. Ternes T.A. (2001): Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *TrAC Trend. Anal. Chem.*, **20** (8), 419–433.
153. Ternes T.A., Meisenheimer M., McDowell D., Sacher F., Brauch H.J., Haist-Gulde B., Preuss G., Wilme U. and Zulei-Seibert, N. (2002a): Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment, *Environ. Sci. Technol.*, **36**, 3855–3863.
154. Ternes T.A., Andersen H., Gilberg D. and Bonerz M. (2002b): Determination of estrogens in sludge and sediments by liquid extraction and GC/MS/MS, *Anal. Chem.*, **74**, 3498–3504.
155. Tixier C., Singer H.P., Ollers S. and Muller S.R. (2003): Occurrence and fate of carbamazepine, clofibric acid, diclofenac, ibuprofen, ketoprofen, and naproxen in surface waters, *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 1061–1068.
156. Vartanian V.H., Goolsby B. and Brodbelt J.S. (1998): Identification of tetracycline antibiotics by electrospray ionization in a quadrupole ion trap, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **9**, 1089–1098.
157. Vieno N.M., Tuhkanen T. and Kronberg L. (2006): Analysis of neutral and basic pharmaceuticals in sewage treatment plants and in recipient rivers using solid phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry detection, *J. Chromatogr. A*, **1134**, 101–111.

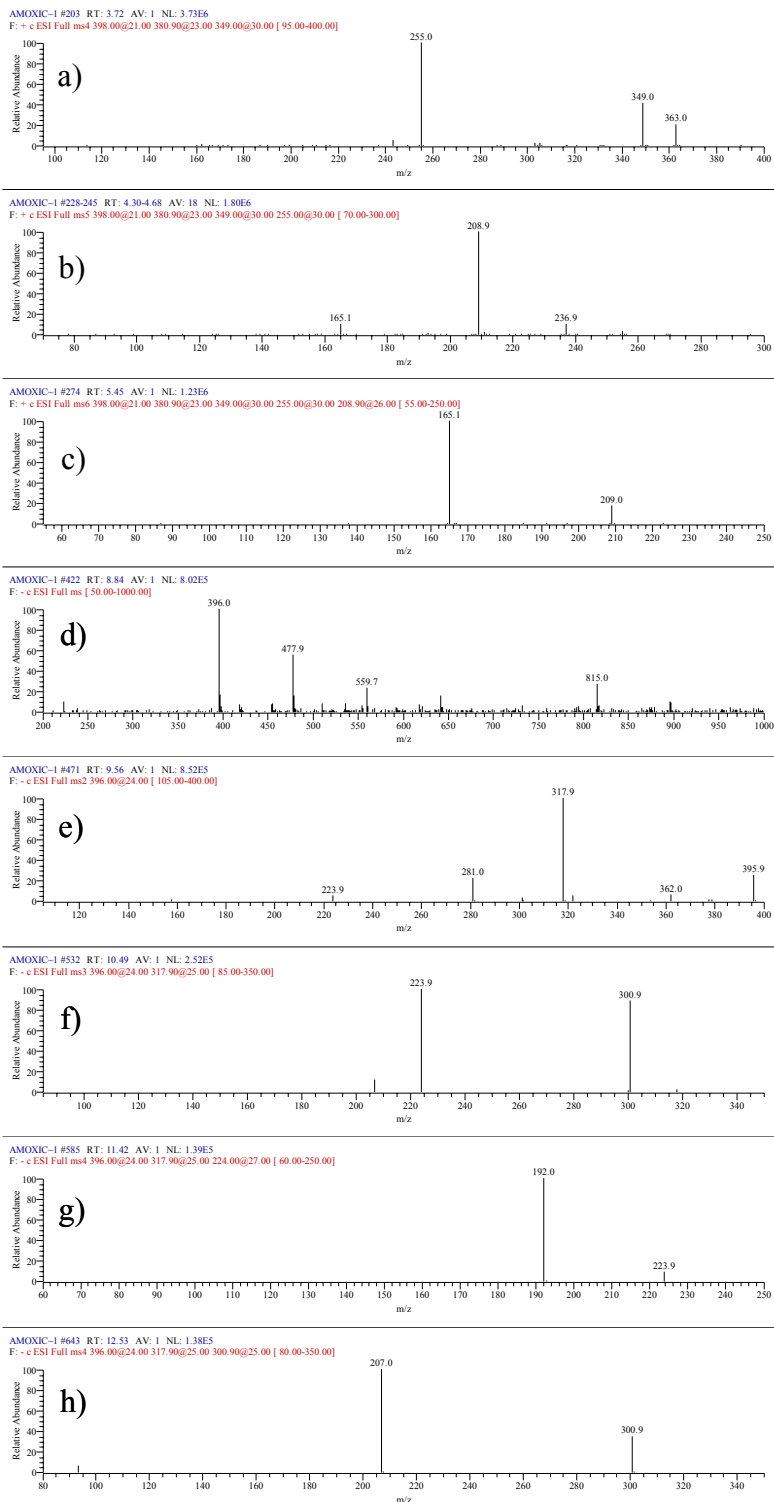
158. Voyksner R.D. and Pack T. (1991): Investigation of collisional-activation decomposition process and spectra in the transport regions of an electrospray single-quadropole mass spectrometer, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **5**, 263–268.
159. Weigel S., Aulinger A., Brockmeyer R., Harms H., Löffler J., Reincke H., Schmidt R., Stachel B., von Tümpling W. and Wanke A. (2004): Pharmaceuticals in the river Elbe and its tributaries, *Chemosphere*, **57**, 107–126.
160. Wieboldt R., Campbell D.A. and Henion J. (1998): Quantitative liquid chromatographic–tandem mass spectrometric determination of orlistat in plasma with a quadropole ion trap, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **708**, 121–129.
161. Yang S. and Carlson K.H. (2004): Solid-phase extraction–high-performance liquid chromatography–ion trap mass spectrometry for analysis of trace concentrations of macrolide antibiotics in natural and waste water matrices, *J. Chromatogr. A*, **1038**, 141–155.
162. Yang S., Cha J. and Carlson K. (2004): Quantitative determination of trace concentrations of tetracycline and sulfonamide antibiotics in surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2131–2145.
163. Yang S., Cha J. and Carlson K. (2005): Simultaneous extraction and analysis of 11 tetracycline and sulfonamide antibiotics in influent and effluent domestic wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1097**, 40–53.
164. Zhang Z., Yang M.J. and Pawliszyn J. (1994): Solid-phase microextraction. A solvent-free alternative for sample preparation, *Anal. Chem.*, **66**, 844A–853A.
165. Zhang Z.L. and Zhou J.L. (2007): Simultaneous determination of various pharmaceutical compounds in water by solid-phase extraction–liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1154**, 205–213.
166. Zhao J.J., Yang A.Y. and Rogers D. J. (2002): Effects of liquid chromatography mobile phase buffer contents on the ionization and fragmentation of analytes in liquid chromatographic/ion spray tandem mass spectrometric determination, *J. Mass Spectrom.*, **37**, 421–433.
167. Zhu J. and Cole R.B. (2000): Formation and decompositions of chloride adduct ions, $[M+Cl]^-$, in negative ion electrospray ionization mass spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **11**, 932–941.
168. Zhu J., Snow D.D., Cassada D.A., Monson S.J. and Spalding R.F. (2001): Analysis of oxytetracycline, tetracycline and chlortetracycline in water using solid-phase extraction and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **928**, 177–186.
169. Zuehlke S., Duennbier U. and Heberer T. (2004): Determination of polar drug residues in sewage and surface water applying liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.*, **76**, 6548–6554.
170. Zwiener C. (2007): Occurrence and analysis of pharmaceuticals and their transformation products in drinking water treatment, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 1159–1162.
171. Zwiener C. and Frimmel F.H. (2004): LC-MS analysis in the aquatic environment and in water treatment—a critical review. Part II: Applications for emerging contaminants and related pollutants, microorganisms and humic acids, *Anal. Bioanal. Chem.*, **378**, 862–874.

PRILOG



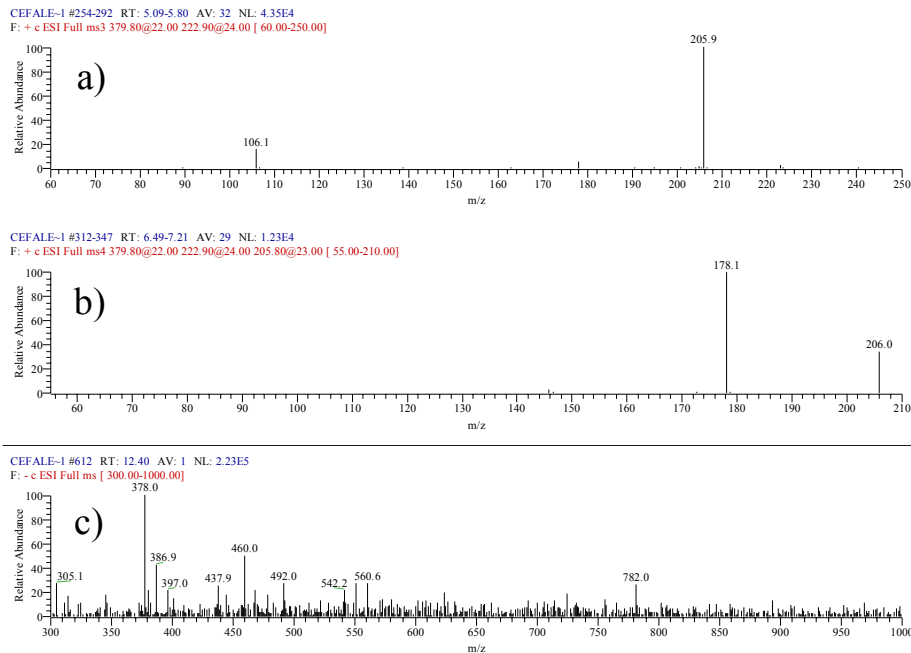
Slika 54. MS^n maseni spektri ampicilina:

a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+CH_3OH+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^5 $[M+CH_3OH+H]^+$;
c) $ESI(+)$ MS^6 $[M+CH_3OH+H]^+$; d) $ESI(-)$ MS ; e) $ESI(-)$ MS^2 $[M+CH_3OH-H]^-$;
f) $ESI(-)$ MS^3 $[M+CH_3OH-H]^-$.



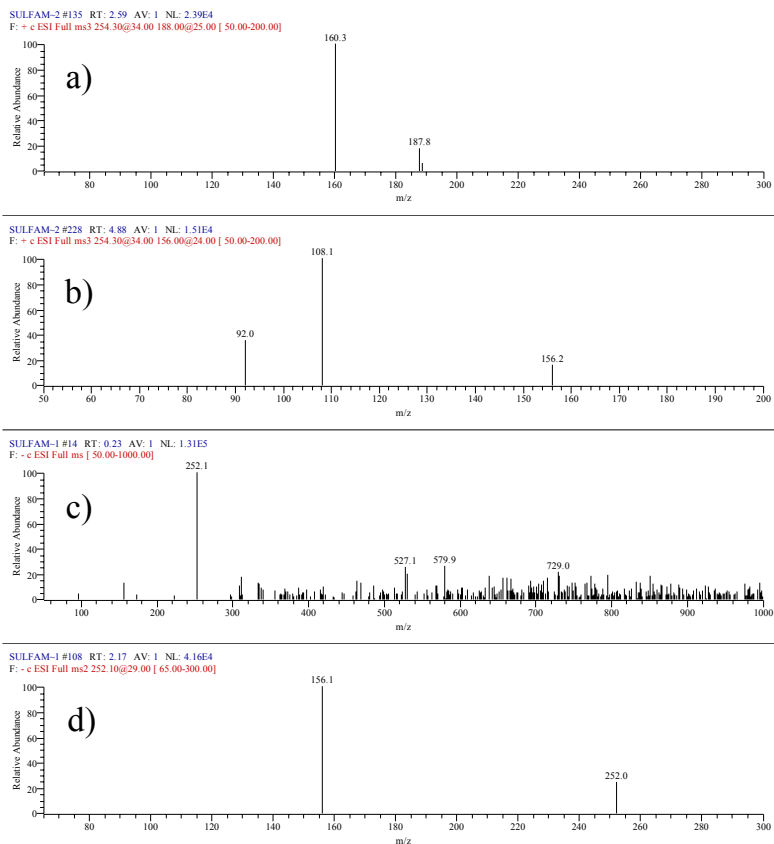
Slika 55. MS^n maseni spektri amoksicilina:

- a) $ESI(+)$ $MS^4 [M+CH_3OH+H]^+$; b) $ESI(+)$ $MS^5 [M+CH_3OH+H]^+$;
 c) $ESI(+)$ $MS^6 [M+CH_3OH+H]^+$; d) $ESI(-)$ MS ; e) $ESI(-)$ $MS^2 [M+CH_3OH-H]^-$;
 f) $ESI(-)$ $MS^3 [M+CH_3OH-H]^-$; g) $ESI(-)$ $MS^4 [M+CH_3OH-H]^-$;
 h) $ESI(-)$ $MS^4 [M+CH_3OH-H]^-$.



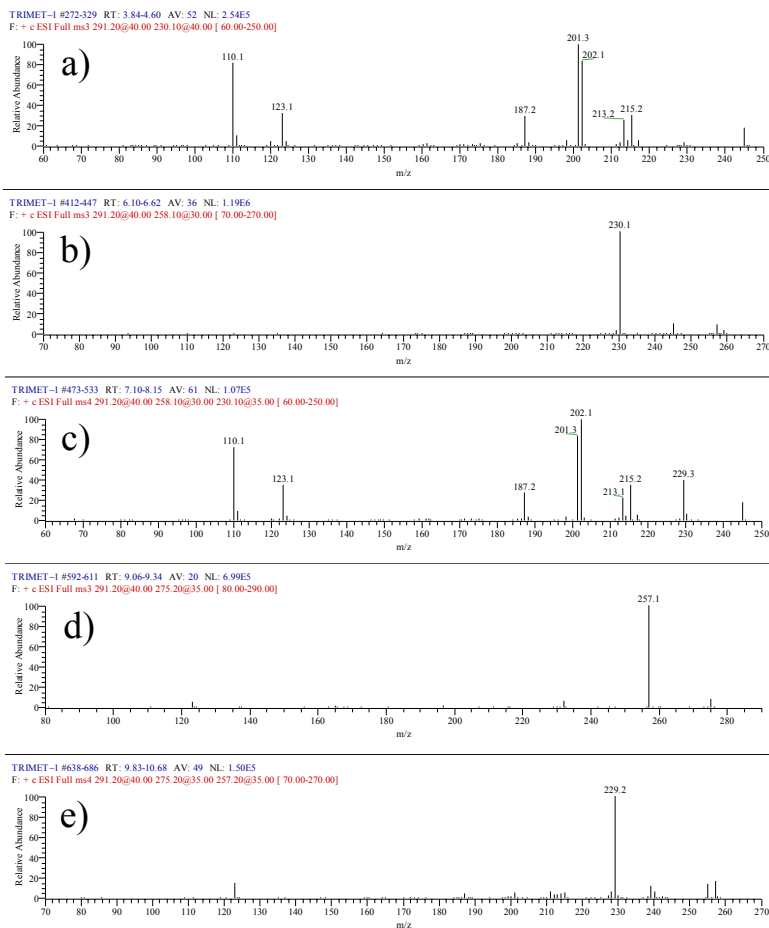
Slika 56. MS^1 maseni spektri cefaleksina:

a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+CH_3OH+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^4 $[M+CH_3OH+H]^+$; c) $ESI(-)$ MS .



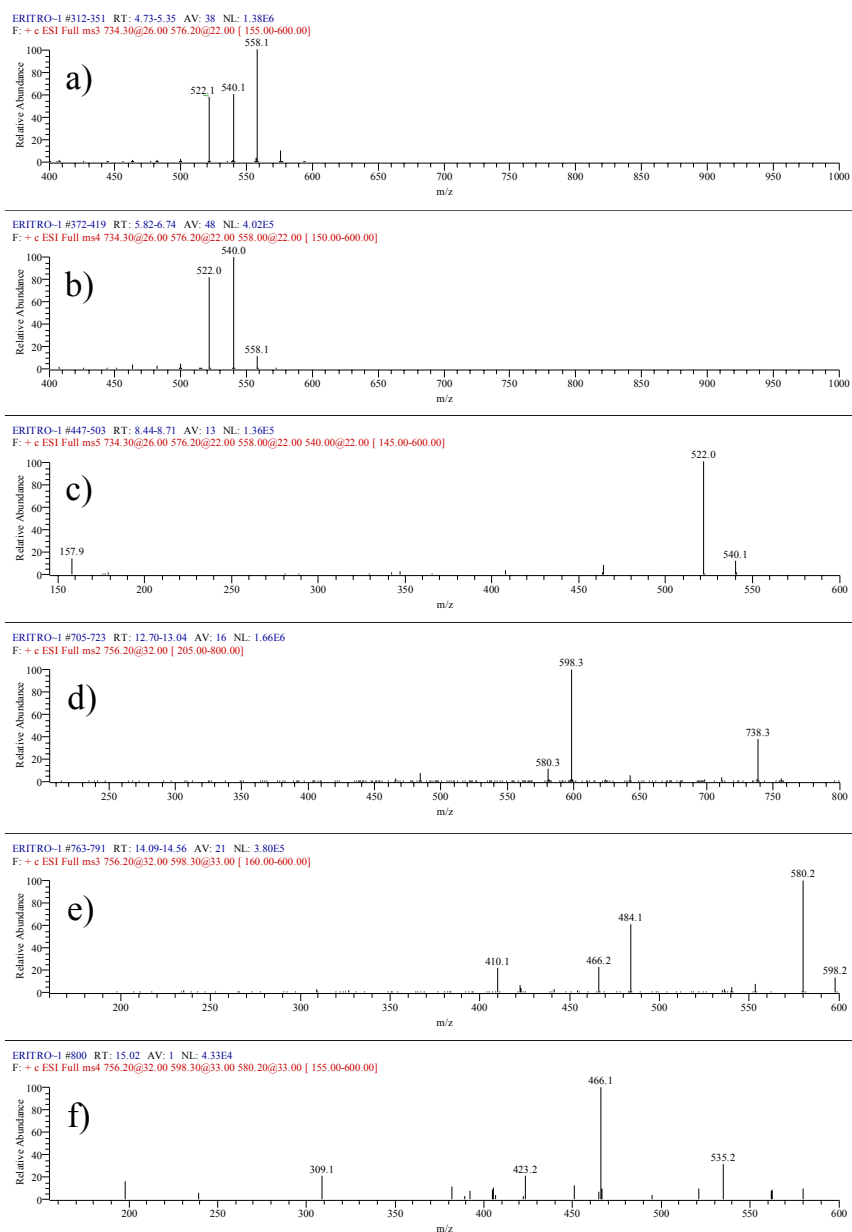
Slika 57. MS^1 maseni spektri sulfametoksazola:

a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; c) $ESI(-)$ MS ; d) $ESI(-)$ MS^2 $[M-H]^-$.



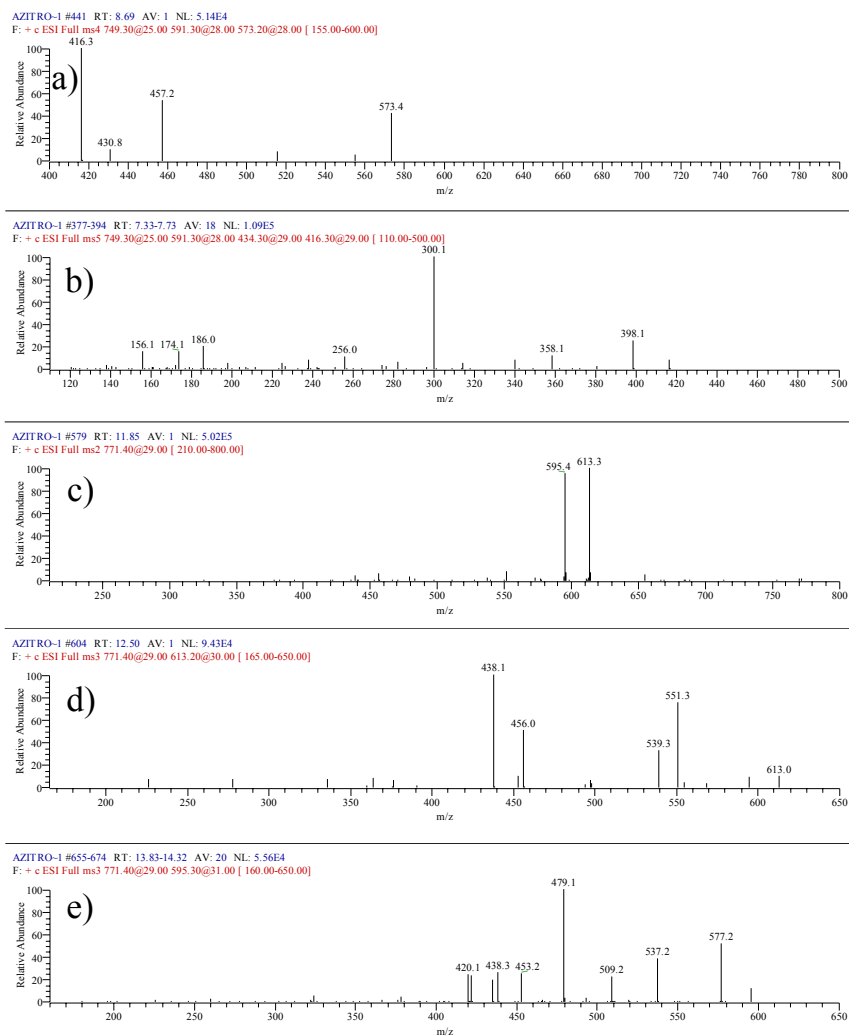
Slika 58. MS^n maseni spektri trimetoprima:

a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; c) $ESI(+)$ MS^4 $[M+H]^+$;
d) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; e) $ESI(+)$ MS^4 $[M+H]^+$.



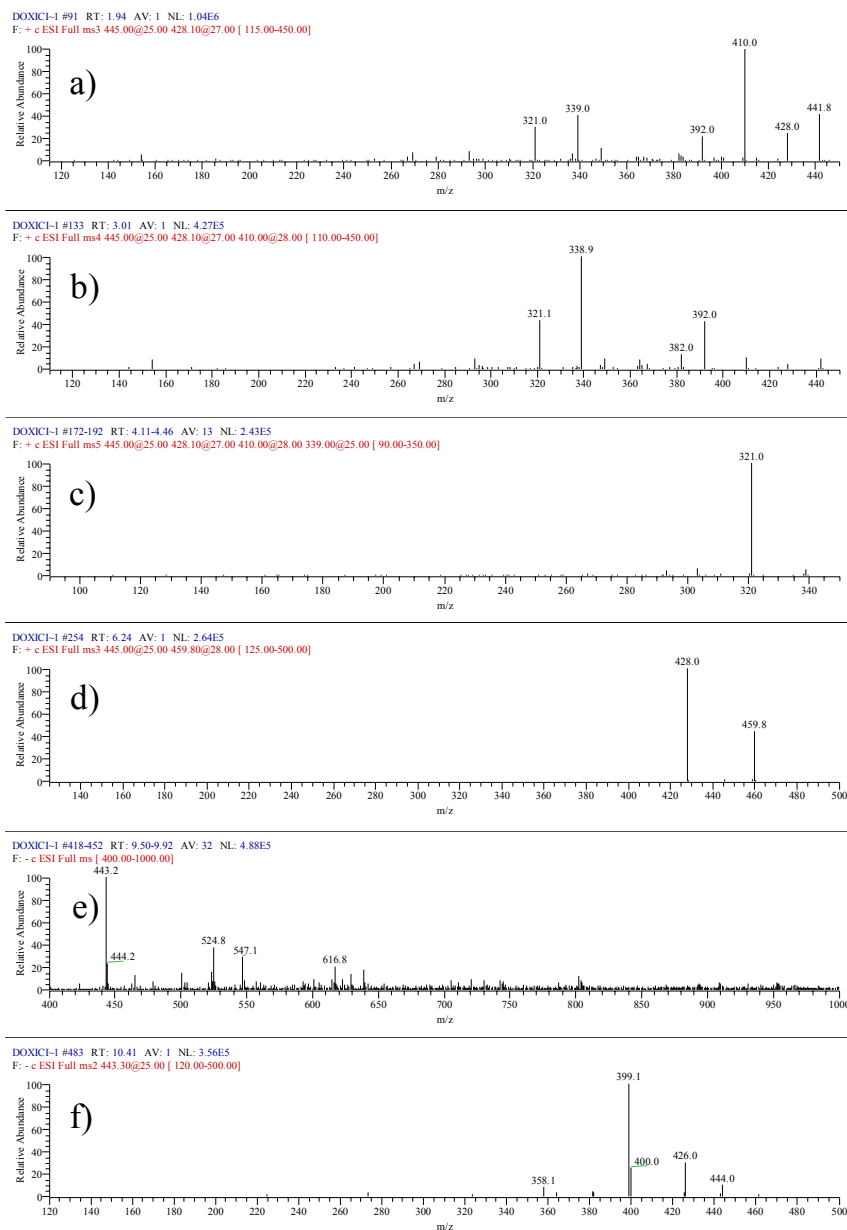
Slika 59. MS^n maseni spektri eritromicina:

a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^4 $[M+H]^+$; c) $ESI(+)$ MS^5 $[M+H]^+$;
d) $ESI(+)$ MS^2 $[M+Na]^+$; e) $ESI(+)$ MS^3 $[M+Na]^+$; f) $ESI(+)$ MS^4 $[M+Na]^+$.



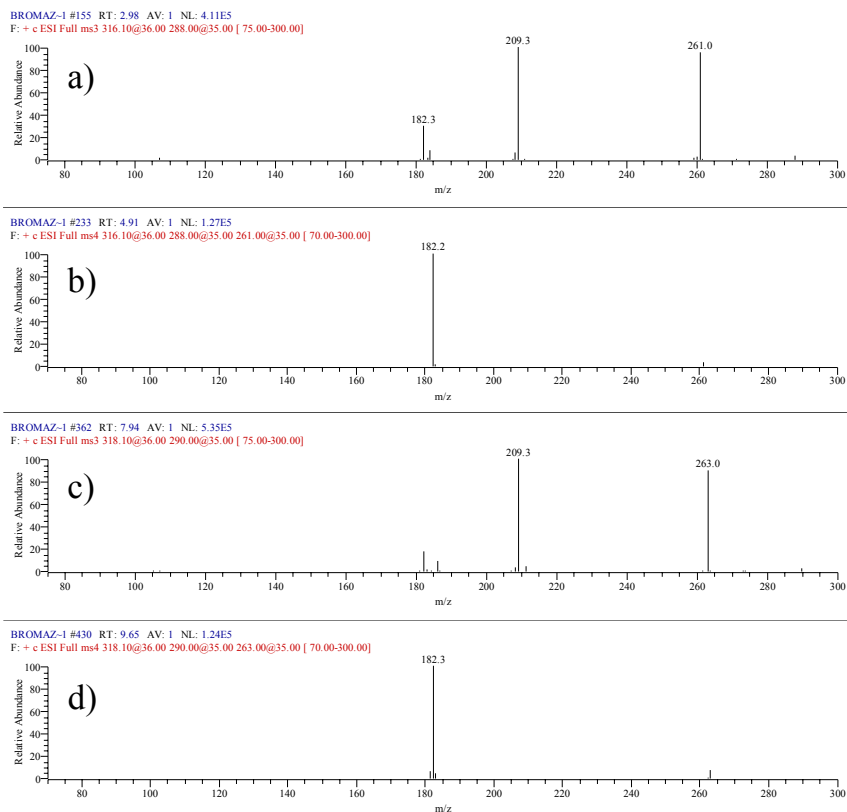
Slika 60. MS^{n1} maseni spektri azitromicina:

a) $ESI(+)$ $MS^1 [M+H]^+$; b) $ESI(+)$ $MS^5 [M+H]^+$; c) $ESI(+)$ $MS^2 [M+Na]^+$;
 d) $ESI(+)$ $MS^3 [M+Na]^+$; e) $ESI(+)$ $MS^3 [M+Na]^+$.



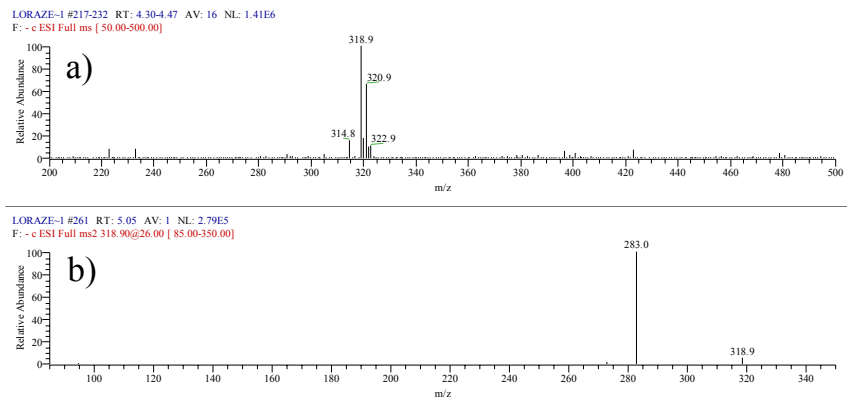
Slika 61. MS^n maseni spektri doksiciklina:

a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^4 $[M+H]^+$; c) $ESI(+)$ MS^5 $[M+H]^+$;
d) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; e) $ESI(-)$ MS ; f) $ESI(-)$ MS^2 $[M-H]^-$.

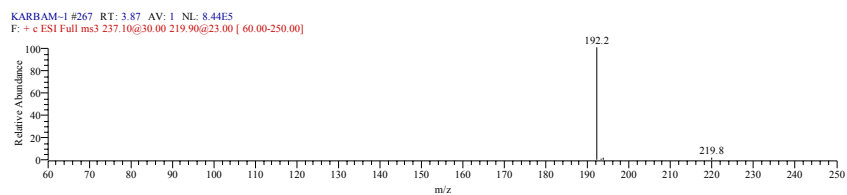


Slika 62. MS^n maseni spektri bromazepama:

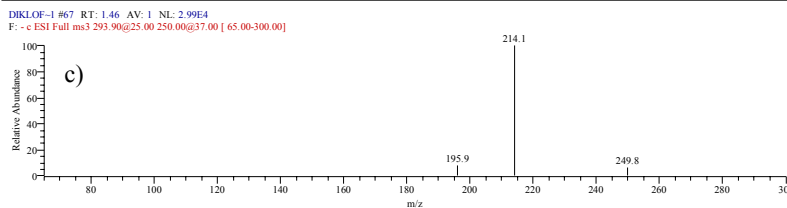
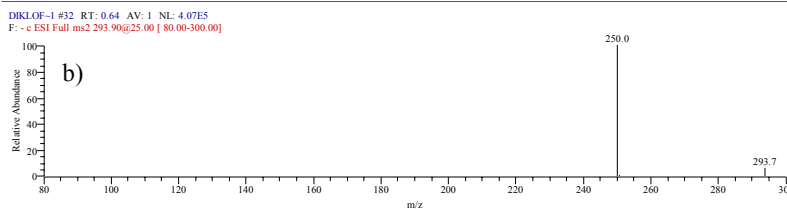
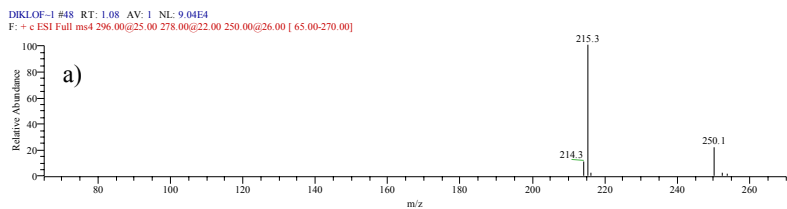
a) $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$; b) $ESI(+)$ MS^4 $[M+H]^+$;
c) $ESI(+)$ MS^3 [izotop+ H] $^+$; d) $ESI(+)$ MS^4 [izotop+ H] $^+$.



Slika 63. MS^n maseni spektri lorazepama: a) $ESI(-)$ MS ; b) $ESI(-)$ MS^2 $[M-H]^-$.

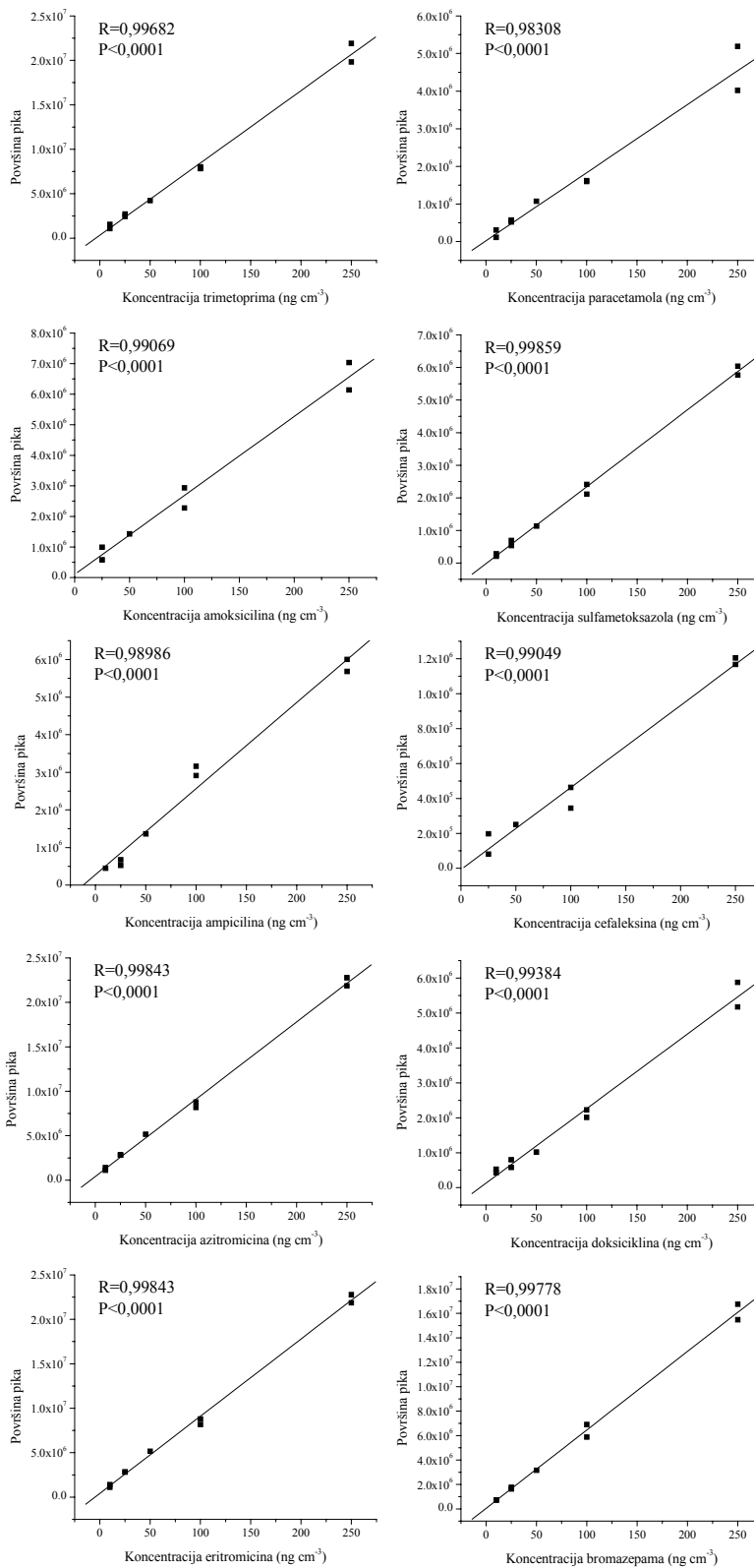


Slika 64. $ESI(+)$ MS^3 $[M+H]^+$ maseni spektar karbamazepina.

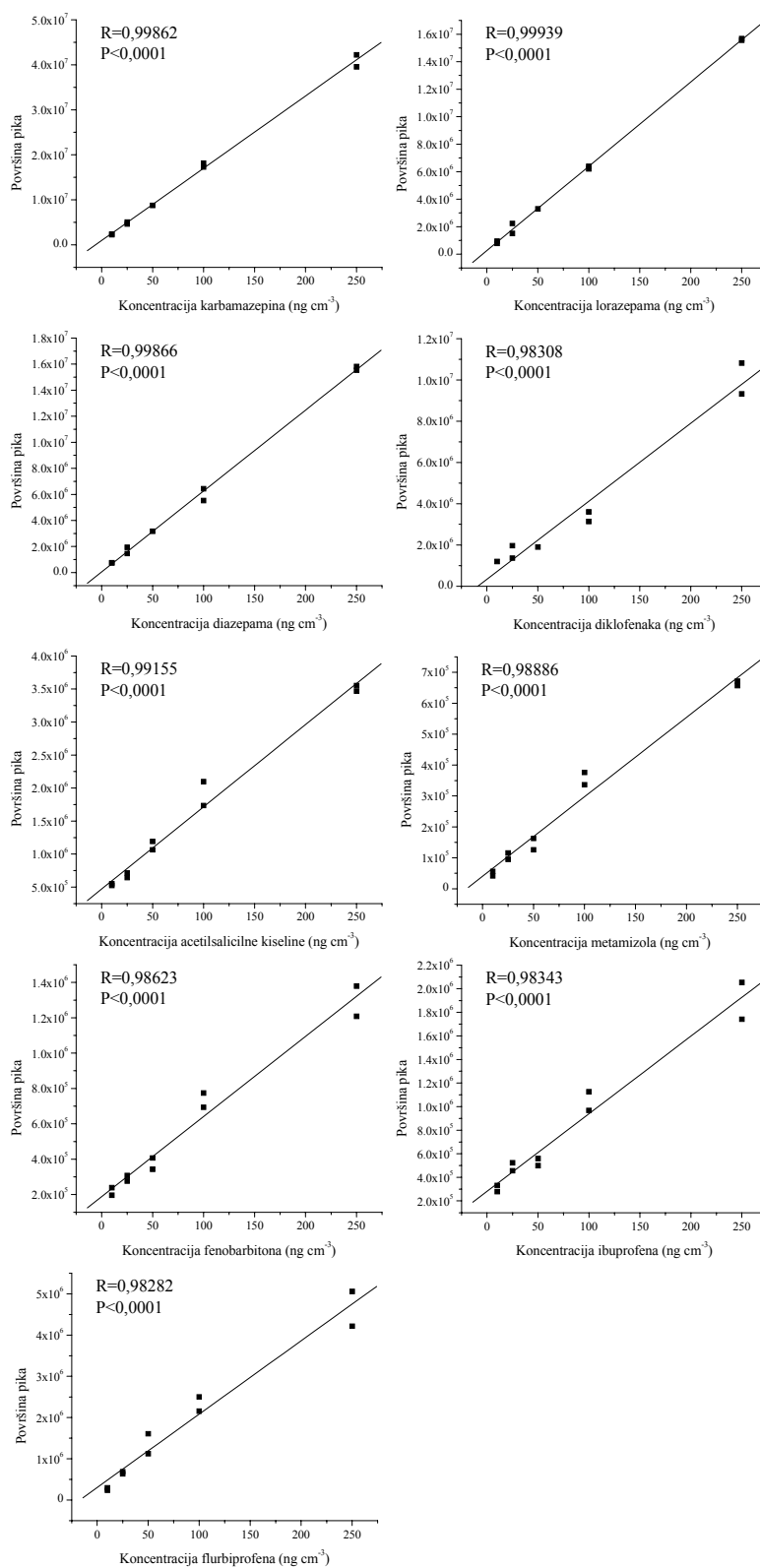


Slika 65. MS^n maseni spektri diklofenaka:

a) $ESI(+)$ MS^4 $[M+H]^+$; b) $ESI(-)$ MS^2 $[M-H]^-$; c) $ESI(-)$ MS^3 $[M-H]^-$.



Slika 66. Provera linearnosti razvijene metode.



Slika 66. (nastavak)

OBJAVLJENI NAUČNI RADOVI IZ DOKTORSKE DISERTACIJE

1. S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, T. Ast, Study on the formation of an amoxicillin adduct with methanol using electrospray ion trap tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **22** (2008) 67–74.
2. S. Grujić, T. Vasiljević, M. Laušević, Determination of multiple pharmaceutical classes in surface and ground waters by liquid chromatography–ion trap–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, **1216** (2009) 4989–5000.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Грујић Светлана

број индекса _____

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

ОДРЕЂИВАЊЕ ТРАГОВА ЛЕКОВА У ВОДИ МЕТОДОМ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ СА ТАНДЕМ МАСЕНОМ СПЕКТРОМЕТРИЈОМ

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 07.02.2014.

Грујић Светлана

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора _____ Светлана Грујић _____

Број индекса _____

Студијски програм _____

Наслов рада _____ Одређивање трагова лекова у води методом течне
хроматографије са тандем масеном спектрометријом _____

Ментор _____ Мила Лаушевић _____

Потписани/а _____ Светлана Грујић _____

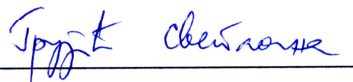
Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 07.02.2014.



Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

ОДРЕЂИВАЊЕ ТРАГОВА ЛЕКОВА У ВОДИ МЕТОДОМ ТЕЧНЕ ХРОМАТОГРАФИЈЕ СА ТАНДЕМ МАСЕНОМ СПЕКТРОМЕТРИЈОМ

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, 07.02.2014.

