



Sveučilište u Zagrebu
PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET

Klaudija Ivanković Koprivić

**MULTIREZIDUALNA ANALIZA,
BIOAKUMULACIJSKI POTENCIJAL I
RASPROSTRANJENOST FARMACEUTSKIH
SPOJEVA U SLATKOVODNIM RIBAMA**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Senka Terzić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb
FACULTY OF SCIENCE

Klaudija Ivanković Koprivić

**MULTIRESIDUE ANALYSIS,
BIOACCUMULATION POTENTIAL AND
OCCURRENCE OF PHARMACEUTICALS
IN FRESHWATER FISH**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
Dr. Senka Terzić

Zagreb, 2026

Ovaj doktorski rad izrađen je u Laboratoriju za analitiku i biogeokemiju organskih spojeva, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Institut Ruđer Bošković, pod vodstvom dr. sc. Senke Terzić, u okviru realizacije projekta PHARMA-RISK (IP-2019-04-9519) i Projekta razvoja karijera mladih istraživača – izobrazba novih doktora znanosti (DOK-2020-01-9250), financiranih putem Hrvatske zaklade za znanost.

Zahvala

Zahvaljujem mentorici dr. sc. Senki Terzić na predloženoj temi, stručnom vodstvu i pomoći pri planiranju i realizaciji ovog istraživanja, interpretaciji rezultata te sugestijama i pomoći prilikom pisanja ove doktorske disertacije. Hvala na uloženom vremenu i trudu.

Zahvaljujem dr. sc. Marijanu Ahelu na sugestijama pri planiranju i realizaciji istraživanja, pomoći u interpretaciji rezultata i pisanju ovog rada, kao i prijenosu znanja te podršci.

Posebno zahvaljujem dr. sc. Tvrtku Smitalu, dr. sc. Ivanu Mihaljeviću i dr. sc. Jeleni Dragojević na suradnji, savjetima i pomoći pri organizaciji i izvođenju modelnih pokusa sa zebricama.

Veliko hvala dr. sc. Damiru Kapetanoviću i Božidaru Kurtoviću na pomoći u prikupljanju, identifikaciji i sekciji divljih riba prikupljenih na terenskim istraživanjima.

Veliko hvala i Nenadu Muhinu na sveprisutnoj pomoći, a naročito u postavljanju modelnih pokusa i prikupljanju terenskih uzoraka. Hvala Karlu Jambrošiću na pomoći u prikupljanju i obradi terenskih uzoraka te nesebičnoj pomoći oko statističke obrade rezultata.

Hvala dr. sc. Ivoni Krizman-Matasić na pomoći pri prijenosu metode na novi LC-MS/MS instrument. Veliko hvala dr. sc. Petri Kostanjevečki na pomoći, trudu i strpljenju pri upoznavanju s tehnikama LC-MS/MS te savjetima prilikom planiranja i provođenja pokusa.

Hvala dr. sc. Ivanu Senti, dr. sc. Ivi Mikac, Petru Ujčiću i Tinu Županoviću što su uvijek bili spremni pomoći, a kolektiv su činili vedrim, poticajnim i ugodnim za rad.

Hvala i svim ostalim kolegama i prijateljima koji su kroz razgovor svojom podrškom i optimizmom doprinijeli zdravijem stanju mog uma, a u konačnici i izradi ove disertacije.

Nadalje, zahvaljujem svojim roditeljima, Josipi i Brani, te braći, Anti i Bruni, na neizmjerljivoj podršci, savjetima i razumijevanju tijekom svih ovih godina školovanja – ova disertacija nosi i vaša imena.

Za kraj, najveće hvala mom suprugu Marku i sinovima, Teodoru i Gabrielu, koji su bili ultimativna podrška i snaga za vrijeme izrade i pisanja ove disertacije te bez kojih bi sve ovo bilo daleko teže. Ova disertacija je za vas, moje mušketire! Ali i za sve koji tek dolaze...

Sadržaj

SAŽETAK.....	XIII
ABSTRACT	XV
§ 1. UVOD.....	1
§ 2. LITERATURNI PREGLED	4
2.1. Podjela, uporaba i metabolizam farmaceutskih spojeva	4
2.2. Farmaceutski spojevi kao zagađivala vodenog okoliša	25
2.2.1. <i>Rasprostranjenost farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u površinskim vodama i slatkovodnoj bioti.....</i>	<i>26</i>
2.2.2. <i>Procjena bioakumulacijskog potencijala farmaceutskih spojeva u divljim populacijama riba..</i>	<i>49</i>
2.2.3. <i>Istraživanje biokoncentracijskog potencijala i farmakokinetičkih pokazatelja u modelnim ribama.....</i>	<i>51</i>
2.3. Analitičke metode za određivanje farmaceutskih spojeva u vodenom okolišu.....	58
2.3.1. <i>Priprema uzoraka vode i biote za instrumentnu analizu</i>	<i>59</i>
2.3.2. <i>Instrumentna analiza</i>	<i>71</i>
§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO	73
3.1. Materijali	73
3.1.1. <i>Kemikalije</i>	<i>73</i>
3.1.2. <i>Otopine.....</i>	<i>76</i>
3.1.3. <i>Pribor.....</i>	<i>77</i>
3.1.4. <i>Uređaji i instrumentacija.....</i>	<i>79</i>
3.2. Metode.....	80
3.2.1. <i>Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu</i>	<i>80</i>
3.2.2. <i>Priprema uzoraka ribe za instrumentnu analizu</i>	<i>82</i>
3.2.3. <i>Instrumentna analiza farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS).....</i>	<i>84</i>
3.3. Validacija analitičkih metoda	86
3.4. Određivanje stabilnosti farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita	88
3.5. Modelni pokus izlaganja zebrića farmaceutskim spojevima	89
3.5.1. <i>Istraživanje kinetike akumulacije i depuracije farmaceutskih spojeva u zebrićama</i>	<i>90</i>
3.5.2. <i>Istraživanje kroničnog izlaganja zebrića farmaceutskim spojevima</i>	<i>90</i>
3.6. Određivanje farmakokinetičkih pokazatelja i bioakumulacijskog potencijala	92
3.6.1. <i>Određivanje kinetike akumulacije i depuracije ispitivanih farmaceutskih spojeva</i>	<i>92</i>
3.6.2. <i>Određivanje kinetike metaboličke biotransformacije i izlučivanja</i>	<i>93</i>

3.6.3. <i>Određivanje bioakumulacijskog potencijala</i>	93
3.6.4. <i>Istraživanje utjecaja fizikalno-kemijskih svojstava farmaceutskih spojeva na bioakumulaciju</i> ..	94
3.7. <i>Istraživanje rasprostranjenosti farmaceutskih spojeva u rijeci Savi</i>	95
3.7.1. <i>Lokacije uzorkovanja</i>	96
3.7.2. <i>Prikupljanje uzoraka riječne vode i ribljeg tkiva</i>	97
3.8. <i>Procjena rizika i prioritizacija</i>.....	100
3.9. <i>Računalna obrada podataka</i>.....	101
§ 4. <i>REZULTATI I RASPRAVA</i>	102
4.1. <i>Razvoj analitičkih metoda za određivanje farmaceutskih spojeva u vodi i bioti</i>	102
4.1.1. <i>Optimiranje kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta</i>	102
4.1.2. <i>Optimiranje postupka ekstrakcije tekućih uzoraka</i>	111
4.1.3. <i>Optimiranje uvjeta ekstrakcije ribljeg tkiva</i>	114
4.1.4. <i>Razvoj postupka pročišćavanja ekstrakata ribljeg tkiva</i>	117
4.1.5. <i>Stabilnost farmaceutskih spojeva u uzorcima vode i njihovim ekstraktima</i>	120
4.2. <i>Validacija analitičkih metoda za određivanje farmaceutskih spojeva</i>	121
4.2.1. <i>Validacija metode za analizu farmaceutskih spojeva u vodi</i>	123
4.2.2. <i>Validacija metode za analizu farmaceutskih spojeva u ribljem tkivu</i>	126
4.3. <i>Bioakumulacija i transformacija farmaceutskih spojeva u modelnim ribama</i>	131
4.3.1. <i>Kinetika akumulacije i depuracije odabranih farmaceutskih spojeva</i>	131
4.3.2. <i>Biokoncentracijski faktori i utjecaj biotransformacije</i>	137
4.3.3. <i>Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na biokoncentracijske faktore</i>	142
4.3.4. <i>Biokoncentracija farmaceutskih spojeva u zebricama pri kroničnom izlaganju</i>	143
4.4. <i>Rasprostranjenost farmaceutskih spojeva u rijeci Savi</i>.....	149
4.4.1. <i>Rasprostranjenost farmaceutskih spojeva u vodi i populaciji riba rijeke Save</i>	149
4.4.2. <i>Prostorna raspodjela farmaceutskih spojeva u vodi i populaciji riba rijeke Save</i>	153
4.4.3. <i>Tkivna raspodjela i bioakumulacijski potencijal farmaceutskih spojeva</i>	160
4.4.4. <i>Utjecaj metabolizma na biokoncentracijski potencijal u populaciji divljih riba</i>	166
4.5. <i>Ekotoksikološka procjena i prioritizacija farmaceutskih spojeva u rijeci Savi</i>.....	170
§ 5. <i>ZAKLJUČAK</i>	175
§ 6. <i>POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ</i>.....	179
§ 7. <i>LITERATURNI IZVORI</i>.....	184
§ 8. <i>DODATAK</i>.....	XVII
§ 9. <i>ŽIVOTOPIS</i>	XLIX



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Kemijski odsjek

Doktorska disertacija

SAŽETAK

MULTIREZIDUALNA ANALIZA, BIOAKUMULACIJSKI POTENCIJAL I RASPROSTRANJENOST FARMACEUTSKIH SPOJEVA U SLATKOVODNIM RIBAMA

Klaudija Ivanković Koprivić

Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, Bijenička cesta 54, 10 000 Zagreb

Farmaceutski aktivni spojevi (FAS-ovi) su velika, raznovrsna skupina biološki aktivnih tvari koje, nakon dospijevanja u okoliš, mogu izazvati brojne negativne posljedice. Njihovi štetni učinci na neciljane organizme u vodenom okolišu u velikoj su mjeri određeni njihovim potencijalom akumulacije u vodenim organizmima. Stoga, ključan korak u procjeni njihovog ekotoksikološkog rizika jest razvoj pouzdanih analitičkih metoda za simultano određivanje složenih smjesa FAS-ova različitih fizikalno-kemijskih svojstava u bioti. U sklopu ove disertacije razvijene su nove multirezidualne analitičke metode za određivanje tragova 44 odabrana FAS-a i njihovih metabolita u riječnoj vodi i ribljem tkivu. Primjenom tih metoda, u laboratorijskim pokusima s modelnim ciprinidnim organizmom *Danio rerio*, istražena je kinetika akumulacije i depuracije, metaboličke transformacije te bioakumulacijski potencijal 20 odabranih FAS-ova. Zadnja faza istraživanja uključivala je terensko istraživanje koje je bilo usmjereno na određivanje realnog utjecaja odabranih FAS-ova na populaciju divljih riba u rijeci Savi, na širem području grada Zagreba.

(196 stranica, 30 slika, 25 tablica, 240 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj kemijskoj knjižnici, Horvatovac 102a, Zagreb i Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb.

Ključne riječi: bioakumulacija/ ekotoksikološka prioritizacija/ farmaceutski aktivni spojevi/ farmakokinetika/ metabolizam/ multirezidualna analiza/ rijeka Sava

Mentor: dr. sc. Senka Terzić, znan. savj. u tr. zv.

Rad prihvaćen: 6. svibnja 2026.

Ocjenitelji:

1. prof. dr. sc. Nives Galić
2. dr. sc. Marijana Erk, v. zn. sur.
3. dr. sc. Darija Klinčić, v. zn. sur.



University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Chemistry

Doctoral Thesis

ABSTRACT

MULTIRESIDUE ANALYSIS, BIOACCUMULATION POTENTIAL AND OCCURRENCE OF PHARMACEUTICALS IN FRESHWATER FISH

Klaudija Ivanković Koprivić

Ruđer Bošković Institute, Division of Marine and Environmental Research, Bijenička cesta 54,
10 000 Zagreb

When released into the environment, pharmaceuticals (PhACs), a broad and varied class of physiologically active compounds, can become a serious environmental hazard. The ability of PhACs to accumulate in aquatic species is the main predictor of the severity of their adverse impacts. One of the key prerequisites for a reliable ecotoxicological risk assessment of environmental contamination with PhACs is the development of analytical methods for the simultaneous determination of PhAC mixtures in biota. In this thesis, novel multiresidue analytical methods for the trace determination of 44 selected PhACs and their metabolites in river water and fish tissue were developed. The kinetics of accumulation and elimination, metabolic transformations, and bioaccumulation potential of 20 selected PhACs were investigated by applying these methods in model experiments with the cyprinid organism *Danio rerio*. The final stage of this research was a field study, which aimed to quantify the impact of pharmaceuticals on the Sava River's wild fish population in the wider area of the city of Zagreb.

(196 pages, 30 figures, 25 tables, 240 references, original in Croatian)

Thesis deposited in Central Chemical Library, Horvatovac 102A, Zagreb, Croatia and National and University Library, Hrvatske bratske zajednice 4, Zagreb, Croatia.

Keywords: bioaccumulation/ ecotoxicological risk assessment/ metabolism/ multiresidue analysis/ pharmaceutically active compounds/ pharmacokinetics/ the Sava River

Supervisor: Dr. Senka Terzić, Tenured Senior Scientist

Thesis accepted: 6th May 2026

Reviewers:

Dr. Nives Galić, Professor
Dr. Marijana Erk, Senior Research Associate
Dr. Darija Klinčić, Senior Research Associate

§ 1. UVOD

Farmaceutski aktivni spojevi (FAS-ovi) su biološki aktivne tvari namijenjene dijagnostici, liječenju i prevenciji bolesti. Prema podacima raznih svjetskih organizacija, ali i hrvatske Agencije za lijekove i medicinske proizvode, potrošnja farmaceutski aktivnih spojeva kontinuirano raste iz godine u godinu te ne postoji naznaka promjene tog trenda. Godišnja statistička izvješća o potrošnji lijekova pokazuju kako je u Republici Hrvatskoj, u razdoblju od 2004. do 2024. godine, ukupna potrošnja lijekova izražena u definiranim dnevnim dozama na tisuću stanovnika porasla za oko 140 %¹.

Glavni izvor unosa FAS-ova u vodeni okoliš su otpadne vode kućanstava, medicinskih centara i proizvodnih pogona, pri čemu u okoliš, osim roditeljskih spojeva, dospijevaju i njihovi metaboliti te ostali transformacijski produkti²⁻⁴. Imajući na umu porast potrošnje lijekova te njihovo neregulirano, kontinuirano ispuštanje u vodeni okoliš, ne iznenađuje činjenica da su u brojnim vodenim sustavima, naročito na lokacijama koje se nalaze u blizini ispusta otpadne vode, zabilježene ekotoksikološki relevantne razine farmaceutskih spojeva⁵⁻⁸. U skladu s tim, FAS-ovi pripadaju jednoj od najistaknutijih kategorija novih tipova zagađivala okoliša, što se odražava u velikom broju publikacija koje se objavljuju svake godine^{3,9-14}. Zbog visoke biološke aktivnosti, njihova prisutnost u okolišu je posebno problematična jer postoji mogućnost izazivanja negativnih učinaka na neciljne vrste¹⁵⁻¹⁷.

Većina trenutačno dostupnih literaturnih spoznaja vezanih uz istraživanje farmaceutskih spojeva u vodenom okolišu odnosi se na istraživanje njihove pojave i ponašanja u abiotičkim matricama, odnosno vodi i sedimentu, dok su informacije o njihovim koncentracijama u vodenim organizmima znatno rjeđe¹¹. Takav pristup ne uzima u obzir činjenicu da upravo unutarnja koncentracija pojedinog spoja u organizmu predstavlja ključan parametar koji određuje njegov potencijal za izazivanje nepovoljnih bioloških učinaka, dok koncentracije u vodi i sedimentu predstavljaju tek neizravnu mjeru izloženosti i potencijalne štetnosti¹⁸. Tradicionalni modeli za predviđanje bioakumulacijskog potencijala zagađivala, koji počivaju na modelu lipofilne akumulacije klasičnih hidrofobnih prioriternih tvari, pretpostavljali su da je bioakumulacija polarnih spojeva, kao što su farmaceutski spojevi, razmjerno niska.

Međutim, novije publikacije ukazuju kako određeni farmaceutski spojevi imaju povećan afinitet prema akumulaciji u tkivu vodenih organizama^{8,19-24}.

Da bi se omogućila znanstveno utemeljena procjena okolišnog rizika vezanog uz farmaceutski aktivne spojeve kao zagađivala vodenog okoliša, potrebno je sustavno proučiti ovisnost bioakumulacijskog faktora o kemijskoj strukturi farmaceutskih spojeva pri čemu je nužno primijeniti sveobuhvatni pristup bioakumulacijskim procesima, uzimajući u obzir metaboličku transformaciju tih spojeva. Takva ispitivanja provode se u kontroliranim laboratorijskim uvjetima, a najčešći nedostatak većine dosadašnjih istraživanja su visoke koncentracije izlaganja koje nisu relevantne za realni vodeni okoliš ($> 10 \mu\text{g L}^{-1}$). Nadalje, najveći broj dosadašnjih ispitivanja proveden je izlaganjem živih organizama pojedinačnim farmaceutskim spojevima ili njihovim jednostavnim smjesama što je u suprotnosti s tipičnom situacijom u okolišu. Zbog svega navedenog, utjecaj smjesa FAS-ova na vodene organizme još uvijek je nedovoljno razjašnjen.

Ključan preduvjet za istraživanje bioakumulacijskog ponašanja farmaceutskih spojeva i rizika povezanih s njihovim prisustvom u okolišu je dostupnost analitičkih metoda za pouzdano određivanje složenih smjesa tragova FAS-ova i njihovih metabolita u različitim okolišnim matricama. U literaturi postoji velik broj multirezidualnih metoda za određivanje farmaceutskih spojeva u vodenim matricama i sedimentu koje pretežno uključuju ekstrakciju na čvrstoj fazi za obogaćivanje uzorka vode te ekstrakcije otapalom za čvrste uzorke, u kombinaciji s instrumentnom analizom temeljenom na vezanom sustavu tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS)²⁵⁻²⁷. Nasuprot tome, potpuno validirane metode za analizu tkiva vodenih organizama su rjeđe^{11,12,28-31} te često uključuju mali broj farmaceutskih spojeva. Stoga, neophodan je kontinuirani razvoj novih metoda i usavršavanje postojećih.

U analitici okolišnih uzoraka, a posebice bioloških uzoraka, jedan od kritičnijih koraka koji najčešće određuje krajnje mogućnosti analitičke metode, jest priprava uzoraka. Pregled objavljenih metoda prikladnih za određivanje tragova farmaceutskih spojeva u bioti može se pronaći u sveobuhvatnim preglednim radovima kao što su radovi Millera i suradnika¹¹, Álvarez-Ruiza i Picó¹², Huerta i suradnika²⁸, Gómez-Regalado i suradnika³⁰ te Yakubua i suradnika³¹. Za multirezidualne metode koje obuhvaćaju farmaceutske spojeve iz više terapijskih skupina, koji su često karakterizirani širokim rasponom fizikalno-kemijskih svojstava, važno je razviti optimirane postupke ekstrakcije koji osiguravaju visoku učinkovitost ekstrakcije ciljanih spojeva uz zadovoljavajuću selektivnost u odnosu na sastojke matrice.

Najčešće korištene tehnike ekstrakcije su ekstrakcije potpomognute visokim tlakom, ultrazvukom ili mikrovalovima, a najčešće korištena ekstrakcijska otapala su metanol i acetonitril^{12,30}. Ekstrakti bioloških uzoraka dobiveni ekstrakcijom organskim otapalima u pravilu sadrže visoke razine interferirajućih spojeva iz matrice zbog čega je za pouzdanu analizu neophodan učinkovit postupak pročišćavanja^{32,33}. Prema literaturi, najčešće korišteni postupci pročišćavanja su ekstrakcija na čvrstoj fazi¹², gel-propusna kromatografija³² i kolonska kromatografija na silika gelu³⁴.

Sukladno svemu navedenom, moguće je zaključiti kako je utjecaj smjesa farmaceutskih spojeva na vodene organizme nedovoljno istražen. Za procjenu ekološkog rizika potrebno je sveobuhvatno istraživanje rasprostranjenosti farmaceutskih spojeva te njihovog biogeokemijskog ponašanja u vodenom okolišu pri okolišno relevantnim koncentracijama. Stoga, glavni ciljevi ovog doktorskog rada su:

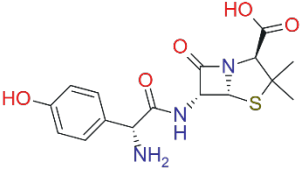
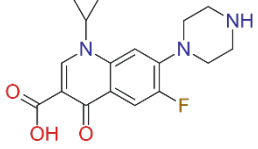
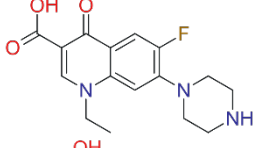
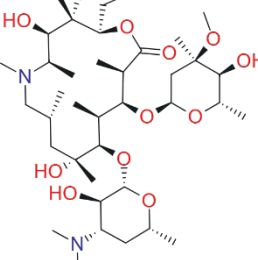
- razvoj analitičkih metoda za multirezidualno određivanje tragova odabranih farmaceutskih spojeva u riječnoj vodi i bioti,
- istraživanje kinetike akumulacije i depuracije odabranih farmaceutskih spojeva u modelnom organizmu *Danio rerio*,
- određivanje bioakumulacijskih faktora i metaboličkih transformacija odabranih farmaceutskih spojeva u modelnom organizmu *Danio rerio* i
- određivanje koncentracija i bioakumulacijskih faktora odabranih farmaceutskih spojeva u ribama iz rijeke Save.

§ 2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Podjela, uporaba i metabolizam farmaceutskih spojeva

Farmaceutski aktivni spojevi su biološki aktivne komponente lijekova koje su odgovorne za njihove terapijske učinke. Većina FAS-ova su male organske molekule (< 1000 Da) koje, zahvaljujući velikoj strukturnoj raznolikosti i različitim fizikalno-kemijskim svojstvima (Tablica 1), mogu ciljano djelovati na brojne procese u organizmu. U svijetu je trenutačno odobreno preko 3000 FAS-ova koji pripadaju skupini malih molekula³⁵, a njihov broj kontinuirano raste. Ovisno o kemijskoj strukturi, terapijskom području, mehanizmu djelovanja i podrijetlu, FAS-ovi se mogu klasificirati na više načina, a najčešće se koristi sveobuhvatna anatomsko-terapijsko-kemijska (ATK) klasifikacija koja je ujedno i standardni sustav za farmakološku klasifikaciju. Nadalje, budući da terapijske doze pojedinih lijekova mogu značajno varirati ovisno o dijagnozi, pacijentu i načinu primjene, njihova se potrošnja standardizirano prati s pomoću pokazatelja DDD/1000 stanovnika/dan pri čemu definirana dnevna doza (DDD) predstavlja prosječnu održavajuću dnevnu dozu lijeka za njegovu glavnu indikaciju kod odraslih.

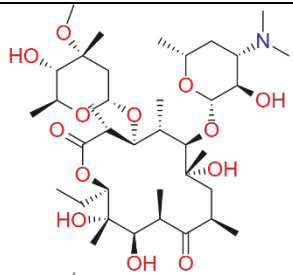
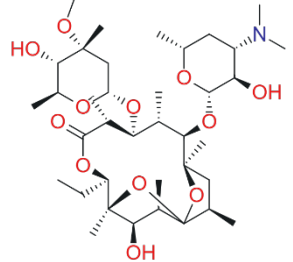
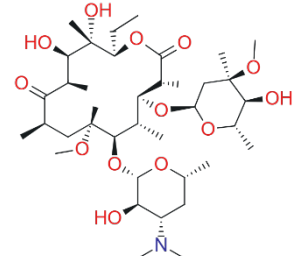
Tablica 1. Farmaceutski aktivni spojevi i njihovi metaboliti obuhvaćeni ovim istraživanjem, njihov elementarni sastav, molekulske mase, fizikalno-kemijski parametri i strukture.

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
ANTIBIOTICI I NJIHOVI METABOLITI (AB)							
Amoksicilin (AMOX)	Beta-laktami	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365,4042	1,30 7,22	-2,86	-2,72	
Ciprofloksacin (CIP)	Fluorokinoloni	C ₁₇ H ₁₈ FN ₃ O ₃	331,3415	5,96 8,69	-1,02	-2,23	
Norfloksacin (NOR)	Fluorokinoloni	C ₁₆ H ₁₈ FN ₃ O ₃	319,3308	5,86 5,97 8,99	-0,87	-0,87 ^b	
Azitromicin (AZI)	Makrolidi	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂	748,9845	9,08 11,16 12,46	3,33 ^c	1,36	

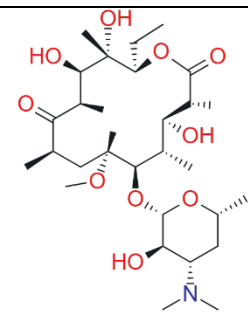
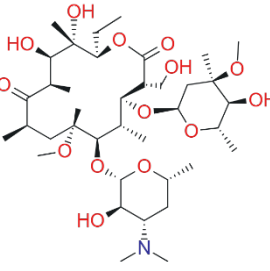
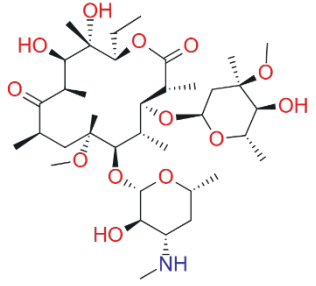
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
ANTIBIOTICI I NJIHOVI METABOLITI (AB)							
Dekladinozil azitromicin (DC-AZI)	Metabolit azitromicina	C ₃₀ H ₅₈ N ₂ O ₉	590,7895	11,17 12,57	0,80	0,1	
N-demetil azitromicin (N-DM-AZI)	Metabolit azitromicina	C ₃₇ H ₇₀ N ₂ O ₁₂	734,9579	9,77 12,43	1,31	0,12	
N'-demetil azitromicin (N'-DM-AZI)	Metabolit azitromicina	C ₃₇ H ₇₀ N ₂ O ₁₂	734,9579	11,17 12,46	1,04	0,29	

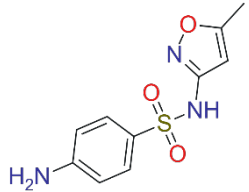
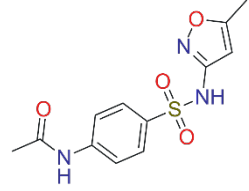
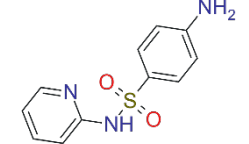
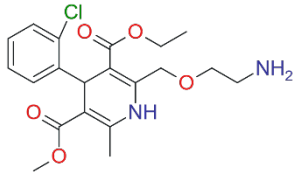
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
ANTIBIOTICI I NJIHOVI METABOLITI (AB)							
Eritromicin (ERY)	Makrolidi	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,9268	9,00 12,45	1,79	1,69	
Bezvodni eritromicin (ERY-H2O)	Metabolit eritromicina	C ₃₇ H ₆₅ NO ₁₂	715,9115	9,08 12,58	3,55	2,16	
Klaritromicin (CLA)	Makrolidi	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₃	747,9534	9,00 12,46	3,16	2,38	

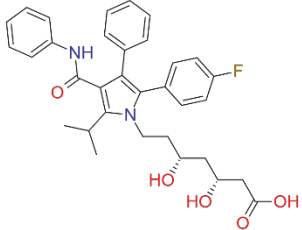
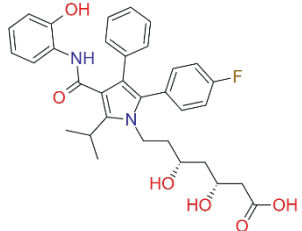
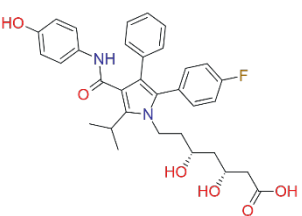
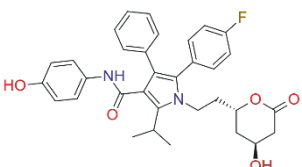
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
ANTIBIOTICI I NJIHOVI METABOLITI (AB)							
Dekladinozil klaritromicin (DC-CLA)	Metabolit klaritromicina	C ₃₀ H ₅₅ NO ₁₀	589,7584	9,0	2,14	1,43	
14-hidroksi klaritromicin (OH-CLA)	Metabolit klaritromicina	C ₃₈ H ₆₉ NO ₁₄	763,9528	9,0	2,09	1,48	
N-demetil klaritromicin (DM-CLA)	Metabolit klaritromicina	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,9268	9,63	2,86	1,28	

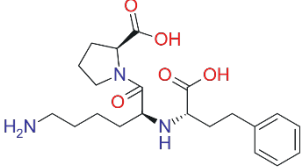
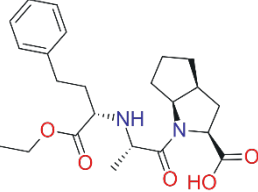
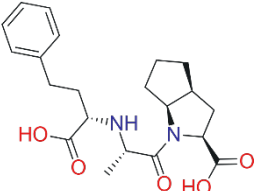
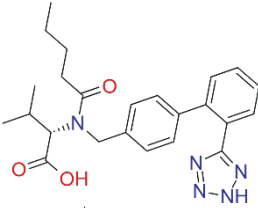
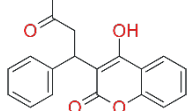
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
ANTIBIOTICI I NJIHOVI METABOLITI (AB)							
Sulfametoksazol (SMX)	Sulfonamidi	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,2776	1,97 5,86	0,89	-0,56	
N-acetil sulfametoksazol (N-Ac-SMX)	Metabolit sulfametoksazola	C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₄ S	295,3143	0,38 5,58	1,25	-0,28	
Sulfapiridin* (SPY)	Sulfonamidi	C ₁₁ H ₁₁ N ₃ O ₂ S	249,2889	2,14 6,24	1,21	0,4	
KARDIOVASKULARNI LIJEKOVI (KV)							
Amlodipin (AML)	Blokatori kalcijevih kanala	C ₂₀ H ₂₅ ClN ₂ O ₅	408,8759	9,30	1,35	1,91	

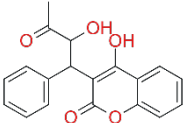
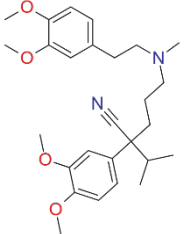
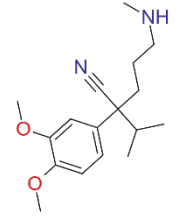
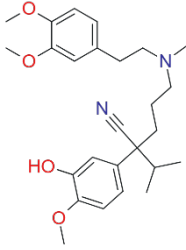
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
KARDIOVASKULARNI LIJEKOVI (KV)							
Atorvastatin (ATOR)	Lijekovi koji modificiraju lipide	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₅	558,6398	4,1	4,13	1,25	
<i>o</i>-hidroksi atorvastatin (<i>o</i>OH-ATOR)	Metabolit atorvastatina	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₆	574,6392	4,26	6,46	1,05	
<i>p</i>-hidroksi atorvastatin (<i>p</i>OH-ATOR)	Metabolit atorvastatina	C ₃₃ H ₃₅ FN ₂ O ₆	574,6392	4,31	5,08	0,87	
2-hidroksi atorvastatin lakton (ATOR-LAC)	Metabolit atorvastatina	C ₃₃ H ₃₃ FN ₂ O ₅	556,6239	4,31	5,39	4,43	

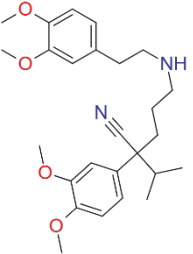
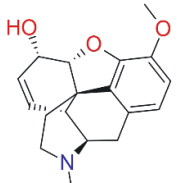
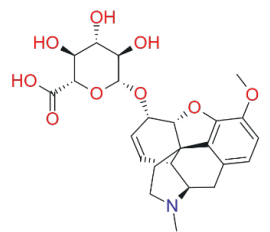
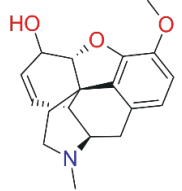
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
KARDIOVASKULARNI LIJEKOVI (KV)							
Lizinopril (LIS)	ACE inhibitori	C ₂₁ H ₃₁ N ₃ O ₅	405,4879	1,95 10,21	-3,99	-1,80	
Ramipril (RAM)	ACE inhibitori	C ₂₃ H ₃₂ N ₂ O ₅	416,5106	3,26 5,19	3,41	-0,13	
Ramiprilat (RAM-COOH)	Metabolit ramiprila	C ₂₁ H ₂₈ N ₂ O ₅	388,4574	3,13 8,05	-0,18	-1,58	
Valsartan (VAL)	Antagonisti angiotenzina II	C ₂₄ H ₂₉ N ₅ O ₃	435,5188	0,85 4,35	4,74	-0,89	
Varfarin (WAR)	Antitrombotici	C ₁₉ H ₁₆ O ₄	308,3279	5,56	3,42	0,30	

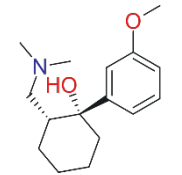
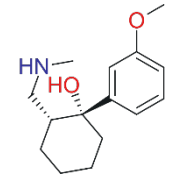
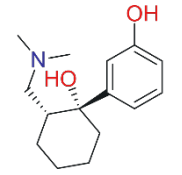
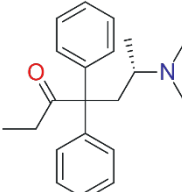
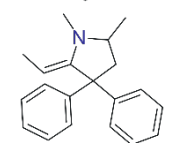
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
KARDIOVASKULARNI LIJEKOVI (KV)							
10-hidroksi varfarin (OH-WAR)	Metabolit varfarina	C ₁₉ H ₁₆ O ₅	324,3273	5,31	2,44	-0,10	
Verapamil (VER)	Blokatori kalcijevih kanala	C ₂₇ H ₃₈ N ₂ O ₄	454,6016	9,61	3,90	2,38	
Verapamil metabolit D-617 (VER D617)	Metabolit verapamila	C ₁₇ H ₂₆ N ₂ O ₂	290,4005	11,14	2,96	-0,03	
O-demetil verapamil (O-DM-VER)	Metabolit verapamila	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₄	440,5750	10,27	4,41	2,16	

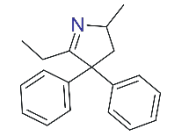
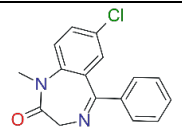
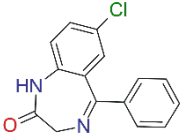
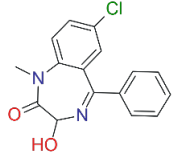
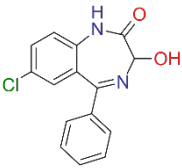
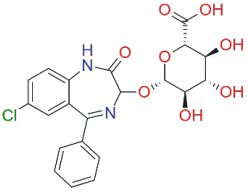
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
KARDIOVASKULARNI LIJEKOVI (KV)							
<i>N</i> -demetil verapamil (norVER)	Metabolit verapamila	C ₂₆ H ₃₆ N ₂ O ₄	440,5750	10,29	4,66	1,53	
OPIOIDNI ANALGETICI I NJIHOVI METABOLITI (OA)							
Kodein (COD)	Antitusici	C ₁₈ H ₂₁ NO ₃	299,3642	8,89	1,20	0,28	
Kodein-6-glukuronid (C6G)	Metabolit kodeina	C ₂₄ H ₂₉ NO ₉	475,4884	2,87 9,19	-2,8	-3,29	
<i>N</i> -demetil kodein (norCOD)	Metabolit kodeina	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285,3377	9,77	0,96	-1,07	

Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
OPIOIDNI ANALGETICI I NJIHOVI METABOLITI (OA)							
Tramadol (TRAM)	Opioidni analgetici	C ₁₆ H ₂₅ NO ₂	263,3752	9,38	2,51	0,52	
N-demetil tramadol (N-DM-TRAM)	Metabolit tramadola	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	249,3486	9,89 13,80	1,64	-0,54	
O-demetil tramadol (O-DM-TRAM)	Metabolit tramadola	C ₁₅ H ₂₃ NO ₂	249,3486	9,04 9,69	1,27	0,07	
Metadon (MTHD)	Lijekovi za liječenje ovisnosti	C ₂₁ H ₂₇ NO	309,4452	9,12	5,58	2,8	
2-etiliden-1,5-dimetil- 3,3-difenilpirolidin (EDDP)	Metabolit metadona	C ₂₀ H ₂₃ N	277,4033	9,04	4,63	1,39	

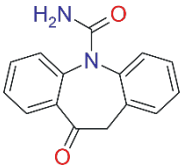
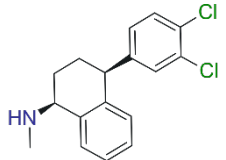
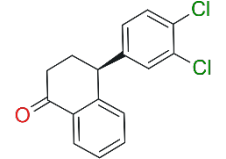
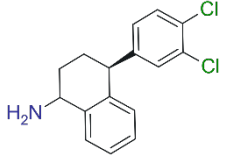
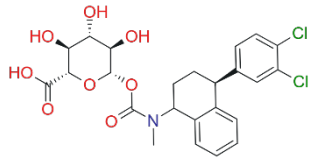
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
OPIOIDNI ANALGETICI I NJIHOVI METABOLITI (OA)							
2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin (EMDP)	Metabolit metadona	C ₁₉ H ₂₁ N	263,3767	5,1	5,05	5,33	
PSIHOAKTIVNI LIJEKOVI (PA)							
Diazepam (DIA)	Psiholeptici	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O	284,7402	2,92	2,91	2,92	
Demetil diazepam (norDIA)	Metabolit diazepama	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O	270,7136	12,3	3,21	2,53	
Temazepam (TEM)	Metabolit diazepama	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O ₂	300,7396	2,85 10,68	2,79	2,11	
Oksazepam (OXA)	Psiholeptici (metabolit diazepama)	C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	286,7130	1,47 10,61	1,77	1,50	
Oksazepam glukuronid (OXAG)	Metabolit oksazepama	C ₂₁ H ₁₉ ClN ₂ O ₈	462,8372	1,3	2,2	-3,43	

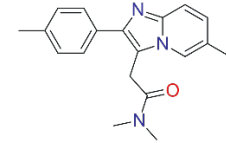
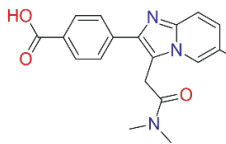
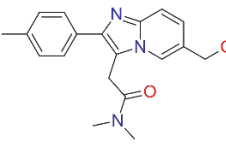
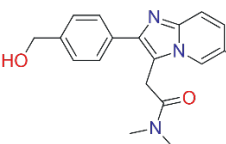
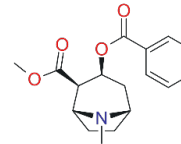
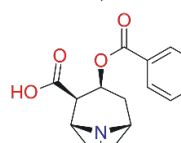
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
PSIHOAKTIVNI LIJEKOVI (PA)							
10,11-epoksi karbamazepin (CARB-EP)	Metabolit karbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,2680	-	1,97	1,31	
3-hidroksi karbamazepin (OH-CARB)	Metabolit karbamazepina	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,2680	9,19	2,46	2,27	
Kvetiapin (QUE)	Psiholeptici	C ₂₁ H ₂₅ N ₃ O ₂ S	383,5071	7,76	3,22	2,29	
Escitalopram (ESC)	Antidepresivi	C ₂₀ H ₂₁ FN ₂ O	324,3919	10,38	3,66	1,27	
Karbamazepin (CARB)	Antiepileptici	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O	263,2686	15,96	2,67	2,28	

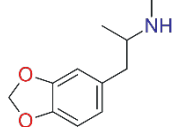
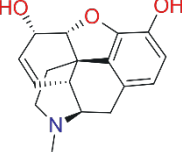
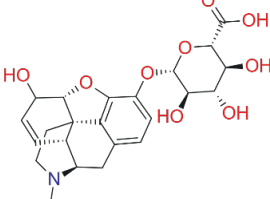
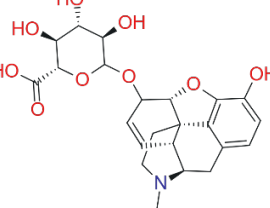
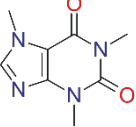
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
PSIHOAKTIVNI LIJEKOVI (PA)							
Okskarbazepin (OXCARB)	Antiepileptici	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₂	252,2680	13,18	1,66	1,87	
Sertralin (SER)	Antidepresivi	C ₁₇ H ₁₇ Cl ₂ N	305,2296	9,56	4,81	3,14	
Sertralin keton (SER-KET)	Metabolit sertralina	C ₁₆ H ₁₂ Cl ₂ O	291,1719	-	4,53	5,20	
Demetil sertralin (norSER)	Metabolit sertralina	C ₁₆ H ₁₅ Cl ₂ N	292,2030	9,52	4,72	2,83	
Sertralin karbamoil glukuronid (SERG)	Metabolit sertralina	C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ NO ₈	526,3632	3,29	3,28	0,09	

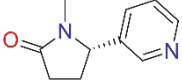
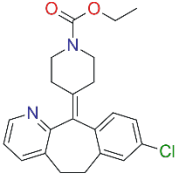
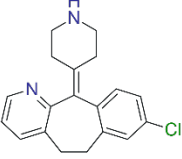
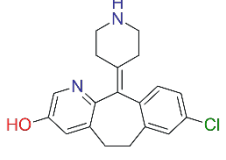
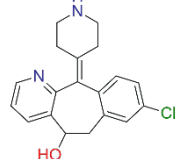
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
PSIHOAKTIVNI LIJEKOVI (PA)							
Zolpidem (ZOLP)	Psiholeptici	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O	307,3895	5,39	3,07	3,06	
Zolpidem fenil-4- karboksilna kiselina (ZOLP-COOH)	Metabolit zolpidema	C ₁₉ H ₁₉ N ₃ O ₃	337,3725	3,81 5,46	0,67	-0,37	
6-hidroksimetil zolpidem (2OH-ZOLP)	Metabolit zolpidema	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	323,3889	5,07	1,74	1,64	
4-(hidroksimetil)fenil zolpidem (1OH-ZOLP)	Metabolit zolpidema	C ₁₉ H ₂₁ N ₃ O ₂	323,3889	5,39	1,74	1,74	
ILEGALNE DROGE I NJIHOVI METABOLITI (ID)							
Kokain (COC)	Ilegalne droge	C ₁₇ H ₂₁ NO ₄	303,3529	8,6 ^c	2,3	1,23	
Benzoilekgonin (BE)	Metabolit kokaina	C ₁₆ H ₁₉ NO ₄	289,3264	3,15 9,14	2,71	-0,21	

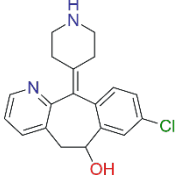
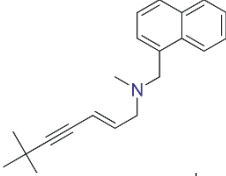
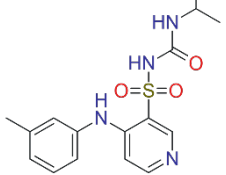
Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
ILEGALNE DROGE I NJIHOVI METABOLITI (ID)							
3,4-metilendioksi- metamfetamin (MDMA)	Ilegalne droge	C ₁₁ H ₁₅ NO ₂	193,2423	10,14	2,02	-0,77	
Morfin (MOR)	Opioidni analgetici (metabolit kodeina i heroina)	C ₁₇ H ₁₉ NO ₃	285,3377	8,28 9,90	0,9	-0,13	
Morfin-3-glukuronid (M3G)	Metabolit morfina	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	461,4618	10,78 12,22	1,55	-4,18	
Morfin-6-glukuronid (M6G)	Metabolit morfina	C ₂₃ H ₂₇ NO ₉	461,4618	2,87 9,12	-3,0	-3,82	
PSIHOSTIMULANSI (PS)							
Kofein (CAFF)	Psihoanaleptici	C ₈ H ₁₀ N ₄ O ₂	194,1906	-	-0,13	0,28	

Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
PSIHOSTIMULANSI (PS)							
Kotinin (COT)	Metabolit nikotina	C ₁₀ H ₁₂ N ₂ O	176,2151	4,79	0,14	0,17	
OSTALI LIJEKOWI (OL)							
Loratadin (LOR)	Antihistaminici	C ₂₂ H ₂₃ ClN ₂ O ₂	382,8832	5,2 ^c	5,2	5,32	
Desloratadin (DLOR)	Antihistaminici (metabolit loratadina)	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₂	310,8206	10,13	6,77	2,14	
3-hidroksi desloratadin (3OH-DLOR)	Metabolit desloratadina	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₂ O	326,8200	8,37 10,14	2,89	2,49	
5-hidroksi desloratadin (5OH-DLOR)	Metabolit desloratadina	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₂ O	326,8200	10,13 14,00	2,63	1,29	

Tablica 1. nastavak

Naziv (kratica)	Podklasifikacija	Elementni sastav	Molarna masa (g mol ⁻¹) ^a	pK _a ^b	log K _{ow} ^b	log D _{ow} ^c (pH 7,4)	Struktura
OSTALI LIJEKOVI (OL)							
6-hidroksi desloratadin (6OH-DLOR)	Metabolit desloratadina	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₂ O	326,8200	10,13 14,10	2,63	1,30	
Terbinafin (TERB)	Antimikotici	C ₂₁ H ₂₅ N	291,4299	7,1 ^c	6,0	5,88	
Torasemid (TOR)	Diuretici	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	348,4200	7,46	5,64	1,44	

^aPodaci izračunati programom MassLynx V4.2, integriran na korištenom instrumentu XEVO TQ-XS; ^bPodaci izračunati programom ChemAxon³⁶; ^cPodaci preuzeti iz baze podataka ChemSpider (ACD/Labs teorijski podaci)³⁷; *farmaceutski spoj se više ne propisuje u humanoj medicini

Premda se prema ATK klasifikaciji FAS-ovi ugrubo razvrstavaju u 14 skupina, lijekovi koji čine čak 90 % dnevne potrošnje u Republici Hrvatskoj pripadaju u sljedećih šest kategorija: lijekovi s učinkom na probavni sustav i mijenu tvari, lijekovi koji djeluju na živčani sustav, lijekovi koji djeluju na krv i krvotvorne organe, lijekovi koji djeluju na respiratorni sustav te lijekovi koji djeluju na koštano-mišićni sustav (Tablica 2).

Tablica 2. Usporedba ukupne potrošnje lijekova (DDD/1000/dan) prema ATK klasifikacijskim skupinama u Republici Hrvatskoj u 2004. i 2024. godini¹.

ATK klasifikacija lijekova	2004.	2024.
Lijekovi koji djeluju na kardiovaskularni sustav	251,95	602,94
Lijekovi s učinkom na živčani sustav	137,89	215,24
Lijekovi s učinkom na probavni sustav i mijenu tvari	76,54	359,94
Lijekovi koji djeluju na krv i krvotvorne organe	70,74	132,43
Lijekovi s učinkom na koštano-mišićni sustav	43,22	94,57
Lijekovi s učinkom na respiratorni sustav	40,4	97,4
Lijekovi za liječenje sustavnih infekcija	23,89	24,3
Sustavni hormonski lijekovi, bez spolnih hormona i inzulina	16,27	46,02
Lijekovi koji djeluju na osjetila	12,22	2,2
Lijekovi koji djeluju na urogenitalni sustav i spolni hormoni	9,72	46,39
Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti i imunomodulatori	2,3	15,16
Lijekovi za liječenje infekcija izazvanih parazitima	0,33	1,05
Lijekovi koji djeluju na kožu – dermatici	0,29	0,81
Ukupno	685,76	1638,45

U posljednjih 20 godina zabilježen je značajan porast potrošnje FAS-ova u Republici Hrvatskoj, pri čemu se ukupna potrošnja povećala sa 685,76 DDD/1000/dan u 2004. godini na 1638,45 DDD/1000/dan u 2024. godini (Tablica 2). Sličan trend bilježi se i u državama Organizacije za ekonomsku suradnju i razvoj (OECD), a najveća potrošnja za 2024. godinu zabilježena je za lijekove koji djeluju na kardiovaskularni sustav (245 – 825 DDD/1000/dan), zatim za lijekove s učinkom na probavni sustav i metabolizam (150 – 630 DDD/1000/dan) te za lijekove koji djeluju na živčani sustav (79 – 427 DDD/1000/dan)³⁸.

Podaci o potrošnji FAS-ova utemeljeni na broju DDD/1000/dan izuzetno su korisni za praćenje vremenskih trendova potrošnje lijekova unutar odabrane populacije te za usporedbu potrošnje između različitih populacijskih skupina. Međutim, važno je napomenuti da se veličine DDD-a pojedinih djelatnih tvari u lijekovima međusobno značajno razlikuju (Tablica 3), što ima direktne implikacije na učestalost pojavljivanja i koncentracije pojedinih FAS-ova u vodenom okolišu.

Tablica 3. Potrošnja istraživanih farmaceutski aktivnih spojeva u Republici Hrvatskoj od 2020. do 2024. godine¹. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

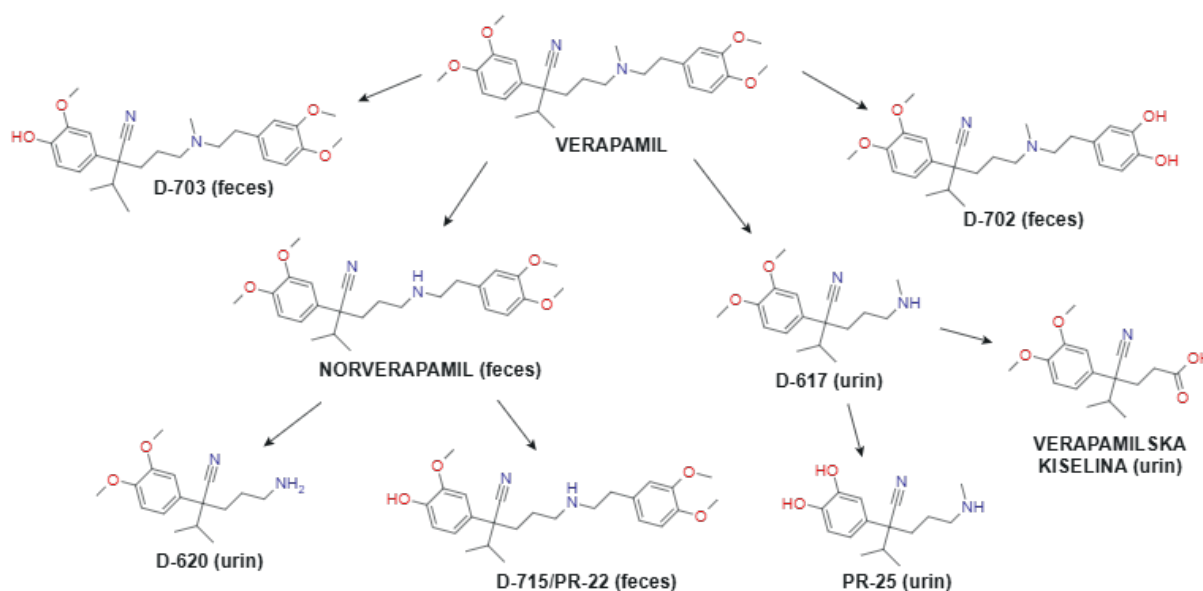
FAS	DDD ^{primjena}	Potrošnja (DDD/1000/dan)				
		2020.	2021.	2022.	2023.	2024.
AMOX	1,5 g ^O i 3 g ^P	1,41	0,90	1,11	1,13	1,47
AMOX + IBL	1,5 g ^O i 3 g ^P	5,96	4,02	4,97	6,08	7,08
CIP	1 g ^O i 0,8 g ^P	0,68	0,46	0,60	0,64	0,71
NOR	0,8 g ^O	0,60	0,65	0,67	0,63	0,49
AZI	0,3 g ^O i 0,5 g ^P	1,88	2,32	2,69	2,64	2,86
ERY	1 g ^{O,P}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
CLA	0,5 g ^O i 1 g ^P	0,61	0,62	0,76	0,84	0,82
SMX + trimetoprim	2 g ^O	0,20	0,20	0,45	0,46	0,50
AML	5 mg ^O	39,26	38,56	37,09	35,80	34,45
AML + bisoprolol	ND	0,37	0,41	0,43	0,43	0,42
AML + perindopril	ND	17,59	20,13	22,11	24,37	28,52
AML + perindopril + indapamid	ND	16,87	21,17	24,60	27,96	31,68
AML + VAL	ND	2,27	2,77	3,21	3,55	4,05
AML + VAL + HCT	ND	3,50	4,22	4,82	5,43	6,04
AML + OM + HCT	ND	0,00	0,03	0,13	0,24	0,42
AML + rosuvastatin	ND	0,06	0,09	0,11	0,11	0,12
AML + RAM	ND	11,60	12,58	12,79	12,90	13,23
AML + RAM + HCT	ND	0,05	0,30	0,61	0,85	1,06
AML + ATOR	ND	1,06	1,00	0,90	0,83	0,74
AML + ATOR + perindopril	ND	1,08	1,23	1,36	1,45	1,52
ATOR	20 mg ^O	51,62	58,00	64,40	73,14	79,61
ATOR + ezetimib	ND	0,01	0,02	0,51	1,47	3,35
LIS	10 mg ^O	9,64	8,54	7,20	6,13	5,16
LIS + diuretici	ND	8,84	7,92	6,78	6,02	5,15
RAM	2,5 mg ^O	52,99	51,53	47,50	43,67	40,05
RAM + diuretici	ND	13,81	13,18	12,03	10,98	10,03
RAM + felodipin	ND	1,06	0,96	0,89	0,80	0,73
RAM + bisoprolol	ND	-	-	-	0,00	0,10
VAL	80 mg ^O	8,64	9,52	9,87	10,17	10,51
VAL + diuretici	ND	6,86	7,43	7,72	8,04	8,45
VAL + sakubitril	ND	1,73	2,26	2,95	3,51	4,02
WAR	7,5 mg ^{O,P}	7,94	7,44	6,65	5,98	5,06
VER	0,24 g ^{O,P}	1,31	1,20	1,06	0,93	0,81
VER + kombinacije	ND	1,56	1,00	0,91	0,83	0,74
COD	0,1 g ^O i 30 mg ^{P,R}	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02
TRAM	0,3 g ^{O,P,R}	2,08	1,49	1,46	1,45	1,34
TRAM + paracetamol	ND	12,22	12,97	13,47	13,98	14,25
MTHD	25 mg ^{O,P}	4,85	5,14	5,17	5,96	5,87
DIA	10 mg ^{O,P,R}	40,76	42,34	41,91	42,21	41,53
ESC	10 mg ^O	8,08	8,81	9,15	10,08	10,41
CARB	1 g ^{O,R}	1,54	1,50	1,42	1,37	1,39
QUE	0,4 g ^O	2,33	2,45	2,50	2,52	2,56
OXA	50 mg ^O	4,94	4,86	4,63	4,65	4,55
OXCARB	1 g ^O	1,25	1,17	1,13	1,07	1,02
SER	50 mg ^O	7,98	8,42	8,64	9,46	9,60
ZOLP	10 mg ^O	12,98	14,20	14,45	13,78	14,04
DLOR	5 mg ^O	8,30	8,78	9,41	9,88	10,04
LOR	10 mg ^O	10,49	9,30	9,58	9,29	8,84
TERB	0,25 g ^O	0,17	0,17	0,21	0,28	0,31
TOR	15 mg ^{O,P}	1,55	1,62	1,64	1,67	1,71

O, oralno; P, parenteralno; R, rektalno; IBL, inhibitori beta-laktamaze; HCT, hidroklorotiazid; OM, olmesartan medoksomi; ND, nije definirano

Većina FAS-ova u organizam se unosi oralnim putem, no mogući su i drugi načini primjene, poput parenteralnog, rektalnog, sublingvalnog, inhalacijskog, transdermalnog ili nazalnog. Nakon ulaska u organizam, FAS-ovi prolaze kroz metaboličku transformaciju (biotransformaciju), pri čemu nastaju metaboliti koji su u pravilu polarniji i topljiviji u vodi od roditeljskog spoja što omogućuje njihovo lakše i brže izlučivanje iz organizma, najčešće putem urina. Biotransformacija FAS-ova uglavnom se odvija u dvije faze. Faza I uključuje reakcije oksidacije, redukcije ili hidrolize, pri čemu dolazi do jednostavnih strukturnih modifikacija roditeljskog spoja, dok u fazi II dolazi do konjugacijskih reakcija roditeljskog spoja ili metabolita iz faze I s polarnim endogenim tvarima kao što je glukuronska kiselina.

Farmaceutski spojevi se iz organizma izlučuju u nepromijenjenom i/ili promijenjenom obliku, a zastupljenost pojedinih oblika ovisi o farmakokinetičkim svojstvima svakog spoja. Tako se npr. lizinopril i ciprofloksacin izlučuju pretežno u nepromijenjenom obliku, verapamil, tramadol i morfin kao metaboliti, dok većina drugih FAS-ova pokazuje mješoviti obrazac eliminacije koji uključuje zastupljenost nepromijenjenih i biotransformiranih oblika³⁹.

Na slici 1 prikazan je primjer metaboličke transformacije verapamila koji se iz ljudskog tijela gotovo u cijelosti (> 90 %) izlučuje u obliku metabolita.



Slika 1. Metabolizam faze I i put izlučivanja verapamila *in vivo* (prema publikaciji Trautweina i suradnika⁴³).

Primarni metabolički putevi verapamila uključuju *O*- i *N*-demetilaciju, pri čemu nastaje *N*-demetil verapamil (norverapamil) i *O*-demetil verapamil (D-703), te *N*-dealkilaciju koja dovodi do nastanka metabolita D-617. Premda se navedeni metaboliti mogu dodatno transformirati putem *N*-dealkilacije (D-620), *O*-demetilacije (PR-22 i PR-25) ili oksidacije (verapamilska kiselina), najzastupljeniji ljudski metabolit verapamila je norverapamil (oko 32 %), a slijede *O*-demetil verapamil (oko 21 %) i metabolit D-617 (oko 20 %), dok je nešto drugačija farmakokinetika verapamila zabilježena kod pasa gdje je najzastupljeniji metabolit D-617 (oko 38 %)⁴⁰.

Ovisno o spoju i metaboličkom putu, farmakološka aktivnost metabolita FAS-ova može biti smanjena, zadržana ili čak pojačana u odnosu na roditeljske spojeve^{41,42} zbog čega sveobuhvatna ekotoksikološka procjena rizika vezana uz bioakumulacijski potencijal FAS-ova treba uključivati i njihove glavne metabolite, a poseban naglasak trebao bi biti stavljen na rasvjetljavanje utjecaja biotransformacije FAS-ova i njihovih ljudskih metabolita u ribama na njihov sveukupni bioakumulacijski potencijal.

2.2. Farmaceutski spojevi kao zagađivala vodenog okoliša

U posljednjih tridesetak godina FAS-ovi su prepoznati kao široko rasprostranjena skupina tzv. novih tipova zagađivala (engl. *emerging contaminants*) čije je prisustvo opsežno dokumentirano u svim sastavnicama vodenog ekosustava, uključujući otpadne vode⁴⁴⁻⁴⁹, površinske vode⁴⁹⁻⁵³, močvarna područja^{8,54-57} te priobalne morske vode⁵⁸⁻⁶¹. Zbog njihove sveprisutnosti u vodenom okolišu, kao i značajnog potencijala za izazivanje neželjenih učinaka na neciljne vrste, onečišćenje FAS-ovima široko je prepoznato kao globalni okolišni problem^{9,14,52,62-66}.

Usprkos tome, FAS-ovi sve do nedavno nisu bili obuhvaćeni popisom prioritarnih tvari obaveznih za praćenje u površinskim vodama. To se promijenilo postizanjem dogovora Vijeća i Parlamenta Europske Unije o proširenju popisa s 45 na ukupno 74 tvari, čime su u njega po prvi put uključeni i određeni farmaceutski spojevi, poput diklofenaka, azitromicina, klaritromicina, eritromicina te hormona 17- α -etinilestradiola i 17- β -estradiola⁶⁷. Paralelno s tim, često detektirani FAS-ovi poput klindamicina, ofloksacina, metformina, fluoksetina,

propranolola te tetraciklina nalaze se na tzv. popisu za praćenje (engl. *Watch list*)⁶⁸, koji se redovito ažurira radi procjene rizika i pojavnosti u okolišu. Važnost istraživanja njihova bioakumulacijskog potencijala dodatno naglašava preporuka Europske komisije o praćenju onih FAS-ova čiji bioakumulacijski faktori premašuju 100 L kg^{-1} ⁶⁸, što je ključno za pouzdanu procjenu rizika za vodene organizme.

Unatoč vrlo opširnoj znanstvenoj literaturi, obuhvat analiziranih tvari i dalje je razmjerno ograničen u odnosu na ukupan broj FAS-ova u uporabi. Fokus većine studija je na metabolički nepromijenjenim roditeljskim spojevima, dok su metaboliti i transformacijski produkti FAS-ova znatno slabije istraženi, unatoč potencijalnoj postojanosti i biološkoj aktivnosti^{9,41,42}. Nadalje, većina dostupnih podataka odnosi se na visoko razvijene zemlje koje imaju visoke standarde pročišćavanja otpadnih voda i zbrinjavanja otpada, dok su podaci za zemlje s nižim i srednjim dohotkom komparativno malobrojniji^{9,69}. Međutim, upravo u tim područjima se često bilježe povišene koncentracije FAS-ova što se povezuje s nedostatnom učinkovitošću pročišćavanja otpadnih voda, neadekvatnim gospodarenjem otpadom i izravnim ispuštanjem nepročišćenih voda u okoliš⁵². Stoga, istraživanje pojavnosti i biogeokemijskog ponašanja farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u vodenom okolišu i dalje je nedovoljno istražena tema pri čemu ključan izazov predstavlja istraživanje procesa njihove biotransformacije i bioakumulacije.

2.2.1. Rasprostranjenost farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u površinskim vodama i slatkovodnoj bioti

Farmaceutski spojevi se u vodeni okoliš najčešće unose putem otpadnih voda te se, uslijed visoke postojanosti i dobre topljivosti u vodi, često mogu detektirati i na velikim udaljenostima od njihovih ispusta u prirodne vode^{3,4,70}. Koncentracije FAS-ova u površinskim vodama mogu značajno varirati ovisno o učestalosti uporabe, porijeklu, fizikalno-kemijskim svojstvima, stupnju razrjeđenja te hidrološkim uvjetima, a dodatni utjecaj ima učinkovitost uređaja za pročišćavanje otpadnih voda te procesi razgradnje, sorpcije i transformacije^{3,52,71}.

Usporedba podataka za pet istraživanih svjetskih regija izdvojila je 37 FAS-ova detektiranih u uzorcima vode svih pet područja⁶⁹. Najčešće detektirani FAS-ovi uključili su nesteroidne protuupalne lijekove (diklofenak, ibuprofen, naproksen i paracetamol), antibiotike (sulfametoksazol, klaritromicin, sulfametazin i ciprofloksacin), spolne hormone (estron, $17\text{-}\alpha\text{-etinilestradiol}$, $17\text{-}\beta\text{-estradiol}$ i estriol), kardiovaskularne lijekove (atenolol, valsartan i

atorvastatin), psihoaktivne tvari (diazepam i kodein) te antiepileptik karbamazepin. Ovi podaci dobro se slažu s rezultatima velike međunarodne studije provedene u 258 svjetskih rijeka, kojom je obuhvaćen utjecaj na okoliš za 471,4 milijuna ljudi u 104 zemlje i 137 zemljopisne regije⁵². Istraživanje je uključilo analizu 61 FAS-a na više od 1000 lokacija, a najviše kumulativne koncentracije određene su u supsaharskoj Africi, južnoj Aziji i Južnoj Americi. Među najčešće detektiranim FAS-ovima izdvojili su se karbamazepin, metformin, kofein, nikotin, paracetamol i kotinin, dok su najviše koncentracije određene za paracetamol, kofein, metformin, feksofenadin, sulfametoksazol, metronidazol i gabapentin. Od svih istraživanih FAS-ova, najviša koncentracija određena je za paracetamol ($227 \mu\text{g L}^{-1}$) u malom zagađenom vodotoku La Paz u Boliviji.

Analiza literaturnih podataka (Tablica 4) dostupnih za FAS-ove i njihove metabolite uključene u ovu disertaciju (Tablica 1) također potvrđuje izrazitu varijabilnost koncentracija u prirodnim vodama te značajne razlike u broju podataka dostupnih za pojedine FAS-ove. Općenito, najviše podataka dostupno je za odabrane predstavnike antibiotika, posebice za sulfametoksazol, te za antiepileptik karbamazepin, dok su podaci za kvetiapin, loratadin, escitalopram, zolpidem te istraživane metabolite puno rjeđi. Mjerljive vrijednosti koncentracija odabranih spojeva u površinskim vodama kreću se u širokom rasponu od $< 1 \text{ ng L}^{-1}$ do nekoliko $\mu\text{g L}^{-1}$. Na većini lokacija koncentracije istraživanih FAS-ova bile su $< 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$, ali su mjestimično određene i više koncentracije za pojedine tvari. Muir i suradnici⁸ su odredili povišene koncentracije azitromicina ($1,1 \mu\text{g L}^{-1}$) i klaritromicina ($1,9 \mu\text{g L}^{-1}$) u Kanadi na lokaciji blizu ispusta u Desjardinski kanal, a slične koncentracije određene su i za bezvodni eritromicin ($1,6 \mu\text{g L}^{-1}$) u Kini⁷². Koncentracije psihostimulansa kofeina, koji u okoliš dospijeva pretežno nakon konzumacije kave i čaja, a tek manjim dijelom zbog konzumacije lijekova, povišene su na gotovo svim lokacijama uz visoku učestalost detekcije, dok su na pojedinim lokacijama u Armeniji izmjerene u vrijednostima i do $80 \mu\text{g L}^{-1}$ ⁵². Svakako treba spomenuti i povišene koncentracije tramadola u Češkoj, Poljskoj i Ujedinjenom Kraljevstvu gdje su masene koncentracije prelazile $7 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tablica 4). Zanimljivo je napomenuti da je broj dostupnih podataka o rasprostranjenosti valsartana, vrlo često propisivanog lijeka za bolesti krvožilnog sustava, izrazito malen, iako su na nekim lokacijama zabilježene relativno visoke koncentracije ($3,7 \mu\text{g L}^{-1}$) i visoka učestalost detekcije (Tablica 4).

Tablica 4. Rasponi masenih koncentracija i učestalost detekcije odabranih farmaceutski aktivnih spojeva i njihovih metabolita u kopnenim površinskim vodama. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
AML	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 18,4	42	Muir i sur. ⁸
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 30	50	Waldetoft i sur. ⁷³
AMOX	Australija	2005. – 2006.	<GK – 0,20	30	Watkinson i sur. ⁷⁴
	Italija	2007. – 2008.	<GK – 9,91	-	Zuccato i sur. ⁷⁵
	UK	2006.	<GK – 245	75	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	UK	2006. – 2007.	<GK – 622	40 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷
ATOR	J. Koreja	2008.	<GK – 15	80	Yoon i sur. ⁷⁸
	SAD	2006.	<GK – 10,3	10	Conley i sur. ⁷⁹
	SAD	2006. – 2007.	<GK – 101,3	5	Conley i sur. ⁸⁰
	Španjolska	2020.	<GK – 7	54	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2021.	<GK – 65	17	Richardson i sur. ⁸¹
AZI	Hrvatska	2016.	294,1 – 778,5	100	Malev i sur. ⁸²
	Japan	2006.	6,5 – 70	100	Nakada i sur. ⁸³
	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 1090	75	Muir i sur. ⁸
	Španjolska	2018. – 2019.	<GK – 11,2	14	Castaño-Ortiz i sur. ⁸⁴
	UK	2021.	<GK – 190	67	Richardson i sur. ⁸¹
CAFF	Albanija	2018.	<GK – 45,2	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Angola	2019.	<GK – 4710	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Antarktik	2018.	224 – 578	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Antigva	2018.	2010 – 7610	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Argentina	2018.	<GK – 10 500	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Armenija	2019.	98,2 – 79 600	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Australija	2018. – 2019.	<GK – 502	46	Wilkinson i sur. ⁵²
	Austrija	2018.	97,7 – 1240	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 498	45	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 23 900	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Brazil	2018. – 2019.	<GK – 1520	42	Wilkinson i sur. ⁵²
	Brunej	2018.	305 – 1200	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bugarska	2019.	1850 – 4500	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Burkina Faso	2019.	<GK – 5270	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	Butan	2019.	<GK – 226	70	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 3210	27	Wilkinson i sur. ⁵²
	Danska	2018.	63,7 – 64,7	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ekvador	2019.	53,2 – 7980	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Estonija	2019.	85,1 – 315	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Etiopija	2019.	5810 – 58 500	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Filipini	2019.	1530 – 15 700	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Francuska	2018.	<GK – 1010	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	185 – 6060	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Grčka	2018.	127 – 329	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gruzija	2019.	712 – 7670	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 3030	54	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hrvatska	2016.	2,5 – 78,4	100	Malev i sur. ⁸²
	Hrvatska	2019.	112 – 515	100	Wilkinson i sur. ⁵²
Indija	2018.	<GK – 30 600	68	Wilkinson i sur. ⁵²	
Indonezija	2018.	<GK – 13 600	70	Wilkinson i sur. ⁵²	
Japan	2006.	<GK – 2100	91	Nakada i sur. ⁸³	
Japan	2019.	35,3 – 1910	100	Wilkinson i sur. ⁵²	

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
CAFF	J. Afrika	2018.	<GK – 8430	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Koreja	2008.	38 – 250	100	Yoon i sur. ⁷⁸
	J. Koreja	2018.	88,7 – 213	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Sudan	2019.	<GK – 1970	13	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kamerun	2019.	<GK – 746	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2012. – 2014.	17 – 3280	100	Muir i sur. ⁸
	Kanada	2018.	<GK – 5480	55	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kazahstan	2018.	<GK – 700	78	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kina	2018.	105 – 17 700	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kolumbija	2018.	122 – 1660	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 6820	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kostarika	2019.	509 – 20 900	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Laos	2019.	90 – 190	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Latvija	2019.	237 – 568	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Lesoso	2019.	<GK – 340	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	<GK – 2330	71	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mađarska	2019.	141 – 487	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mali	2019.	180 – 7740	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Maroko	2019.	<GK – 43,8	17	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 11 800	94	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nizozemska	2018.	115 – 398	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 6060	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Obala Bjelokosti	2019.	<GK – 552	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	264 – 44 200	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Palestina	2018.	<GK – 22 700	94	Wilkinson i sur. ⁵²
	Panama	2019.	<GK – 3710	83	Wilkinson i sur. ⁵²
	Peru	2019.	<GK – 4150	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	<GK – 530	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Rumunjska	2019.	617 – 2670	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Rusija	2019.	42,9 – 1000	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ruvanda	2019.	<GK – 1000	63	Wilkinson i sur. ⁵²
	SAD	2006.	23,2 – 38,8	100	Conley i sur. ⁷⁹
	SAD	2006. – 2007.	<GK – 175,7	92	Conley i sur. ⁸⁰
	SAD	2013.	560 – 24 000	100	Du i sur. ⁸⁵
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 7360	51	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sj. Irska	2019.	808 – 2420	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Slovačka	2019.	87,5 – 572	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Srbija	2019.	619 – 3050	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018.	<GK – 6110	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2020.	<GK – 555	100	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Švedska	2018.	<GK – 195	88	Wilkinson i sur. ⁵²
	Švedska	2021. – 2022.	100 – 2400	100	Waldetoft i sur. ⁷³
	Švicarska	2018.	<GK – 655	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tajland	2018.	<GK – 466	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tajvan	2019.	314 – 1120	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tunis	2018.	<GK – 22 200	63	Wilkinson i sur. ⁵²
	Turska	2018.	205 – 7440	100	Wilkinson i sur. ⁵²
UK	2018. – 2019.	<GK – 1390	64	Wilkinson i sur. ⁵²	
Urugvaj	2019.	1420 – 25 700	100	Wilkinson i sur. ⁵²	
Zimbabve	2019.	<GK – 43,5	40	Wilkinson i sur. ⁵²	
CARB	Angola	2019.	<GK – 906	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Antigva	2018.	7,16 – 28,7	100	Wilkinson i sur. ⁵²

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
CARB	Argentina	2018.	12,9 – 113	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Armenija	2019.	6,9 – 84,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Australija	2018. – 2019.	<GK – 84,1	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Austrija	2018.	12,6 – 619	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bangladeš	2018.	<GK – 48	30	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	19,1 – 10 300	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 561	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Brazil	2018. – 2019.	<GK – 81,6	46	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bugarska	2019.	13,2 – 58,4	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Burkina Faso	2019.	<GK – 11	30	Wilkinson i sur. ⁵²
	Češka	2018.	22,2 – 36	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 1090	27	Wilkinson i sur. ⁵²
	Danska	2018.	4,96 – 54,4	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ekvador	2019.	<GK – 92,6	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Estonija	2019.	6,66 – 7,64	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Etiopija	2019.	15,5 – 99,6	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Filipini	2019.	<GK – 7,1	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Finska	2018.	<GK – 46	70	Wilkinson i sur. ⁵²
	Francuska	2007. – 2008.	<GK – 13,9	70	Vulliet i Cren-Olivé ⁸⁶
	Francuska	2018.	<GK – 37,3	73	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	27 – 103	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Grčka	2018.	3,7 – 11	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gruzija	2019.	8,28 – 25,4	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 173	62	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hrvatska	2016.	1,9 – 3,6	100	Malev i sur. ⁸²
	Hrvatska	2019.	5,01 – 30,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indija	2018.	<GK – 206	24	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indonezija	2018.	<GK – 8,18	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irak	2018.	4,71 – 76,8	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Iran	2018.	<GK – 2,2	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irska	2018.	97 – 140	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irska	2020. – 2022.	7,88 – 26,44	100	Regan i O'Flynn ⁸⁷
	Italija	2018.	7,43 – 10,8	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Izrael	2019.	59,4 – 1790	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Japan	2006.	<GK – 15	79	Nakada i sur. ⁸³
	J. Afrika	2018.	<GK – 405	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Afrika	2022.	67 – 157	100	Murgatroyd i sur. ⁸⁸
	J. Koreja	2008.	8,4 – 160	100	Yoon i sur. ⁷⁸
	J. Koreja	2018.	6,66 – 48,7	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Sudan	2019.	<GK – 50,6	38	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kamerun	2019.	<GK – 77,8	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2012. – 2014.	2,27 – 299	100	Muir i sur. ⁸
	Kanada	2018.	<GK – 26,7	23	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kazahstan	2018.	<GK – 24,4	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kenija	2018.	68,2 – 883	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kina	-	1,5 – 3	100	Weng i sur. ⁸⁹
	Kina	2013.	2,0 – 6,9	100	Liu i sur. ²⁰
	Kina	2013.	1,03 – 3,83	100	Liu i sur. ¹⁶
	Kina	2018.	<GK – 15,3	85	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kolumbija	2018.	1,89 – 9,42	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 131	68	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kostarika	2019.	7,03 – 159	100	Wilkinson i sur. ⁵²

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
CARB	Latvija	2019.	2,47 – 3,11	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Lesoso	2019.	34,6 – 47	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Liberija	2019.	<GK – 2,46	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Litva	2018.	<GK – 7,97	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	10,2 – 114	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mađarska	2019.	27,1 – 513	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Malezija	2018.	<GK – 29,2	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mali	2019.	<GK – 26,4	56	Wilkinson i sur. ⁵²
	Maroko	2019.	<GK – 71,2	83	Wilkinson i sur. ⁵²
	Meksiko	2018.	23,5 – 33,3	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 409	82	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nizozemska	2018.	45,2 – 203	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 804	81	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	3,34 – 156	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Palestina	2018.	717 – 1970	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Panama	2019.	<GK – 8,07	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Peru	2019.	<GK – 8,54	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Poljska	2007.	311 – 794	100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	Poljska	2018.	<GK – 449	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	<GK – 19	92	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	0,22 – 52,6	100	Kötke i sur. ⁹⁰
	Rumunjska	2014.	<GK – 40	85	Chitescu i sur. ⁹¹
	Rumunjska	2019.	16,5 – 19,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Rusija	2019.	7,67 – 13,6	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	SAD	2006.	4,09 – 5,62	100	Conley i sur. ⁷⁹
	SAD	2006. – 2007.	<GK – 23,1	80	Conley i sur. ⁸⁰
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 249,3	74	Batt i sur. ⁹²
	SAD	2013.	130 – 250	100	Du i sur. ⁸⁵
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 219	44	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sj. Irska	2019.	13,9 – 17,2	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Slovačka	2019.	20,8 – 59,6	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Slovenija	2018.	<GK – 2,74	22	Wilkinson i sur. ⁵²
	Srbija	2019.	5,1 – 18,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	-	15,0 – 38,6	100	Huerta i sur. ⁹³
	Španjolska	2009.	<GK – 38,8	26	Vazquez-Roig i sur. ⁵⁴
	Španjolska	2018.	11,2 – 147	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018. – 2019.	<GK – 16,9	14	Castaño-Ortiz i sur. ⁸⁴
	Španjolska	2020.	0,1 – 31	100	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Šri Lanka	2018.	2,09 – 74	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Švedska	2018.	<GK – 20,7	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 830	57	Waldetoft i sur. ⁷³
	Švicarska	2018.	5,43 – 16,9	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tajland	2018.	<GK – 140	63	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tajvan	2019.	5,1 – 34,8	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tanzanija	2018.	<GK – 34,1	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tunis	2018.	3,1 – 842	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Turska	2018.	1,47 – 190	100	Wilkinson i sur. ⁵²
UK	2006.	<GK – 9	50	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶	
UK	2006. – 2007.	<GK – 684	20 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷	
UK	2012.	6 – 344	100	Miller i sur. ⁹⁴	
UK	2018. – 2019.	<GK – 535	81	Wilkinson i sur. ⁵²	
UK	2021.	149 – 587	100	Richardson i sur. ⁸¹	
Ukrajina	2018.	<GK – 315	50	Wilkinson i sur. ⁵²	

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
CARB	Urugvaj	2019.	6,57 – 213	100	Wilkinson i sur. ⁵²
CARB-EP	Kina	-	<GK – 0,7	75	Weng i sur. ⁸⁹
	Španjolska	2020.	<GK – 22	54	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2021.	32 – 61	100	Richardson i sur. ⁸¹
OH-CARB	Kina	-	0,3 – 0,7	100	Weng i sur. ⁸⁹
CIP	Angola	2019.	<GK – 1570	13	Wilkinson i sur. ⁵²
	Australija	2005. – 2006.	<GK – 1,30	30	Watkinson i sur. ⁷⁴
	Austrija	2018.	<GK – 93,2	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bangladeš	2018.	<GK – 80,5	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 82	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Brazil	2018. – 2019.	<GK – 30,6	38	Wilkinson i sur. ⁵²
	Cipar	2018.	41,7 – 89,7	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Češka	2018.	14,3 – 31	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Etiopija	2019.	<GK – 195	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Finska	2018.	<GK – 74,1	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	<GK – 122	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gruzija	2018.	<GK – 62	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 351	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indija	2018.	<GK – 506,2	24	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irak	2018.	23,5 – 236	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irska	2020. – 2022.	3,2 – 19,29	100	Regan i O'Flynn ⁸⁷
	Italija	2007. – 2008.	<GK – 37,5	-	Zuccato i sur. ⁷⁵
	Izrael	2019.	<GK – 587	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 105	75	Muir i sur. ⁸
	Kenija	2018.	<GK – 205	88	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kina	2012.	<GK – 23,1	44	Zhao i sur. ⁷²
	Kongo	2019.	<GK – 149	4	Wilkinson i sur. ⁵²
	Laos	2019.	<GK – 81,4	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Malezija	2018.	21,5 – 136	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Meksiko	2018.	14,3 – 33,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 423	47	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 234	19	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	<GK – 58,6	44	Wilkinson i sur. ⁵²
	Palestina	2018.	<GK – 647	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Poljska	2018.	<GK – 193	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	<GK – 158	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Rumunjska	2014.	<GK – 6	5	Chitescu i sur. ⁹¹
	SAD	2006. – 2007.	<GK – 54,2	10	Conley i sur. ⁸⁰
SAD	2018. – 2019.	<GK – 361	20	Wilkinson i sur. ⁵²	
Španjolska	2009.	<GK – 34,6	3	Vazquez-Roig i sur. ⁵⁴	
Španjolska	2020.	<GK – 5	25	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷	
Švedska	2021. – 2022.	<GK – 220	20	Waldetoft i sur. ⁷³	
Tanzanija	2018.	<GK – 48	7	Wilkinson i sur. ⁵²	
CLA	Armenija	2019.	<GK – 251	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Austrija	2018.	<GK – 712	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 135	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 927	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bugarska	2019.	<GK – 139	63	Wilkinson i sur. ⁵²
	Češka	2018.	19 – 92,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 117	7	Wilkinson i sur. ⁵²
	Etiopija	2019.	<GK – 115	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gruzija	2019.	<GK – 214	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 329	38	Wilkinson i sur. ⁵²

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
CLA	Italija	2007. – 2008.	0,89 – 44,76	-	Zuccato i sur. ⁷⁵
	Irak	2018.	<GK – 76,1	42	Wilkinson i sur. ⁵²
	Izrael	2019.	<GK – 565	43	Wilkinson i sur. ⁵²
	Japan	2006.	12 – 60	100	Nakada i sur. ⁸³
	J. Koreja	2018.	<GK – 122	63	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 1940	75	Muir i sur. ⁸
	Kenija	2018.	<GK – 448	75	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kostarika	2019.	<GK – 857	17	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	<GK – 179	57	Wilkinson i sur. ⁵²
	Malezija	2018.	<GK – 39,1	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 58,9	12	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 337	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	<GK – 1300	89	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	0,01 – 4,65	100	Kötkea i sur. ⁹⁰
	Španjolska	-	7,7 – 32,8	100	Huerta i sur. ⁹³
	Španjolska	2020.	<GK – 21	21	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Šri Lanka	2018.	<GK – 56,7	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 110	60	Waldetoft i sur. ⁷³
	Tunis	2018.	<GK – 677	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	UK	2018. – 2019.	<GK – 570,0	38	Wilkinson i sur. ⁵²
UK	2021.	<GK – 151	50	Richardson i sur. ⁸¹	
Urugvaj	2019.	<GK – 742	33	Wilkinson i sur. ⁵²	
COC	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 65,7	42	Muir i sur. ⁸
	Španjolska	2012.	<GK – 103,0	29 – 86	Mendoza i sur. ⁹⁵
	Španjolska	2020.	<GK – 4	21	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2006. – 2007.	<GK – 4	11 – 45	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷
	UK	2021.	<GK – 28	67	Richardson i sur. ⁸¹
BE	Kanada	2012. – 2014.	0,300 – 460	100	Muir i sur. ⁸
	Španjolska	2012.	10,3 – 823,0	100	Mendoza i sur. ⁹⁵
	Španjolska	2020.	<GK – 90	96	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2006. – 2007.	<GK – 123	17 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷
	UK	2021.	<GK – 26	100	Richardson i sur. ⁸¹
COD	Austrija	2018.	<GK – 159	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 190	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 286	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bugarska	2019.	<GK – 19,4	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 97,4	27	Wilkinson i sur. ⁵²
	Danska	2018.	<GK – 16,7	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	<GK – 60,4	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 41,1	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hrvatska	2017.	1,1 – 4,0	100	Krizman-Matasic i sur. ⁷
	Indija	2018.	<GK – 95,1	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irak	2018.	<GK – 28,6	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Afrika	2018.	<GK – 645	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2018.	<GK – 69,2	14	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kenija	2018.	<GK – 111	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 19,4	7	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kostarika	2019.	<GK – 262	83	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	<GK – 121	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mali	2019.	<GK – 56	44	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 158	47	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 998	5	Wilkinson i sur. ⁵²
Pakistan	2018.	<GK – 223	89	Wilkinson i sur. ⁵²	

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
COD	Poljska	2007.	<GK – 15	50	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 231	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sj. Irska	2019.	30,5 – 43,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2009.	<GK – 62,7	59	Vazquez-Roig i sur. ⁵⁴
	Španjolska	2018.	<GK – 598	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2020.	<GK – 11	42	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Šri Lanka	2018.	<GK – 6,94	30	Wilkinson i sur. ⁵²
	Švedska	2018.	<GK – 21,6	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tunis	2018.	<GK – 459	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	UK	2006.	<GK – 34	50	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	UK	2006. – 2007.	<GK – 815	50 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁸
	UK	2018. – 2019.	<GK – 1560	79	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ukrajina	2018.	<GK – 91,6	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	norCOD	Hrvatska	2017.	<GK – 1,6	50
MOR	Hrvatska	2017.	<GK – 0,3	50	Krizman-Matasic i sur. ⁷
	Španjolska	2012.	5,9 – 148,0	86 – 100	Mendoza i sur. ⁹⁵
COT	Angola	2019.	<GK – 540	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Antarktik	2018.	17,54 – 60,75	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Antigva	2018.	267 – 297	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Argentina	2018.	<GK – 763	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Armenija	2019.	<GK – 1620	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Australija	2018. – 2019.	<GK – 26,5	12	Wilkinson i sur. ⁵²
	Austrija	2018.	<GK – 109	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 360	45	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 416	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Brazil	2018. – 2019.	<GK – 52,9	21	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bugarska	2019.	91,5 – 332	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Burkina Faso	2019.	<GK – 317	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 416	7	Wilkinson i sur. ⁵²
	Danska	2018.	<GK – 15,2	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ekvador	2019.	<GK – 57,3	30	Wilkinson i sur. ⁵²
	Etiopija	2019.	27,1 – 724	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Filipini	2019.	122 – 1310	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Finska	2018.	<GK – 57,8	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	<GK – 370	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Grčka	2018.	<GK – 16,9	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gruzija	2019.	82,2 – 211	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 24,4	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hrvatska	2016.	<GK – 17,0	50	Malev i sur. ⁸²
	Hrvatska	2019.	<GK – 44,2	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indija	2018.	<GK – 5020	48	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indonezija	2018.	<GK – 901	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Iran	2018.	<GK – 14,3	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Izrael	2019.	<GK – 9570	43	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Afrika	2018.	<GK – 168	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Koreja	2018.	<GK – 172	88	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Sudan	2019.	<GK – 102	63	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kamerun	2019.	<GK – 334	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2018.	<GK – 249	36	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kazahstan	2018.	<GK – 43,6	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kina	2018.	<GK – 2660	92	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 2060	71	Wilkinson i sur. ⁵²

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
COT	Kostarika	2019.	<GK – 304	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Lesoso	2019.	22,5 – 118	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Liberija	2019.	<GK – 20,3	30	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	49,8 – 2470	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mađarska	2019.	11,2 – 47,9	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mali	2019.	<GK – 311	78	Wilkinson i sur. ⁵²
	Maroko	2019.	<GK – 44,9	17	Wilkinson i sur. ⁵²
	Meksiko	2018.	18,5 – 64	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 420	94	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nizozemska	2018.	<GK – 52	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 21,9	5	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	33,3 – 2920	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Palestina	2018.	65 – 3760	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Panama	2019.	<GK – 27,4	17	Wilkinson i sur. ⁵²
	Peru	2019.	<GK – 28,2	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	<GK – 30,5	58	Wilkinson i sur. ⁵²
	Rumunjska	2019.	30,6 – 50,1	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Rusija	2019.	41,4 – 151	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ruvanda	2019.	<GK – 31,6	75	Wilkinson i sur. ⁵²
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 53,8	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sijera Leone	2018.	<GK – 28,1	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sj. Irska	2019.	<GK – 32,2	71	Wilkinson i sur. ⁵²
	Slovenija	2018.	<GK – 17,7	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Srbija	2019.	21,1 – 51,5	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018.	<GK – 245	70	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2020.	<GK – 123	100	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Šri Lanka	2018.	<GK – 45,7	10	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tajland	2018.	<GK – 73,6	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tunis	2018.	16 – 6290	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Turska	2018.	<GK – 778	89	Wilkinson i sur. ⁵²
	UK	2018. – 2019.	<GK – 56,6	21	Wilkinson i sur. ⁵²
	Urugvaj	2019.	29,3 – 671	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	DIA	Bangladeš	2018.	<GK – 50,8	30
Belgija		2018.	<GK – 4,01	15	Wilkinson i sur. ⁵²
Brazil		2018. – 2019.	<GK – 31,7	13	Wilkinson i sur. ⁵²
Gana		2018.	<GK – 170	33	Wilkinson i sur. ⁵²
Indija		2018.	<GK – 59,56	24	Wilkinson i sur. ⁵²
J. Koreja		2008.	<GK – 1,7	70	Yoon i sur. ⁷⁸
Kanada		2012. – 2014.	<GK – 1,45	50	Muir i sur. ⁸
Kanada		2018.	<GK – 3,79	5	Wilkinson i sur. ⁵²
Kenija		2018.	<GK – 29,1	13	Wilkinson i sur. ⁵²
Kongo		2019.	<GK – 15,7	14	Wilkinson i sur. ⁵²
Nigerija		2018.	<GK – 12,3	53	Wilkinson i sur. ⁵²
Njemačka		2018.	<GK – 851	14	Wilkinson i sur. ⁵²
Pakistan		2018.	<GK – 8,7	56	Wilkinson i sur. ⁵²
SAD		2018. – 2019.	<GK – 4,02	2	Wilkinson i sur. ⁵²
Španjolska		2009.	<GK – 8,6	32	Vazquez-Roig i sur. ⁵⁴
Španjolska		2012.	3,3 – 55,7	100	Mendoza i sur. ⁹⁵
Španjolska		2018.	<GK – 11,1	60	Wilkinson i sur. ⁵²
Španjolska		2020.	<GK – 19	67	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
Tajland		2018.	<GK – 4,47	13	Wilkinson i sur. ⁵²
UK		2012.	<GK – 4	88	Miller i sur. ⁹⁴

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
DIA	UK	2018. – 2019.	<GK – 4,65	2	Wilkinson i sur. ⁵²
TEM	Australija	2018. – 2019.	<GK – 503	15	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 188	55	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nizozemska	2018.	<GK – 1380	56	Wilkinson i sur. ⁵²
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 652	23	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2020.	<GK – 53	83	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2012.	<GK – 67	88	Miller i sur. ⁹⁴
	UK	2018. – 2019.	<GK – 867	2	Wilkinson i sur. ⁵²
	UK	2021.	17 – 29	100	Richardson i sur. ⁸¹
OXA	Francuska	2007. – 2008.	<GK – 25,1	27	Vulliet i Cren-Olivé ⁸⁶
	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 162	75	Muir i sur. ⁸
	Španjolska	2020.	<GK – 44	75	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 730	57	Waldetoft i sur. ⁷³
ERY	Argentina	2018.	<GK – 40,2	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Austrija	2018.	<GK – 170	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Belgija	2018.	<GK – 73,3	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 30	13	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	<GK – 1590	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 66,6	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indija	2018.	<GK – 90,1	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irak	2018.	<GK – 307	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irska	2020. – 2022.	<GK – 55,25	17	Regan i O'Flynn ⁸⁷
	Italija	2007. – 2008.	0,78 – 8,12	-	Zuccato i sur. ⁷⁵
	Kenija	2018.	<GK – 1520	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kina	2013.	13,0 – 85,3	100	Liu i sur. ²⁰
	Kina	2013.	4,12 – 10,22	100	Liu i sur. ¹⁶
	Kina	2018.	<GK – 729	23	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 1890	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	<GK – 236	6	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	<GK – 204	89	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	<GK – 3,76	80	Kötkea i sur. ⁹⁰
	SAD	2013.	19 – 53	100	Du i sur. ⁸⁵
	SAD	2015.	2 – 83	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 18,6	2	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018. – 2019.	<GK – 8,6	29	Castaño-Ortiz i sur. ⁸⁴
	Španjolska	2020.	<GK – 7	33	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
Švedska	2021. – 2022.	<GK – 68	40	Waldetoft i sur. ⁷³	
Tanzanija	2018.	<GK – 9,79	13	Wilkinson i sur. ⁵²	
Tunis	2018.	<GK – 124	25	Wilkinson i sur. ⁵²	
UK	2018. – 2019.	<GK – 330,96	19	Wilkinson i sur. ⁵²	
ERY-H2O	Italija	2007. – 2008.	1,66 – 30,52	-	Zuccato i sur. ⁷⁵
	Kanada	2012. – 2014.	2,46 – 89,7	100	Muir i sur. ⁸
	Kina	2012.	<GK – 1578	83	Zhao i sur. ⁷²
	UK	2006.	<GK – 22	50	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	UK	2006. – 2007.	<GK – 351	40 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷
ESC	Kina	-	<GK – 1,1	95	Weng i sur. ⁸⁹
LOR	Hong Kong	2018.	<GK – 40,9	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hrvatska	2016.	1,9 – 2,1	100	Malev i sur. ⁸²
	Palestina	2018.	<GK – 58,4	81	Wilkinson i sur. ⁵²
MDMA	Hrvatska	2015.	2,2 – 8,6	100	Senta i sur. ⁹⁷
	Hrvatska	2016.	<GK – 0,6	50	Malev i sur. ⁸²
	Španjolska	2012.	<GK – 40,2	86 – 100	Mendoza i sur. ⁹⁵
	UK	2021.	11 – 64	100	Richardson i sur. ⁸¹

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
MTHD	Španjolska	2012.	6,3 – 54,8	100	Mendoza i sur. ⁹⁵
	Španjolska	2020.	<GK – 9	25	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
EDDP	Hrvatska	2017.	0,9 – 1,7	100	Krizman-Matasic i sur. ⁷
	Španjolska	2012.	20,7 – 151,0	100	Mendoza i sur. ⁹⁵
NOR	Australija	2005. – 2006.	<GK – 1,15	78	Watkinson i sur. ⁷⁴
	Hrvatska	2016.	<GK – 5,5	50	Malev i sur. ⁸²
	Kina	2012.	<GK – 97,1	67	Zhao i sur. ⁷²
	Španjolska	2009.	<GK – 37,2	26	Vazquez-Roig i sur. ⁵⁴
QUE	Španjolska	2020.	<GK – 1	25	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
SER	Češka	2012. – 2013.	<GK – 22	83	Grabicová i sur. ²²
	Kanada	2012. – 2014.	0,163 – 40,3	100	Muir i sur. ⁸
	Kina	-	0,3 – 1,1	100	Weng i sur. ⁸⁹
	SAD	2005. – 2006.	<GK – 37,5	94	Schultz i sur. ⁹⁸
	SAD	2006. – 2007.	<GK – 12,4	3	Conley i sur. ⁸⁰
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 19	1	Batt i sur. ⁹²
	SAD	2015.	<GK – 218	-	Armnok i sur. ⁹⁶
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 140	43	Waldetoft i sur. ⁷³
norSER	Kina	-	<GK – 5,9	75	Weng i sur. ⁸⁹
	SAD	2005. – 2006.	<GK – 26,7	75	Schultz i sur. ⁹⁸
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 7	0,5	Batt i sur. ⁹²
SMX	Angola	2019.	<GK – 2690	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Antigva	2018.	<GK – 40,3	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Argentina	2018.	<GK – 765	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Armenija	2019.	<GK – 283	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Australija	2005. – 2006.	<GK – 2,00	73	Watkinson i sur. ⁷⁴
	Benin	2019.	<GK – 16	38	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 6550	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bugarska	2019.	29,9 – 77,6	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Burkina Faso	2019.	<GK – 541	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	Češka	2018.	8,15 – 23,4	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 134	27	Wilkinson i sur. ⁵²
	Danska	2018.	<GK – 14,7	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ekvador	2019.	<GK – 742	80	Wilkinson i sur. ⁵²
	Etiopija	2019.	119 – 805	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Filipini	2019.	<GK – 135	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Francuska	2007. – 2008.	<GK – 3,0	66	Vulliet i Cren-Olivé ⁸⁶
	Francuska	2018.	21,5 – 32,4	13	Wilkinson i sur. ⁵²
	Gana	2018.	322 – 9810	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 90,4	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Indija	2018.	<GK – 973	52	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irak	2018.	<GK – 180	92	Wilkinson i sur. ⁵²
	Irska	2020. – 2022.	69,32 – 290,25	100	Regan i O'Flynn ⁸⁷
	Italija	2007. – 2008.	1,83 – 11,40	-	Zuccato i sur. ⁷⁵
	Izrael	2019.	<GK – 674	43	Wilkinson i sur. ⁵²
	Japan	2006.	<GK – 160	15	Nakada i sur. ⁸³
	J. Afrika	2018.	<GK – 2260	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Afrika	2022.	69 – 138	100	Murgatroyd i sur. ⁸⁸
	J. Koreja	2008.	<GK – 190	90	Yoon i sur. ⁷⁸
	J. Koreja	2018.	<GK – 25,5	88	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Sudan	2019.	<GK – 977	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kamerun	2019.	<GK – 2020	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 441	92	Muir i sur. ⁸

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
SMX	Kanada	2018.	<GK – 29,6	9	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kazahstan	2018.	<GK – 62,2	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kenija	2018.	203 – 15 400	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kina	2012.	<GK – 150	79	Zhao i sur. ⁷²
	Kina	2018.	<GK – 131	46	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kolumbija	2018.	<GK – 25,1	17	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 16 700	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kostarika	2019.	<GK – 935	83	Wilkinson i sur. ⁵²
	Lesoso	2019.	484 – 1200	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Liberija	2019.	19,2 – 192	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	<GK – 32,3	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mađarska	2019.	10,2 – 107	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Malezija	2018.	<GK – 20,6	90	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mali	2019.	5,53 – 1190	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Maroko	2019.	<GK – 82,5	33	Wilkinson i sur. ⁵²
	Meksiko	2018.	38,6 – 271	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nigerija	2018.	51,2 – 4610	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nizozemska	2018.	<GK – 38,8	56	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 922	62	Wilkinson i sur. ⁵²
	Pakistan	2018.	<GK – 3000	89	Wilkinson i sur. ⁵²
	Palestina	2018.	<GK – 215	88	Wilkinson i sur. ⁵²
	Panama	2019.	<GK – 27,4	50	Wilkinson i sur. ⁵²
	Peru	2019.	<GK – 21	40	Wilkinson i sur. ⁵²
	Poljska	2007.	26 – 60	100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	Poljska	2018.	<GK – 76,2	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Portugal	2018.	0,09 – 12,9	100	Kötkea i sur. ⁹⁰
	Rumunjska	2014.	<GK – 30	90	Chitescu i sur. ⁹¹
	Rumunjska	2019.	11,5 – 26,5	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Ruvanda	2019.	<GK – 190	75	Wilkinson i sur. ⁵²
	SAD	2006.	5,81 – 9,51	100	Conley i sur. ⁷⁹
	SAD	2006. – 2007.	<GK – 33,0	86	Conley i sur. ⁸⁰
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 576,4	78	Batt i sur. ⁹²
	SAD	2013.	220 – 670	100	Du i sur. ⁸⁵
	SAD	2015.	3 – 260	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 410	43	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sj. Irska	2019.	4,27 – 6,92	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Slovačka	2019.	5,79 – 25,2	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Srbija	2019.	7,13 – 22	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	-	9,0 – 23,2	100	Huerta i sur. ⁹³
	Španjolska	2009.	<GK – 15,6	32	Vazquez-Roig i sur. ⁵⁴
	Španjolska	2018.	<GK – 600	70	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018. – 2019.	<GK – 4,9	29	Castaño-Ortiz i sur. ⁸⁴
	Španjolska	2020.	<GK – 66	79	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Šri Lanka	2018.	<GK – 21,7	60	Wilkinson i sur. ⁵²
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 710	57	Waldetoft i sur. ⁷³
	Tajvan	2019.	10,7 – 33,5	100	Wilkinson i sur. ⁵²
Tanzanija	2018.	<GK – 1290	87	Wilkinson i sur. ⁵²	
Tunis	2018.	<GK – 303	13	Wilkinson i sur. ⁵²	
Turska	2018.	<GK – 90,7	67	Wilkinson i sur. ⁵²	
UK	2006. – 2007.	<GK – 4	11 – 67	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷	
UK	2018. – 2019.	<GK – 54,9	28	Wilkinson i sur. ⁵²	
UK	2021.	16 – 78	100	Richardson i sur. ⁸¹	
Urugvaj	2019.	<GK – 231	67	Wilkinson i sur. ⁵²	

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
<i>N</i> -Ac-SMX	Španjolska	2020.	<GK – 6	33	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
SPY	Kina	2012.	<GK – 30,1	62	Zhao i sur. ⁷²
	Poljska	2007.	14 – 39	100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	Španjolska	2020.	<GK – 53	100	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2006.	<GK – 10	50	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	UK	2006. – 2007.	<GK – 142	27 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷
	UK	2021.	35 – 222	100	Richardson i sur. ⁸¹
TRAM	Antigva	2018.	<GK – 36,7	67	Wilkinson i sur. ⁵²
	Bolivija	2019.	<GK – 80,7	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	Češka	2012. – 2013.	2,0 – 2100	100	Grabicová i sur. ²²
	Čile	2018. – 2019.	<GK – 413	27	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hong Kong	2018.	<GK – 303	31	Wilkinson i sur. ⁵²
	Hrvatska	2017.	23 – 72	100	Krizman-Matasic i sur. ⁷
	Irak	2018.	<GK – 100	42	Wilkinson i sur. ⁵²
	J. Koreja	2018.	17 – 130	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kamerun	2019.	<GK – 467	29	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kanada	2018.	<GK – 139	9	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kenija	2018.	<GK – 112	13	Wilkinson i sur. ⁵²
	Kongo	2019.	<GK – 236	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Luksemburg	2019.	<GK – 215	86	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mađarska	2019.	24,6 – 93,3	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Mali	2019.	<GK – 121	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Nizozemska	2018.	<GK – 226	22	Wilkinson i sur. ⁵²
	Njemačka	2018.	<GK – 683	48	Wilkinson i sur. ⁵²
	Poljska	2007.	425 – 2108	100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 1380	19	Wilkinson i sur. ⁵²
	Sj. Irska	2019.	44,6 – 72,9	100	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018.	<GK – 2950	70	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2020.	0,3 – 427	100	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 880	57	Waldetoft i sur. ⁷³
	Tajland	2018.	<GK – 17,3	13	Wilkinson i sur. ⁵²
	Tunis	2018.	<GK – 167	25	Wilkinson i sur. ⁵²
	Turska	2018.	<GK – 157	44	Wilkinson i sur. ⁵²
	UK	2006.	<GK – 252	75	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
UK	2006. – 2007.	<GK – 7731	82 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷	
UK	2018. – 2019.	<GK – 1330	4	Wilkinson i sur. ⁵²	
UK	2021.	141 – 312	100	Richardson i sur. ⁸¹	
<i>O</i> -DM-TRAM	Hrvatska	2017.	7,6 – 10	100	Krizman-Matasic i sur. ⁷
<i>N</i> -DM-TRAM	Hrvatska	2017.	4,2 – 5,3	100	Krizman-Matasic i sur. ⁷
VAL	Kanada	2012. – 2014.	2,04 – 3660	100	Muir i sur. ⁸
	Poljska	2007.	20 – 133	100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 319,4	39	Batt i sur. ⁹²
	Španjolska	2018. – 2019.	18,4 – 71,3	100	Castaño-Ortiz i sur. ⁸⁴
	Španjolska	2020.	<GK – 409	100	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	UK	2006.	<GK – 14	75	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁶
	UK	2006. – 2007.	<GK – 144	67 – 100	Kasprzyk-Hordern i sur. ⁷⁷
VER	Austrija	2018.	<GK – 18	14	Wilkinson i sur. ⁵²
	Izrael	2019.	<GK – 4,3	14	Wilkinson i sur. ⁵²
	Japan	2006.	<GK – 0,4	3	Nakada i sur. ⁸³
	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 7,45	42	Muir i sur. ⁸
	Njemačka	2018.	<GK – 767	5	Wilkinson i sur. ⁵²

Tablica 4. nastavak

FAS	Država	Godina uzorkovanja	Raspon masenih koncentracija $\gamma / \text{ng L}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
VER	Panama	2019.	<GK – 2,39	17	Wilkinson i sur. ⁵²
	Peru	2019.	<GK – 2,4	20	Wilkinson i sur. ⁵²
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 35,8	21	Batt i sur. ⁹²
	SAD	2018. – 2019.	<GK – 32,1	11	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2018.	<GK – 29,2	30	Wilkinson i sur. ⁵²
	Španjolska	2020.	<GK – 0,1	8	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Tunis	2018.	<GK – 3,18	25	Wilkinson i sur. ⁵²
norVER	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 1,3	42	Muir i sur. ⁸
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 30,4	10	Batt i sur. ⁹²
WAR	Kanada	2012. – 2014.	<GK – 13,5	42	Muir i sur. ⁸
	SAD	2008. – 2009.	<GK – 131,3	1	Batt i sur. ⁹²
	Španjolska	2020.	<GK – 1	79	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 15	50	Waldetoft i sur. ⁷³
	UK	2012.	<GK – 53	100	Miller i sur. ⁹⁴
ZOLP	Španjolska	2020.	<GK – 0,2	8	Martínez-Megías i sur. ⁵⁷
	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 4,1	28	Waldetoft i sur. ⁷³

GK, granica kvantifikacije; J, južna/južni; Sj, sjeverna; SAD, Sjedinjene Američke Države; UK, Ujedinjeno Kraljevstvo

Iako je informacija o koncentraciji FAS-ova u površinskoj vodi koristan podatak o izloženosti vodenih organizama, ona sama po sebi ne govori puno o stvarnom učinku na izložene organizme.

S obzirom na to da FAS-ovi uglavnom pripadaju skupini ionskih organskih spojeva, modeli razvijeni za procjenu bioakumulacijskog ponašanja klasičnih lipofilnih organskih zagađivala, uglavnom nisu prikladni za procjenu njihovog bioakumulacijskog potencijala i toksičnog efekta. Zbog toga bi se istraživanje bioakumulacije FAS-ova i stvarnog učinka izloženosti na živi organizam trebalo temeljiti na sustavnom određivanju koncentracija FAS-ova u bioti, istraživanju kinetike akumulacije i depuracije te doprinosa metaboličkih transformacija depuracijskim mehanizmima i ekotoksikološkim ispitivanjima^{18,99}. Literaturni podaci o rasprostranjenosti FAS-ova u bioti potvrđuju da se dio opterećenja iz vodenog stupca prenosi u organizme. Kod viših organizama kao što su ribe, dominantni putevi unosa FAS-ova uključuju akumulaciju preko škrga i kože te kroz prehranu, dok je raspodjela među tkivima određena prokrvljenošću, propusnošću membrana, afinitetom vezanja FAS-ova na proteine i/ili lipide te sposobnošću metaboličke transformacije i izlučivanja tih spojeva.

U tablici 5 prikazan je pregled literaturnih podataka o rasponima masenih udjela izabranih FAS-ova i njihovih metabolita (Tablica 1) u istraživanim tkivima i tjelesnim tekućinama (krv i žuč) slatkovodnih riba i drugih istraživanih organizama. Koncentracije FAS-ova i njihovih metabolita najčešće su bile reda veličine $\mu\text{g kg}^{-1}$, odnosno $\mu\text{g L}^{-1}$ za uzorke žuči i plazme.

Najviše podataka pronađeno je za sertralin ($n = 36$), karbamazepin ($n = 35$), norsertralin ($n = 18$) i eritromicin ($n = 16$). Istraživanja su primarno usmjerena na istraživanje koncentracija FAS-ova u ribama, no za pojedine spojeve dostupne su i informacije o koncentracijama u drugim taksonomskim skupinama vodenih organizama kao što su rakušci, mekušci (školjkaši i puževi) i vodozemci (žabe). Kada su u pitanju ribe, za većinu spojeva dostupni su podaci o koncentracijama FAS-ova u različitim tkivima, a najčešće analizirana tkiva su mišić i jetra. Rane studije^{19,100} temeljile su se uglavnom na analizi ribljeg mišića, dok su novija istraživanja^{72,96,99} usmjerena na tkivno-specifičnu distribuciju FAS-ova, što daje bolji uvid u njihov bioakumulacijski potencijal te omogućuje pouzdaniju procjenu rizika. U globalu, najviše koncentracije FAS-ova određene su u jetri i bubrezima riba, dok su u mišiću i škragama uglavnom niže^{22,101,102} (Tablica 5). Liu i suradnici¹⁰¹ pokazali su kako antibiotici imaju afinitet prema bioakumulaciji u jetri i bubrezima, pri čemu su makrolidni antibiotici pokazali veći afinitet za akumulaciju u bubrezima, a sulfonamidi, trimetoprim i fluorokinoloni u jetri. Slične rezultate objavili su i Zhang i suradnici¹⁰² koji su uočili afinitet amidnog antibiotika kloramfenikola za bioakumulaciju u žuči, za razliku od njegovih strukturnih analoga, fluorfenikola i tiamfenikola, koji su se dominantno akumulirali u jetri ribe, a što dodatno potvrđuje važnost sustavnog ispitivanja koncentracija po tkivima umjesto oslanjanja na teorijske pretpostavke i modele.

Tablica 5. Rasponi masenih udjela i učestalost detekcije farmaceutski aktivnih spojeva i njihovih metabolita u tkivima i tjelesnim tekućinama slatkovodnih organizama. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
AML	Rakušci	Meko tkivo	UK	2021.	11 – 24	100	Richardson i sur. ⁸¹
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	0,013 – 0,126*	33	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 1,33	2	Edwards i sur. ¹⁰³
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 2,49	71	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
AMOX	Puževi	Meko tkivo ⁺	Malezija	-	0,29 – 0,58	100	Omar i sur. ¹⁰⁵
	Ribe	Mišić ⁺	Malezija	-	0,29 – 3,66	100	Omar i sur. ¹⁰⁵
ATOR	Žabe	Mišić ⁺	Argentina	2018.	<GK – 2,08	71	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 7,50	43	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
AZI	Kukci	Cijelo tijelo	Češka	2013.	33 – 93	100	Grabicová i sur. ¹⁰⁶
	Ribe	Plazma	Češka	2012.	<GK – 19*	10	Cervený i sur. ¹⁰⁷
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	0,109 – 52,7*	100	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	<GK – 11,00	75	de Solla i sur. ²¹
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 24,4	43	Edwards i sur. ¹⁰³
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 5,88	100	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
CAFF	Puževi	Meko tkivo	SAD	2011.	5,6 – 9,6	-	Du i sur. ¹⁰⁸
	Ribe	Gonade ⁺	SAD	2015.	1,3 – 140,1	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	Ribe	Jetra	Argentina	2016.	<GK – 13,0	67	Ondarza i sur. ¹⁰⁹
	Ribe	Jetra ⁺	SAD	2015.	2,4 – 869,7	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	Ribe	Mišić	Argentina	2016.	0,8 – 6,1	100	Ondarza i sur. ¹⁰⁹
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2015.	1,6 – 60,7	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	Ribe	Mozak ⁺	SAD	2015.	5,8 – 278,6	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	0,014 – 1,440*	100	Malev i sur. ⁸²
	Ribe	Plazma	Kanada	2014.	<GK – 5,05	60	Muir i sur. ⁸
	Ribe	Škrge	Argentina	2016.	<GK – 6,7	33	Ondarza i sur. ¹⁰⁹
CARB	Puževi	Meko tkivo	SAD	2011.	1,11 – 1,29	-	Du i sur. ¹⁰⁸
	Rakušci	Cijelo tijelo	Francuska	2022.	<GK – 0,9	50	Duny i sur. ¹¹⁰
	Rakušci	Cijelo tijelo ⁺	UK	2012.	<GK – 6	62	Miller i sur. ⁹⁴
	Rakušci	Mišić ⁺	Južna Afrika	2022.	1879 – 5695	100	Murgatroyd i sur. ⁸⁸
	Ribe	Bubreg	Japan	2013. – 2014.	<GK – 0,180	96	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Gonade ⁺	SAD	2015.	0,4 – 6,6	-	Arnnok i sur. ⁹⁶

Tablica 5. nastavak

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor	
CARB	Ribe	Jetra	Japan	2013. – 2014.	<GK – 0,204	96	Tanoue i sur. ⁹⁹	
	Ribe	Jetra	Japan	2013.	<GK – 0,11	43	Tanoue i sur. ¹¹¹	
	Ribe	Jetra	Kina	2013.	0,8 – 1,6	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Jetra	SAD	2008.	<GK – 1,1	60	Du i sur. ¹¹²	
	Ribe	Jetra	SAD	2021.	<GK – 0,5	13	Sims i sur. ¹¹³	
	Ribe	Jetra	SAD	2010.	<GK – 0,92	-	Garcia i sur. ¹¹⁴	
	Ribe	Jetra ⁺	SAD	2006.	<GK – 8	-	Ramirez i sur. ¹¹⁵	
	Ribe	Jetra ⁺	Španjolska	2010.	<GK – 20,3	-	Huerta i sur. ³²	
	Ribe	Mišić	Japan	2013. – 2014.	<GK – 0,050	92	Tanoue i sur. ⁹⁹	
	Ribe	Mišić	Kina	2013.	0,1 – 0,2	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Mišić ⁺	Kina	-	2,4 – 63,8	100	Weng i sur. ⁸⁹	
	Ribe	Mišić	SAD	-	0,83 – 1,44	-	Ramirez i sur. ¹⁰⁰	
	Ribe	Mišić	SAD	2008.	<GK – 0,60	40	Du i sur. ¹¹²	
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2006.	<GK – 3,1	20	Ramirez i sur. ¹¹⁵	
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2008. – 2009.	<GK – 8,2	17	Huerta i sur. ⁵⁰	
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2010.	<GK – 1,54	-	Garcia i sur. ¹¹⁴	
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2015.	0,04 – 3,8	-	Arnnok i sur. ⁹⁶	
	Ribe	Mozak	Japan	2013.	<GK – 0,11	71	Tanoue i sur. ¹¹¹	
	Ribe	Mozak	Japan	2013. – 2014.	0,021 – 0,165	100	Tanoue i sur. ⁹⁹	
	Ribe	Mozak	Kina	2013.	0,1 – 1,0	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Mozak ⁺	SAD	2015.	0,5 – 1,6	-	Arnnok i sur. ⁹⁶	
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,180*	58	Malev i sur. ⁸²	
	Ribe	Plazma	Japan	2013.	0,030 – 0,055	100	Tanoue i sur. ¹¹¹	
	Ribe	Plazma	Japan	2011. – 2014.	<GK – 0,054*	79	Tanoue i sur. ⁹⁹	
	Ribe	Plazma	SAD	2010.	<GK – 921,6	-	Garcia i sur. ¹¹⁴	
	Ribe	Plazma	UK	2011.	<GK – 4,4*	23	Cervený i sur. ¹⁰⁷	
	Ribe	Škrge	Japan	2013. – 2014.	<GK – 0,117	75	Tanoue i sur. ⁹⁹	
	Ribe	Škrge	Kina	2013.	<GK – 0,7	75	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Žabe	Mišić ⁺	Argentina	2018.	0,44 – 13,9	100	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
	OH-CARB	Ribe	Mišić ⁺	Kina	-	<GK – 0,6	88	Weng i sur. ⁸⁹
Ribe		Mišić ⁺	SAD	2008. – 2009.	<GK – 2,5	20	Huerta i sur. ⁵⁰	
CIP	Ribe	Mišić ⁺	Kina	2008. – 2010.	<GK – 12,5	35	Gao i sur. ¹⁹	

Tablica 5. nastavak

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
CIP	Ribe	Mišić	Saudijska Arabija	2021.	<GK – 60,4	40 – 50	Shaaban i Mostafa ¹¹⁶
	Ribe	Jetra	Kina	2012.	<GK – 2,44	8	Zhao i sur. ⁷²
	Ribe	Mišić	Kina	2012.	<GK – 1,26	5	Zhao i sur. ⁷²
	Ribe	Plazma	Kina	2012.	<GK – 4,55*	10	Zhao i sur. ⁷²
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 3,36*	83	Malev i sur. ⁸²
	Ribe	Žuč	Kina	2012.	<GK – 51,3*	12	Zhao i sur. ⁷²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 44,5	8	Edwards i sur. ¹⁰³
CLA	Kukci	Cijelo tijelo	Češka	2013.	<GK – 4,8	69	Grabicová i sur. ¹⁰⁶
	Rakušci	Meko tkivo	UK	2021.	6 – 15	100	Richardson i sur. ⁸¹
	Ribe	Mišić	Saudijska Arabija	2021.	<GK – 43,5	6 – 60	Shaaban i Mostafa ¹¹⁶
	Ribe	Plazma	Češka	2012.	<GK – 11*	40	Cervený i sur. ¹⁰⁷
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 3,65*	83	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	<GK – 9,04	100	de Solla i sur. ²¹
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	0,63 – 1,23	100	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
	Žabe	Mišić ⁺	Argentina	2018.	0,75 – 2,87	100	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
COC	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,014*	8	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	0,16 – 0,55	100	de Solla i sur. ²¹
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 0,347	23	Edwards i sur. ¹⁰³
BE	Ribe	Jetra	SAD	2021.	<GK – 0,57	9	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,021*	17	Malev i sur. ⁸²
COD	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,329*	83	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	<GK – 14,6	75	de Solla i sur. ²¹
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 3,02	1	Edwards i sur. ¹⁰³
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 5,82	71	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
MOR	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,022*	42	Malev i sur. ⁸²
COT	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,286*	92	Malev i sur. ⁸²
DIA	Rakušci	Cijelo tijelo ⁺	UK	2012.	<GK – 9	50	Miller i sur. ⁹⁴
	Ribe	Jetra	SAD	2008.	<GK – 10	60	Du i sur. ¹¹²
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2008. – 2009.	<GK – 1,9	4	Huerta i sur. ⁵⁰
OXA	Ribe	Plazma	Češka	2012.	<GK – 25*	30	Cervený i sur. ¹⁰⁷
	Ribe	Plazma	Kanada	2014.	<GK – 33,7	95	Muir i sur. ⁸
ERY	Ribe	Gonade ⁺	SAD	2015.	1,1 – 28,7	-	Arnnok i sur. ⁹⁶

Tablica 5. nastavak

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor	
ERY	Ribe	Cijelo tijelo	SAD	2013.	<GK – 4,0	87	Du i sur. ⁸⁵	
	Ribe	Jetra	Argentina	2016.	0,92 – 5,60	100	Ondarza i sur. ¹⁰⁹	
	Ribe	Jetra	Kina	2013.	0,3 – 25,7	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Jetra ⁺	SAD	2015.	5,2 – 46,9	-	Arnnok i sur. ⁹⁶	
	Ribe	Mišić	Argentina	2016.	1,00 – 1,90	100	Ondarza i sur. ¹⁰⁹	
	Ribe	Mišić ⁺	Kina	2008. – 2010.	<GK – 45,1	29	Gao i sur. ¹⁹	
	Ribe	Mišić	Kina	2013.	0,7 – 8,4	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2015.	1,6 – 2,9	-	Arnnok i sur. ⁹⁶	
	Ribe	Mozak	Kina	2013.	0,4 – 3,7	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Mozak ⁺	SAD	2015.	3,7 – 31,7	-	Arnnok i sur. ⁹⁶	
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 12,7*	92	Malev i sur. ⁸²	
	Ribe	Škrge	Argentina	2016.	0,68 – 2,00	100	Ondarza i sur. ¹⁰⁹	
	Ribe	Škrge	Kina	2013.	1,2 – 25,7	100	Liu i sur. ²⁰	
	Ribe	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	<GK – 1,64	50	de Solla i sur. ²¹
	Ribe	Žabe	Mišić ⁺	Argentina	2018.	<GK – 6,73	86	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
ERY-H2O	Ribe	Jetra	Kina	2012.	<GK – 2390	90	Zhao i sur. ⁷²	
	Ribe	Mišić	Kina	2012.	<GK – 2,36	49	Zhao i sur. ⁷²	
	Ribe	Plazma	Kanada	2014.	<GK – 0,791	95	Muir i sur. ⁸	
	Ribe	Plazma	Kina	2012.	<GK – 545*	92	Zhao i sur. ⁷²	
	Ribe	Žuč	Kina	2012.	<GK – 285*	79	Zhao i sur. ⁷²	
	Ribe	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 1,52	24	Edwards i sur. ¹⁰³
ESC	Ribe	Mišić ⁺	Kina	-	<GK – 0,8	88	Weng i sur. ⁸⁹	
LOR	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,038*	25	Malev i sur. ⁸²	
	Žabe	Jetra ⁺	Argentina	2018.	<GK – 2,53	14	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴	
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 7,55	33	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴	
DLOR	Ribe	Plazma	Češka	2012.	<GK – 0,90*	10	Cervený i sur. ¹⁰⁷	
	Ribe	Plazma	UK	2011.	<GK – 2,6*	0,3	Cervený i sur. ¹⁰⁷	
	Žabe	Jetra ⁺	Argentina	2018.	<GK – 88,5	43	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴	
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 2,87	71	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴	
MDMA	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,079*	67	Malev i sur. ⁸²	
NOR	Ribe	Jetra	Kina	2012.	<GK – 7,67	9	Zhao i sur. ⁷²	
	Ribe	Mišić ⁺	Kina	2008. – 2010.	<GK – 63,5	59	Gao i sur. ¹⁹	

Tablica 5. nastavak

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
NOR	Ribe	Mišić	Saudijska Arabija	2021.	<GK – 52,3	30 – 50	Shaaban i Mostafa ¹¹⁶
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 1,44*	83	Malev i sur. ⁸²
	Ribe	Žuč	Kina	2012.	<GK – 83,0*	47	Zhao i sur. ⁷²
OXCARB	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,029*	42	Malev i sur. ⁸²
RAM	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,425*	25	Malev i sur. ⁸²
SER	Kukci	Cijelo tijelo	Češka	2013.	3,5 – 7,1	100	Grabicová i sur. ¹⁰⁶
	Pijavice	Cijelo tijelo	Češka	2013.	1,6 – 6,8	100	Grabicová i sur. ¹⁰⁶
	Ribe	Bubreg	Češka	2012. – 2013.	<GK – 71	100	Grabicová i sur. ²²
	Ribe	Bubreg	Japan	2013. – 2014.	0,8 – 23,6	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Bubreg	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 9,0	25	Waldetoft i sur. ⁷³
	Ribe	Gonade	SAD	2021.	<GK – 6,97	52	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Gonade ⁺	SAD	2015.	0,1 – 6,7	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
	Ribe	Jetra	Češka	2012. – 2013.	<GK – 43	93 – 100	Grabicová i sur. ²²
	Ribe	Jetra	Japan	2013.	1,0 – 7,9	100	Tanoue i sur. ¹¹¹
	Ribe	Jetra	Japan	2013. – 2014.	0,18 – 7,86	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Jetra	SAD	-	<GK – 5,26	-	Brooks i sur. ¹¹⁷
	Ribe	Jetra ⁺	SAD	2006.	<GK – 545	77	Ramirez i sur. ¹¹⁵
	Ribe	Jetra	SAD	2008.	<GK – 110	60	Du i sur. ¹¹²
	Ribe	Jetra	SAD	2021.	<GK – 26,8	65	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Mišić	Japan	2013. – 2014.	0,11 – 1,15	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Mišić ⁺	Kina	-	0,8 – 4,8	100	Weng i sur. ⁸⁹
	Ribe	Mišić	SAD	-	<GK – 0,43	-	Brooks i sur. ¹¹⁷
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2006.	<GK – 19	40	Ramirez i sur. ¹¹⁵
	Ribe	Mišić ⁺	SAD	2008. – 2009.	<GK – 17,1	4	Huerta i sur. ⁵⁰
	Ribe	Mišić	SAD	2021.	<GK – 2,33	30	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Mozak	Češka	2012. – 2013.	<GK – 28	45 – 100	Grabicová i sur. ²²
	Ribe	Mozak	Japan	2013.	1,0 – 9,2	100	Tanoue i sur. ¹¹¹
	Ribe	Mozak	Japan	2013. – 2014.	0,52 – 9,51	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Mozak	SAD	-	<GK – 5,67	-	Brooks i sur. ¹¹⁷
	Ribe	Mozak ⁺	SAD	2005. – 2006.	<GK – 4,244	75	Schultz i sur. ⁹⁸
	Ribe	Mozak ⁺	SAD	2015.	4,4 – 16,9	-	Arnnok i sur. ⁹⁶
Ribe	Mozak	SAD	2021.	<GK – 19,8	78	Sims i sur. ¹¹³	

Tablica 5. nastavak

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
SER	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,044*	8	Malev i sur. ⁸²
	Ribe	Plazma	Japan	2011. – 2014.	0,049 – 0,791*	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Plazma	Japan	2013.	0,14 – 0,51	100	Tanoue i sur. ¹¹¹
	Ribe	Plazma	Kanada	2014.	<GK – 0,236	60	Muir i sur. ⁸
	Ribe	Plazma	SAD	2021.	<GK – 1,38*	22	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Škrge	Japan	2013. – 2014.	0,23 – 3,40	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Škrge	SAD	2021.	<GK – 12	30	Sims i sur. ¹¹³
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	29 – 76,9	100	de Solla i sur. ²¹
Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 187	92	Edwards i sur. ¹⁰³	
norSER	Puževi	Meko tkivo	SAD	2011.	34 – 50	-	Du i sur. ¹⁰⁸
	Ribe	Bubreg	Japan	2013. – 2014.	<GK – 161	17	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Gonade	SAD	2021.	<GK – 25,8	22	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Jetra	Japan	2013. – 2014.	6,39 – 54	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Jetra	Japan	2013.	6,4 – 18	100	Tanoue i sur. ¹¹¹
	Ribe	Jetra	SAD	-	<GK – 23,39	-	Brooks i sur. ¹¹⁷
	Ribe	Mišić	Japan	2013. – 2014.	<GK – 11,8	58	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Mišić ⁺	Kina	-	<GK – 7,8	75	Weng i sur. ⁸⁹
	Ribe	Mišić	SAD	-	<GK – 1,28	-	Brooks i sur. ¹¹⁷
	Ribe	Mozak	Japan	2013. – 2014.	5,55 – 45,1	100	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Mozak	Japan	2013.	7,8 – 16	100	Tanoue i sur. ¹¹¹
	Ribe	Mozak	SAD	-	<GK – 29,9	-	Brooks i sur. ¹¹⁷
	Ribe	Mozak ⁺	SAD	2005. – 2006.	<GK – 28,90	88	Schultz i sur. ⁹⁸
	Ribe	Mozak	SAD	2021.	<GK – 24	26	Sims i sur. ¹¹³
	Ribe	Plazma	Japan	2013. – 2014.	<GK – 2,80	17	Tanoue i sur. ⁹⁹
	Ribe	Plazma	Japan	2013.	0,57 – 2,8*	100	Tanoue i sur. ¹¹¹
	Ribe	Plazma	SAD	2021.	<GK – 1,3*	4	Sims i sur. ¹¹³
Ribe	Škrge	SAD	2021.	<GK – 14,9	4	Sims i sur. ¹¹³	
SMX	Puževi	Meko tkivo	Malezija	-	0,10 – 1,13	100	Omar i sur. ¹⁰⁵
	Rakušci	Meko tkivo	UK	2021.	5 – 45	100	Richardson i sur. ⁸¹
	Rakušci	Mišić ⁺	Južna Afrika	2022.	480 – 2094	100	Murgatroyd i sur. ⁸⁸
	Ribe	Jetra	Argentina	2016.	<GK – 2,40	50	Ondarza i sur. ¹⁰⁹
	Ribe	Mišić	Argentina	2016.	<GK – 1,87	83	Ondarza i sur. ¹⁰⁹

Tablica 5. nastavak

FAS	Organizmi	Tip uzorka	Država	Godina	Raspon masenog udjela, ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$	Učestalost detekcije (%)	Literaturni izvor
SMX	Ribe	Mišić	Kina	2012.	<GK – 0,91	4	Zhao i sur. ⁷²
	Ribe	Mišić	Malezija	-	<GK – 1,05	25	Omar i sur. ¹⁰⁵
	Ribe	Mišić	Saudijska Arabija	2021.	<GK – 106,0	20 – 50	Shaaban i Mostafa ¹¹⁶
	Ribe	Plazma	Kina	2012.	<GK – 5,50*	2	Zhao i sur. ⁷²
	Ribe	Škrge	Argentina	2016.	<GK – 1,87	33	Ondarza i sur. ¹⁰⁹
	Žabe	Mišić ⁺	Argentina	2018.	<GK – 5,84	86	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
SPY	Rakušci	Meko tkivo	UK	2021.	<GK – 9	67	Richardson i sur. ⁸¹
	Ribe	Mišić ⁺	Kina	2008. – 2010.	<GK – 3,3	6	Gao i sur. ¹⁹
TRAM	Ribe	Bubreg	Češka	2012. – 2013.	0,42 – 30	100	Grabicová i sur. ²²
	Ribe	Bubreg	Švedska	2021. – 2022.	<GK – 0,99	50	Waldetoft i sur. ⁷³
	Ribe	Jetra	Češka	2012. – 2013.	<GK – 3,4	9 – 33	Grabicová i sur. ²²
VAL	Ribe	Plazma	Kanada	2014.	<GK – 0,625	30	Muir i sur. ⁸
	Žabe	Masno tkivo ⁺	Argentina	2018.	<GK – 6,15	33	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
VER	Kukci	Cijelo tijelo	Češka	2013.	2,3 – 4,4	100	Grabicová i sur. ¹⁰⁶
	Pijavice	Cijelo tijelo	Češka	2013.	<GK – 3,3	75	Grabicová i sur. ¹⁰⁶
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,059*	8	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	0,06 – 0,37	100	de Solla i sur. ²¹
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 0,927	54	Edwards i sur. ¹⁰³
norVER	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	<GK – 0,162	25	de Solla i sur. ²¹
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 0,505	18	Edwards i sur. ¹⁰³
	Žabe	Jetra ⁺	Argentina	2018.	<GK – 2,27	43	Salgado Costa i sur. ¹⁰⁴
WAR	Rakušci	Cijelo tijelo ⁺	UK	2012.	<GK – 7	12	Miller i sur. ⁹⁴
	Rakušci	Meko tkivo	UK	2021.	3,5 – 27	100	Richardson i sur. ⁸¹
	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,334*	8	Malev i sur. ⁸²
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2012.	<GK – 1,15	25	de Solla i sur. ²¹
	Školjkaši	Meko tkivo	Kanada	2013. – 2018.	<GK – 3,28	6	Edwards i sur. ¹⁰³
ZOLP	Ribe	Plazma	Hrvatska	2016.	<GK – 0,015*	8	Malev i sur. ⁸²

GK, granica kvantifikacije; SAD, Sjedinjene Američke Države; UK, Ujedinjeno Kraljevstvo; ⁺uzorak liofiliziran; */ $\mu\text{g L}^{-1}$

2.2.2. Procjena bioakumulacijskog potencijala farmaceutskih spojeva u divljim populacijama riba

Procjena bioakumulacijskog potencijala FAS-ova u vodenim organizmima, posebno ribama, jedan je od bitnih elemenata u procjeni njihovog ekološkog rizika. Najveći broj literaturnih podataka o bioakumulacijskim faktorima odnosi se na jednostavnu usporedbu koncentracija FAS-ova u ribljim tkivima i njihovih koncentracija u vodi koje u pravilu predstavljaju koncentraciju otopljenih FAS-ova. U većini slučajeva, koncentracije u vodi određene su analizom tzv. trenutnih uzoraka čija reprezentativnost nije uvijek osigurana zbog značajne prostorno-vremenske varijabilnosti koncentracija FAS-ova u vodenom stupcu, a vrste riba i njihova analizirana tkiva često se razlikuju, zbog čega se u literaturi pojavljuju značajne razlike u procjenama bioakumulacijskog potencijala pojedinih tvari.

Bioakumulacijske faktore dobivene usporedbom koncentracija u ribama i u vodi u terminološkom smislu trebalo bi definirati kao biokoncentracijske faktore (BCF-ovi). Međutim, u prirodnom okolišu postoje i drugi načini unošenja FAS-ova u ribe koje također treba uzeti u razmatranje kada se procjenjuju njihovi ukupni bioakumulacijski faktori (BAF-ovi). To su prije svega unošenje putem hrane i interakcije riba sa zagađenim sedimentom. Nadalje, poseban mehanizam obogaćivanja u ribama viših trofičkih razina predstavlja prijenos tvari kroz hranidbeni lanac koji se naziva biomagnifikacija. Biomagnifikacijski faktor (BMF) se definira kao odnos koncentracija u istim tkivima za ribe dviju različitih trofičkih razina. Osim ovih načelnih razloga, treba spomenuti da bi razlike među literaturnim BAF-ovima dijelom mogle proizlaziti i iz nedovoljne pouzdanosti mjerenja niskih koncentracija FAS-ova u okolišnim uzorcima, posebno u zahtjevnoj matrici ribljih tkiva.

Imajući u vidu složenost svih navedenih mehanizama, velike varijabilnosti objavljenih vrijednosti bioakumulacijskog potencijala su razumljive i očekivane. Zbog toga je potrebno uložiti dodatne napore u standardizaciju postupaka kojima se određuju bioakumulacijski faktori. U svijetu postoji regulativa koja omogućuje rangiranje ekološke rizičnosti FAS-ova prema bioakumulacijskim faktorima^{118,119}. Spojevi s vrijednostima BAF-a iznad 250 L kg⁻¹ smatraju se srednje rizičnima, oni s vrijednosti iznad 1000 L kg⁻¹ indiciraju visoki rizik, dok BAF-ovi viši od 5000 L kg⁻¹ označavaju izrazito visoku razinu bioakumulativnosti pa time i najviši potencijalni rizik za okoliš. Prema europskom zakonodavstvu¹²⁰, tvar se smatra bioakumulativnom ako njen BCF u vodenim organizmima premašuje 2000 L kg⁻¹, a vrlo bioakumulativnom ako premašuje 5000 L kg⁻¹.

Pregled literature pokazao je da su za većinu FAS-ova vrijednosti BAF-ova i BCF-ova bile ispod 250 L kg^{-1} , čime se generalno ove spojeve smješta u skupinu zagađivala relativno niskog rizika^{14,21,50,60,96,121,122}. S druge strane, za neke antibiotike^{19,20,72,101}, beta blokatore^{16,21} i antidepresive^{8,21,22} objavljeni su vrlo visoki BAF-ovi koji su dostizali red veličine od 10^3 do 10^5 L kg^{-1} . Primjerice, de Solla i suradnici²¹ odredili su izrazito visoke BAF-ove za amlodipin (6566 L kg^{-1}), amitriptilin (6028 L kg^{-1}) i sertralin ($32\,022 \text{ L kg}^{-1}$), dok su Liu i suradnici¹⁰¹ za predstavnike triju skupina antibiotika objavili BAF-ove u rasponima od 25 do $19\,953 \text{ L kg}^{-1}$ za sulfonamide, od 79 do $39\,811 \text{ L kg}^{-1}$ za fluorokinolone te od 100 do $630\,957 \text{ L kg}^{-1}$ za makrolidne antibiotike. Međutim, takve ekstremno visoke vrijednosti nisu u skladu s rezultatima iz modelnih pokusa te se nameće pitanje o mogućim metodološkim pogreškama i/ili reprezentativnosti koncentracija u prikupljenim uzorcima vode i organizama.

Među FAS-ovima karakteriziranim vrlo velikom varijabilnošću objavljenih BCF i BAF vrijednosti je i sertralin za koji se u radovima mogu naći izrazito široki rasponi BAF-ova čak i za ista tkiva. Tako Grabicová i suradnici²² navode BAF za sertralin u bubrezima divlje populacije riba i do 4400 L kg^{-1} , dok u drugom radu za isto tkivo, također kod populacije divljih riba, određuju maksimalnih 310 L kg^{-1} ¹³. U opširnoj studiji koja je uključivala više različitih vrsta divljih riba, Arnnok i suradnici⁹⁶ dobili su maksimalnu vrijednost BAF-a za sertralin u mozgu riba od 63 L kg^{-1} , dok su Chen i suradnici¹²¹ u kontroliranom laboratorijskom eksperimentu izlaganja odredili vrijednosti BCF-a sertralina u različitim organima i tkivima zebrica u rasponu od $3,7 \text{ L kg}^{-1}$ do $171,0 \text{ L kg}^{-1}$. Najvjerojatniji razlog ovakvim literaturnim neslaganjima mogla bi biti loša procjena reprezentativne koncentracije izlaganja FAS-ova u vodi jer koncentracija u vodenom stupcu može značajno varirati.

Osim toga, postoji mogućnost da varijabilnost rezultata odražava razlike u uvjetima laboratorijskih izlaganja i realnog okoliša, kao što su temperatura, pH medija, duljina izlaganja, faktori rasta, prehrana, otopljena organska tvar i sl.¹⁴ Primjerice, opće pravilo je da su FAS-ovi, koji u vodi mogu postojati u disociranom i nedisociranom obliku, toksičniji i bioakumulativniji u neutralnom obliku. Stoga, bioakumulativnost takvih spojeva ovisit će o pH-vrijednosti medija izlaganja i pK_a vrijednostima samog spoja¹²³. Drugi mogući izvor varijabilnosti BAF-ova mogao bi biti u vrstama riba i njihovom trofičkom statusu. Međutim, prema rezultatima Arnnoka i suradnika⁹⁶ te Liua i suradnika¹⁰¹, jedina zabilježena značajnija razlika bila je među pelagičkim ribama. Drugi autori su pokazali da je varijabilnost BAF-ova za organizme različitih trofičkih razina zabilježena tek za neke FAS-ove¹²⁴.

2.2.3. Istraživanje biokoncentracijskog potencijala i farmakokinetičkih pokazatelja u modelnim ribama

Određivanje bioakumulacijskih faktora FAS-ova za divlju populaciju vodenih organizama ima veliku važnost za realnu procjenu njihovog bioakumulacijskog potencijala i s njim povezanih ekotoksikoloških ishoda, ali nije dovoljno za razumijevanje mehanizama koji upravljaju složenim procesima akumulacije i depuracije FAS-ova. Toksikološki utjecaj FAS-ova na neciljane organizme ovisi ne samo o koncentraciji već i o trajanju izloženosti te sposobnosti organizma da učinkovito eliminira i/ili metabolizira FAS-ove. Zbog toga je za sveobuhvatno tumačenje interakcije vodenih organizama i FAS-ova potrebno provesti ispitivanja u kontroliranim laboratorijskim uvjetima uz uporabu reprezentativnih modelnih organizama.

Modelni pokusi uključuju kontrolirana izlaganja laboratorijski uzgojenih ili divljih izlovljenih vodenih organizama pojedinačnim FAS-ovima ili njihovim smjesama. Prema literaturi, postoje značajne razlike u dizajnu tih ispitivanja, kako po odabiru modelnog organizma, tako i po vremenu, koncentraciji i načinu izlaganja te broju FAS-ova kojima se organizmi izlažu (Tablica 6). Kao medij za izlaganja najčešće se koristi čista akvarijska voda obogaćena FAS-ovima ili pročišćena otpadna voda (SE)^{125,126}. Prema vremenu izlaganja, modelne pokuse možemo podijeliti na dva osnovna tipa, kraća (2 – 8 dana) i duža (20 – 40 dana) izlaganja. Kraća izlaganja najčešće se koriste za procjenu kinetičkih parametara gdje se izlaganje stabilnoj koncentraciji FAS-ova provodi u trajanju od nekoliko dana (najčešće do 7 dana) nakon čega slijedi depuracijski period u kojem su organizmi premještaju u akvarij s čistim medijem. Dugotrajnijim izlaganjima nastoje se simulirati uvjeti kronične izloženosti kod kojih će, za sve prisutne FAS-ove, biti postignuto ravnotežno stanje u modelnim organizmima, a koje je preduvjet za pouzdanu procjenu BCF-ova.

Postoji velik broj objavljenih publikacija koje opisuju modelna toksikološka ispitivanja utjecaja FAS-ova na ponašanje i hranjenje te citološke, histološke ili embrionalne promjene modelnih organizama^{127–135}. Međutim, broj radova usmjerenih na proučavanje procesa bioakumulacije vrlo je ograničen. Posebno su rijetka istraživanja u kojima su sustavno istraženi farmakokinetički pokazatelji kao što su konstante brzina akumulacije i depuracije te metabolička transformacija. U tablici 6 prikazana je usporedba laboratorijskih uvjeta i rezultata modelnih izlaganja za odabrane FAS-ove (Tablica 1) iz do sada objavljenih i dostupnih publikacija.

Tablica 6. Usporedba eksperimentalnih uvjeta u laboratorijskim pokusima s modelnim organizmima, dobivenih biokoncentracijskih faktora (BCF) i kinetičkih parametara (k_a , k_d i $t_{1/2}$) odabranih farmaceutski aktivnih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Modelni organizam	Konc. izlaganja, $\gamma/\mu\text{g L}^{-1}$	Vrijeme izlaganja t/dan	Organ/ tkivo	BCF / L kg^{-1}	Konst. brzine akumulacije, $k_a / \text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Konst. brzine depuracije, k_d / h^{-1}	Poluvrijeme depuracije, $t_{1/2} / \text{h}$	Literaturni izvor
CAFF	<i>Gambusia holbrooki</i> (ribe)	8,6 (SE)	7	CT	0,2 – 2,0	0,001	0,005	141	Wang i Gardinali ¹²⁵
	<i>Oreochromis niloticus</i> (ribe)	4 mg kg^{-1} (IP)	8 sati	Škrge			0,14	5,0	Gómez-Martínez ¹⁴⁸
				Jetra			0,16	4,3	
				Plazma			0,17	4,1	
CARB	<i>Gammarus pulex</i> (rakušci)	1	2	CT	25 – 32	0,4418 – 0,5307	0,014 – 0,0214		Miller i sur. ¹⁴⁹
		100	2	CT	7,1	0,217	0,030		Meredith-Williams i sur. ¹⁵⁰
	<i>Notonecta glauca</i> (kukci)	100	2	CT	0,2	0,012	0,049		Meredith-Williams i sur. ¹⁵⁰
	<i>Dreissena polymorpha</i> (školjkaši)	0,236	7	MT	91,0				Contardo-Jara i sur. ¹⁴³
		2,36	7	MT	8,7				Contardo-Jara i sur. ¹⁴³
		23,6	7	MT	9,1				Contardo-Jara i sur. ¹⁴³
		236	7	MT	5,1				Contardo-Jara i sur. ¹⁴³
	<i>Carassius carassius</i> (ribe)	1 – 2	7	Mišić	2,2 – 3,8	0,008 – 0,020	0,004 – 0,005	133,3 – 195,3	Nkoom i sur. ¹³⁶
				Škrge	3,8 – 5,8	0,017 – 0,024	0,004 – 0,005	134,2 – 152,7	
				Jetra	5,4 – 9,3	0,028 – 0,050	0,005 – 0,007	105,0 – 132,1	
				Mozak	4,5 – 9,0	0,025 – 0,042	0,005 – 0,006	121,8 – 127,2	
	<i>Danio rerio</i> (ribe)	1,36 – 5,35	6	Mišić	0,4 – 1,2	0,15 – 0,96			Chen i sur. ¹⁴²
				Jetra	1,2 – 8,0	0,10 – 0,38	0,01 – 0,16	4,3 – 57,1	
Gonade				0,9 – 3,4	0,12 – 0,3	0,09 – 0,14	5,0 – 7,9		
Plazma				0,8 – 9,1	0,43 – 0,93	0,10	6,7		
CT				1,4 – 1,8	0,11	0,06	11,5		
<i>Gambusia affinis</i> (ribe)	10	4	CT	0,7				Valdés i sur. ¹⁴¹	
	100	4	CT	0,9				Valdés i sur. ¹⁴¹	
<i>Gambusia holbrooki</i> (ribe)	1,2 (SE)	7	CT	0,9 – 1,4	0,009	0,010	71	Wang i Gardinali ¹²⁵	

Tablica 6. nastavak

FAS	Modelni organizam	Konc. izlaganja, $\gamma/\mu\text{g L}^{-1}$	Vrijeme izlaganja t/dan	Organ/ tkivo	BCF / L kg^{-1}	Konst. brzine akumulacije, $k_a / \text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Konst. brzine depuracije, k_d / h^{-1}	Poluvrijeme depuracije, $t_{1/2} / \text{h}$	Literaturni izvor							
CARB	<i>Ictalurus punctatus</i> (ribe)	125	7	Mišić	1,8				Garcia i sur. ¹¹⁴							
				Jetra	1,5											
				Mozak	1,6											
				Plazma	7,1											
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ribe)	1,6	10	Plazma	0,4					Lahti i sur. ¹⁴⁰						
				43	10					Plazma	0,3	Lahti i sur. ¹⁴⁰				
	<i>Oreochromis niloticus</i> (ribe)	4	8	Mišić	1,7 – 4,0					0,217	0,073	9,6	Liu i sur. ¹⁵¹			
				Škrge	1,4 – 3,0					0,235	0,101	6,9				
				Jetra	3,3 – 6,8					0,440	0,083	8,4				
				Bubreg	2,4 – 6,0					0,240	0,050	13,9				
				Slezena	2,0 – 4,1					0,231	0,068	10,2				
				Želudac	2,2 – 4,8					0,264	0,069	10,0				
				Crijeva	2,5 – 6,8					0,532	0,100	6,9				
				Mozak	2,7 – 5,5					0,377	0,093	7,5				
Koža				1,3 – 3,3	0,185	0,075	9,3									
Plazma				0,6 – 1,3	0,077	0,063	11,1									
Žuč	5,2 – 11,6	0,909	0,090	7,7												
<i>Pimephales notatus</i> (ribe)	300	28	Mišić	1,9				Garcia i sur. ¹¹⁴								
			Jetra	4,6												
DIA	<i>Gammarus pulex</i> (rakušci)	1	2	CT					41 – 58	2,6469 – 9,5942	0,046 – 0,2349		Miller i sur. ¹⁴⁹			
				100					2	CT	37,5		3,804	0,103	Meredith-Williams i sur. ¹⁵⁰	
				100					2	CT	1,0		0,040	0,042	Meredith-Williams i sur. ¹⁵⁰	
OXA	<i>Asellus aquaticus</i> (rakušci)	0,4 (J)	66	CT					42 – 50				Lagesson i sur. ¹²⁴			
				<i>Planorbidae</i> (slatkovodni puževi)					0,4 (J)				66	CT	28 – 48	Lagesson i sur. ¹²⁴
														<i>Ephemeroptera: Cloeon</i> (kukci)	0,4 (J)	66

Tablica 6. nastavak

FAS	Modelni organizam	Konc. izlaganja, $\mu\text{g L}^{-1}$	Vrijeme izlaganja t/dan	Organ/ tkivo	BCF / L kg^{-1}	Konst. brzine akumulacije, $k_a / \text{L kg}^{-1} \text{h}^{-1}$	Konst. brzine depuracije, k_d / h^{-1}	Poluvrijeme depuracije, $t_{1/2} / \text{h}$	Literaturni izvor	
OXA	<i>Zygoptera</i> (kukci)	0,4 (J)	66	CT	10 – 12				Lagesson i sur. ¹²⁴	
	<i>Perca fluviatilis</i> (ribe)	0,4 (J)	66	Mišić	16 – 20				Lagesson i sur. ¹²⁴	
SER	<i>Dreissena bugensis</i> (školjkaši)	0,5	5	MT	1173 ± 265	9,292	jako spora eliminacija		Passignat i sur. ¹³⁷	
		0 – 0,5*	23	MT	5947 ± 1098				Passignat i sur. ¹³⁷	
	<i>Dreissena polymorpha</i> (školjkaši)	0,5	5	MT	435 ± 44	3,917	jako spora eliminacija		Passignat i sur. ¹³⁷	
		0 – 0,5*	23	MT	7216 ± 930				Passignat i sur. ¹³⁷	
	<i>Sagittunio subrostratus</i> (školjkaši)	1,1 ± 1,1	14	MT	28 836,4	nije postignuto ravnotežno stanje	jako brza eliminacija		Burket i sur. ¹³⁸	
	<i>Oncorhynchus mykiss</i> (ribe)	0,053 ± 0,016 (SE)	13	Jetra Mozak	85 180				Grabicová i sur. ¹⁵²	
	<i>Danio rerio</i> (ribe)		0,20 – 0,76	6	Mišić	5,32 – 36,2	1,70 – 2,40	0,07	10,6	Chen i sur. ¹⁴²
		Jetra			64,7 – 302	13,88 – 21,75	0,07	9,6 – 10,6		
		Gonade			1,71 – 171	0,04 – 0,25	0,02	32,4 – 42,5		
		Plazma			0,2 – 7,1	0,05 – 0,87	0,12 – 0,21	3,1 – 5,5		
CT ⁺		45,6 – 73,4			1,08 – 1,31	0,02	29,3 – 38,9			
<i>Oreochromis niloticus</i> (ribe)		4	8	Mišić	1,9 – 26,3	0,562	0,037	18,7	Liu i sur. ¹⁵¹	
	Škrge			66,3 – 145	5,23	0,040	17,5			
	Jetra			16,4 – 60,8	2,61	0,048	14,3			
	Bubreg			17,1 – 199	5,44	0,056	12,3			
	Slezena			78,7 – 441	14,5	0,051	13,5			
	Želudac			18,3 – 141	2,55	0,026	26,9			
	Crijeva			31,9 – 195	6,71	0,055	12,7			
	Mozak			23,2 – 169	5,35	0,040	17,2			
	Koža			13,1 – 49,1	1,38	0,034	20,7			
	Plazma			1,5 – 12,8	0,414	0,067	10,4			
Žuč	4,5 – 97,5	3,67	0,070	9,9						

Tablica 6. nastavak

FAS	Modelni organizam	Konc. izlaganja, $\gamma/\mu\text{g L}^{-1}$	Vrijeme izlaganja t/dan	Organ/ tkivo	BCF / L kg^{-1}	Konst. brzine akumulacije, $k_a / \text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Konst. brzine depuracije, k_d / h^{-1}	Poluvrijeme depuracije, $t_{1/2} / \text{h}$	Literaturni izvor	
SMX	<i>Mytilus galloprovincialis</i> (školjkaši)	1	28	MT	1,26				Mejías i sur. ¹⁵³	
	<i>Lepomis macrochirus</i> (ribe)	1 – 2	30	Mišić	0,1 – 0,5				Zhao i sur. ¹³⁹	
				Škrge	0,4					
				Jetra	3,0 – 4,5					
				Crijeva	3,4					
Mozak				2,4 – 3,0						
			Žuč	0,5 – 2,5						
TEM	<i>Gammarus pulex</i> (rakušci)	1	2	CT	37 – 41	2,751 – 4,3326	0,0669 – 0,1186		Miller i sur. ¹⁴⁹	
	<i>Salmo trutta</i> (ribe)	80	5	Mišić	5,2				McCallum i sur. ¹⁵⁴	
		500	7	Mišić	7,7				McCallum i sur. ¹⁵⁴	
		1500	5	Mišić	6,4				McCallum i sur. ¹⁵⁴	
	<i>Lepomis macrochirus</i> (ribe)	2	14	Mišić		0,0160 – 0,0295	0,0133 – 0,0244	28,4 – 61,3	Zhao i sur. ¹³⁹	
				Jetra		0,0137 – 0,0330	0,0100 – 0,0384	18,1 – 69,3		
				Mozak		0,0192 – 0,0318	0,0119 – 0,0228	30,4 – 58,2		
				Žuč		0,0053 – 0,0066	0,0053 – 0,0096	60,3 – 92,4		
				Mišić		0,7 – 3,5				Zhao i sur. ¹³⁹
				Škrge		3,3				
Jetra					20,5 – 32,9					
			Crijeva	95,4						
			Mozak	9,3 – 14,1						
			Plazma	4,5						
			Žuč	3,9 – 4,0						
TRAM	<i>Pimephales promelas</i> (ribe)	1	24	Plazma	0,7 – 1,1				Tanoue i sur. ¹⁵⁵	
		10	24	Plazma	0,3 – 0,8				Tanoue i sur. ¹⁵⁵	
		1000	24	Plazma	0,4 – 0,5				Tanoue i sur. ¹⁵⁵	
VER	<i>Ictalurus punctatus</i> (ribe)	500	7	Mišić	17,3	0,22	0,012	55,2	Nallani i sur. ¹⁵⁶	
				Škrge	40,3	0,50	0,012	55,2		
				Jetra	75,0	1,12	0,015	45,6		

Tablica 6. nastavak

FAS	Modelni organizam	Konc. izlaganja, $\gamma/\mu\text{g L}^{-1}$	Vrijeme izlaganja t/dan	Organ/ tkivo	BCF / L kg^{-1}	Konst. brzine akumulacije, $k_a / \text{L kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$	Konst. brzine depuracije, k_d / h^{-1}	Poluvrijeme depuracije, $t_{1/2} / \text{h}$	Literaturni izvor
VER	<i>Ictalurus punctatus</i> (ribe)	500	7	Bubreg	74,0	1,12	0,015	45,6	Nallani i sur. ¹⁵⁶
	<i>Pimephales promelas</i> (ribe)	500	28	Mišić	23,1				Nallani i sur. ¹⁵⁶
				Škrge	29,3				
				Jetra	40,0				
				Bubreg	34,4				
				Srce	14,6				
WAR	<i>Gammarus pulex</i> (rakušci)	10	2	CT	19 – 22	0,2091 – 0,2242	0,0096 – 0,0119		Miller i sur. ¹⁴⁹

CT, homogenat cijelog tijela; MT, homogenat mekog tkiva; SE, izlaganje pročišćenju otpadnoj vodi; IP, intraperitonealno izlaganje; J, modelno izlaganje u jezeru; *kronično varijabilno izlaganje uz povremena akutna izlaganja; +teorijska vrijednost

Kao i kod terenskih istraživanja, vidljivo je kako je od odabranih FAS-ova najispitivaniji spoj karbamazepin koji se ponovo pokazao kao spoj niske bioakumulativnosti. Farmakokinetički pokazatelji karbamazepina, konstante brzine akumulacije i depuracije, pokazuju da su ti procesi brzi (unutar 10 h). Međutim, Nkoom i suradnici¹³⁶ procijenili su da je depuracija karbamazepina iz nekih organa ribe *Carassius carassius* znatno usporena (poluvrijeme depuracije i do 8 dana). Neki FAS-ovi, posebno sertralin, pokazali su povišeni stupanj biokoncentracije u tkivu modelnih riba ($BCF > 100 \text{ L kg}^{-1}$), posebice u crijevima (195 L kg^{-1}), bubregu (199 L kg^{-1}), jetri (302 L kg^{-1}) i slezeni (441 L kg^{-1}), no poluvremena depuracije su najčešće unutar 24 h. S druge strane, izrazito visoke vrijednosti BCF-a sertralina dobivene su za različite vrste školjkaša. Dvije vrste školjkaša iz roda *Dreissena* pokazale su relativno brzu akumulaciju te BCF-ove u rasponu od 391 L kg^{-1} do 7045 L kg^{-1} ¹³⁷ dok je za *Sagittunio subrostratus* određen BCF od čak $28\,836,4 \text{ L kg}^{-1}$ ¹³⁸. Burket i suradnici¹³⁸ napominju kako tijekom 14-dnevnog izlaganja nije postignuta ravnotežna koncentracija sertralina u tkivu školjkaša, a Passignat i suradnici¹³⁷ pokazuju kako je ravnotežno stanje kod školjkaša postignuto tek 16. dan izlaganja.

Od ostalih spojeva, treba spomenuti temazepam i verapamil koji su pokazali niže BCF vrijednosti ($< 100 \text{ L kg}^{-1}$), ali značajno duža poluvremena depuracije u odnosu na druge FAS-ove ($t_{1/2} = 2 - 3$ dana). Modelni pokusi su pokazali da vodeni organizmi brže akumuliraju i eliminiraju spojeve kod izlaganja pojedinačnim FAS-ovima nego pri istovremenom izlaganju smjesi spojeva^{136,139}. Za većinu FAS-ova i tkiva, nije uočena značajnija razlika u BCF-ovima određenim kod različitih koncentracija izlaganja¹⁴⁰⁻¹⁴². Nasuprot tome, Contardo-Jara i suradnici¹⁴³ odredili su vrlo slične BCF-ove za meko tkivo školjkaša *Dreissena polymorpha* pri tri različite koncentracije ($2,36 \mu\text{g L}^{-1}$, $23,6 \mu\text{g L}^{-1}$ i $236 \mu\text{g L}^{-1}$) dok je kod najniže koncentracije izlaganja ($0,236 \mu\text{g L}^{-1}$) biokoncentracija bila 10 – 20 puta veća. Međutim, ovo opažanje nije u skladu s ostalom literaturom.

Posebnu vrstu modelnih pokusa čine izlaganja s ciljem određivanja utjecaja fizikalnih parametara na samu koncentraciju FAS-ova, poput pH-vrijednosti i saliniteta medija¹⁴⁴⁻¹⁴⁷. Scott i suradnici¹⁴⁷ pokazali su kako salinitet ne utječe na biokoncentraciju karbamazepina, diltiazema i difenhidramina u ribi *Fundulus grandis* te su zaključili da mehanizam biokoncentracije ovih FAS-ova u ovoj vrsti ribe najvjerojatnije nije putem crijeva i pijenja medija, dok se za biokoncentraciju sulfametoksazola u *Danio rerio* salinitet pokazao kao bitan faktor¹⁴⁶. Nadalje, prilikom izlaganja riba *Oryzias latipes*, *Fundulus grandis* i *Pimephales promelas* nekim FAS-ovima (fluoksetin, norfloksetin, diltiazem i difenhidramin), pokazalo se

da pH-vrijednost medija može imati značajni utjecaj na stupanj bioakumulacije^{144,145,147}. U pravilu su vrijednosti BCF-a bile više pri višim pH-vrijednostima, što je uglavnom bio rezultat povećanja udjela neionskog oblika ispitivanih spojeva koji imaju višu lipofilnost u odnosu na njihove ionske oblike. Promjena pH-vrijednosti medija unutar raspona 6,7 – 8,3 nije dovela do značajnijeg utjecaja na BCF-ove karbamazepina u ribi *Fundulus grandis*¹⁴⁷.

Alternativno, bioakumulacijski potencijal može se procijeniti i modeliranjem na temelju raspodjelnog koeficijenta oktanol-voda ($\log K_{ow}$). Nažalost, tako procijenjene vrijednosti često ne odražavaju stvarno stanje jer ovaj pokazatelj ne uzima u obzir utjecaj pH-vrijednosti na specijaciju FAS-ova koji u vodenim otopinama mogu stvarati različite ionske oblike čije ravnoteže utječu na aktivni transport, akumulativnost i biotransformaciju FAS-ova^{50,101,139,142}. Stoga se u poboljšanim modelima sve više primjenjuju korigirani koeficijent raspodjele oktanol-voda ($\log D_{ow}$) koji uzima u obzir specijaciju promatranog FAS-a pri određenoj pH-vrijednosti medija. Na taj se način dobivaju značajno bolje procjene za kinetičke pokazatelje u modelima akumulacije i depuracije^{139,146}.

2.3. Analitičke metode za određivanje farmaceutskih spojeva u vodenom okolišu

Razvoj i usavršavanje hibridnih analitičkih tehnika, posebice vezanih sustava tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa, omogućio je razvoj vrlo velikog broja analitičkih metoda namijenjenih određivanju tragova raznovrsnih kombinacija FAS-ova u složenim okolišnim matricama, uključujući uzorke otpadne i prirodne vode^{27,157–160}, sedimenta^{160–162} i biote^{12,27,30,31,160}.

Međutim, unatoč izrazito opsežnoj literaturi, postoji stalna potreba za unaprjeđenjem postojećih analitičkih metoda i razvojem novih analitičkih pristupa u analitici tragova FAS-ova. Pri tome poseban izazov predstavlja razvoj analitičkih metoda za multirezidualno određivanje tragova FAS-ova u uzorcima biote, s naglaskom na tehnike pročišćavanja uzoraka, koje moraju biti prikladne za selektivno uklanjanje koekstrahiranih sastojaka matrice uz istodobne minimalne gubitke ciljanih analita. Osim toga, cilj unaprjeđenja postojećih i razvoja novih analitičkih protokola je uključivanje novih okolišno relevantnih FAS-ova, njihovih metabolita

i transformacijskih proizvoda, te stalna poboljšanja glavnih pokazatelja kvalitete analitičkog postupka, posebice granica kvantifikacija, točnosti i ponovljivosti metode.

2.3.1. Priprema uzoraka vode i biote za instrumentnu analizu

Kod pripreme uzoraka površinske vode za analizu tragova FAS-ova ključan korak predstavlja njihovo obogaćivanje koje se najčešće provodi ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction*, SPE)^{27,157–160}. Pri tome, kod metoda koje u istom postupku obuhvaćaju kisele, bazične i neutralne analite, odabir sorbensa i uvjeta ekstrakcije (pH i ionska jakost) može predstavljati izazov, a što se najbolje vidi usporedbom broja i vrste spojeva koje metoda obuhvaća i kvalitete određenih validacijskih parametara. Dok gotovo 50 % literaturnih izvora nudi metode za manje od 25 FAS-ova, tek se manji broj njih (ispod 10 %) bavi širokim spektrom koji premašuje 100 analita^{158,159}.

Kod analitičkih postupaka namijenjenih multirezidualnom određivanju raznovrsnih FAS-ova, dominantna je uporaba kolonica punjenih sorbensom mješovitog hidrofilno-lipofilnog karaktera, poput Oasis HLB ili Strata-X, dok su drugi najčešći odabir kolonice punjene mješovitim polimernim sorbensom s jakim kationskim izmjenjivačem kao što su Oasis MCX ili Strata-XC^{27,157,158}. Volumeni uzoraka vode za analizu najčešće su u rasponu od 100 mL do 500 mL, s time da za uzorke površinske vode u pojedinim radovima koriste volumeni i veći od 1000 mL^{157,158,163}. Najčešće korišteno otapalo za eluiranje FAS-ova sa sorbensa je metanol, bez ili s dodatkom kiseline (najčešće mravlja ili octena kiselina) ili lužine (amonijak), a primjenjuju se i smjese otapala^{157,158}. Osim klasičnog SPE-a, u novije vrijeme raste broj razvijenih metoda za tzv. automatski SPE (engl. *on-line* SPE) gdje je SPE kolonica ugrađena u injekcijski ventil umjesto injekcijske petlje, a omogućuje da se prethodno koncentrirani analiti izravno eluiraju na kromatografsku kolonu^{27,157,158}. Zbog kompatibilnosti, automatski SPE se najčešće priključuje na sustav tekućinske kromatografije (LC), a prednosti su automatizacija, brža priprema uzorka, manja mogućnost kontaminacije, manje količine organskih otapala, izostanak potrebe za uparavanjem te manji volumeni uzorka (≤ 2 mL).

Priprema bioloških uzoraka je složenija te obično uključuje pretpripremu, ekstrakciju i pročišćavanje dobivenih ekstrakata. U tablici 7 prikazan je pregled objavljenih i dostupnih metoda za multirezidualno određivanje tragova odabranih FAS-ova (Tablica 1) u uzorcima

biote uz informacije o postupcima pretpripreme, ekstrakcije, pročišćavanja i instrumentnim metodama te glavnim validacijskim pokazateljima kvalitete metode.

Postupci pretpripreme uključuju vaganje i mjerenje prikupljenih organizama, mehaničko čišćenje, sekciju s ciljem prikupljanja organa i tkiva, usitnjavanje i homogenizaciju (Tablica 7) te pohranu na temperaturi ispod $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ s ciljem smanjenja enzimatske aktivnosti^{11,12,164}. Predobrada uzorka može uključiti i liofilizaciju, posebice kod analize uzoraka s povišenim udjelima vode (npr. mekušci, alge, mozak, bubrezi i sl.), s ciljem smanjenja mogućnosti degradacije FAS-ova zbog prisustva vode^{96,165–167}. Pretpriprema prikupljenih bioloških tekućina (krv i žuč) najčešće uključuje centrifugiranje, denaturaciju proteina te enzimatsku dekonjugaciju metabolita faze II^{11,12} (Tablica 7). Krv je kompleksna matrica koja, između ostalog, sadrži proteine za zgrušavanje zbog čega nije pogodna za dulje čuvanje i manipulaciju. Stoga se krv centrifugira kako bi se odvojio supernatant, odnosno plazma, čija je daljnja obrada i analiza daleko jednostavnija^{8,82,111}. Uklanjanje proteina preostalih u plazmi provodi se denaturacijom s pomoću dodatka organskog otapala, najčešće alkohola, ili kiseline/lužine. Kod analize FAS-ova u uzorcima žuči i jetre često se koriste hidrolizirajući enzimi, najčešće β -glukuronidaze/sulfataze, koji cijepaju komplekse farmaceutskog spoja i glukuronida/sulfata, što omogućuje određivanje ukupne količine FAS-ova u uzorku^{111,168}.

Kod odabira ekstrakcijskog postupka potrebno je osigurati što efikasniju ekstrakciju ciljanih analita, koje često karakteriziraju vrlo različita fizikalno-kemijskih svojstava, uz istodobnu minimizaciju koekstrahirane matrice. Pri tome ključnu ulogu ima odabir ekstrakcijskog otapala, a najviši ekstrakcijski povrati postižu se uglavnom s pomoću polarnih organskih otapala kao što je metanol^{30,32,33,100}. Najčešće korištene tehnike za ekstrakciju FAS-ova iz čvrstih bioloških uzoraka su ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom (engl. *pressurized liquid extraction*, PLE) te ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom (engl. *ultrasound assisted extraction*, UAE), dok se za tekuće uzorke uglavnom koriste ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *liquid-liquid extraction*, LLE) i SPE^{12,28,30,31} (Tablica 7). Od ostalih tehnika, treba svakako spomenuti QuEChERS (engl. *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe*), koji uključuje ekstrakciju s pomoću otapala i ekstrakcijskih soli te pročišćavanje disperzivnom ekstrakcijom na čvrstoj fazi (d-SPE)^{12,30,31}. Ovaj protokol razvijen je primarno za ekstrakciju pesticida¹⁶⁹, no može se prilagoditi i za analizu FAS-ova u bioti^{170–172}.

Za razliku od ostalih navedenih ekstrakcijskih tehnika, UAE i PLE koriste vanjski izvor energije kako bi se pospješila interakcija uzorka, odnosno njegove matrice, i otapala, čime se

povećava učinkovitost ekstrakcije tj. prijenos FAS-ova iz uzorka u otapalo. Huerta i suradnici³² su tijekom razvoja metode za određivanje 20 FAS-ova u ribljem tkivu testirali tri ekstrakcijska postupka koji uključuju: i) UAE tehniku, uz smjesu vodene otopine octene kiseline i metanola (1:1, v/v) kao ekstrakcijskog otapala; ii) QuEChERS tehniku, uz acetonitril i vodu kao ekstrakcijska otapala te magnezijev sulfat i natrijev acetat kao ekstrakcijske soli, te d-SPE; te iii) PLE tehniku, uz istraživanje različitih otapala, temperatura i broja ciklusa. Kod testiranih uvjeta, primjenom UAE tehnike ekstrahirano je samo 5 od ukupno 20 FAS-ova, a PLE tehnika dala je bolje analitičke povrate (40 – 130 %) od QuEChERS tehnike (2 – 100 %). Najviši ekstrakcijski prinosi ostvareni su korištenjem metanola, dok je efikasnost ekstrakcije bila slabija kod uporabe acetonitrila, metanola s dodatkom kiseline ili smjesa metanol/voda (1:1, v/v) i metanol/acetonitril (1:1, v/v). Od istraživanih temperaturnih uvjeta (50 – 90 °C), najbolji analitički povrati ostvareni su pri 50 °C, a najbolja efikasnost ekstrakcije postignuta je primjenom 4 ekstrakcijska ciklusa. S druge strane, Dasenaki i Thomaidis¹⁷³ razvili su generičku multirezidualnu metodu za određivanje tragova ukupno 115 različitih FAS-ova u ribljem mišiću temeljenu na ekstrakciji potpomognutoj ultrazvukom, dok su kao ekstrakcijsko otapalo koristili smjesu vodene otopine EDTA, metanola i acetonitrila (1:1:1, v/v/v), uz dodatak mravlje kiseline za pospješenje ekstrakcije amfoternih spojeva. Metoda je pokazala prihvatljive analitičke povrate (75 – 114 %) za većinu spojeva (82 od 115), a granice kvantifikacije varirale su u rasponu od 0,03 µg kg⁻¹ do 6,7 µg kg⁻¹. Iako je metoda uključivala postupke pročišćavanja (krioprecipitacija i LLE heksanom), utjecaji matrice bili su vrlo visoki i kretali su se u širokom rasponu od –89 % do 332 %.

Visoki utjecaji matrice u ekstraktima biote uglavnom su povezani s interferirajućim utjecajem koekstrahiranih sastojaka složene matrice uzorka, a njihov utjecaj se nastoji smanjiti primjenom što selektivnijeg otapala za ekstrakciju i/ili dodatnim pročišćavanjem ekstrakta. U pročišćavanju ekstrakata se, uz klasične tehnike odjeljivanja krutih čestica (taloženje, centrifugiranje i filtracija), često koristi separacija na kolonicama punjenim različitim sorbensima (kao i za SPE), d-SPE, kolonska kromatografija te kromatografija isključenjem (Tablica 7). Ovisno o namjeni i fizikalno-kemijskim svojstvima analita i koekstrahiranih sastojaka matrice, u pročišćavanju ekstrakata koristi se široki spektar komercijalno dostupnih SPE kolonica punjenih raznovrsnim polimernim i/ili ionsko-izmjenjivačkim sorbensima (npr. Oasis HLB, PSA i SAX/PSA)^{11,12,28}. Neka istraživanja su pokazala da kolonice Oasis HLB ne daju dobre rezultate kod pročišćavanja uzoraka jetre koje imaju značajan udio lipida^{174,175}

zbog čega su, kod takvih uzoraka, korištena druga punila poput Oasis MCX¹⁷⁴ ili polietersulfonski (PES) sorbensi¹⁷⁵. Neki postupci pročišćavanja koriste sekvencijalnu uporabu različitih tipova sorbensa pri čemu se najprije koristi sorbens za uklanjanje lipida, primjerice SAX/PSA, nakon čega slijedi sorpcija na hidrofilno-lipofilni sorbens s ciljem koncentriranja, npr. Oasis HLB¹⁷⁶. Steinbach i Schwack¹⁷⁷ su na temelju usporedbe sedam različitih kolonica pokazali kako se lipidi najbolje uklanjaju na kolonicama sa PSA punilom.

Za pročišćavanje ekstrakta koriste se kromatografije isključenjem, najčešće gel propusna kromatografija (engl. *gel permeation chromatography*, GPC) koja tvari odvaja na temelju veličina te kolonska kromatografija, najčešće na stupcu silika gela (engl. *silica gel chromatography*, SGC), koja tvari odvaja na temelju afiniteta prema stacionarnoj fazi. Huerta i suradnici³² pokazali su da pročišćavanje GPC tehnikom daje bolje rezultate od pročišćavanja na kolonicama punjenim florisilom ili kombinacijom GPC i SPE pristupa, najviše zbog gubitka većeg broja analita tijekom SPE postupka. Tanoue i suradnici¹¹¹ usporedili su pročišćavanje tehnikama GPC i SGC uz korištenje različitih otapala, pri čemu je pročišćavanje SGC tehnikom dalo veće analitičke povrate i manji utjecaj matrice za sve tipove tkiva, osim jetre i mozga. Za ta dva tipa tkiva, zadovoljavajući rezultati postignuti su dodatnim korakom pročišćavanja GPC tehnikom. Najveća mana pročišćavanja ekstrakata primjenom GPC i SGC pristupa je trajanje postupka pročišćavanja, velika potrošnja organskih otapala te potreba za dodatnim procesom ekstenzivnog koncentriranja. S druge strane, SPE je relativno brza i jeftina tehnika koja ne zahtijeva dodatne postupke obrade uzorka^{158,165,174}.

Tablica 7. Pregled objavljenih i dostupnih multirezidualnih metoda za određivanje izabranih farmaceutski aktivnih spojeva u uzorcima biote. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
20 FAS-a (COD, CARB, DIA, SER, CARB-EP, OH-CARB)	Ribe (mišić, jetra, cijelo tijelo)	Homogenizacija i liofilizacija	0,5 g	PLE (hidromatriks, MeOH)	GPC	HPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,01 – 0,98 ^b 0,4 – 3,28	19,3 – 150,6	-80 – 20	Huerta i sur. ³²
17 FAS+OZ (CARB, SER, norSER)	Ribe (mozak, bubrezi, jetra, krv)	Centrifugiranje (krv), hidroliza β-glukuronidazom/sulfatazom	0,5 g ili 1 mL	UAE (MeCN), razrjeđenje otopinom NaCl i LE (MTBE)	SGC, GPC i SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,009 – 3,2 ^b 0,020 – 8,7	89,4 – 125	-16 – 25	Tanoue i sur. ¹¹¹
26 FAS-a (SMX, SPY, CIP, NOR, ERY-H2O)	Ribe (žuč)	-	0,05 – 0,2 mL	pH 3, SPE (kombinirane SAX/PSA-HLB kolonice)	-	UHPLC(ESI)-MS/MS (MRM)	^a 0,04 – 9,09* ^b 0,13 – 30,30*	28 – 121	-	Zhao i sur. ⁷²
	Ribe (krv)	Centrifugiranje	0,05 – 0,2 mL	pH 3, SPE (Oasis HLB kolonice)	-	UHPLC(ESI)-MS/MS (MRM)	^a 0,02 – 1,58* ^b 0,08 – 5,28*	53 – 196	-	
	Ribe (mišić, jetra)	-	0,5 – 2 g	UAE (MeOH/NaAc)	SPE (kombinirane SAX/PSA-HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS (MRM)	^a 0,04 – 4,10 ^b 0,14 – 13,70	40 – 178	-	
20 FAS+OZ (SER, norSER, CARB)	Ribe (krv)	Centrifugiranje, hidroliza acetatnim puferom i β-glukuronidazom/sulfatazom	1 mL	UAE (MeCN/Ac-pufer), razrjeđenje otopinom NaCl, LLE (MTBE)	SGC, GPC i SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,039 – 0,32*	89,7 – 110	-	Tanoue i sur. ⁹⁹

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
20 FAS+OZ (SER, norSER, CARB)	Ribe (mozak, jetra, bubrezi, mišić, škrge)	-	0,5 g	UAE (MeCN/Ac-pufer), razrjeđenje otopinom NaCl, LLE (MTBE)	SGC, GPC i SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,005 – 3,3	91 – 120	-86 – -9,3	Tanoue i sur. ⁹⁹
62 FAS+OZ (CAFF, CARB, OH-CARB, CARB-EP, COD, norVER, SMX, TOR, VER, WAR)	Kukci, puževi i virnjaci (cijelo tijelo)	Homogenizacija i liofilizacija	0,1 g	FUSLE (MeOH)	Dodatak MeCN/H ₂ O, 3:1 v/v, mikro-SPE (Ostro™ s 96 jažica)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,06 – 4,3 ^b 0,21 – 14	23 – 125	-	Huerta i sur. ⁹³
8 FAS-a (ERY, CARB)	Ribe (jetra, mozak, škrge, mišić)	-	0,5 – 1 g	PLE (hidromatriks, MeOH)	Dodatak MeCN i krioprecipitacija	LC(ESI)-MS/MS(QqQ)	^b 0,4 – 1,2	62,4 – 83,6	-	Liu i sur. ¹⁶
115 FAS-a (CIP, NOR, AMOX, AZI, ERY, CLA, SMX, SPY, CAFF, TRAM, ATOR, CARB, VAL)	Ribe (mišić)	Homogenizacija	1 g	UAE (MeOH/MeCN + EDTA)	Krioprecipitacija i LLE (heksan)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^b 0,03 – 6,7	18,3 – 114	-89 – 332	Dasenaki i Thomaidis ¹⁷³
77 FAS+OZ (CAFF, CARB, COD, DIA, SMX, TEM)	Ribe (mišić)	Homogenizacija i mljevenje	10 g	QuEChERS (MeCN, MgSO ₄ + NaCl)	Krioprecipitacija, dodatak MeCN i frakcionacija na Captiva ND lipid kolonicama	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTOF) (IDA)	^b 0,2 – 5,4	40 – 130	-57 – 0	Baduel i sur. ¹⁷⁸

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
44 FAS+OZ (CAFF, CARB, COT, SMX, WAR)	Školjkaši (meko tkivo)	Homogenizacija	1 – 1,5 g	LLE (MeOH:MeCN, 1:1, v/v)	Krioprecipitacija, dodatak MeCN i frakcionacija na Captiva ND lipid kolonicama	LC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,003 – 33	41 – 163	4 – 417	Bayen i sur. ¹⁷⁹
8 FAS-a (ERY, CARB)	Ribe (jetra, mozak, škrge, mišić)	-	0,5 – 1 g	PLE (MeOH)	Dodatak MeCN i krioprecipitacija	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,08 – 0,25 ^b 0,3 – 1,0	65,2 – 85,3	-	Liu i sur. ²⁰
23 FAS-a (SMX, N-Ac-SMX, AZI, ERY, CARB, OH-CARB, CARB-EP, COD)	Školjkaši (meko tkivo)	Liofilizacija i mljevenje	0,5 g	PLE (hidromatriks, MeOH/H ₂ O, 1:2, v/v)	Dodatak H ₂ O + EDTA, SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,01 – 0,80 ^b 0,02 – 2,66	30,1 – 115,7	-95 – 75	Álvarez-Muñoz i sur. ¹⁶⁵
11 FAS+OZ (CARB, SER)	Ribe (krv)	Centrifugiranje	20 µL	LLE (acetone)	-	HPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,02 – 8,11* ^b 0,05 – 27,00*	55 – 137	-28,2 – 56,0	Chen i sur. ¹²¹
10 FAS+OZ (WAR, SMX, CARB, TEM, DIA, CAFF)	Rakušci (cijelo tijelo)	Liofilizacija i mljevenje	0,1 g	Pulverizirana LLE (MeCN)	Dodatak NH ₄ Ac, SPE (Oasis HLB kolonice)	LC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 1 – 13 ^b 4 – 61	41 – 89	-56 – 9	Miller i sur. ⁹⁴
23 FAS-a (SMX, AZI, CLA)	Ribe (mišić) i školjkaši (meko tkivo)	Homogenizacija, liofilizacija i mljevenje	0,5 g	QuEChERS (MeCN:MeOH, 3:1, v/v, MgSO ₄ + NaAc)	-	UHPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,01 – 0,31 ^b 0,02 – 1,03	28 – 70	-	Serra-Compte i sur. ¹⁶⁷

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
16 FAS+OZ (SMX, AMOX)	Ribe (mišić) i puževi (meko tkivo)	Liofilizacija i mljevenje	0,5 g	QuEChERS (Al ₂ O ₃ + hidromatriks, MeCN:H ₂ O, 1:1, v/v, QuEChERS kit ekstrakcijskih soli)	d-SPE kit, dodatak MeCN:H ₂ O, 1:9, v/v, SPE (Strata-X C18 kolonice)	HPLC-MS/MS(QTRAP) (MRM)	^a 0,02 – 3,5	64 – 114	-	Omar i sur. ¹⁰⁵
74 FAS-a (OH-CARB, ATOR, AZI, CAFF, CARB, CLA, ERY, N-Ac-SMX, norSER, OXA, OXCARB, SER, SMX, TERB, TRAM, VAL, VER)	Ribe (mišić, mozak, bubrezi, jetra, krv)	Homogenizacija i mljevenje (čvrsti uzorci) i centrifugiranje (krv)	0,25 – 0,5 g	LLE (MeCN:iPrOH, 3:1, v/v)	Krioprecipitacija	HPLC(HESI)-HRPS	^b 0,2 – 5,4	78 – 156	-	Grabicová i sur. ³³
34 FAS+OZ (SMX, SPY, CIP, NOR, CLA, ERY-H ₂ O, CARB)	Ribe (mišić) i školjkaši (meko tkivo)	Liofilizacija i mljevenje	0,2 g	UAE (MeCN:H ₂ O, 8:2, v/v)	Frakcionacija na Oasis PRiME HLB kolonicama	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,01 – 1,9 ^b 0,03 – 5,6	43 – 127	56 – 125	Xie i sur. ¹⁸⁰

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
107 FAS+OZ (BE, CARB, CARB-EP, COC, COT, DIA, MDMA, norDIA, OXA, SPY, TEM, TRAM, VER, WAR)	Rakušci (cijelo tijelo)	Liofilizacija i mljevenje	0,02 g	UAE (MeCN:H ₂ O, 3:1, v/v)	Dodatak NH ₄ Ac, SPE (kombinirane Strata Alumina-N-HLB kolonice)	LC(API-HESI)-MS/MS(QqQ) (SRM)	^a 0,03 – 8,3 ^b 0,1 – 25,2	26 – 100	–82 – 50	Miller i sur. ¹⁸¹
15 FAS+OZ (SMX, CARB, CAFF)	Ribe (mišić, škrge, jetra, crijeva)	Liofilizacija i mljevenje	10 g	Soxhlet (MeOH/acetone, 3:1, v/v)	Dodatak NaOH, SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,01 – 0,03 ^b 0,025 – 0,098	68,8 – 98,5	-	Ojemaye i Petrik ⁵⁹
35 FAS-a (COC, BE, MDMA, MOR, MTHD, EDDP, CAFF, DIA, OXA, TEM, SER, ZOLP)	Školjkaši (meko tkivo)	Homogenizacija	10 g	QuEChERS (MeCN, MgSO ₄ + NaCl + NaCitrat + DCS)	d-SPE (PSA, C18, MgSO ₄)	HPLC(ESI)-MS/MS(QTRAP) (SRM)	^a 0,1 – 10 ^b 0,3 – 30	77 – 115	–95 – 65	López-García i sur. ¹⁸²
63 FAS-a (CARB, OH-CARB, OXA, SER, SMX, TRAM, VAL, N-Ac-SMX)	Ribe (mišić, jetra)	Homogenizacija i liofilizacija, dodatak natrijeva acetata i hidroliza β-glukuronidazom	0,05 – 0,1 g	LLE (heptan i MeCN)	Frakcionacija na SiO ₂ SPE kolonicama, RAM	LC-MS/MS	^b 0,1 – 48	60 – 135	–84 – 200	Boulard i sur. ¹⁸³

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
63 FAS-a (CARB, OH-CARB, OXA, SER, SMX, TRAM, VAL, <i>N</i> -Ac-SMX)	Ribe (krv)	Centrifugiranje, dodatak natrijeva acetata i hidroliza β-glukuronidazom	0,2 mL	LLE (heptan i MeCN)	Frakcionacija na SiO ₂ SPE kolonicama, RAM	LC-MS/MS	^b 0,05 – 5,5*	70 – 135	–88 – 130	Boulard i sur. ¹⁸³
6 FAS-a (CARB, SMX)	Ribe (mišić, jetra, bubreg, škrge, mozak, želudac, crijeva, slezena, koža)	Homogenizacija, dodatak β-glukuronidaza/arilsulfataza	0,5 g	UAE (MeCN + 1 % MeCOOH)	Captiva ND Lipid kolonice, d-SPE kolonice	HPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^b 0,003 – 14,4	0 – 203	-	Liu i sur. ¹⁵¹
	Ribe (krv, žuč)	Centrifugiranje, dodatak β-glukuronidaza/arilsulfataza	0,05 mL	LLE (MeCN + 1 % MeCOOH)	Captiva ND Lipid kolonice, d-SPE kolonice	HPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^b 0,030 – 12,37	0 – 160	-	
22 FAS-a (SMX, <i>N</i> -Ac-SMX, CARB, CARB-EP, SER, norSER)	Ribe (mišić, bubreg, škrge, mozak)	Homogenizacija i liofilizacija	0,5 g	PLE (MeCN)	SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,02 – 0,48 ^b 0,08 – 1,51	72,5 – 89,3	81 – 106	Yan i sur. ¹⁸⁵
	Ribe (krv)	Centrifugiranje	1 mL	UAE (MeCN)	SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,04 – 0,10* ^b 0,15 – 0,40*	-	-	

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
81 FAS-a (ATOR, BE, CAFF, CARB, CARB-EP, CLA, CIP, COC, COD, COT, DIA, ERY, LOR, MOR, OXA, SER, SMX, N-Ac-SMX, SPY, TEM, VAL, VER, WAR)	Ribe (mišić, jetra, srce, koža, bubreg, gušterača, mozak)	Homogenizacija	0,5 g	UAE (MeCN/iPrOH, 3:1, v/v + 0,1 % HCOOH)	d-SPE (QuE Z-Sep/C18 sorbent)	UHPLC(ESI)-MS/MS(Orbitrap) (SIM/DIA)	^a 0,0004 – 14,91 ^b 0,001 – 49,7	0 – > 120	-100 – 200	Manjarrés i sur. ¹⁸⁴
	Ribe (krv)	Centrifugiranje	0,1 mL	LLE (MeCN)	-	UHPLC(ESI)-MS/MS(Orbitrap) (SIM/DIA)	^a 0,01 – 1,56* ^b 0,03 – 5,2*	0 – > 120	-60 – 200	
	Ribe (žuč)	-	0,05 mL	LLE (HCl, MeCN)	Dodatak acetona	UHPLC(ESI)-MS/MS(Orbitrap) (SIM/DIA)	^a 0,02 – 28,71* ^b 0,08 – 95,69*	0 – > 120	-100 – 215	
29 FAS-a (CARB, CARB-EP, OH-CARB, ESC, SER, norSER)	Ribe (mišić)	Homogenizacija i liofilizacija	0,5 g	UAE (MeCN/iPrOH, 1:1, v/v + 5 % HCOOH)	SPE (kombinirane SAX-HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 2,4 – 296,2 ^b 7,0 – 888,8	30 – 96	-	Weng i sur. ⁸⁹
11 FAS+OZ (CARB, AMOX, SMX, ERY)	Školjkaši (meko tkivo)	Homogenizacija i liofilizacija	0,25 g	QuEChERS (MeCN/MeOH, 1:1 v/v + EDTA + MgSO ₄ i heksan/acetone, 1:1 v/v + EDTA)	LLE (CHAPS, 0,6 %, m/v i MeOH)	HPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,0009 – 10 ^b 0,003 – 30	32 – 95	-75 – -16	Interino i sur. ¹⁸⁶
43 FAS-a (AMOX, CIP, NOR, SPY)	Školjkaši (meko tkivo)	Homogenizacija	2,0 g	LLE (MeCN + EDTA)	LLE (heksan)	UHPLC(ESI)-MS(Tof)	^a 3,31 – 57,9 ^b 9,7 – 175	29,8 – 124,1	-	Pereira i sur. ¹⁸⁷

Tablica 7. nastavak

Spojevi u metodi	Uzorak (matrica)	Pretpriprema uzorka	Veličina uzorka	Postupak ekstrakcije	Tehnika pročišćavanja	Instrumentna tehnika	^a GD/ ^b GK (µg kg ⁻¹)	Povrat metode (%)	Utjecaj matrice (%)	Literaturni izvor
14 FAS-a (CIP, NOR, CLA, SMX)	Ribe (mišić)	Homogenizacija	0,5 g	UAE (EtAc + EDTA)	SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,008 – 0,35 ^b 0,03 – 1,5	80,1 – 99,1	-	Shaaban i Mostafa ¹¹⁶
23 FAS-a (AZI, CLA, ERY, ERY-H ₂ O, SMX, VAL, CARB, ATOR)	Ribe (cijelo tijelo)	Homogenizacija i liofilizacija	1 g	LLE (MeCN/acetatni pufer, 1:1, v/v)	SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,4 – 12 ^b 5 – 50	0 – 106	-	Royano i sur. ¹⁸⁸
10 FAS-a (CLA, CARB, SMX)	Koralji	-	-	SPME (15 min)	-	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^a 0,2 – 1,6	89 – 102	-15,7 – 7,4	Becchi i sur. ¹⁸⁹
48 FAS+OZ (CARB, SMX)	Rakušci (cijelo tijelo)	Homogenizacija	0,125 g	QuEChERS (MeCN + 1 % HCOOH, heksan, MgSO ₄ + NaCl + NaCitrat + NH ₄ Ac)	d-SPE (PSA, GCB, MgSO ₄)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QqQ) (MRM)	^b 0,5 – 100	10 – 115	-75 – 168	Duny i sur. ¹¹⁰
10 FAS-a (N-Ac-SMX, SMX)	Školjkaši (meko tkivo)	Homogenizacija i liofilizacija	0,2 g	MSPD (SiO ₂ , MeCN)	Frakcionacija na smjesi sorbensa (Florisil, C18 i PSA)	HPLC(ESI)-MS/MS(QToF) (MSE)	^a 0,03 – 1,5 ^b 0,10 – 5,0	27 – 71,6	-56,4 – -2,14	Mejías i sur. ¹⁵³
14 FAS-a (SMX, ERY, CARB, CAFF)	Ribe (mišić, škrge)	Homogenizacija i liofilizacija	0,5 g	UAE (MeOH/MeCN, 2:1, v/v, fosfatni pufer)	Dodatak H ₂ O i EDTA, SPE (Oasis HLB kolonice)	UHPLC(ESI)-MS/MS(QToF) (MSE)	^a 0,02 – 0,25 ^b 0,18 – 1,86	70 – 114	-	Wanjeri i sur. ¹⁹⁰

^aGD, granica detekcije; ^bGK, granica kvantifikacije; *γ/ng L⁻¹; **OZ**, druga organska zagađivala; **FUSLE**, fokusirana ultrazvučna ekstrakcija kruto-tekuće; **LLE**, ekstrakcija tekuće-tekuće; **USE**, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom; **PLE**, ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom; **SPE**, ekstrakcija na čvrstoj fazi; **d-SPE**, disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi; **SPME**, mikroekstrakcija na čvrstoj fazi; **MSPD**, disperzija matrice na čvrstoj fazi; **SGC**, kolonska kromatografija sa silika gel stacionarnom fazom; **GPC**, gel propusna kromatografija; **MTBE**, metil-*tert*-butil eter; **CHAPS**, 3-[(3-kolamidopropil)dimetilamino]-1-propansulfonat; **DCS**, dinatrijev citrat seskvihidrat

2.3.2. Instrumentna analiza

Završni ekstrakti uzoraka biote sadrže vrlo niske koncentracije analita unutar kompleksne matrice uzorka te se za njihovu kvalitativnu i kvantitativnu analizu uglavnom koriste visokoselektivni i visokoosjetljivi vezani sustavi tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS), dok je uporaba vezanih sustava plinske kromatografije i spektrometrije masa (GC-MS) znatno rjeđa.

Budući da su FAS-ovi pretežno slabo hlapljivi, polarni spojevi, prije njihove analize na GC-MS sustavu potrebno je provesti derivatizaciju. Usporedba osjetljivosti određivanja i kromatografske separacije istraživanih FAS-ova postignutih primjenom različitih derivatizacijskih agensa pokazala je bolje rezultate za *N-tert-butildimetilsilil-N-metiltrifluoroacetamid* (MTBSTFA) nego za *N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamid* (BSTFA)¹⁹¹, a primjenom GC-MS tehnike analizirani su FAS-ovi iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova^{168,191–193}, lipidnih regulatora^{168,191}, antidepresiva^{34,117}, steroida^{168,194}, antimikotika i antikonvulzanata^{34,168} te fibrata^{168,192}.

Međutim, broj metoda utemeljenih na primjeni LC-MS/MS tehnika puno je veći (Tablica 7), prvenstveno zbog bolje kompatibilnosti s fizikalno-kemijskim karakteristikama ciljanih analita. Starije metode uglavnom su uključivale kromatografsku separaciju na klasičnim kromatografskim kolonama s punilima promjera 3,5 μm , dok je većina novijih uređaja danas opremljena tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC), a separacije se odvijaju na kolonama punjenim sorbensima veličine čestica ispod 2 μm što poboljšava kromatografsku rezoluciju i znatno skraćuje vrijeme analize. Za analizu FAS-ova najčešće se koristi kromatografija obrnutih faza (npr. kolone Acquity HSS T3, Acquity BEH C18, Poroshell 120 SB-C18, Synergi Hydro RP i XDB-C18) kod koje mobilnu fazu čini kombinacija ultračiste vode i organskog otapala (metanol ili acetonitril) s ili bez dodatka kiseline (najčešće octena ili mravlja kiselina) i/ili soli (najčešće amonijev formijat ili amonijev acetat)^{11,12,28}.

Od ionizacijskih tehnika, najčešće se koristi ionizacija elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI)^{11,12,28} (Tablica 7), a postoje i primjeri uporabe kemijske ionizacije pri atmosferskom tlaku (APCI)^{174,195} te poboljšane verzije ESI-a kao što su grijana ionizacija elektroraspršenjem (HESI)^{91,196,197} i tzv. turbo ion sprej (TIS)^{121,142,198}. Prednosti ESI tehnike u analitici FAS-ova su blaga ionizacija s minimalnom fragmentacijom u ionskom izvoru te vrlo učinkovita ionizacija većine polarnih, nehlapljivih i termolabilnih spojeva, dok

je glavni nedostatak visoka osjetljivost na utjecaj matrice što se najbolje kompenzira korištenjem odgovarajućih izotopno označenih unutarnjih standarda¹¹².

U analizi tragova FAS-ova u uzorcima iz okoliša najčešće se koriste LC-MS/MS sustavi koji uključuju analizatore s tri kvadrupola (QqQ), a snimanje se provodi praćenjem višestrukih tranzicijskih reakcija (engl. *multi reaction monitoring*, MRM)^{11,12,28} (Tablica 7). U literaturi ima i niz primjera korištenja drugih tipova analizatora kao što su ionska stupica vezana s kvadrupolom (QTrap)^{32,99,111,165}, Orbitrap^{91,184,197} te analizator vremena leta vezan s kvadrupolom (QTof)^{82,178,190}.

Specifikacije instrumentnog sustava (vrsta analizatora, način ionizacije, korištene mobilne i stacionarne faze i dr.) određuju instrumentne granice detekcije pojedinih spojeva te su neovisne o pripremi uzorka za analizu. S druge strane, granice detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) metode su jedan od pokazatelja kvalitete optimirane metode, zajedno s već spomenutim analitičkim povratom i utjecajem matrice. Vrijednosti granica kvantifikacije u objavljenim metodama uglavnom su u rasponu od 10^2 ng kg⁻¹ do 10^1 µg kg⁻¹ (Tablica 7), dok su omjeri GK/GD najčešće između 3 i 10. Osim kvalitete razvijene metode, GD i GK ovisit će i o vrsti matrice, ponajprije njenoj kompleksnosti i udjelu lipida pa su tako granice određivanja u tkivima poput bubrega, jetre, žuči i masnog tkiva često značajno više nego u uzorcima mišića, škruga i kože^{151,184}. Također, analize cijelog mekog tkiva školjkaša često pokazuju više vrijednosti GD i GK u usporedbi s homogenatom cijelog tijela ili pojedinačnih tkiva riba (Tablica 7).

Pregledom literature vidljivo je da često metode s manjim brojem analita, međusobno sličnijih fizikalno-kemijskih svojstava, u konačnici daju bolje analitičke pokazatelje pa tako i niže vrijednosti GD i GK. Od ukupno 40 metoda prikazanih u tablici 7 za odabrane FAS-ove, polovica metoda obuhvaća manje od 20 analita, dok svega 5 metoda (15 %) obuhvaća više od 40 spojeva koji pripadaju isključivo skupini farmaceutskih spojeva. Primjerice metoda Boulard i suradnika¹⁸³ obuhvaća 63 FAS-a, ali GK dosežu i do 50 µg kg⁻¹ za pojedine spojeve u uzorcima jetre dok metoda Yana i suradnika¹⁸⁵, koja obuhvaća tri puta manje analita, pokazuje maksimalnu vrijednost GK od $1,5$ µg kg⁻¹ (bubreg). Imajući u vidu koncentracije FAS-ova u realnim uzorcima biote (Tablica 5), jasno je da metode poput Boulard i suradnika¹⁸³, iako praktične zbog istovremene analize većeg broja spojeva, nisu adekvatne za praćenje realnog stanja te potvrđuju hipotezu o konstantnoj potrebi za razvojem novih i poboljšanjem starih metoda za analizu tragova FAS-ova u okolišu.

§ 3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Prilikom razvoja i validacije metode za određivanje farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita korištene su referentne tvari visoke čistoće i njihovi izotopno obilježeni analozi (unutarnji standardi, IS) prikazani u tablici 8. Referentne tvari korištene za identifikaciju i kvantifikaciju metabolita nastalih u modelnim pokusima sa zebričama (*Danio rerio*) prikazane su u tablici 9.

Tablica 8. Referentne tvari (analiti) i njihovi izotopno obilježeni analozi (unutarnji standardi) korišteni za razvoj i validaciju metoda.

Naziv spoja	Kratice	Proizvođač	Čistoća / %
ANALITI			
Lizinopril	LIS	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Ramipril	RAM	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Kodein	COD	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Morfin	MOR	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Metadon	MTHD	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
2-etilidien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin	EDDP	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Tramadol	TRAM	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
<i>N</i> -demetil- <i>cis</i> -tramadol	<i>N</i> -DM-TRAM	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
<i>O</i> -demetil- <i>cis</i> -tramadol	<i>O</i> -DM-TRAM	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Valsartan	VAL	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Amoksicilin	AMOX	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 95,0
Ciprofloksacin	CIP	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Norfloksacin	NOR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Azitromicin	AZI	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Dekladinozil azitromicin	DC-AZI	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
<i>N</i> '-demetil azitromicin	<i>N</i> '-DM-AZI	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
<i>N</i> -demetil azitromicin	<i>N</i> -DM-AZI	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Klaritromicin	CLA	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 95
Eritromicin	ERY	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
Bezvodni eritromicin	ERY-H ₂ O	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 97
Sulfametoksazol	SMX	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 99,5
<i>N</i> -acetil sulfametoksazol	<i>N</i> -Ac-SMX	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98,5
Sulfapiridin	SPY	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98,0
Escitalopram	ESC	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Sertralin	SER	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Karbamazepin	CARB	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 99
Okskarbazepin	OXCARB	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 97,5
Terbinafin	TERB	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Loratadin	LOR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Desloratadin	DLOR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Kvetiapin	QUE	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Varfarin	WAR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98

Tablica 8. nastavak

Naziv spoja	Kratice	Proizvođač	Čistoća / %
ANALITI			
Diazepam	DIA	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Oksazepam	OXA	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Amlodipin	AML	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Verapamil	VER	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 99
Torasemid	TOR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Zolpidem	ZOLP	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Kokain	COC	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Benzoilekgonin	BE	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
3,4-metilen- dioksimetamfetamin	MDMA	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Atorvastatin	ATOR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 95
Kofein	CAFF	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 99
Kotinin	COT	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 98,5
UNUTARNJI STANDARDI			
Ramipril- <i>d</i> ₅	RAM- <i>d</i> ₅	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Kodein- <i>d</i> ₃	COD- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 97,0
Morfin- <i>d</i> ₃	MOR- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Metadon- <i>d</i> ₃	MTHD- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
2-etilidien-1,5-dimetil-3,3- difenilpirolidin- <i>d</i> ₃	EDDP- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Tramadol- <i>d</i> ₃	TRAM- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Valsartan- <i>d</i> ₃	VAL- <i>d</i> ₃	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
Amoksisilin- <i>d</i> ₄	AMOX- <i>d</i> ₄	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
Ciprofloksacin- <i>d</i> ₈	CIP- <i>d</i> ₈	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 96
Norfloksacin- <i>d</i> ₅	NOR- <i>d</i> ₅	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka)	≥ 99
Azitromicin- <i>d</i> ₃	AZI- <i>d</i> ₃	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Klaritromicin- <i>d</i> ₃	CLA- <i>d</i> ₃	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Eritromicin- ¹³ C, <i>d</i> ₃	ERY- ¹³ C, <i>d</i> ₃	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Sulfametoksazol- <i>d</i> ₄	SMX- <i>d</i> ₄	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka)	≥ 97
<i>N</i> -acetil sulfametoksazol- <i>d</i> ₄	<i>N</i> -Ac-SMX- <i>d</i> ₄	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka)	≥ 97
Sulfapiridin- ¹³ C ₆	SPY- ¹³ C ₆	Dr. Ehrenstorfer GmbH (Njemačka)	≥ 97
Sertralin- <i>d</i> ₃	SER- <i>d</i> ₃	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 98,5
Karbamazepin- <i>d</i> ₁₀	CARB- <i>d</i> ₁₀	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 99
Terbinafin- <i>d</i> ₇	TERB- <i>d</i> ₇	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
Loratadin- <i>d</i> ₄	LOR- <i>d</i> ₄	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Desloratadin- <i>d</i> ₄	DLOR- <i>d</i> ₄	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
Kvetiapin- <i>d</i> ₈	QUE- <i>d</i> ₈	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 99,5
Varfarin- <i>d</i> ₅	WAR- <i>d</i> ₅	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Diazepam- <i>d</i> ₅	DIA- <i>d</i> ₅	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 98,5
Oksazepam- <i>d</i> ₅	OXA- <i>d</i> ₅	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 98,5
Amlodipin- <i>d</i> ₄	AML- <i>d</i> ₄	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Verapamil- <i>d</i> ₃	VER- <i>d</i> ₃	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
Torasemid- <i>d</i> ₇	TOR- <i>d</i> ₇	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
Zolpidem- <i>d</i> ₆	ZOLP- <i>d</i> ₆	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 98,5
Kokain- <i>d</i> ₃	COC- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Benzoilekgonin- <i>d</i> ₃	BE- <i>d</i> ₃	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 97,0
3,4-metilen- dioksimetamfetamin- <i>d</i> ₅	MDMA- <i>d</i> ₅	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Atorvastatin- <i>d</i> ₅	ATOR- <i>d</i> ₅	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 90
Kofein- ¹³ C ₃	CAFF- ¹³ C ₃	Cambridge Isotope Laboratories (MA, SAD)	≥ 99
Kotinin- <i>d</i> ₃	COT- <i>d</i> ₃	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 99

Tablica 9. Referentne tvari korištene za identifikaciju i kvantifikaciju metabolita u modelnim pokusima.

Naziv spoja	Kratica	Proizvođač	Čistoća / %
Kodein-6-glukuronid	C6G	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
<i>N</i> -demetil kodein	norCOD	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Morfin-3-β-D-glukuronid	M3G	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Morfin-6-β-D-glukuronid	M6G	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin	EMDP	Lipomed AG (Švicarska)	≥ 98,5
Dekladinozil klaritromicin	DC-CLA	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
<i>N</i> -demetil klaritromicin	DM-CLA	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 96
Zolpidem fenil-4-karboksilna kiselina	ZOLP-COOH	Cerilliant (TX, SAD)	≥ 99
<i>rac-trans-N</i> -demetil sertralin	norSER	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 96
Temazepam	TEM	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 95
3-hidroksi desloratadin	3OH-DLOR	Sigma-Aldrich (MO, SAD)	≥ 98
Verapamil metabolit D-617	VER D617	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 97
<i>N</i> -demetil verapamil	norVER	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98
10-hidroksi varfarin	OH-WAR	Toronto Research Chemicals (Kanada)	≥ 98

U radu su korištena sljedeća otapala, kemikalije, sorbensi i plinovi visoke čistoće:

- Metanol, čistoća za HPLC, VWR International, (PA, SAD)
- Metanol, čistoća za LC-MS, Sigma-Aldrich (MO, SAD)
- Acetonitril, čistoća za HPLC, VWR, (PA, SAD)
- Acetonitril, čistoća za LC-MS, Sigma-Aldrich (MO, SAD)
- Aceton, čistoća za HPLC, Supelco (PA, SAD)
- Voda, čistoća za LC-MS, VWR International, (PA, SAD)
- Amonijak, 25 % vodena otopina, p.a., Merck KGaA (Njemačka)
- Amonijak, bezvodna otopina u metanolu, 7 mol L⁻¹, Sigma-Aldrich (MO, SAD)
- Mravlja kiselina, čistoća za LC-MS, Honeywell Fluka (NY, SAD)
- Mravlja kiselina, čistoća ≥ 96 %, Sigma-Aldrich (MO, SAD)
- Argon 5,0, φ > 99,999 %, Messer Croatia Plin (Hrvatska)
- Dušik 5,0, φ > 99,999 %, Messer Croatia Plin (Hrvatska)
- Amonijev formijat, čistoća za LC-MS, Sigma-Aldrich (MO, SAD)
- Bondesil-PSA sorbent u prahu, 40 μm, Agilent Technologies (CA, SAD)
- Bondesil-C₁₈ sorbent u prahu, 40 μm, Agilent Technologies (CA, SAD)
- Sepra NH₂ sorbent u prahu, 50 μm, 65 Å, Phenomenex (CA, SAD)
- Silika gel 60, ultračisto za kolonsku kromatografiju, 0,063 – 0,200 mm, Merck KGaA (Njemačka)

3.1.2. Otopine

Osnovne standardne otopine analita i izotopno obilježenih analoga farmaceutskih spojeva, koji su nabavljeni u obliku krutina, pripremljene su odvagom 1,0 mg tvari na analitičkoj vagi u tamnoj bočici s navrtnim čepom volumena 2 mL (Supelco, PA, SAD). Za pripremu svih vrsta standardnih otopina korištena su otapala LC-MS čistoće. Većina odvaganih referentnih tvari otopljena je u 1,0 mL metanola, osim fluorokinolonskih antibiotika (ciprofloksacin i norfloksacin), koji su otopljeni u 1 mL smjese vode i metanola [$\varphi(\text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}) = 1 : 1$] koja je sadržavala 0,2 % (v/v) klorovodične kiseline. Tako pripremljene standardne otopine pojedinačnih spojeva masene koncentracije 1 g L^{-1} korištene su za pripremu njihovih razrijeđenih otopina u metanolu.

Neke referentne tvari su nabavljene u obliku certificiranih metanolnih otopina (1 mL) masene koncentracije 1 g L^{-1} (morfin, kodein, metadon, tramadol, EDDP, *O*-demetil tramadol, *N*-demetil tramadol, kotinin, kokain, benzoilekgonin, MDMA, norkodein, morfin-3-glukuronid, morfin-6-glukuronid i EMDP). Certificirane metanolne otopine nekih izotopno obilježenih unutarnjih standarda (karbamazepin- d_{10} , kvetiapin- d_8 , diazepam- d_5 , oksazepam- d_5 , zolpidem- d_5 , sertralin- d_3 , morfin- d_3 , kodein- d_3 , metadon- d_3 , EDDP- d_3 , tramadol- d_3 , kotinin- d_3 , kokain- d_3 , benzoilekgonin- d_3 i MDMA- d_5) imale su masenu koncentraciju $0,1 \text{ g L}^{-1}$. Zolpidem fenil-4-karboksilna kiselina nabavljena je u obliku otopine u smjesi vode i acetonitrila [$\varphi(\text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{CN}) = 1 : 1$] masene koncentracije $0,5 \text{ g L}^{-1}$. Nakon otvaranja ampule, certificirane standardne otopine prenesene su u tamne bočice s navrtnim čepom volumena 2 mL Pasteurovom pipetom. Sve pripremljene otopine čuvane su u zamrzivaču, na temperaturi od $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

Osnovne standardne otopine korištene su za pripremu glavnih radnih otopina koje su služile za provedbu modelnih pokusa prilikom razvoja i validacije metoda te za konstrukciju umjernih krivulja. Pripremane su tri vrste glavnih radnih otopina u metanolu: i) smjesa 44 analita (Tablica 8), ii) smjesa 14 metabolita (Tablica 9) te iii) smjesa 35 unutarnjih standarda (Tablica 8). Smjesa 44 analita i smjesa 13 metabolita pripremljene su u metanolu, masene koncentracije 10 mg L^{-1} za pojedinačne sastojke. Iz glavnih radnih otopina su, prema potrebi, u metanolu pripremane ostale radne otopine masenih koncentracija $0,1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $1 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $10 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$, $100 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ i $1000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Kalibracijske standardne otopine analita, koje su upotrijebljene za konstrukciju umjernih krivulja, pripravljanje su u rasponu masenih koncentracija od $0,5 \text{ ng L}^{-1}$ do $2000 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$.

Kao optimirano otapalo za pripremu kalibracijskih otopina poslužila je smjesa vode i metanola [$\varphi(\text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}) = 6 : 4$] s dodatkom amonijevog formijata (50 mmol L^{-1}) i mravlje kiseline [$\varphi(\text{HCOOH}) = 0,2 \%$]. Raspon masenih koncentracija te broj točaka umjerne krivulje prilagođavan je očekivanim koncentracijama u završnom ekstraktu. U kalibracijske otopine dodana je i smjesa 35 unutarnjih standarda dodatkom 5 ili $10 \mu\text{L}$ glavne radne otopine unutarnjih standarda masene koncentracije 5 mg L^{-1} (dodatak 25 ng ili 50 ng). Identična količina unutarnjeg standarda dodavana je i u svaki uzorak vode i ribljeg tkiva prije početka njegove obrade te je imala ulogu idealnog surogata.

Za potrebu provedbe modelnih pokusa u kojima je istraživana akumulacija i depuracija FAS-ova, pripravljene su pojedinačne otopine 20 ispitivanih analita (kodein, tramadol, benzoilekgonin, norfloksacin, sulfametoksazol, EDDP, azitromicin, kofein, desloratadin, zolpidem, karbamazepin, ramipril, verapamil, oksazepam, klaritromicin, sertralina, varfarin, valsartan, diazepam i atorvastatin) u metanolu, masene koncentracije 10 g L^{-1} . Zbog slabije topljivosti pojedinih tvari, njihove pojedinačne otopine pripravljene su u nižim koncentracijama; oksazepam (5 g L^{-1}) te klaritromicin i kofein (8 g L^{-1}). Iz pojedinačnih otopina pripremljena je radna smjesa 20 analita masene koncentracije $0,25 \text{ g L}^{-1}$ u metanolu.

3.1.3. Pribor

U svakodnevnom laboratorijskom radu korišteno je stakleno laboratorijsko posuđe koje je prethodno oprano kromsumpornom kiselinom, isprano ultračistom vodom te osušeno na $200 \text{ }^\circ\text{C}$. Prije svakog korištenja, posuđe je isprano metanolom i osušeno u struji dušika.

Za pripremu standardnih otopina, dodatak unutarnjih standarda u uzorke, dodatke smjese analita u modelne uzorke i slično korištene su automatske pipete s promjenjivim nastavcima (Eppendorf AG, Njemačka).

Sve standardne otopine pohranjene su u tamnim bočicama s navrtnim čepom s teflonskom brtvom. Pojedinačne standardne otopine pohranjivane su u bočicama volumena 2 mL, dok su radne otopine čuvane u bočicama volumena 4 mL (Supelco, PA, SAD).

Završni ekstrakti uzoraka za instrumentnu analizu te standardne otopine za konstrukciju umjernih krivulja čuvani su u bočicama s navrtnim čepom sa septumom za automatsko injektiranje, volumena 2 mL (Agilent Technologies, CA, SAD).

Uzorci vode prikupljeni u pokusima s modelnim ribljim organizmima čuvani su u polietilenskim bočicama volumena 5 mL, 70 mL ili 125 mL (Thermo Scientific, MA, SAD). Uzorci sekundarnog efluenta i riječne vode prikupljeni su u polietilenske boce volumena 500 mL i 1000 mL (Thermo Scientific, MA, SAD). Za pripremu homogenog medija izlaganja korišteni su polietilenski spremnici volumena 10 L.

Modelno izlaganje zebrića za istraživanje kinetike akumulacije i depuracije farmaceutskih spojeva provedeno je u polikarbonatnim akvarijima volumena 8 L, dok su ispitivanja kroničnog izlaganja i metaboličkih transformacija provedena u polikarbonatnim akvarijima volumena 3,5 L (Tecniplast, Italija).

Uzorci ribljeg tkiva pohranjeni su u polietilenskim epruvetama s konusnim dnom volumena 15 mL ili 50 mL, ovisno o veličini uzorka (Falcon, Lab Logistics Group GmbH, Njemačka).

Za ultrazvučnu ekstrakciju uzoraka ribljeg tkiva i uparavanje organskih ekstrakta korištene su silanizirane borosilikatne epruvete (Thermo Scientific, MA, SAD).

Ekstrakti ribljeg tkiva dobiveni postupkom ekstrakcije, a prije postupka pročišćavanja, čuvani su u epruvetama za mikrocentrifugu volumena 2 mL (Eppendorf AG, Njemačka).

Uzorci vode filtrirani su staklenim vakuumskim sustavom, volumena 2 L, uz korištenje filtera sa staklenim mikrovlaknima (GF/D) promjera 47 mm i veličinom pora 2,7 μm (Whatman, UK). Ekstrakti uzoraka ribljih tkiva u postupku pročišćavanja filtrirani su na staklenom vakuumskom sustavu volumena 125 mL uz korištenje filtera sa staklenim mikrovlaknima (GF/F) promjera 25 mm i veličinom pora 0,7 μm (Whatman, UK).

Za provjeru pH-vrijednosti otopina korištene su pH indikatorske trake fiksiranog pH u rasponu 1,7 – 3,8 s podjelom 0,3 pH jedinice te pH indikatorskim trakama fiksiranog pH u rasponu 6 – 7,7 s podjelom 0,5 pH jedinice (Macherey-Nagel GmbH & Co., Njemačka).

Za ekstrakciju tekućih uzoraka na čvrstoj fazi primjenjivane su kolonice Oasis HLB (Waters Corp, MA, SAD) volumena 6 mL i punjenja 200 mg te volumena 3 mL i punjenja 60 mg. U preliminarnim pokusima optimiranja postupka pročišćavanja ekstrakata ribljeg tkiva korištene su sljedeće kolonice za ekstrakciju na čvrstoj fazi: Strata NH2 (3 mL/200 mg; Supelco, PA, SAD), PSA (3 mL/200 mg; Supelco, PA, SAD) i Supelclean ENVI-18 (6 mL/500 mg; Supelco, PA, SAD).

Prije instrumentne analize, pripremljeni završni ekstrakti su filtrirani na politetrafluoroetilenskim (PTFE) Minispike filterima promjera 13 mm i veličine pora 0,2 μm

te na PTFE Minispikes filterima promjera 17 mm i veličine pora 0,45 μm (Waters Corp, MA, SAD). Za filtraciju je korištena injekcijska šprica s navojem volumena 1 mL (Hamilton, NV, SAD).

3.1.4. Uređaji i instrumentacija

U eksperimentalnom radu korišteni su sljedeći uređaji:

- Tehnička vaga PB 3002, Delta Range (Metler Toledo, OH, SAD),
- Analitička vaga ALC 201,4 (Acculab, NJ, SAD),
- Ultrazvučna kupelj Branson 3800 (Branson Ultrasonics, CT, SAD),
- Vakuumski uređaj za višestruko propuštanje uzoraka s nastavkom za sušenje (Supelco, PA, SAD),
- Uređaj za uparavanje u struji dušika, Turbovap (Caliper Life Science, MA, SAD),
- Laboratorijska centrifuga SIGMA 3-16 (SciQuip, UK),
- Laboratorijska centrifuga s hlađenjem MIKRO 200 | 200 R (Hettich, Njemačka),
- Laboratorijski vrtložni homogenizator Vortex V-1plus (Biosan, Latvija),
- Vibracijski kriomlin sa spremnikom za tekući dušik SPEX SamplePrep 6875 (Cole-Parmer, NJ, SAD)
- Uređaj za proizvodnju ultračiste vode, Elix-Milli-Q system (Millipore, MA, SAD).

Za analizu farmaceutskih spojeva u uzorcima korištena su dva LC-MS/MS instrumenta:

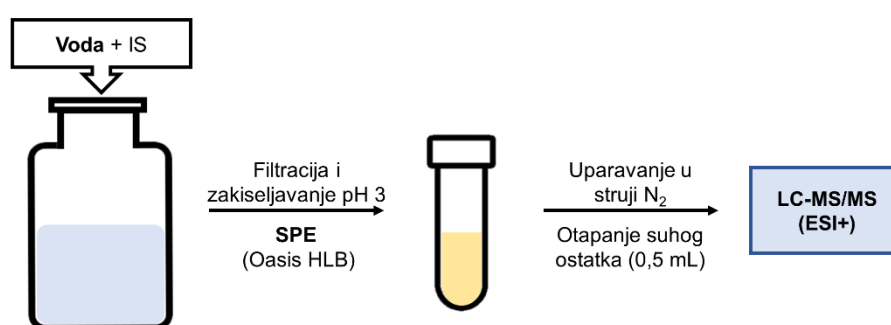
- Vezani sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (Thermo Electron Corporation, MA, SAD) korišten je za postupak razvoja i optimiranja analitičkih metoda. Tekućinski dio sustava sastojao se od kvaterne visokotlačne pumpe (Surveyor MS Pump) i automatskog injektora s grijačem kolone (Surveyor Autosampler). Masenospektrometrijski dio sustava činio je spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom (TSQ Quantum AM) opremljen ionskim izvorom za ionizaciju elektroraspršenjem (ESI). Za sve analize provedene na ovom uređaju korištena je HPLC kolona Synergi Polar-RP (4 μm , 80 Å, 3 mm \times 150 mm; Phenomenex, CA, SAD).
- Vezani sustav tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa (Waters Corp, MA, SAD) korišten je za kvantitativnu analizu

uzoraka vode i ribljeg tkiva iz modelnih pokusa izlaganja zebrića te za kvantitativnu analizu uzoraka riječne vode i ribljeg tkiva prikupljenih na terenskim istraživanjima na rijeci Savi. LC dio sustava je Acquity UPLC I-Class PLUS sustav koji sadrži binarnu visokotlačnu pumpu i automatski injektor s grijačem kolone. LC sustav je preko ionskog izvora za ionizaciju elektroraspršenjem vezan na spektrometar masa s trostrukim kvadrupolom (XEVO TQ-XS). Za analize je korištena UHPLC kolona Acquity UPLC BEH C18 (1,7 μm , 130 Å, 2,1 mm \times 100 mm; Waters Corp, MA, SAD).

3.2. Metode

3.2.1. Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu

Ekstrakcija analita iz tekućih uzoraka provedena je primjenom optimiranog postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi prema protokolu prikazanom na slici 2. Volumeni uzoraka bili su: i) 125 mL i 500 mL za riječnu vodu, ovisno o lokaciji; ii) 125 mL za otpadnu vodu; iii) 5 mL za akvarijski medij iz modelnog pokusa ispitivanja kinetike akumulacije i depuracije kod koncentracije izlaganja od 10 $\mu\text{g L}^{-1}$; iv) 50 mL za medij iz modelnog pokusa ispitivanja kroničnog izlaganja smjese 20 FAS-ova, koncentracije 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ te v) 250 mL za akvarijski medij iz modelnog pokusa ispitivanja utjecaja kroničnog izlaganja razrijeđenoj otpadnoj vodi.



Slika 2. Shematski prikaz postupka pripreme uzoraka vode za instrumentnu analizu.

Prije same obrade uzorka vode, u izuzeti alikvot dodano je 25 ng unutarnjih standarda. Nakon 15 minuta ekvibracije, uzorci su filtrirani kroz GF/D filtere (Whatman) primjenom vakuumske sustava za filtraciju, a filtrat je zakiseljen dodatkom mravlje kiseline na pH 3.

Nakon zakiseljavanja i homogenizacije, filtrat je propušten kroz prethodno isprane i kondicionirane kolonice Oasis HLB približnom brzinom od 5 mL min^{-1} . Za obogaćivanje uzoraka vode volumena većeg od 100 mL primjenjivane su kolonice Oasis HLB volumena 6 mL i punjenja 200 mg, dok su za sve ostale uzorke korištene kolonice Oasis HLB volumena 3 mL i punjenja 60 mg. Prije nanošenja uzoraka, kolonice Oasis HLB (6 mL/200 mg) su sekvencijalno isprane sa 6 mL metanola s dodatkom amonijaka ($\varphi = 1 \%$), 6 mL metanola, 6 mL metanola s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,2 \%$) i 6 mL ultračiste vode te kondicionirane sa 6 mL izvorske vode zakiseljene na pH 3 dodatkom mravlje kiseline. Nakon koncentriranja uzorka, kolonice Oasis HLB (6 mL/200 mg) su isprane sa 6 mL zakiseljene izvorske vode (pH 3) te pohranjene u zamrzivač na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

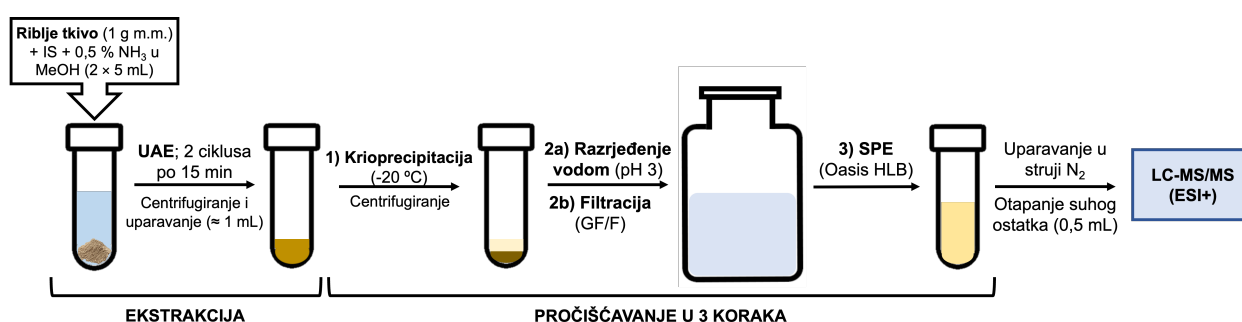
Na dan analize, kolonice su odmrznute na sobnoj temperaturi te gravitacijski sekvencijalno eluirane metanolom ($V = 2 \text{ mL}$) i metanolom s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,2 \%$; $V = 4 \text{ mL}$]. Postupak obrade manjih kolonica (3 mL/60 mg) bio je identičan, osim što su volumeni svih otapala primijenjenih za ispiranje, kondicioniranje i sekvencijalno eluiranje bili dvostruko manji. Eluati su prikupljeni u silaniziranu borosilikatnu epruvetu te upareni do suha u struji dušika na temperaturi od $40 \text{ }^\circ\text{C}$, a zaostali suhi ostatak otopljen je u 0,5 mL završnog otapala, smjese vode i metanola [$\varphi(\text{H}_2\text{O}, \text{CH}_3\text{OH}) = 6 : 4$] uz dodatak 50 mmol L^{-1} amonijevog formijata i mravlje kiseline ($\varphi = 0,2 \%$). Otapanje suhog ostatka i desorpcija analita sa stakla pospješeni su uporabom laboratorijskog vrtložnog homogenizatora te ultrazvučne kupelji. Završni ekstrakti filtrirani su korištenjem PTFE filtera ($0,2 \text{ }\mu\text{m}$) i pohranjeni u bočice s navrtnim čepom (2 mL) sa septumom za automatsko injektiranje. Takvi finalni ekstrakti analizirani su ciljanom analizom na LC-MS/MS sustavu.

Za analizu uzoraka medija iz modelnih pokusa sa zebričama primijenjen je pojednostavljeni proces pripreme uzorka jer su koncentracije izlaganja bile znatno više (do $100 \text{ }\mu\text{g L}^{-1}$) i nisu zahtijevale pretkoncentriranje uzorka. Iz homogeniziranog uzorka medija odvojen je alikvot volumena 0,55 mL koji je nadopunjen s 0,45 mL prethodno pripremljene otopine za podešavanje sastava (otopina $0,11 \text{ mol L}^{-1}$ amonijeva formijata u metanolu s dodatkom mravlje kiseline, $\varphi = 0,44 \%$). Nakon dodataka IS, tako podešen uzorak homogeniziran je uporabom laboratorijskog vrtložnog homogenizatora te ekvilibriran najmanje 15 minuta prije instrumentne analize.

3.2.2. Priprema uzoraka riblje tkiva za instrumentnu analizu

Smrznuti uzorci ribljeg tkiva samljeveni su i homogenizirani s pomoću vibracijskog kriomlina, nakon čega su do daljnje obrade pohranjeni na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Optimirani postupak ekstrakcije i pročišćavanja uzoraka ribljeg tkiva prikazan je na slici 3. Alikvot uzorka ribljeg tkiva (1,0 g mokre mase) izvagan je u silaniziranu borosilikatnu epruvetu te je na njega dodano po 50 ng IS. Nakon 30 minuta ekvibracije na sobnoj temperaturi, u epruvetu je dodano 5 mL metanola s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,5\%$] te je sadržaj epruvete homogeniziran s pomoću vrtložnog homogenizatora.



Slika 3. Shematski prikaz postupka pripreme uzoraka ribje za instrumentnu analizu.

Tako pripremljeni uzorak ekstrahiran je 15 minuta u ultrazvučnoj kupelji, nakon čega je centrifugiran 15 minuta brzinom od 4200 rpm (3392 rcf). Supernatant je prikupljen u čistu silaniziranu borosilikatnu epruvetu, a kruti ostatak podvrgnut još jednom, identičnom ciklusu ekstrakcije. Udruženi prikupljeni supernatant, oko 10 mL metanolnog ekstrakta po uzorku, koncentriran je uparavanjem u struji dušika na temperaturi od $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ do približnog volumena od 1 mL. Upareni ekstrakt je kvantitativno, uz ispiranje stijenke epruvete, prenesen u epruvetu za mikrocentrifugu nakon čega je preko noći pohranjen na temperaturi od $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Ekstrakt je sljedeći dan pročišćen u tri međusobno povezana koraka. Hladni ekstrakt je centrifugiran 10 min pri 15 000 rpm (21 382 rcf) na temperaturi $0\text{ }^{\circ}\text{C}$. Dobiveni supernatant je izdvojen i razrijeđen sa 100 mL zakiseljene izvorske vode (pH 3), homogeniziran s pomoću vrtložnog homogenizatora, ekvibriran 15 minuta te filtriran korištenjem GF/F filtera na vakuumskom sustavu za filtriranje. Dobiveni filtrat je nakon toga pročišćen i koncentriran primjenom postupka ekstrakcije na čvrstoj fazi, prethodno opisanog za ekstrakciju tekućih uzoraka (poglavlje 3.2.1. Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu). Volumen završnog ekstrakta za analizu bio je 1 mL.

Optimiranom postupku pročišćavanja ekstrakata ribljeg tkiva prethodilo je ekstenzivno istraživanje različitih metoda pročišćavanja, dijelom preuzetih iz literature, s ili bez modifikacije postupka, uključujući izmućkivanje završnog ekstrakta *n*-heksanom, sorpciju na dispergiranoj čvrstoj fazi ili na stupcu čvrste faze te frakcionaciju na stupcu silikagela ili na kolonicama punjenim hidrofilno-lipofilnim sorbensom (Oasis HLB).

Postupak izmućkivanja završnog ekstrakta nepolarnim otapalom preuzet je iz rada Boulard i suradnika¹⁸³, a uključivao je dodatak 0,5 mL *n*-heksana u 1 mL završnog ekstrakta. Smjesa je homogenizirana jednu minutu na vrtložnom homogenizatoru i dvije minute u ultrazvučnoj kupelji, a nakon 30 minuta i potpunog odjeljivanja slojeva, gornji sloj *n*-heksana je uklonjen, a donji sloj uzorka analiziran.

Po uzoru na pročišćavanje u QuEChERS metodama, ispitana je metoda sorpcije nečistoća na dispergiranoj čvrstoj fazi prema protokolu iz rada Peña-Herrera i suradnika¹⁹⁹. Ova metoda sorpcije testirana je na uzorcima uparenog metanolnog ekstrakta (1 mL) u koje je dodana određena masa sorbensa. Smjesa je potom homogenizirana jednu minutu na vrtložnom homogenizatoru, centrifugirana, bistri supernatant izuzet i uparen do suha, a suhi ostatak otopljen u 1 mL završnog otapala za analizu. Ispitana su ukupno tri sorbensa, NH₂ i PSA čiji je dodatak bio 50 mg te C₁₈ s dodatkom od 30 mg.

Isti sorbensi ispitani su i u metodi sorpcije nečistoća na stupcu čvrste faze. Kolonice s ionsko-izmjenjivačkim sorbensima NH₂ (3 mL/200 mg) i PSA (3 mL/200 mg) prethodno su kondicionirane s 3 mL metanola i 3 mL metanola s dodatkom kiseline [$\varphi(\text{HCOOH}) = 1\%$]. U metanolne ekstrakte uparene na 0,5 mL dodano je 5 μL mravlje kiseline, a nakon homogenizacije ekstrakti su nanjeni na prethodno kondicionirane kolonice uz ispiranje stjenki epruveta s 2 mL metanola s dodatkom kiseline [$\varphi(\text{HCOOH}) = 1\%$]. Kolonice su gravitacijski eluirane istim otapalom, eluati su upareni do suha, a suhi ostatak otopljen je u 1 mL završnog otapala za analizu. Postupak sorpcije na kolonicama punjenim sorbensom C₁₈ (6 mL/500 mg) bio je vrlo sličan uz korištenje drugih otapala za kondicioniranje (3 mL metanola i 3 mL smjese metanola i ultračiste vode u volumnom omjeru 80/20) i eluiranje (metanol). Prije nanošenja na kolonicu, u metanolni ekstrakt je dodano 200 μL ultračiste vode, a stjenke epruvete su dodatno isprane s 2,5 mL smjese metanola i ultračiste vode [$\varphi(\text{CH}_3\text{OH}, \text{H}_2\text{O}) = 8 : 2$]. Prikupljeni eluat potom je uparen do 1 mL uz dodatak mravlje kiseline (20 μL , $\varphi = 10\%$) i amonijeva formijata (50 μL , $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$) s ciljem podešavanja sastava smjese što sličnije sastavu završnog otapala za analizu.

Frakcionacija na stupcu silikagela provedena je po uzoru na protokol Terzić i Ahel²⁰⁰. Ukratko, metanolni ekstrakt uparen je do suha i otopljen u 1 mL diklormetana. Na kolonu deaktiviranog silikagela (15 % H₂O) u diklormetanu nanosi se otopljeni uzorak koji se eluira sekvencijalno diklormetanom (20 mL), metanolom s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 1$ %, 25 mL) i metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5$ %, 25 mL). Frakcije su prikupljene zasebno, uparene do suha i otopljene u 1 mL završnog otapala za analizu.

Frakcionacija na kolonicama punjenim hidrofilno-lipofilnim sorbensom (Oasis HLB, 6 mL/200 mg) provedena je po uzoru na postupak ekstrakcije analita iz tekućih uzoraka opisan u prethodnom poglavlju. Metanolni ekstrakt uparen je do 0,5 mL te prenesen u 100 mL ultračiste vode, prethodno podešenog pH na 3 odnosno 7. Nakon homogenizacije, uzorak je nanesen na prethodno kondicioniranu HLB kolonicu (6 mL metanola i 6 mL izvorske vode pH 3) te vakuumski eluiran. Ostatak postupka jednak je postupku opisanom u poglavlju 3.2.1. *Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu.*

3.2.3. Instrumentna analiza farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS)

Za kvantitativnu analizu farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u okolišnim uzorcima i uzorcima iz modelnih pokusa korištena su dva LC-MS/MS sustava s tri kvadrupola (QqQ) koja su opisana ranije (poglavlje 3.1.4. *Uređaji i instrumentacija*). Instrument starije generacije, TSQ Quantum AM (Thermo Electron Corporation, MA, SAD), korišten je u prvoj fazi izrade eksperimentalnog dijela istraživanja, posebice u fazi razvoja metode, dok je u kasnijoj fazi napravljen transfer metode na osjetljiviji instrument novije generacije, XEVO TQ-XS (Waters Corp, MA, SAD).

Na sustavu TSQ Quantum AM, kromatografska separacija analita postignuta je na HPLC koloni Synergi Polar-RP (80 Å, 150 mm × 3 mm, 4 µm) primjenom gradijentnog eluiranja (Tablica 10) s pomoću binarnog sustava otapala, pri sobnoj temperaturi (22 °C) i protoku mobilne faze od 0,4 mL min⁻¹. Pokretna faza A bila je voda uz dodatak mravlje kiseline ($\varphi = 0,1$ %), a pokretna faza B metanol s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,1$ %).

Tablica 10. Uvjeti gradijentnog načina rada na koloni Synergi Polar-RP na LC-MS/MS instrumentu TSQ Quantum AM.

Vrijeme / min	Pokretna faza A	Pokretna faza B
	φ / %	φ / %
0	90	10
8	60	40
28	40	60
38	20	80
40	10	90
43	10	90
44	90	10
54	90	10

Ciljana analiza farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita provedena je uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom polaritetu, pri naponu kapilare 3500 V i temperaturi konusa 330 °C. Za desolvataciju i elektroraspršenje korišten je dušik, dok je kolizijski plin bio argon.

Za kromatografsku separaciju na instrumentu XEVO TQ-XS upotrijebljena je UHPLC kolona ACQUITY UPLC BEH C18 (130 Å, 100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm) uz primjenu gradijentnog eluiranja (Tablica 11) s pomoću binarnog sustava otapala, uz protok od 0,4 mL min⁻¹ i temperaturu kolone od 35 °C. Pokretna faza A bila je voda uz dodatak amonijeva formijata ($c = 0,05$ mmol L⁻¹) i mravlje kiseline ($\varphi = 0,05$ %), a pokretna faza B acetonitril s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,1$ %).

Tablica 11. Uvjeti gradijentnog načina rada na koloni Acquity UPLC BEH C18 na LC-MS/MS instrumentu XEVO TQ-XS.

Vrijeme / min	Pokretna faza A	Pokretna faza B
	φ / %	φ / %
0	99	1
0,5	99	1
1,5	85	15
6,0	75	25
12,0	55	45
12,5	5	95
14,0	5	95
14,5	99	1
15,0	99	1

Analiza FAS-ova i njihovih metabolita na ovom instrumentu također je provedena uz ionizaciju elektroraspršenjem, u pozitivnom polaritetu. Temperatura ionskog izvora bila je 120 °C, napon kapilare 0,5 kV, napon konusa 20 V, temperatura desolvatacije 600 °C, protok desolvacijskog plina 1000 L h⁻¹, konusni protok 150 L h⁻¹, a tlak u raspršivaču 4 bar. Kolizijski plin bio je

argon, dok je za desolvataciju i elektroraspršenje korišten dušik. Za analizu sertralina i njegovih metabolita, koji su pokazali nestabilnost pri elektroraspršenju u odabranim uvjetima, korištene su niže energije i temperature: napon konusa bio je 10 V, a temperatura desolvatacije 300 °C.

Identifikacija i kvantitativno određivanje farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita na oba instrumenta provedena su praćenjem optimiranih višestrukih tranzicijskih reakcija (MRM) gdje su za svaki analit i unutarnji standard odabrane i praćene po dvije tranzicije. Prva MRM tranzicija korištena je za kvantifikaciju, dok je druga MRM tranzicija služila dodatnoj potvrdi identifikacije spoja. Optimizacija uvjeta snimanja za svaki spoj provedena je infuzijom otopine čiste tvari u koncentraciji od 1 mg L⁻¹ direktno u MS te podešavanjem kolizijskih energija i napona na otvoru leće.

Za kvantitativnu analizu primijenjena je metoda unutarnjeg standarda s pomoću izotopno obilježenih strukturnih analoga (izotopnih surogata). Kvalitativne i kvantitativne analize uzoraka snimljenih na instrumentu TSQ Quantum AM provedene su uporabom programa Xcalibur 2.0.5, dok su uzorci snimljeni na instrumentu XEVO TQ-XS obrađeni u programu MassLynx V4.2.

Prije analize uzoraka na instrumentu XEVO TQ-XS, završni ekstrakti uzoraka razrijeđeni su 10 do 50 puta završnim otapalom.

3.3. Validacija analitičkih metoda

Validacija razvijenih analitičkih metoda za određivanje FAS-ova i njihovih metabolita u uzorcima vode i riba uključivala je određivanje instrumentne granice detekcije, područja linearnosti, granica kvantifikacije metode, točnosti, preciznosti, analitičkih povrata i utjecaja matrice. Svi validacijski pokusi učinjeni su u kvadriplikatu.

Instrumentna granica određivanja određena je kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano odrediti u standardnoj otopini bez prisustva matrice uz kriterij omjera intenziteta signala i šuma koji je oko tri. Granica kvantifikacije metode određena je kao najniža koncentracija analita koja se može pouzdano odrediti u matrici uz ispunjavanje sljedećih kriterija: odstupanje od umjerne krivulje i relativno standardno odstupanje uzastopnih

injektiranja manje je od 30 %, omjer intenziteta signala i šuma je oko osam te je prisutan prihvatljiv oblik kromatografskog pika.

Linearnost je određena injektiranjem standardnih otopina s konstantnom masenom koncentracijom unutarnjih standarda ($50 \mu\text{g L}^{-1}$) i masenom koncentracijom analita u rasponu od $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ do $5000 \mu\text{g L}^{-1}$ te konstrukcijom umjernih krivulja s 15 točaka u navedenom mjernom području.

Za svaku pojedinu fazu razvijenih analitičkih metoda određeni su analitički povrati farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u modelnim pokusima uz primjenu metode standardnog dodatka. Analitički povrati određeni su iz omjera odziva analita u modelnim uzorcima u koje su analiti dodani prije (A_{prije}) i nakon (A_{nakon}) ispitivanog postupka uz korekciju za odziv analita prisutnih u originalnom uzorku (A_{original}) prema izrazu:

$$\text{Analitički povrat (\%)} = \frac{A_{\text{prije}} - A_{\text{original}}}{A_{\text{nakon}} - A_{\text{original}}} \cdot 100 \%$$

Standardni dodatak svakog od analita i unutarnjih standarda u postupku određivanja analitičkih povrata za pojedine faze obrade vodenih uzoraka bio je 50 ng L^{-1} , dok je za obradu uzoraka ribljeg tkiva bio $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Točnost i preciznost su određivane za ukupni postupak pripreme uzoraka pri čemu je također primijenjena metoda standardnog dodatka. Modelni uzorci obogaćeni su točnim dodacima analita (nominalna koncentracija) i unutarnjih standarda te se njihova eksperimentalno određena masena koncentracija ($\gamma_{\text{eksperiment}}$), korigirana za masenu koncentraciju u originalnom uzorku (γ_{original}), usporedila s nominalnom masenom koncentracijom (γ_{nominal}) prema izrazu:

$$\text{Točnost (\%)} = \frac{\gamma_{\text{eksperiment}} - \gamma_{\text{original}}}{\gamma_{\text{nominal}}} \cdot 100 \%$$

Preciznost je izražena kao relativna standardna devijacija eksperimentalno određene masene koncentracije analita u modelnim obogaćenim uzorcima. Točnost i preciznost određene su za tri koncentracijske razine analita, 5 ng L^{-1} , 50 ng L^{-1} i 500 ng L^{-1} za uzorke vode te $10 \mu\text{g kg}^{-1}$, $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $250 \mu\text{g kg}^{-1}$ za uzorke ribljeg tkiva. Pritom je dodatak unutarnjih standarda u uzorcima riječne vode bio 50 ng L^{-1} , a u uzorcima ribljeg tkiva $50 \mu\text{g kg}^{-1}$.

Utjecaj matrice određen je usporedbom odziva analita i unutarnjih standarda dodanih u modelni uzorak nakon potpune obrade (A_{final}), uz korekciju za odziv u originalnom uzorku (A_{original}), s odzivom analita i unutarnjih standarda u standardnoj otopini (A_{std}) iste

koncentracije. Standardni dodatak analita i unutarnjeg standarda bio je isti kao i kod određivanja analitičkog povrata, 50 ng L⁻¹ za uzorke vode odnosno 50 µg kg⁻¹ za uzorke ribljeg tkiva.

$$\text{Utjecaj matrice (\%)} = \frac{A_{\text{final}} - A_{\text{original}} - A_{\text{std}}}{A_{\text{std}}} \cdot 100 \%$$

3.4. Određivanje stabilnosti farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita

Tijekom modelnih pokusa sa zebricama, nije bilo uvijek moguće provesti analizu uzoraka vode isti dan kada su uzorci prikupljeni, stoga je testirano nekoliko metoda čuvanja uzoraka u ukupnom trajanju od 41 dana. U tu su svrhu istraženi sljedeći postupci: i) skladištenje zamrznutog sirovog uzorka vode (-20 °C), ii) skladištenje analita na sorbensu kolonice Oasis HLB na -20 °C, iii) skladištenje metanolnog ekstrakta dobivenog eluiranjem kolonice Oasis HLB na -20 °C, i iv) skladištenje završnih ekstrakata pripremljenih za instrumentnu analizu na +4 °C.

Sva testiranja provedena su u triplicatu. Za testiranje je korištena profiltrirana (filter GF/D) akvarijska voda obogaćena analitima u masenoj koncentraciji od 10 µg L⁻¹. Tako pripremljen medij podijeljen je u 30 identičnih alikvota, volumena 5 mL. Tri alikvota su odmah obrađena prema protokolu za uzorke vode i analizirana. Ti su ekstrakti čuvani u hladnjaku na +4 °C te ponovno analizirani 3., 7. i 41. dan nakon obrade. Devet alikvota je propušteno kroz kolonice Oasis HLB (3 mL/60 mg), kolonice su osušene u struji dušika i zamrznute na -20 °C te je njihova obrada nastavljena na dan analize odnosno 3., 7. i 41. dan od zamrzavanja. Dodatnih devet alikvota propušteno je kroz kolonice Oasis HLB (3 mL/60 mg), kolonice su osušene u struji dušika i eluirane, a dobiveni eluati pohranjeni su na -20 °C. Njihova obrada i analiza nastavljena je nakon 3., 7. i 41. dana. Preostalih devet alikvota vode je zamrznuto na -20 °C bez prethodne obrade. Ti su uzorci odmrznuti, obrađeni i analizirani 3., 7. i 41. dan. Prije početka obrade uzorka, u svaki alikvot je dodano 25 ng unutarnjih standarda.

3.5. Modelni pokus izlaganja zebrica farmaceutskim spojevima

Kao modelni organizam za istraživanje utjecaja farmaceutskih spojeva na ribe odabrana je zebrica (*Danio rerio*) koja se često koristi u ekotoksikološkim istraživanjima^{14,18}, a svi pokusi i postupci provedeni su prema prihvaćenim bioetičkim načelima u skladu s Rješenjem koje je izdala Uprava za veterinarstvo i sigurnost hrane Ministarstva poljoprivrede Republike Hrvatske (HR-POK-023, klasa UP/I-322-01/19-01/76, reg. br. 525-10/0543-20-04, 16. siječnja 2020.).

Provedena su dva tipa modelnih pokusa kod izlaganja zebrica farmaceutskim spojevima: i) istraživanje kinetike akumulacije i depuracije i ii) istraživanje akumulacije FAS-ova kod kroničnog izlaganja. Ti su pokusi provedeni sa smjesom 20 odabranih farmaceutskih spojeva: kodein, tramadol, benzoilekgonin, norfloksacin, sulfametoksazol, EDDP, azitromicin, kofein, desloratadin, zolpidem, karbamazepin, ramipril, verapamil, oksazepam, klaritromicin, sertralin, varfarin, valsartan, diazepam i atorvastatin (Tablica 1), koji su odabrani prema kriteriju visoke uporabe u Hrvatskoj i posljedično mjerljivih koncentracija u vodenom okolišu, tako da se obuhvate predstavnici različitih terapijskih kategorija.

Sva izlaganja FAS-ovima provedena su u duplikatu, a uključivala su i kontrolne akvarije, bez dodatka FAS-ova. Zebrice u kontrolnim akvarijama bile su podvrgnute identičnim vanjskim uvjetima, režimu hranjenja i izmjenama medija. Prije početka svakog pokusa, izdvojen je potreban broj zdravih odraslih jedinki zebrica koje su nasumično raspodijeljene u prethodno pripremljene akvarije s medijem (akvarijskom vodom) za izlaganje FAS-ovima i kontrolne pokuse. Akvariji sa zebricama bili su smješteni u termostatiranoj prostoriji s izmjeničnim ciklusima svjetla i tame u omjeru 14 h/10 h. Prosječna temperatura vodenog medija za vrijeme pokusa bila je $28,0 \pm 0,5$ °C. Pokusi su provedeni uz konstantnu aeraciju medija, u semi-statičkim uvjetima s izmjenom 50 % odnosno 75 % medija svaka 24 h. Svježi vodeni medij za izmjenu pripreman je svaki dan u polietilenskom spremniku, homogeniziran te jednoliko raspodijeljen u odgovarajuće akvarije. Zebrice su hranjene jednom dnevno, nakon izmjene medija.

Uzorci medija prikupljeni su prilikom izmjene medija, a odmah po prikupljanju su obrađeni i propušteni kroz kolonice Oasis HLB prema protokolu opisanom u poglavlju 3.2.1. *Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu* i čuvani na smrznutim kolonicama do analize. Kod uzorkovanja zebrica, nasumično je, u svakom akvariju, izlovljeno pet zebrica koje su činile jedan kompozitni uzorak. Zebrice su nakon izlova usmrćene metodom brzog pothlađivanja

uranjanjem u hladnu vodu temperature 2 – 4 °C, nakon čega su smrznute tekućim dušikom i pohranjene na –80 °C u polietilenskim epruvetama s konusnim dnom.

3.5.1. Istraživanje kinetike akumulacije i depuracije farmaceutskih spojeva u zebricama

Istraživanje kinetike akumulacije i depuracije odabranih 20 farmaceutskih spojeva u zebricama provedeno je u trajanju od 14 dana pri čemu su zebrice prvih sedam dana izlagane smjesi farmaceutskih spojeva (faza akumulacije), nakon čega su premještene u akvarije s čistom akvarijskom vodom (faza depuracije).

Pokus je proveden u akvarijima volumena 8 L koji su sadržavali 6 L vodenog medija, a svaki akvarij je na početku pokusa sadržavao 60 jedinki zebrica. Vodeni medij za izlaganje u akumulacijskoj fazi dobiven je obogaćivanjem akvarijske vode smjesom farmaceutskih spojeva u masenoj koncentraciji od 10 µg L⁻¹ svakog pojedinačnog analita. Nakon protoka akumulacijske faze, preostale izlagane zebrice su isprane čistim medijem te premještene u dva čista akvarija u kojima je provedena druga, depuracijska faza pokusa.

Uzorci medija (5 mL) prikupljeni su svaki dan prije i nakon izmjene medija. Uzorci vodenog medija u kontrolnim akvarijima (5 mL) uzorkovani su na početku pokusa te 3., 6., 7., 10. i 14. dan pokusa. Uzorci zebrica (5 jedinki po akvariju) uzorkovani su svaki dan, osim 5. i 12. dana pokusa.

Prije provedbe modelnog pokusa izlaganja zebrica, proveden je i 24-satni preliminarni modelni pokus bez zebrica kako bi se procijenili potencijalni gubici farmaceutskih spojeva uslijed abiotičkih procesa. Taj je pokus proveden u jednom akvariju, kod identičnih uvjeta kao i pokusi sa zebricama, a uzorci medija su prikupljeni na početku i na kraju pokusa.

3.5.2. Istraživanje kroničnog izlaganja zebrica farmaceutskim spojevima

Istraživanje akumulacije odabranih FAS-ova kod kroničnog izlaganja provedeno je u modelnim pokusima primjenom triju scenarija: A) kronično izlaganje smjesi 20 farmaceutskih spojeva pri konstantnoj, okolišno relevantnoj koncentraciji (1 µg L⁻¹), B) kronično izlaganje smjesi 20 farmaceutskih spojeva pri koncentraciji (1 µg L⁻¹) uz dvokratno dvadesetčetverosatno izlaganje povišenim koncentracijama (100 µg L⁻¹) čime se simuliraju povremena udarna zagađenja u blizini ispusta otpadne vode, i C) kronično izlaganje zebrica razrijeđenom realnom

sekundarnom efluentu. Za sva tri scenarija kroničnog izlaganja ispitivanja su provedena u trajanju od 28 dana. Ti modelni pokusi provedeni su u akvarijima volumena 3,5 L koji su sadržavali 2 L vodenog medija, a svaki akvarij sadržavao je 20 jedinki odraslih zebrića.

Pri provedbi kroničnog izlaganja prema scenarijima A i B, korištena je smjesa farmaceutskih spojeva identična onoj koja je korištena u modelnom pokusu ispitivanja kinetike akumulacije i depuracije farmaceutskih spojeva. U scenariju A, zebriće su tijekom trajanja cijelog pokusa (28 dana) izlagane smjesi analita čije su masene koncentracije bile $1 \mu\text{g L}^{-1}$, dok je u pokusu prema scenariju B dugotrajno izlaganje toj koncentraciji prekinuto u dva navrata (1. i 14. dan) kratkotrajnim izlaganjem (24 h) stostruko povišenoj koncentraciji, $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Kako bi se izbjegla kontaminacija, provedba ovog scenarija uključivala je 2 akvarija za izlaganje nižoj koncentraciji i dodatna dva akvarija za izlaganje višoj koncentraciji.

Sekundarni efluent (SE) koji je korišten za pripremu medija u trećem pokusu kroničnog izlaganja (scenarij C) prikupljen je na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda Grada Zagreba dana 3. studenog 2021. godine. Medij za pokus izlaganja pripremljen je razrjeđivanjem sekundarnog efluenta akvarijskom vodom u omjeru 1:4 nakon čega je homogeniziran. Ostatak efluenta razdijeljen je istog dana na 28 alikvota, od kojih je 27 zamrznuto na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. Po jedan alikvot efluenta odmrzavan je svakog dana kako bi se pripremio svjež medij za izmjenu. Prije početka pokusa uzorak sekundarnog efluenta analiziran je metodom razvijenom u ovom radu kako bi se odredile koncentracijske razine prisutnih FAS-ova.

Koncentracije u akvarijskom mediju praćene su svakodnevno u uzorcima prikupljenim nakon izmjene medija. Za analizu uzoraka medija izlaganja pri koncentraciji od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (scenarij A i B) prikupljeni su alikvoti volumena 50 mL, za analizu uzoraka koncentracije $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (scenarij B) prikupljeni su uzorci volumena 5 mL, dok su za analizu medija iz scenarija C, izlaganja sekundarnom efluentu, prikupljeni uzorci volumena 250 mL. Uzorci vodenog medija kontrolnih akvarija (50 mL) prikupljeni su u 7 vremenskih točaka, na početku pokusa te 5., 9., 13., 16., 20., 23. i 27. dan pokusa, dok su uzorci zebrića (5 jedinki po akvariju) prikupljeni u četiri vremenske točke, nakon 1., 13., 14. i 28. dana pokusa.

3.6. Određivanje farmakokinetičkih pokazatelja i bioakumulacijskog potencijala

3.6.1. Određivanje kinetike akumulacije i depuracije ispitivanih farmaceutskih spojeva

Na temelju izmjerenih koncentracija u vodi i uzorcima zebrića u pokusu akumulacije i depuracije odabranih farmaceutskih spojeva, određena je farmakokinetika tih spojeva. Korištenjem tzv. modela s jednim odjeljkom (engl. *1-compartment model*) i kinetike prvog reda²⁰¹, procijenjeni su sljedeći farmakokinetički parametri: konstanta brzine akumulacije (k_a), konstanta brzine depuracije (k_d) i poluvrijeme depuracije ($t_{1/2}$) za svaki ispitivani spoj.

Nelinearna regresija i statistička analiza provedene su u programu GraphPad Prism 8.0.1, koristeći ugrađene modele: jednofazni raspad (engl. *one-phase decay*) za fazu depuracije, dok su za fazu unosa korišteni jednofazni model asocijacije (engl. *one-phase association*) i Michaelis-Mentenov model. Jednofazni raspad opisan je jednadžbom:

$$c_r(t) = c_{r,ss,d} + (c_{r,0,d} - c_{r,ss,d}) * e^{-k_d t} \quad (1)$$

gdje su $c_{r,0,d}$, c_r i $c_{r,ss,d}$ koncentracije FAS-ova u zebrići u vremenu $t = 0$, vremenu t te stacionarnom stanju tijekom faze depuracije.

Vrijeme $t_{1/2}$ u kojem zebrića eliminira pola akumulirane količine je izračunato na temelju dobivene vrijednost k_d na način:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_d} \quad (2)$$

S obzirom na to da se depuracija tijekom prvih 7 dana pokusa događa paralelno s akumulacijom, to je uzeto u obzir kod procjene ukupnog unosa FAS-ova, primjenom jednofaznog modela asocijacije kako je prikazano u jednadžbi:

$$c_r(t) = c_{r,0,a} + (c_{r,ss,a} - c_{r,0,a})(1 - e^{-k_d t}) \quad (3)$$

gdje su $c_{r,0,a}$, c_r i $c_{r,ss,a}$ koncentracije FAS-ova u zebrići u vremenu $t = 0$, vremenu t te stacionarnom stanju tijekom faze akumulacije.

Usporedba modela s jednim odjeljkom i kinetike prvog reda²⁰¹ s jednofaznim modelom asocijacije (Jednadžba 3) daje izraz za izračun vrijednosti k_a :

$$(c_{r,ss,a} - c_{r,0,a}) = \frac{k_a}{k_d} \gamma_m \quad (4)$$

gdje je γ_m prosječna masena koncentracija FAS-ova u mediju izlaganja tijekom cijele faze izlaganja.

Michaelis-Mentenov model korišten je za određivanje koncentracije zasićenja, koristeći izraz:

$$\frac{1}{c_r(t)} = \frac{K_M}{c_{r,sat}} \frac{1}{t} + \frac{1}{c_{r,sat}} \quad (5)$$

gdje su c_r i $c_{r,sat}$ koncentracije FAS-ova u zebrici u vremenu t i zasićenom stanju tijekom faze unosa, a K_M je Michaelis-Mentenova konstanta.

3.6.2. Određivanje kinetike metaboličke biotransformacije i izlučivanja

Prilikom praćenja depuracije FAS-ova iz zebrica važno je imati na umu da se istovremeno s izlučivanjem roditeljskih spojeva događa i njihov metabolizam što dodatno smanjuje koncentraciju prisutnog roditeljskog spoja, a nastali produkti mogu se zadržati u organizmu ili se izlučiti. Procjena stvarne konstante brzine depuracije (izlučivanja; k_i) dobivena je iz metaboličkog doprinosa ukupnoj ravnoteži ispitivanih FAS-ova u ribama korištenjem sljedećeg izraza prema Chenu i suradnicima¹⁴²:

$$f_M = \frac{k_m}{k_d} = \frac{k_m}{(k_m + k_i)} \quad (6)$$

gdje f_M predstavlja molarni udio ukupnih metabolita u ribi u ravnotežnom stanju, k_m je konstanta brzine metaboličke transformacije, dok je zbroj k_m i k_i jednak eksperimentalno određenom k_d za pojedinačne FAS-ove. Iz eksperimentalnih vrijednosti moguće je izračunati k_m , nakon čega se stvarna konstanta brzine depuracije (k_i) odredi kao razlika između vrijednosti k_d i k_m .

3.6.3. Određivanje bioakumulacijskog potencijala

Biokoncentracijski faktori (BCF) ili bioakumulacijski faktori (BAF) najčešće se računaju kao omjeri ravnotežne koncentracije spojeva u ribi i koncentracije u vodi. U pokusu akumulacije i depuracije farmaceutskih spojeva, BCF-ovi su određeni ili iz pretpostavljenih koncentracija u ravnotežnom stanju u ribi i prosječne koncentracije medija izlaganja (Jednadžba 7 i 8) ili iz omjera konstanti brzina akumulacije i depuracije (Jednadžba 9) na sljedeći način:

$$BCF_{7d} = \frac{c_{r,ss}}{\gamma_m} \quad (7)$$

$$BCF_{ss} = \frac{c_{sat}}{\gamma_m} \quad (8)$$

$$BCF_k = \frac{k_a}{k_d} \quad (9)$$

gdje je $c_{r,ss}$ prosječna koncentracija FAS-ova u zebrici u šestom i/ili sedmom danu izlaganja (pretpostavljeno stacionarno stanje).

Za uzorke prikupljene u terenskim ispitivanjima, BAF-ovi su određeni na temelju jednadžbi 7 i 8, korištenjem koncentracija FAS-ova određenih u pojedinom organu odnosno tkivu ribe i srednjih vrijednosti koncentracija u uzorcima riječne vode.

Biokoncentracijski i bioakumulacijski potencijal može se izraziti i kao ukupni BCF ili BAF, a dobiva se korištenjem jednadžbe 9 gdje se vrijednosti k_d i k_a dobivaju iz prethodno opisanih kinetičkih modela korištenjem ukupne koncentracije spoja (c_{uk}) umjesto koncentracije roditeljskog spoja, tako da se zbroje koncentracije roditeljskog spoja i svih metabolita, prethodno korigirane za molekulsku masu, prema izrazu:

$$c_{uk} = c_r + \sum_i c_{m,i} \frac{M_{r,r}}{M_{r,m,i}} \quad (10)$$

gdje su c_r i c_m prosječne koncentracije roditeljskog spoja i metabolita u vodi ili zebrici, dok su $M_{r,r}$ i $M_{r,m}$ molekulske mase roditeljskog spoja odnosno metabolita.

3.6.4. Istraživanje utjecaja fizikalno-kemijskih svojstava farmaceutskih spojeva na bioakumulaciju

Procjena utjecaja ključnih fizikalno-kemijskih svojstava FAS-ova, kao što su koeficijenti raspodjele oktanol-voda (K_{ow}) i pK_a vrijednosti, na njihov potencijal biokoncentracije, provedena je korištenjem literaturno dostupnih modela za ionske vrste. Koeficijenti raspodjele oktanol-voda ovisni o pH (D_{ow}) procijenjeni su prema pristupu Armitagea i suradnika²⁰² prema jednadžbi:

$$D_{ow} = \chi_n * \log K_{ow,n} + \chi_i * \log K_{ow,i} \quad (11)$$

gdje χ_n i χ_i predstavljaju udjele neutralne i ionske forme spoja pri pH 7,4, a $K_{ow,n}$ i $K_{ow,i}$ odgovarajuće koeficijente raspodjele oktanol-voda neutralnih i ionskih formi.

Na sličan način određeni su i koeficijenti raspodjele membrana-voda (D_{mw}) prema jednadžbi²⁰²:

$$D_{mw} = \chi_n * \log K_{mw,n} + \chi_i * \log K_{mw,i} \quad (12)$$

gdje su $K_{mw,n}$ i $K_{mw,i}$ koeficijenti raspodjele lipozom-voda za neutralnu i ionsku formu spoja. $K_{mw,n}$ može se izračunati s pomoću jednadžbe²⁰³:

$$\log K_{mw,n} = 1,01 * \log K_{ow} + 0,12 \quad (13)$$

dok se vrijednost za ionsku formu dobiva izrazom²⁰²:

$$\log K_{mw,i} = \log K_{mw,n} + \Delta_{mw} \quad (14)$$

gdje je Δ_{mw} korekcijski faktor čija vrijednost ovisi o funkcijskoj skupini spoja.

Koeficijenti raspodjele mišićni protein-voda (D_{mpw}) izračunati su primjenom poliparametarskog linearnog odnosa slobodne energije (PP-LFER) modela za procjenu razdiobnog ponašanja ionskih organskih spojeva, kako su predložili Henneberger i suradnici²⁰⁴, prema jednadžbi:

$$\log D_{mpw} = c + eE_i + sS_i + aA_i + bB_i + vV_i + j^+ J_i^+ + j^- J_i^- \quad (15)$$

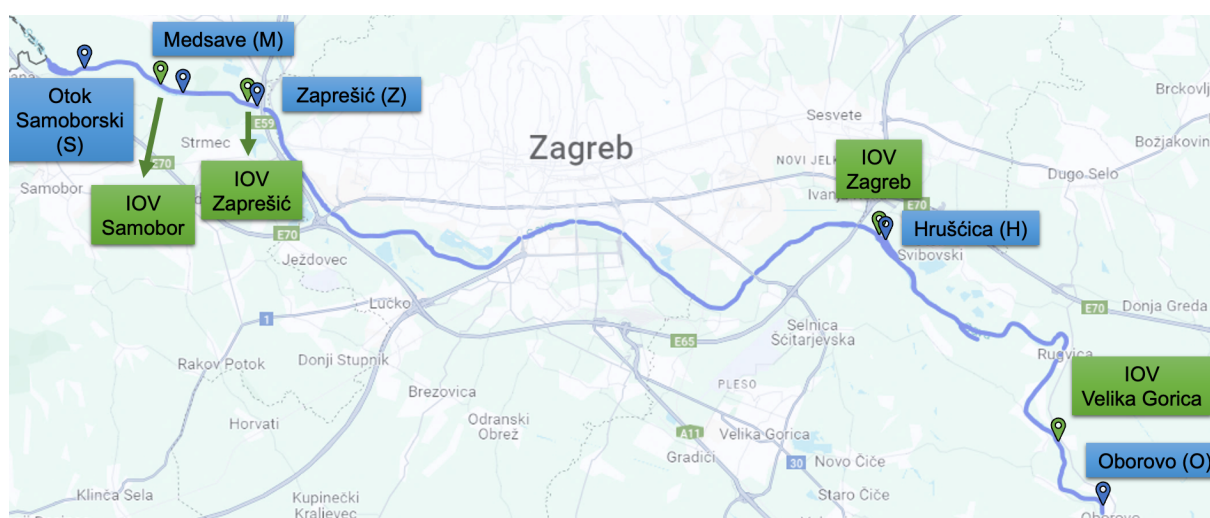
gdje su c, e, s, a, b, v, j^+ i j^- deskriptori svojstava sustava, a E, S, A, B, V, J^+ i J^- deskriptori svojstava tvari. Deskriptori za neutralne vrste preuzeti su iz UFZ-LSER baze podataka²⁰⁵ i korišteni su za izračune deskriptora ionskih vrsta. Na temelju empirijskih jednadžbi Abrahama²⁰⁶, izračuni su bili mogući za fenokside, karboksilne kiseline, amine i piridine što znači da su procjene bile moguće za sve odabrane farmaceutske spojeve osim za EDDP, benzoilekgonin, sulfametoksazol, desloratadin, ramipril, varfarin i atorvastatin.

3.7. Istraživanje rasprostranjenosti farmaceutskih spojeva u rijeci Savi

Razvijene metode i bioakumulacijski koncepti koji su primijenjeni u modelnim pokusima sa zebricama iskorišteni su u terenskim istraživanjima na odsječku rijeke Save na širem području grada Zagreba. Cilj tih istraživanja bio je da se u realnim uvjetima prouče pitanja vezana uz procjenu moguće važnosti FAS-ova kao zagađivala slatkovodnih sustava opterećenih unošenjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda s posebnim naglaskom na značaj bioakumulacije. Stoga, istraživanja su bila usmjerena na određivanje koncentracija FAS-ova u riječnoj vodi i tkivima divlje populacije riba rijeke Save što predstavlja podlogu za procjenu ekološkog rizika i njihovu ekotoksikološku prioritizaciju.

3.7.1. Lokacije uzorkovanja

Uzorkovanje riječne vode i riba provedeno je na odsječku rijeke Save smještenom na širem području grada Zagreba dugom oko 60 km. Lokacije uzorkovanja uključivale su lokacije Otok Samoborski (S), Medsave (M), Zaprešić (Z), Hrušćica (H) i Oborovo (O) (lokacije su označene plavim oznakama na slici 4). Lokacija Otok Samoborski smještena je u blizini hrvatsko-slovenske granice te se nalazi uzvodno od lokalnih ispusta otpadne vode zbog čega je odabrana kao referentna lokacija. Ostale četiri nizvodne lokacije su pod izravnim utjecajem komunalnih i industrijskih otpadnih voda obližnjih gradova (zelene oznake na slici 4).



Slika 4. Lokacije uzorkovanja riječne vode i riba na rijeci Savi [lokacije uzorkovanja prikazane su plavim oznakama; lokacije ispusta otpadne vode (IOV) označene su zeleno].

Lokacija Medsave smještena je nizvodno od ispusta otpadnih voda grada Samobora čija otpadna voda prolazi samo mehaničku obradu prije ispusta. Lokacija Zaprešić smještena je nizvodno od ispusta mehanički obrađenih otpadnih voda grada Zaprešića, koje uključuju komunalnu otpadnu vodu te otpadnu vodu farmaceutske industrije. Na ovoj lokaciji uzorci su prikupljeni na lijevoj (ZL) i desnoj (ZD) obali zbog posebnosti hidroloških uvjeta i lošeg poprečnog miješanja. Nizvodno od ispusta otpadnih voda grada Zagreba koji uključuje mehaničku i biološku obradu mješovite komunalne i industrijske otpadne vode smještena je lokacija Hrušćica, dok je lokacija Oborovo smještena nizvodno od lokacije miješanja mehanički i biološki pročišćenih otpadnih voda gradova Zagreb i Velika Gorica.

3.7.2. Prikupljanje uzoraka riječne vode i ribljeg tkiva

Prikupljanje uzoraka riječne vode i riba na svim lokacijama obavljeno je unutar jednog tjedna u lipnju 2022. godine, točnije 10. lipnja 2022. (lokacije S i M), 13. lipnja 2022. (lokacija Z), 15. lipnja 2022. (lokacija H) i 17. lipnja 2022. (lokacija O) (Slika 4). Uzorkovanje je provedeno u relativno sušnom periodu u stabilnim hidrološkim uvjetima.

Uzorci riječne vode (približno 1 L po uzorku) prikupljeni su u polietilenske boce i čuvani u prijenosnom hladnjaku, a po dolasku u laboratorij pohranjeni u mraku na 4 °C do obrade koja je provedena unutar 24 h od prikupljanja. Uzorci vode prikupljeni su tri puta tijekom svakog uzorkovanja: po dolasku na lokaciju, za vrijeme elektroizlova ribe te prije odlaska s lokacije. Provedene su sve standardne mjere opreza kako bi se izbjegla kontaminacija na terenu, uključujući korištenje prethodno testiranih i očišćenih boca za uzorkovanje, a za svaku seriju uzoraka vode, analizirani su i laboratorijski slijepi uzorci s čistom izvorskom vodom.

Prikupljanje uzoraka ribe provedeno je elektroribolovom (EL63 II GI; Hans Grassl GmbH, Njemačka), u skladu s hrvatskim propisima²⁰⁷, a izlovljene ribe pregledane su i secirane na terenu odmah nakon uzorkovanja²⁰⁸. Pregled riba podrazumijevao je identifikaciju vrste, određivanje općeg stanja i spola te morfološka mjerenja, a prikupljene informacije za sve uzorke ribe po lokacijama prikazane su u tablici 12. Od svih uzoraka riba, sustavno su prikupljene četiri vrste tkiva; mišić, škrge, jetra i bubrezi. Nadalje, na pojedinim primjercima riba prikupljene su i druge vrste tkiva, uključujući gonade, srce, slezenu, crijeva i mozak. Tkiva su u pravilu uzimana iz pojedinačnih primjeraka riba, a kod manjih vrsta načinjen je kompozitni uzorak od nekoliko primjeraka iste vrste. Uzorci su prikupljeni u polietilenskim epruветama s konusnim dnom te čuvani u prijenosnom hladnjaku na +4 °C tijekom terenskog rada, a po povratku u laboratorij, pohranjeni na –80 °C do daljnje obrade.

Tablica 12. Popis svih prikupljenih uzoraka riba s njihovim biometrijskim podacima, prehrambenim navikama i trofičkim statusom.

Naziv ribe	Latinski naziv	Oznaka uzorka	Ukupna duljina (cm)	Vilična duljina ^a (cm)	Standardna duljina (cm)	Ukupna masa (g)	Spol	Prehrambene navike	Trofički status
10.06.2022. OTOK SAMOBORSKI (S)									
Mrena	<i>Barbus barbus</i>	S1	17,0	15,5	14,0	32,5	M	beskralježnjaci	3,1 ± 0,4
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	S2	11,5	11,0	9,5	27,6	-	svejed	2,5 ± 0,0
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	S3	26,5	24,5	21,5	190,5	M	svejed	2,7 ± 0,1
10.06.2022. MEDSAVE (M)									
Crni somić	<i>Ameiurus melas</i>	M1	22,5	-	21,0	80,7	-	svejed	3,8 ± 0,4
Crni somić	<i>Ameiurus melas</i>	M2	22,5	-	20,5	74,5	-	svejed	3,8 ± 0,4
Crni somić	<i>Ameiurus melas</i>	M3*	21,0	-	19,5	53,5	-	svejed	3,8 ± 0,4
Crni somić	<i>Ameiurus melas</i>	M3*	19,0	-	17,5	41,5	-	svejed	3,8 ± 0,4
Šaran	<i>Cyprinus carpio</i>	M4*	21,0	19,0	17,5	180,0	M	svejed ⁺	3,1 ± 0,0
Šaran	<i>Cyprinus carpio</i>	M4*	12,0	11,0	9,5	20,5	-	svejed ⁺	3,1 ± 0,0
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	M5	16,5	15,0	13,5	70,5	-	svejed	2,5 ± 0,0
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	M6*	11,1	10,0	9,0	50,5	-	svejed	2,5 ± 0,0
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	M6*	10,6	9,8	8,4	50,5	-	svejed	2,5 ± 0,0
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	M6*	10,2	9,5	8,3	50,5	-	svejed	2,5 ± 0,0
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	M7*	15,5	14,0	12,5	37,5	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	M7*	16,0	15,0	13,5	38,5	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	M7*	15,5	14,0	12,0	34,5	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	M7*	15,0	14,0	12,5	34,0	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	M7*	18,5	17,5	15,5	72,0	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	M7*	17,0	16,0	14,0	53,0	M	svejed	2,7 ± 0,1
13.06.2022. ZAPREŠIĆ (Z)									
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZL1	14,5	13,7	12,5	30,2	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZL2*	12,9	12,0	10,9	22,9	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZL2*	12,0	11,2	10,3	17,8	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZL2*	13,2	12,5	11,2	24,1	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZL3	39,3	37,0	34,2	806,3	M	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZD4*	17,4	16,3	14,5	54,8	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZD4*	15,6	14,8	13,5	42,6	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZD4*	14,4	13,4	12,1	34,0	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	ZD4*	17,3	15,5	14,5	49,6	M	svejed	2,7 ± 0,1

Tablica 12. nastavak

Naziv ribe	Latinski naziv	Oznaka uzorka	Ukupna duljina (cm)	Vilična duljina ^a (cm)	Standardna duljina (cm)	Ukupna masa (g)	Spol	Prehrambene navike	Trofički status
15.06.2022. HRUŠĆICA (H)									
Plotica	<i>Rutilus pigus virgo</i>	H1	48,5	45,5	40,0	1530,0	M	beskralježnjaci	3,4 ± 0,5
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	H2	53,5	49,0	45,8	2407,0	Ž	svejed	2,5 ± 0,0
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	H3	50,0	45,0	42,0	1862,0	-	svejed	2,5 ± 0,0
Podust	<i>Chondrostoma nasus</i>	H4	46,5	43,0	39,8	1290,0	-	biljojed	2,0 ± 0,0
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	H5	47,0	44,0	40,0	1065,0	Ž	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	H6	36,0	33,5	30,5	572,5	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	H7	35,0	33,0	30,0	594,0	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	H8	27,6	26,0	23,8	267,9	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	H9	30,6	28,0	26,0	360,5	M	svejed	2,7 ± 0,1
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H10	35,0	32,0	27,0	665,0	Ž	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H11	28,5	26,5	24,0	346,0	Ž	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H12	28,0	26,0	23,5	413,0	Ž	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H13	24,8	22,3	20,4	173,6	M	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H14	34,5	31,8	29,5	593,3	Ž	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H15	33,4	30,2	28,5	636,8	M	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H16	33,4	30,5	28,5	636,0	Ž	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H17	29,9	27,3	25,1	461,0	M	svejed	2,9 ± 0,4
Crvenperka	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	H18	31,0	28,3	26,0	483,0	M	svejed	2,9 ± 0,4
17.06.2022. OBOROVO (O)									
Crni somić	<i>Ameiurus melas</i>	O1	19,8	-	18,4	47,9	-	svejed	3,8 ± 0,4
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	O2	19,0	17,1	15,3	111,8	M	svejed	2,5 ± 0,0
Babuška	<i>Carassius gibelio</i>	O3	10,4	9,5	8,0	17,2	-	svejed	2,5 ± 0,0
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	O4	15,0	13,8	12,7	35,7	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	O5	16,2	15,0	13,8	42,1	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	O7*	20,6	19,1	17,3	87,4	Ž	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	O7*	11,3	10,5	9,5	13,4	-	svejed	2,7 ± 0,1
Klen	<i>Squalius cephalus</i>	O7*	10,8	10,0	9,0	11,5	-	svejed	2,7 ± 0,1

^adužina od vrha zatvorenih čeljusti do sredine repne peraje; *kompozitni uzorci; +svejedi s izraženim detritivornim ponašanjem; M, mužjak; Ž, ženka

3.8. Procjena rizika i prioritizacija

Procjena ekotoksikološkog rizika farmaceutskih spojeva pronađenih u uzorcima iz rijeke Save provedena je korištenjem široko prihvaćenog pristupa temeljenog na koncentracijama u vodi i ribama te vrijednosti predviđenih koncentracija bez učinka (engl. *predicted no-effect concentration*, PNEC) pojedinačnih farmaceutskih spojeva. PNEC vrijednosti preuzete su iz baze podataka NORMAN²⁰⁹. Za neke metabolite, naročito metabolite azitromicina, procjene relativne toksičnosti preuzete su iz rada Löfflera i suradnika²¹⁰. Procjena rizika, a na kojoj se temelji i prioritizacija FAS-ova, provedena je korištenjem dviju metoda; određivanjem kvocijenta rizika i indeksa toksikološkog prioriteta²¹¹.

Procjena ekotoksikološkog rizika putem kvocijenta rizika (engl. *risk quotient*, RQ) određuje se s pomoću omjera najveće izmjerene koncentracije farmaceutskog spoja (c_{\max}) i njegove najniže PNEC vrijednosti na način:

$$RQ = \frac{c_{\max}}{\text{najniži PNEC}} \quad (16)$$

Ovakva procjena omogućuje jednostavno rangiranje istraživanih FAS-ova prema opadajućim RQ vrijednostima, a provedena je za obje proučavane matrice, vodu i ribu. Kod izračuna RQ vrijednosti za ribu, umjesto koncentracija u cijelom tijelu ribe, korištene su koncentracije u mišićima ribe za koje je na temelju rezultata, zapažanja i zaključaka iz modelnih pokusa i terenskih ispitivanja, pretpostavljena reprezentativnost, a o čemu će biti više riječ u poglavlju 4. *Rezultati i rasprava*.

Dodatno, naprednije rangiranje farmaceutskih spojeva provedeno je korištenjem složenijeg pristupa koji su predložili Reif i suradnici²¹¹, a koji za rangiranje koristi indeks toksikološkog prioriteta (engl. *the toxicological prioritization index*, ToxPi). Ova metoda prioritizira spojeve na temelju tri različite varijable; koncentracije u okolišu (C), relativne toksičnosti (T) te učestalosti detekcije (DF). Vrijednost ToxPi je za svaki pojedini farmaceutski spoj (i) određena jednadžbom:

$$\text{ToxPi}_i = W_C \frac{\log c_i - \log c_{\min}}{\log c_{\max} - \log c_{\min}} + W_T \frac{T_i - T_{\min}}{T_{\max} - T_{\min}} + W_{DF} \frac{DF_i - DF_{\min}}{DF_{\max} - DF_{\min}} \quad (17)$$

gdje su c_i , c_{\min} i c_{\max} najveće izmjerene koncentracije pojedinih spojeva u matrici. W_C , W_T i W_{DF} su relativni težinski faktori za koncentraciju, relativnu toksičnost i učestalost detekcije, a njihove vrijednosti su preuzete iz rada Fenga i suradnika²¹² te iznose dva za W_C i W_T , dok je

W_{DF} bio jedan. T vrijednost, koja odražava relativnu toksičnost spojeva, definirana je na sljedeći način:

$$T = \log \frac{1}{\text{najniži PNEC}} \quad (18)$$

3.9. Računalna obrada podataka

Kvalitativne i kvantitativne analize FAS-ova i njihovih metabolita u uzorcima snimljenim na instrumentu TSQ Quantum AM provedene su uporabom integriranog programa Xcalibur 2.0.5. Uzorci snimljeni na instrumentu XEVO TQ-XS obrađeni su integriranim programom MassLynx V4.2.

Statistička analiza i vizualizacija podataka prikupljenih u modelnim pokusima sa zebricama načinjena je korištenjem statističkog programa GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, CA, SAD) te programskog paketa Statistica 7.0 (StatSoft, Inc., OK, SAD). Za modeliranje kinetike akumulacije i izlučivanja farmaceutskih spojeva korišteni su ugrađeni modeli programa GraphPad Prism 8.0.1, model jednofaznog raspada (engl. *one-phase decay*) i jednofazne asocijacije (engl. *one-phase association*) te Michaelis-Mentenov model.

Statistička analiza i vizualizacija podataka prikupljenih terenskim ispitivanjima obavljena je u programu R, verzija 4.3.2²¹³ korištenjem paketa ggplot2 (verzija 3.5.1), ggbiplot (verzija 0.6.2) i ggdendro (verzija 0.2.0). Hijerarhijsko grupiranje i analiza glavnih komponenti (engl. *principal component analysis*, PCA) provedene su na normaliziranim skupovima podataka kako bi se minimizirao utjecaj širokog raspona koncentracija. Za PCA, koncentracije su skalirane na srednju vrijednost nula i standardnu devijaciju jedan. Hijerarhijska analiza grupiranja koristila je 1-Pearsonov r kao mjeru udaljenosti i aritmetički prosjek parova i skupina kao algoritam grupiranja.

§ 4. REZULTATI I RASPRAVA

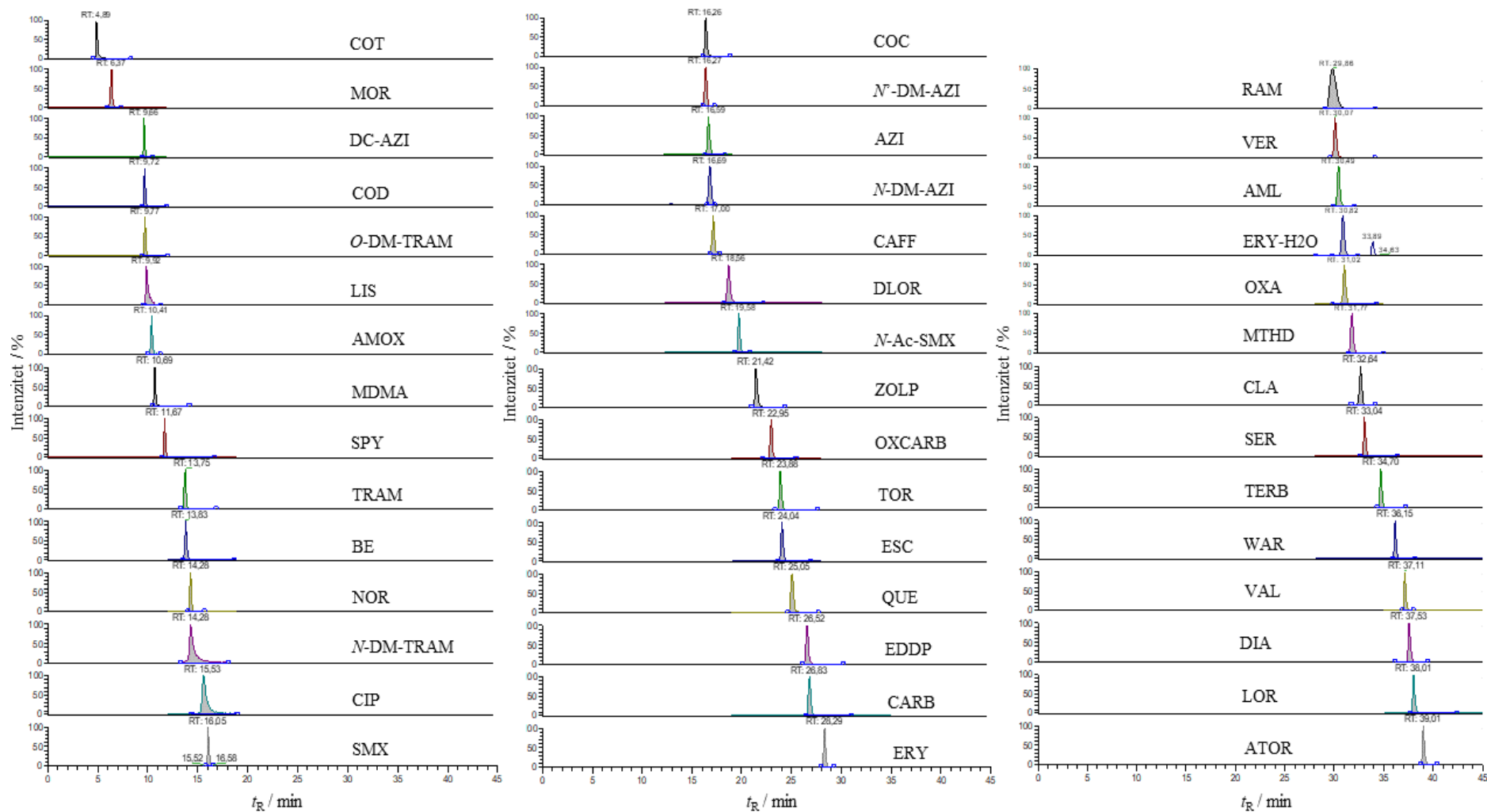
4.1. Razvoj analitičkih metoda za određivanje farmaceutskih spojeva u vodi i bioti

4.1.1. Optimiranje kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta

Razvoj LC-MS metoda namijenjenih multirezidualnom određivanju raznovrsnih analita u kompleksnim okolišnim matricama uključuje pažljivo optimiranje kromatografskih i masenospektrometrijskih uvjeta s ciljem postizanja što potpunijeg kromatografskog odvajanja analiziranih spojeva uz što bolju selektivnost i osjetljivost određivanja.

Za kromatografsko razdvajanje istraživanih farmaceutskih spojeva (Tablica 1) na LC-MS/MS sustavu TSQ Quantum AM odabrana je kolona punjena stacionarnom fazom dizajniranom za razdvajanje polarnih spojeva Synergi Polar-RP (80 Å, 150 mm × 3 mm, 4 µm) koja je uspješno primjenjivana u nizu istraživanja, uključujući analizu opioidnih analgetika i biomarkera ilegalnih droga u vodenom okolišu^{7,97}. Najbolje kromatografsko razdvajanje i oblici kromatografskih pikova postignuti su primjenom binarne gradijentne elucije kod uvjeta prikazanih u tablici 10 [poglavlje 3.2.3. *Instrumentna analiza farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS)*], pri čemu je pokretna faza A bila voda uz dodatak mravlje kiseline ($\varphi = 0,1 \%$), a pokretna faza B metanol s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,1 \%$).

Primjer kromatograma smjese svih 44 analita snimljenog pri optimiranim uvjetima prikazan je na slici 5, a vrijeme zadržavanja na koloni u tablici 13. Prvi je eluiran kotinin ($t_R = 4,9$ min), a posljednji atorvastatin ($t_R = 38,7$ min), dok je ukupno vrijeme analize bilo 54 min. Unatoč prethodno provedenom pažljivom optimiranju kromatografskih uvjeta, nije bilo moguće kromatografski razdvojiti sve analite već su neki od njih (dekladinozil azitromicin i kodein; *N*-demetil tramadol i norfloksacin; kokain i *N*'-demetil azitromicin) bili koeluirani. Međutim, budući da među koeluiranim spojevima nije bilo izobarnih strukturnih analoga, visoka pouzdanost određivanja svih analita bila je osigurana primjenom masenospektrometrijske detekcije temeljene na praćenju odabranih višestrukih tranzicijskih reakcija (MRM; Tablica 13).



Slika 5. Kromatogram standardne otopine 44 istraživana analita ($\gamma = 100 \mu\text{g L}^{-1}$) snimljen LC-MS/MS instrumentom TSQ Quantum AM, korištenjem Synergi Polar-RP ($150 \times 3 \text{ mm}$, $4 \mu\text{m}$) kolone. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Za razliku od LC-MS/MS sustava TSQ Quantum AM, koji koristi klasični tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, sustav XEVO TQ-XS opremljen je tekućinskim kromatografom ultravisoke djelotvornosti. Kako bi se maksimalno iskoristile tehničke mogućnosti UHPLC sustava, provedena je prilagodba uvjeta kromatografskog odjeljivanja istraživanih spojeva, uključujući odabir kolone i optimiranje uvjeta kromatografske separacije. Testirane su dvije, često korištene, kolone široke namjene tvrtke Waters Corporation (MA, SAD), Acquity UPLC HSS T3 (100 Å, 2,1 mm × 100 mm, 1,8 µm) i Acquity UPLC BEH C18 (130 Å, 100 mm × 2,1 mm, 1,7 µm).

Glavne razlike između ovih kolona su što HSS T3 kolona sadrži potpuno porozno silicijevo punjenje s niskom gustoćom liganda, dok BEH C18 kolona sadrži porozno hibridno punilo s visokom gustoćom liganda. Prema specifikacijama proizvođača, HSS T3 kolona namijenjena je zadržavanju polarnih i nepolarnih spojeva, dok pakiranje u BEH C18 koloni nije adekvatno za zadržavanje izrazito polarnih spojeva. Testiranja su pokazala da u slučaju smjese FAS-ova korištenih u ovom istraživanju, HSS T3 kolona ne daje zadovoljavajuće rezultate budući da dolazi do bržeg eluiranja svih spojeva u kratkom periodu bez obzira na promjenu elucijskog gradijenta ili sastava i tipa eluensa, što posljedično stvara interferencije pri masenospektrometrijskoj detekciji. Kao bolji izbor, pokazala se BEH C18 kolona koja je pokazala zadovoljavajuće razdvajanje analita uz samo jedan par analita koji je koeluiran (terbinafin i diazepam; $t_R = 11,81$ min) te nekolicinu analita koji su eluirani s razmakom retencijskih vremena manjim od 0,05 min (lizinopril i kofein; sulfapiridin, *O*-demetil tramadol, dekladinozil azitromicin i amoksicilin; MDMA i norfloksacin; *N*-acetil sulfametoksazol i zolpidem; *N*-demetil azitromicin i azitromicin). No, ni u jednom od navedenih slučajeva ne radi se o izobarnim, strukturno sličnim spojevima.

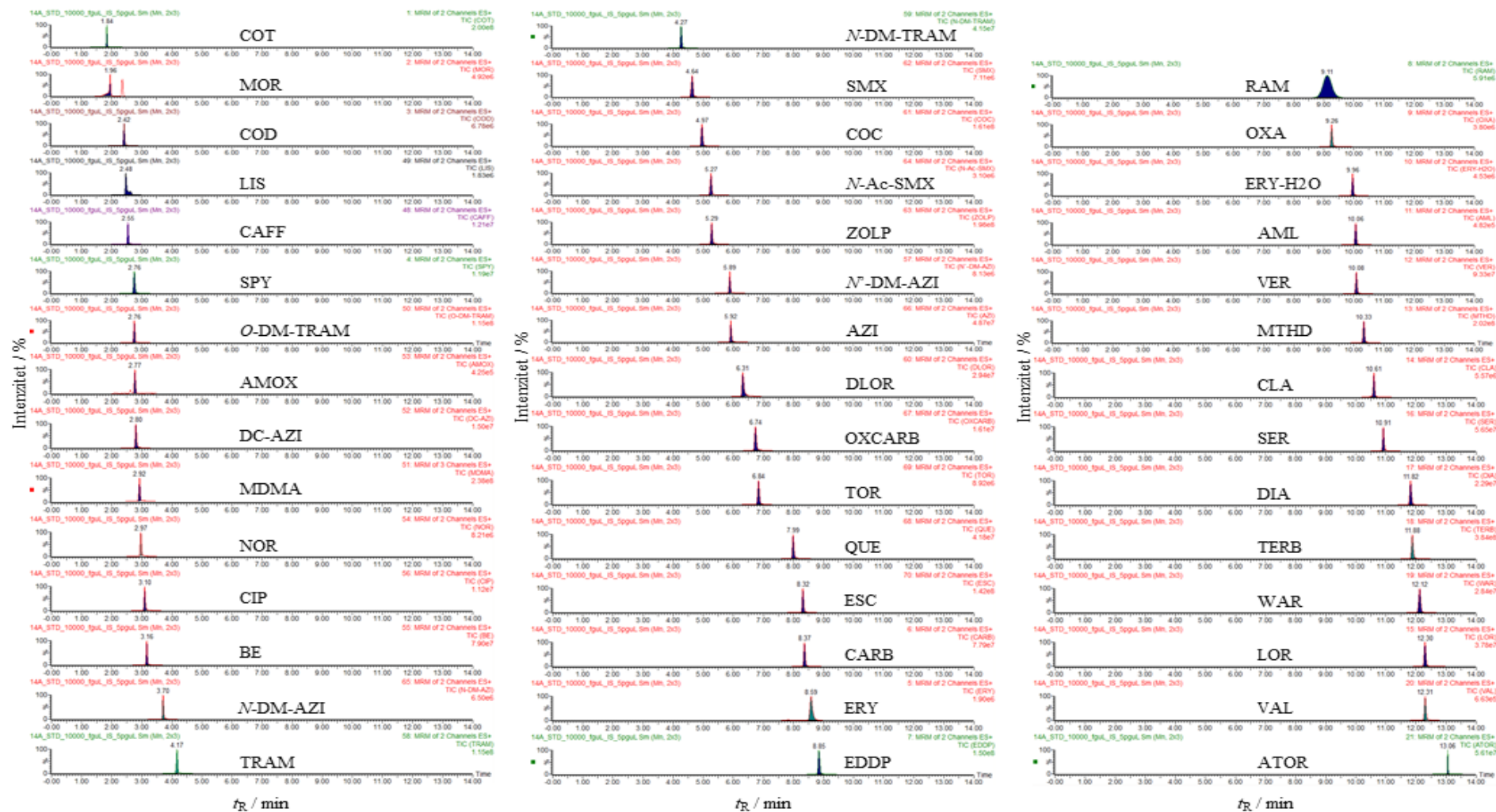
Kao i kod sustava TSQ Quantum AM, i ovdje su testirani eluensi s dodatkom soli (amonijev formijat i amonijev acetat), kiseline (mravlja i octena kiselina) te pufera, a rezultati su bili jednaki za oba sustava. Dodatak kiseline kod većine spojeva rezultirao je užim, oštrijim pikovima, većom površinom kromatografskih pikova te većim intenzitetom odziva, a efekt je bio izraženiji kod dodatka mravlje kiseline u odnosu na octenu kiselinu. Iznimke ovog zapažanja bili su eritromicin, varfarin i valsartan, s naglaskom na eritromicin koji je pokazao oko 20 puta manji odziv u prisustvu kiseline. Njegova nestabilnost u kiselom mediju umanjena je kombinacijom amonijeva formijata i mravlje kiseline, odnosno stvaranjem puferskog sustava

koji je u konačnici rezultirao zadovoljavajućim oblikom i površinom kromatografskih pikova eritromicina, ali i ostalih analita.

Stoga, konačna optimirana kromatografska metoda na sustavu XEVO TQ-XS uključivala je kolonu Acquity UPLC BEH C18 te gradijentno eluiranje [Tablica 11; poglavlje 3.2.3. *Instrumentna analiza farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita vezanim sustavom tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa (LC-MS/MS)*] gdje su pokretne faze bile voda s dodatkom amonijeva formijata ($c = 0,05 \text{ mmol L}^{-1}$) i mravlje kiseline ($\varphi = 0,05 \%$) (faza A) te acetonitril s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,1 \%$) (faza B).

Na koloni BEH C18 testirano je pet različitih temperatura za vrijeme kromatografskog razdvajanja: 30 °C, 35 °C, 40 °C, 45 °C i 50 °C. Rezultati su pokazali kako pri povišenoj temperaturi kolone dolazi do manjeg smanjenja površine kromatografskih pikova nekih spojeva, a broj koeluiranih analita se povećava. Optimalnom se pokazala temperatura od 35 °C, koja je omogućila nešto bolje razdvajanje i bolji oblik kromatografskih pikova, uz smanjenje tlaka na koloni, u istim uvjetima gradijentnog eluranja i protoka, za razliku od rada pri sobnoj temperaturi.

Primjer kromatograma smjese svih 44 analita snimljenog pri optimiranim uvjetima prikazan je na slici 6, a vrijeme zadržavanja svih analita u tablici 13. U skladu s očekivanjima, kromatografska separacija istraživanih analita na UHPLC sustavu, u odnosu na HPLC sustav, postignuta je u znatno kraćem vremenu pri čemu je ukupno trajanje analize, uključujući i završno kondicioniranje na početne uvjete, bilo 15 min. Za razliku od analize na HPLC sustavu koja je trajala 54 min, analize na UHPLC sustavu omogućile su analizu većeg broja uzoraka u kraćem vremenu. Kao i kod kolone Synergi Polar-RP, prvi eluirani analit je kotinin ($t_R = 1,78 \text{ min}$), a posljednji atorvastatin ($t_R = 13,06 \text{ min}$), međutim redosljed elucije ostalih analita bio je različit, a najveće razlike uočene su za polarnije analite koji se eliraju u prvoj polovici analize. Također, očigledna je razlika u kromatografskom razdvajanju postignutom ovim sustavima, gdje korištenjem HPLC sustava, bez obzira na višestruko dulje vrijeme analize, postoji veći broj koeluiranih spojeva (tri para), nego uporabom UHPLC sustava (jedan par).



Slika 6. Kromatogram standardne otopine 44 istraživana analita ($\gamma = 10 \text{ ng L}^{-1}$) snimljen instrumentom XEVO TQ-XS, korištenjem Acquity UPLC BEH C18 ($100 \times 2,1 \text{ mm}$, $1,7 \mu\text{m}$) kolone. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Masenospektrometrijska detekcija svakog istraživanih spoja temeljila se na praćenju dvije, prethodno optimirane, tranzicijske reakcije (Tablica 13), od kojih je prva korištena za kvantifikaciju, a druga za kvalitativnu potvrdu. Kako bi se osigurala optimalna osjetljivost i selektivnost određivanja, odabir tranzicija načinjen je na temelju intenziteta odziva i selektivnosti, pri čemu je za kvantifikaciju uglavnom korištena tranzicijska reakcija intenzivnijeg odziva. Ioni prekursori većine istraživanih analita bili su njihove jednostruko protonirane molekule $[M+H]^+$. Iznimke su azitromicin i njegovi metaboliti (dekladinozil azitromicin, *N*-demetil azitromicin i *N'*-demetil azitromicin) za koje su, zbog značajnije višeg intenziteta, kao ioni prekursori korištene njihove dvostruko protonirane molekule $[M+H]^{2+}$. Druga iznimka je amoksicilin za koji je kao prekursor odabran njegov stabilni, visoko rasprostranjeni metanolni adukt $[M+CH_3OH+H]^+$, što je u skladu s radom Grujić i suradnika²¹⁴.

Tranzicijske reakcije su bile iste, no maksimalni intenzitet i stabilnost signala u svakom od dva korištena instrumenta postignuti su optimiranjem energija sudara i ostalih masenospektrometrijskih uvjeta. MS uvjeti korišteni pri analizi sustavom TSQ Quantum AM i sustavom XEVO TQ-XS bili su jednaki za gotovo sve spojeve. Međutim, korištenjem zadanih uvjeta u sustavu XEVO TQ-XS primjećen je pad odziva te izrazito niske površine kromatografskih pikova sertralina i njegovih metabolita pri korištenim uvjetima elektroraspršenja (napon konusa 20 V i temperatura desolvatacije 600 °C), zbog čega su za analizu tih spojeva upotrebljavani niži napon konusa (10 V) i temperatura desolvatacije (300 °C).

S ciljem pouzdane kvantifikacije istraživanih analita, korišteni su izotopno obilježeni, najčešće deuterirani (*d*), unutarnji standardi koji su strukturni analozi analita. Međutim, za kvantifikaciju analita čiji izotopno obilježeni analozi nisu bili dostupni, upotrebljavan je neki od dostupnih izotopno obilježenih analoga drugih analita, a odabir je napravljen temeljem strukturne sličnosti sa analitom i/ili sličnosti u kromatografskom ponašanju, analitičkim povratima i utjecaju matrice. Kako bi se osigurala što veća točnost i ponovljivost određivanja analita u vodi i bioti, za pojedine analite bez dostupnih izotopno obilježenih analoga (npr. lizinopril, dekladinozil azitromicin, *O*-demetil tramadol i escitalopram) korišteni su različiti unutarnji standardi, ovisno o tipu uzorka.

Tablica 13. Vrijeme zadržavanja (t_R), ioni prekursori, ioni produkti (IP) i kolizijske energije (CE) istraživanih tvari i njihovih izotopno obilježenih surogata pri analizi LC-MS/MS sustavima TSQ Quantum i XEVO TQ-XS. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	IS	t_R^a / min	t_R^b / min	Ion prekursor / m/z	IP1 / m/z	CE1 / V	IP2 / m/z	CE2 / V
COT	COT- d_3	4,9	1,78	177,1	80,1	20	98,1	18
MOR	MOR- d_3	6,4	1,96	286,1	165,0	37	201,1	22
DC-AZI	AZI- d_3^*	9,7	2,78	296,2	158,0	12	116,0	15
	MDMA- d_5^{**}							
COD	COD- d_3	9,7	2,41	300,2	165,0	39	215,0	18
O-DM-TRAM	AZI- d_3^*	9,8	2,75	250,2	58,0	20	232,0	12
	MDMA- d_5^{**}							
LIS	AMOX- d_4^*	9,9	2,51	406,2	84,1	20	246,0	18
	COC- d_3^{**}							
AMOX	AMOX- d_4	10,4	2,79	398,1	348,9	10	380,9	7
MDMA	MDMA- d_5	10,7	2,92	194,1	163,0	10	135,0	16
SPY	SPY- $^{13}C_6$	11,7	2,74	250,1	184,0	15	108,0	21
TRAM	TRAM- d_3	13,7	4,15	264,2	58,2	10	246,0	8
BE	BE- d_3	13,8	3,17	290,1	168,0	15	77,1	50
N-DM-TRAM	TRAM- d_3	14,3	4,26	250,2	44,0	11	232,0	9
NOR	NOR- d_5	14,3	2,96	320,1	233,0	20	276,0	11
CIP	CIP- d_8	15,6	3,09	332,0	288,0	13	245,0	19
SMX	SMX- d_4	16,0	4,65	254,1	108,0	18	92,1	22
COC	COC- d_3	16,3	4,94	304,2	182,0	16	82,1	25
N'-DM-AZI	AZI- d_3	16,3	5,86	368,3	434,0	14	144,0	17
AZI	AZI- d_3	16,6	5,89	375,2	591,3	16	83,1	15
								31 ⁺
N-DM-AZI	AZI- d_3	16,7	3,67	368,3	158,0	19	420,1	15
CAFF	CAFF- $^{13}C_3$	17,0	2,54	195,1	138,1	15	110,1	19
						18 ⁺		
DLOR	DLOR- d_4	18,6	6,21	311,1	259,0	17	294,0	14
N-Ac-SMX	N-Ac-SMX- d_4	19,6	5,26	296,1	65,1	40	198,0	13
ZOLP	ZOLP- d_6	21,4	5,28	308,2	235,0	32	236,0	24
OXCARB	CARB- d_{10}	22,9	6,71	253,1	180,0	28	208,0	17
TOR	TOR- d_7	23,8	6,90	349,1	264,0	15	183,0	21
ESC	QUE- d_8^*	24,0	8,29	325,2	109,0	22	262,0	14
	TOR- d_7^{**}							
QUE	QUE- d_8	25,0	7,85	384,2	252,9	13	221,0	24
EDDP	EDDP- d_3	26,5	8,84	278,0	234,0	28	249,0	19
CARB	CARB- d_{10}	26,8	8,38	237,0	194,0	12	192,0	23
ERY	ERY- $^{13}C, d_3$	28,3	8,56	734,5	158,0	25	576,0	12
RAM	RAM- d_5	30,0	8,97	417,2	234,0	16	117,0	35
VER	VER- d_3	30,3	10,08	455,3	165,0	24	303,0	18
AML	AML- d_4	30,6	10,03	409,2	293,9	12	219,9	22
ERY-H2O	CLA- d_3	31,0	9,93	716,5	558,2	19	158,1	41
OXA	OXA- d_5	31,1	9,26	287,1	240,9	18	268,9	11
MTHD	MTHD- d_3	31,8	10,29	310,2	265,0	11	105,0	23
CLA	CLA- d_3	32,4	10,60	748,5	158,0	22	590,1	13
						11 ⁺		23 ⁺
SER	SER- d_3	32,9	11,50	306,1	158,9	25	274,9	10
TERB	TERB- d_7	34,6	11,81	292,2	141,0	21	115,0	48
WAR	WAR- d_5	36,3	12,14	309,1	163,0	11	251,0	14
VAL	VAL- d_3	36,9	12,33	436,2	207,0	20	291,0	12
DIA	DIA- d_5	37,4	11,81	285,1	193,0	28	154,0	22
LOR	LOR- d_4	37,7	11,98	383,2	336,9	19	266,9	31

Tablica 13. nastavak

FAS	IS	t_R^a / min	t_R^b / min	Ion prekursor / m/z	IP1 / m/z	CE1 / V	IP2 / m/z	CE2 / V
ATOR	ATOR- d_5	38,7	13,06	559,3	440,0	15	249,9	40
COT- d_3	-	4,9	1,78	180,1	80,1	22	101,1	21
MOR- d_3	-	6,3	1,95	289,1	165,0	32	201,0	23
COD- d_3	-	9,7	2,41	303,2	165,0	35	215,0	21
AMOX- d_4	-	10,4	2,74	402,1	352,9	11	385,0	7
MDMA- d_5	-	10,7	2,91	199,1	165,0	8	135,0	19
SPY- $^{13}C_6$	-	11,6	2,74	256,1	190,1	17	98,1	29
TRAM- d_3	-	13,6	4,12	267,2	58,2	20	249,0	5
BE- d_3	-	13,8	3,17	293,2	171,0	17	77,1	52
NOR- d_5	-	14,2	2,94	325,2	238,0	20	281,0	11
CIP- d_8	-	15,5	3,07	340,0	296,1	15	249,0	23
						13 ⁺		19 ⁺
SMX- d_4	-	15,9	4,58	258,0	112,0	23	96,1	23
COC- d_3	-	16,3	4,94	307,0	185,1	16	85,1	27
AZI- d_3	-	16,5	5,85	376,8	594,0	15	83,0	14
CAFF- $^{13}C_3$	-	17,0	2,54	198,0	140,0	16	112,1	14
DLOR- d_4	-	18,6	5,93	315,2	263,1	19	298,1	18
N-Ac-SMX- d_4	-	19,5	5,22	300,1	69,0	40	139,1	20
						50 ⁺		
ZOLP- d_6	-	21,2	5,19	314,2	235,0	32	236,0	26
TOR- d_7	-	23,7	6,85	356,2	263,9	15	289,9	11
QUE- d_8	-	24,6	7,76	392,2	258,0	21	257,0	17
EDDP- d_3	-	26,5	8,81	281,2	234,0	25	249,0	19
CARB- d_{10}	-	26,4	8,22	247,2	204,1	22	201,1	18
ERY- $^{13}C, d_3$	-	28,1	8,56	738,5	162,0	20	580,0	14
RAM- d_5	-	29,5	8,97	422,3	239,0	17	121,0	33
VER- d_3	-	29,9	10,04	458,3	165,0	26	150,0	31
AML- d_4	-	30,3	10,02	413,2	298,0	12	223,9	25
OXA- d_5	-	30,8	9,17	292,1	245,9	21	273,9	15
MTHD- d_3	-	31,6	10,27	313,2	268,0	10	105,0	26
CLA- d_3	-	32,4	10,60	751,5	160,9	23	593,1	11
SER- d_3	-	32,9	10,88	309,1	158,9	28	274,9	13
TERB- d_7	-	34,5	11,76	299,3	148,0	19	120,1	50
WAR- d_5	-	36,1	12,13	314,1	163,0	10	256,0	13
VAL- d_3	-	36,9	12,27	439,2	207,0	25	294,1	17
DIA- d_5	-	37,4	11,64	290,1	198,0	32	154,0	25
LOR- d_4	-	37,7	11,90	387,2	340,9	19	269,0	29
ATOR- d_5	-	38,7	13,04	564,3	445,0	15	254,9	41

^avrijeme zadržavanja na koloni u LC-MS sustavu TSQ Quantum AM; ^bvrijeme zadržavanja na koloni u LC-MS sustavu XEVO TQ-XS; *unutarnji standard korišten u analizama uzoraka vode; **unutarnji standard korišten u analizama uzoraka ribljeg tkiva; ⁺kolizijska energija korištena kod MS/MS analize sustavom XEVO TQ-XS

Kako bi se procijenio utjecaj metaboličkih procesa na bioakumulacijski potencijal FAS-ova istraživanih u pokusima s modelnim ribama, prethodno razvijena LC-MS/MS metoda za 44 analita (Tablica 13) sustavom XEVO TQ-XS, naknadno je proširena za dodatnih 30 analita (ukupno 74 analita; Tablica 1) čiji je odabir napravljen na temelju podataka o ljudskom metabolizmu³⁹ s obzirom na to da je metabolizam FAS-ova u ribama slabo istražen. Za metabolite čije referentne tvari nisu bile dostupne, praćene su tranzicijske reakcije preuzete iz

literature (Tablica 14), a njihove su koncentracije procijenjene s pomoću kalibracijskih krivulja roditeljskih spojeva ili njima srodnih metabolita, uz pretpostavku da su molarni odzivi istraživanih farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita jednaki ili vrlo slični.

Tablica 14. Vrijeme zadržavanja t_R , ioni prekursori, ioni produkti (IP) i kolizijske energije (CE) analita naknadno dodanih u metodu s ciljem ispitivanja metaboličkih transformacija istraživanih farmaceutskih spojeva LC-MS/MS sustavom XEVO TQ-XS. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

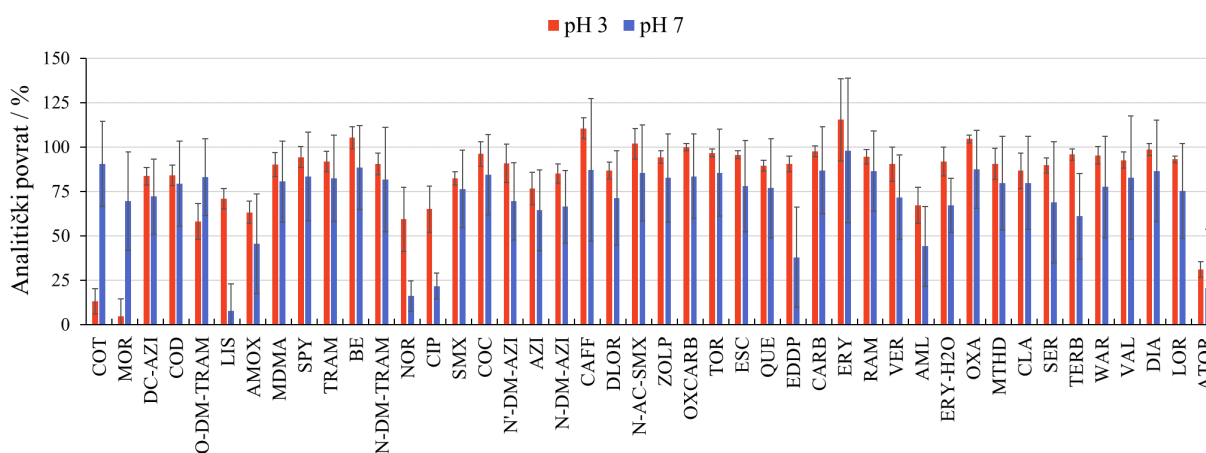
FAS	IS	Kvantifikacija	t_R / min	Ion prekursor / m/z	IP1 / m/z	CE1 / V	IP2 / m/z	CE2 / V
C6G⁺	COD- <i>d</i> ₃	C6G	2,23	476	300	30	215	35
norCOD⁺	COD- <i>d</i> ₃	norCOD	2,36	286	165	37	225	17
M3G⁺	MOR- <i>d</i> ₃	M3G	1,69	462	286	27	201	41
M6G⁺	MOR- <i>d</i> ₃	M6G	1,69	462	286	35	201	36
EMDP⁺	EDDP- <i>d</i> ₃	EMDP	9,71	264	220	28	235	20
DC-CLA⁺	CLA- <i>d</i> ₃	DC-CLA	7,19	590	158	18	116	31
OH-CLA⁴⁵	CLA- <i>d</i> ₃	CLA*	7,82	764,5	158	33	160	23
DM-CLA⁺	CLA- <i>d</i> ₃	DM-CLA	10,36	734,5	144	23	576	12
ZOLP-COOH⁺	ZOLP- <i>d</i> ₆	ZOLP-COOH	2,96	338	293	30	251	30
2OH-ZOLP²¹⁵	ZOLP- <i>d</i> ₆	ZOLP-COOH*	4,18	324	251	32	279	30
1OH-ZOLP²¹⁵	ZOLP- <i>d</i> ₆	ZOLP-COOH*	5,72	324	251	32	279	30
SER-KET²¹⁶	SER- <i>d</i> ₃	norSER*	10,70	291	145	29	117	40
norSER⁺	SER- <i>d</i> ₃	norSER	10,74	292	159	20	275	10
SERG²¹⁷	SER- <i>d</i> ₃	norSER*	-	543	350	15	-	-
norDIA²¹⁸	DIA- <i>d</i> ₅	DIA*	10,30	271	140	22	179	22
TEM⁺	DIA- <i>d</i> ₅	TEM	10,56	301	255	18	283	11
OXAG²¹⁹	OXA- <i>d</i> ₅	OXA*	9,26	463	241	18	287	20
3OH-DLOR⁺	DLOR- <i>d</i> ₄	3OH-DLOR	3,68	327	275	22	-	-
5OH-DLOR²²⁰	DLOR- <i>d</i> ₄	3OH-DLOR*	4,02	327	280	21	-	-
6OH-DLOR²²⁰	DLOR- <i>d</i> ₄	3OH-DLOR*	4,71	327	280	21	-	-
CARB-EP²²¹	CARB- <i>d</i> ₁₀	CARB*	4,39	253	180	24	-	-
OH-CARB²²¹	CARB- <i>d</i> ₁₀	CARB*	7,03	253	210	20	-	-
RAM-COOH²²²	RAM- <i>d</i> ₅	RAM*	-	389	156	23	206	23
VER D617⁺	VER- <i>d</i> ₃	VER-D617	6,87	291	150	24	165	24
O-DM-VER²²³	VER- <i>d</i> ₃	norVER*	9,11	441	291	24	303	24
norVER⁺	VER- <i>d</i> ₃	norVER	9,84	441	165	24	289	18
OH-WAR⁺	WAR- <i>d</i> ₅	OH-WAR	9,58	325	179	11	251	14
oOH-ATOR²²⁴	ATOR- <i>d</i> ₅	ATOR*	-	575	466	15	-	-
pOH-ATOR²²⁴	ATOR- <i>d</i> ₅	ATOR*	-	575	440	15	-	-
ATOR-LAC²²⁴	ATOR- <i>d</i> ₅	ATOR*	-	557	448	15	-	-

⁺optimiranje provedeno instrumentom XEVO TQ-XS; *koncentracije procijenjene pomoću kalibracijskog pravca roditeljskog spoja ili srodnog metabolita

4.1.2. Optimiranje postupka ekstrakcije tekućih uzoraka

Standardna procedura u analitici tragova organskih zagađivala u tekućim uzorcima najčešće uključuje SPE, pri čemu odabir najprikladnijeg sorbensa ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima ispitivanih analita. S ciljem postizanja učinkovite ekstrakcije (povrat metode veći od 50 %) za većinu analita, a koji su karakterizirani širokim rasponom fizikalno-kemijskih svojstava ($\log K_{ow}$ od $-3,99$ do $6,77$; pK_a od $0,14$ do $13,80$; Tablica 1), obogaćivanje iz vodenih uzoraka provedeno je s pomoću kolonica Oasis HLB koje su već pokazale dobre rezultate u analizi kompleksnih smjesa farmaceutskih spojeva u uzorcima vode^{7,26,27,158}.

S ciljem optimiranja ekstrakcijskih povrata na kolonicama Oasis HLB (200 mg/60 mL), u modelnim pokusima koji su provedeni u triplikatu uz uporabu nezagađene površinske vode obogaćene smjesom istraživanih analita masene koncentracije 50 ng L^{-1} , ispitani su utjecaji pH uzorka te različite vrste, sastavi i volumeni eluensa. U prvom koraku ispitan je utjecaj pH-vrijednosti uzorka i postupka ekstrakcije na analitičke povrate. Ekstrakcija je provedena kod kiselih (pH 3) i neutralnih uvjeta (pH 7), a rezultati su prikazani na slici 7.

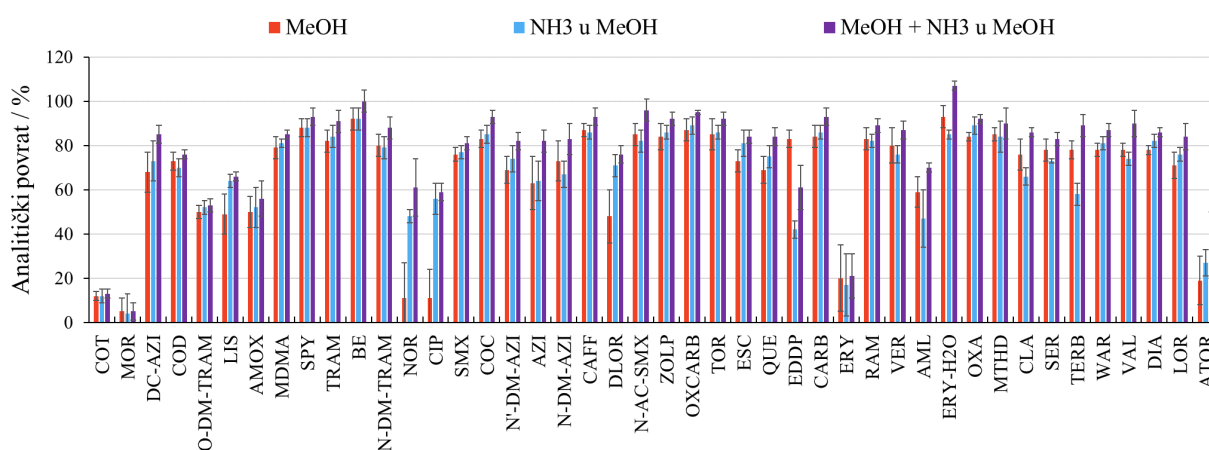


Slika 7. Srednje vrijednosti (i sd) analitičkih povrata analita ekstrahiranih iz obogaćenih uzoraka površinske vode ($V = 500 \text{ mL}$, $\gamma = 50 \text{ ng L}^{-1}$, $n = 3$) pri pH 3 i pH 7 na kolonicama Oasis HLB (200 mg/6 mL) uz eluciju metanolom. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Pri neutralnom pH postignuti su relativno dobri ekstrakcijski povrati ($> 50 \%$) većine analita (37 od 44), dok su povrati šest FAS-ova (lizinopril, ciprofloksacin, norfloksacin, amlodipin, atorvastatin i EDDP) bili niži od 50% (Slika 7). S druge strane, u kiselim uvjetima (pH = 3) postignuti su veći povrati za gotovo sve analite ($31 - 115 \%$), uključujući i spomenutih šest čiji su povrati bili niži od 50% , no uočena je slaba učinkovitost ekstrakcije dvaju najpolarnijih

analita, kotinina (13 %) i morfina (5 %), iz relativno velikih volumena uzorka (0,5 L). Budući da se može pretpostaviti kako su ova dva polarna analita manje značajna u kontekstu bioakumulacijskog ponašanja, te uzimajući u obzir bolje ekstrakcijske povrate i analitičku ponovljivost ostalih ispitivanih spojeva ($RSD = 7\%$), za daljnji rad je odabrana ekstrakcija pri kiselim uvjetima (pH 3).

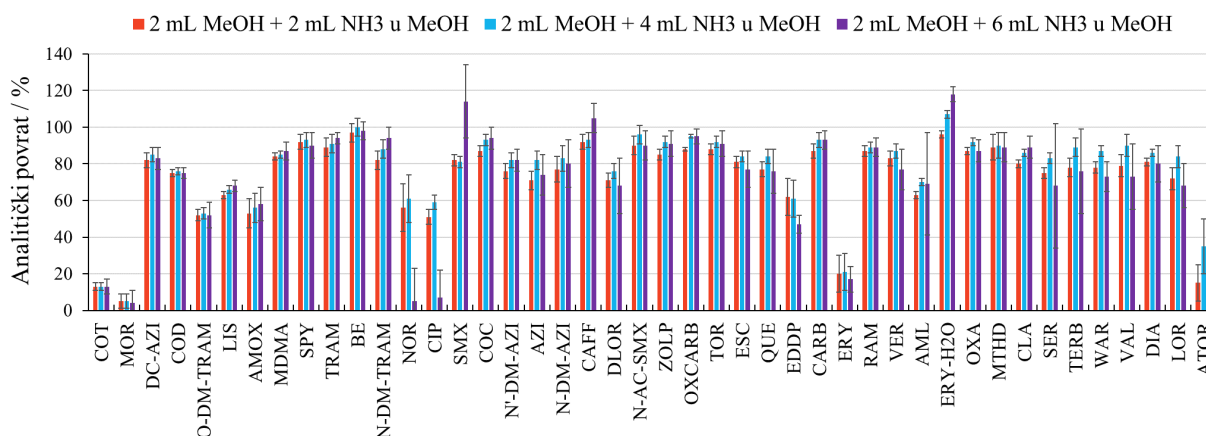
Osim uvjeta obogaćivanja na sorbentu, kroz modelne pokuse optimirani su i uvjeti desorpcije analita, uključujući odabir otapala (Slika 8) i volumena otapala za desorpciju (Slika 9). Zbog velikog broja podataka, na slikama 8 i 9 prikazani su najvažniji rezultati, dok se ostali nalaze u tablici I u poglavlju 8. *Dodatak*. Premda je efikasna desorpcija većine analita postignuta već primjenom jednokratne elucije neutralnim metanolom, još bolji prinosi postignuti su primjenom metanola s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,2\%$], posebice za norfloksacin i ciprofloksacin (Slika 8). Za većinu analita postignut je dodatni napredak primjenom sekvencijalne elucije metanolom i metanolom s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,2\%$]. Pokušaji pospješivanja analitičkih povrata elucijom metanolom s dodatkom kiseline ili povećanjem udjela amonijaka u metanolu [$\varphi(\text{NH}_3) = 1,0\%$] nisu rezultirali značajnijim rezultatima (Tablica I u poglavlju 8. *Dodatak*), stoga je u daljnjem radu za desorpciju analita primjenjivano sekvencijalno eluiranje analita metanolom i metanolom s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,2\%$].



Slika 8. Srednje vrijednosti (i sd) analitičkih povrata analita ekstrahiranih iz modelnih uzoraka površinske vode ($V = 500\text{ mL}$, $\gamma = 50\text{ ng L}^{-1}$, $n = 3$) na kolonicama Oasis HLB (200 mg/6 mL) pri pH 3 postignute desorpcijom sa sljedećim otapalima: i) 4 mL metanola, ii) 4 mL metanola s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,2\%$); te iii) sekvencijalna elucija metanolom (2 mL) i metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,2\%$, $V = 4\text{ mL}$). Puni nazivi analita nalaze se u tablici 1.

Nadalje, testiranje volumena odabranih elucijskih otapala pokazalo je kako povećanjem volumena metanola s dodatkom amonijaka na 6 mL, a time posljedično i volumena ukupnog ekstrakta na 8 mL, dolazi do znatnog pada analitičkog povrata fluorokinolonskih antibiotika (norfloksacin i ciprofloksacin) (Slika 9), najvjerojatnije uslijed povećanih gubitaka tijekom uparavanja većeg volumena ekstrakta. Niti jedna od ostalih istraživanih kombinacija volumena nije dovela do značajnih porasta u desorpcijskim povratima istraživanih analita (Tablica I u poglavlju 8. *Dodatak*).

Sekvencijalna elucija s 2 mL metanola i 4 mL metanola s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,2 \%$] rezultirala je povratima većim od 50 % za 40 od 44 ispitivana analita s prosječnom relativnom standardnom devijacijom od 5 te rasponom analitičkih povrata od 54 % do 104 %, uz iznimke za kotinin ($13 \pm 2 \%$), morfin ($5 \pm 4 \%$), eritromicin ($21 \pm 10 \%$) i atorvastatin ($35 \pm 15 \%$) (Tablica I u poglavlju 8. *Dodatak*). Zbog zadovoljavajućih rezultata za većinu analita, ovaj postupak je primjenjivan u daljnjim analizama tekućih uzoraka.



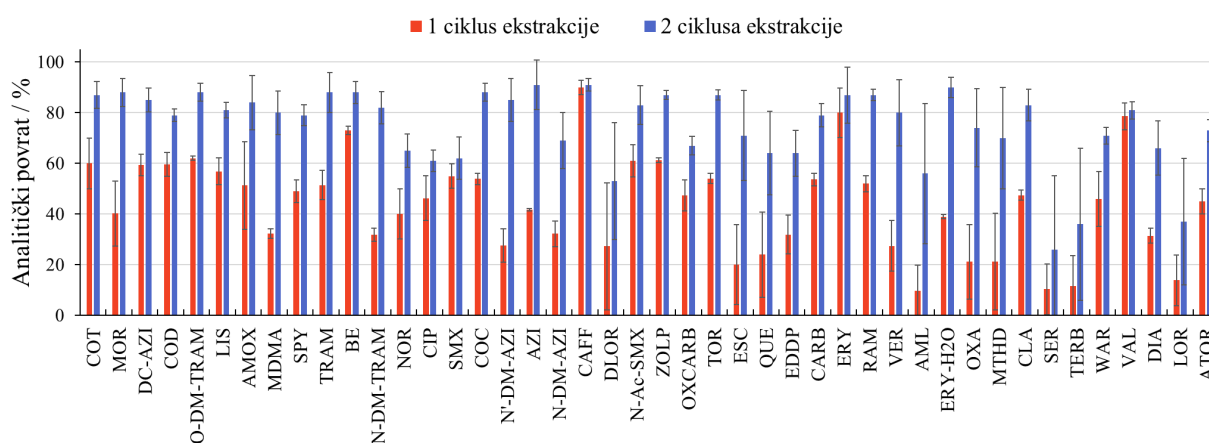
Slika 9. Srednje vrijednosti (i sd) analitičkih povrata analita ekstrahiranih iz modelnih uzoraka površinske vode ($V = 500 \text{ mL}$, $\gamma = 50 \text{ ng L}^{-1}$, $n = 3$) pri pH 3 na kolonicama Oasis HLB (200 mg/6 mL) postignute sekvencijalnom elucijom metanolom i metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$) uz primjenu različitih kombinacija volumena: i) po 2 mL svakog otapala, ii) 2 mL metanola i 4 mL metanola s dodatkom amonijaka; te iii) 2 mL metanola i 6 mL metanola s dodatkom amonijaka. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

4.1.3. Optimiranje uvjeta ekstrakcije ribljeg tkiva

Ekstrakcija složenih smjesa farmaceutskih spojeva iz uzoraka biote obično uključuje ekstrakciju potpomognutu visokim tlakom ili ekstrakciju potpomognutu ultrazvukom, koristeći ekstrakcijska otapala metanol i acetonitril^{11,12,30}. Razvijeni ekstrakcijski protokoli uglavnom se temelje na uporabi neutralnih otapala ili otapala s dodatkom kiseline^{33,100,109} dok je primjena otapala s dodatkom lužine rjeđa^{225,226}. Međutim, budući da je pokazano kako uporaba otapala s dodatkom lužina može značajno poboljšati učinkovitost ekstrakcije bazičnih spojeva iz čvrstih okolišnih uzoraka, kao što su riječni sediment ili otpadni mulj²²⁷, taj pristup je testiran tijekom razvoja ove metode.

Za metodu ekstrakcije odabrana je ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom zbog jednostavnosti, široke dostupnosti, niske cijene, jednostavne modifikacije te mogućnosti provođenja paralelnih ekstrakcija više različitih uzoraka istovremeno. Modelni pokusi ispitivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije provedeni su na liofiliziranom kriomljevenom mišiću klana (0,5 g), prikupljenom iz neonečišćenog okoliša, uz obogaćivanje ispitivanim analitima u masenom udjelu od 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

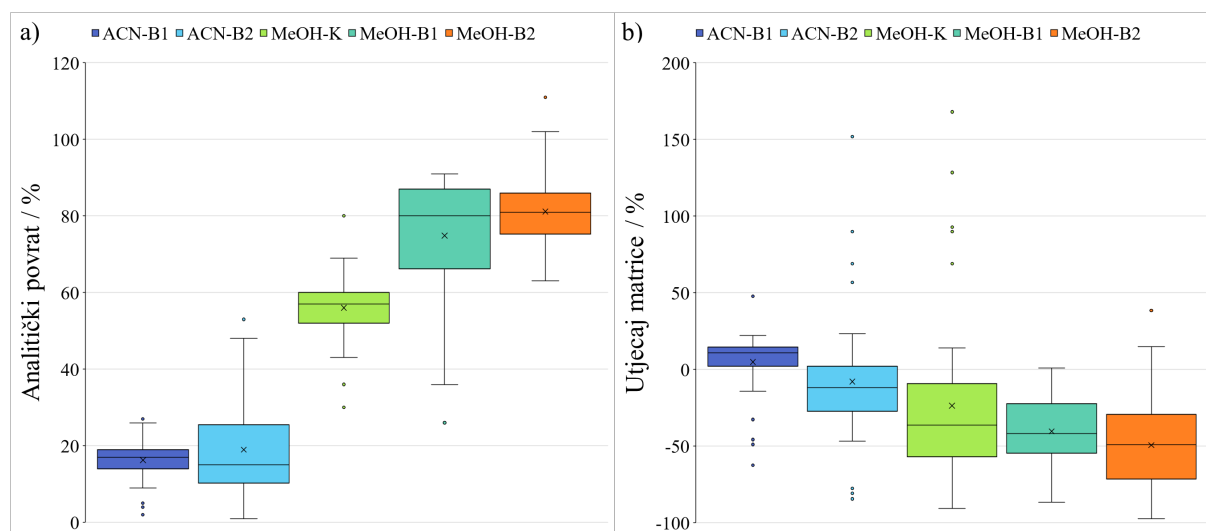
S obzirom na to da se u literaturi mogu pronaći različiti pristupi, za početak je testiran utjecaj jednog odnosno dva ciklusa ekstrakcije na analitičke povrate, uz korištenje metanola s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,5 \%$] kao ekstrakcijskog otapala (Slika 10).



Slika 10. Srednje vrijednosti (i sd) analitičkih povrata analita ekstrahiranih iz liofiliziranog modelnog uzorka ribljeg mišića ($m = 0,5 \text{ g}$, $\omega = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 3$) ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u jednom i u dva ciklusa ekstrakcije, korištenjem metanola s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$) kao ekstrakcijskog otapala. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Značajno viši analitički povrati postignuti su za većinu analita pri ekstrakciji u dva ciklusa u odnosu na jedan, a 39 od 44 ispitivana analita pokazalo je povrate veće od 60 %. Stoga su sva daljnja ispitivanja provedena uz primjenu dva ciklusa ekstrakcije.

Nadalje, testirano je nekoliko ekstrakcijskih otapala i njihovih kombinacija, uključujući acetonitril s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,5 \%$] (ACN-B1), smjesu acetonitrila i acetona, $\varphi(\text{CH}_3\text{CN} : (\text{CH}_3)_2\text{O}) = 3 : 1$, s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,5 \%$] (ACN-B2), metanol s dodatkom mravlje kiseline [$\varphi(\text{HCOOH}) = 0,2 \%$] (MeOH-K), metanol s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,5 \%$] (MeOH-B1) te smjesu metanola i acetona, $\varphi(\text{CH}_3\text{OH} : (\text{CH}_3)_2\text{O}) = 3 : 1$, s dodatkom amonijaka [$\varphi(\text{NH}_3) = 0,5 \%$] (MeOH-B2). Sumarna usporedba rezultata tih pokusa prikazana je na slici 11, dok su pojedinačni rezultati za sve istraživane analite prikazani u tablici II u poglavlju 8. *Dodatak*.



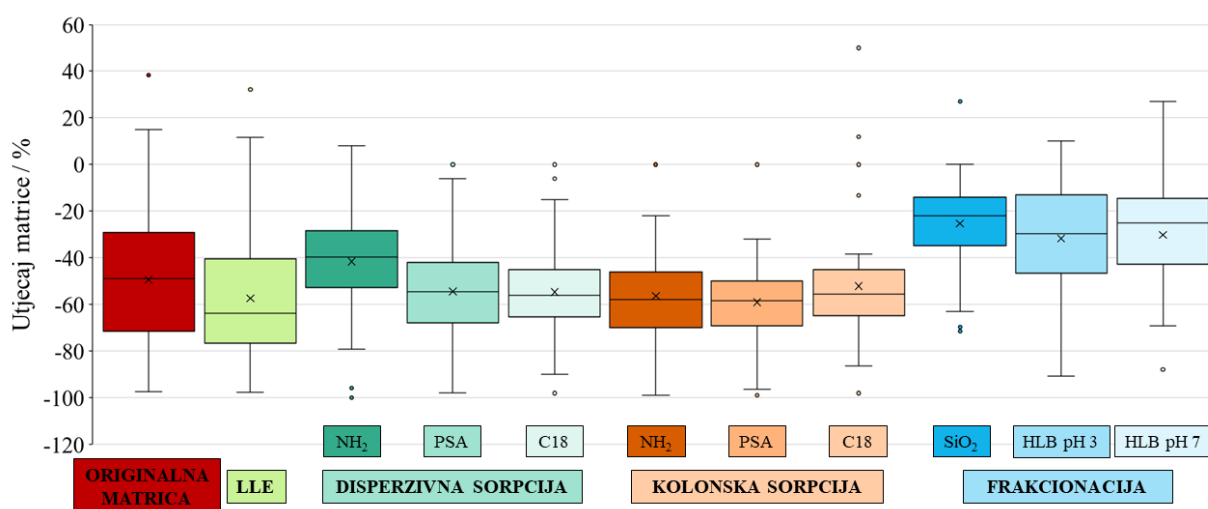
Slika 11. Prosječne srednje vrijednosti (i sd) analitičkih povrata (a) i utjecaja matrice (b) analita ekstrahiranih iz liofiliziranog modelnog uzorka ribljeg mišića ($m = 0,5 \text{ g}$, $\omega = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 3$) ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u dva ciklusa, korištenjem različitih ekstrakcijskih otapala: i) **ACN-B1**, acetonitril s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$), ii) **ACN-B2**, smjesa acetonitrila i acetona ($3 : 1$, v/v) s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$), iii) **MeOH-K**, metanol s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,2 \%$), iv) **MeOH-B1**, metanol s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$); te v) **MeOH-B2**, smjesa metanola i acetona ($3 : 1$, v/v) s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$).

Znatno viši ekstrakcijski povrati postignuti su uporabom metanola u odnosu na acetonitril što je u skladu s istraživanjem koje su proveli Huerta i suradnici³². Osim toga, viši analitički povrati postignuti su s pomoću metanola s dodatkom lužine u odnosu na znatno češće primjenjivanu opciju s dodatkom kiseline. Iznimka su bili sertralin, terbinafin i loratadin, čiji su analitički povrati bili gotovo dvostruko viši kod kiselih uvjeta, te *N*-demetil tramadol, sulfametoksazol, desloratadin i amlodipin za koje nije bilo značajnih razlika između ispitivanih modifikacija (Tablica II u poglavlju 8. *Dodatak*). Dodatak acetona u ekstrakcijska otapala (ACN-B2 i MeOH-B2) nije značajno povećao analitičke povrate istraživanih analita, premda je ranije pokazano da smjesta acetonitrila i manje polarnog otapala može povećati učinkovitost ekstrakcije FAS-ova iz uzoraka biote³³.

Osim analitičkih povrata, vrlo važan faktor pri odabiru optimalnog ekstrakcijskog otapala jest selektivnost, odnosno stupanj koekstrakcije neželjenih sastojaka matrice uzorka koji mogu negativno utjecati na osjetljivost i ponovljivost određivanja te na kromatografsko ponašanje ciljanih analita^{33,174,199}. Usporedba rezultata prikazanih na slici 11 jasno upućuje da je učestali odabir acetonitrila kao ekstrakcijskog otapala u analizi FAS-ova u biološkim uzorcima^{11,12,30} povezan prvenstveno s njegovom selektivnošću u odnosu na lipidne interferencije. Naime, testirane metanolne otopine koekstrahirale su znatno više interferirajućih tvari mišićne matrice u odnosu na acetonitrilne otopine, što je dovelo do izražene supresije signala (> 50 %) brojnih analita (Slika 11; Tablica II u poglavlju 8. *Dodatak*). Taj efekt je bio još izraženiji pri dodatku acetona, što upućuje na lipidni karakter koekstrahiranih interferencija. S obzirom na ostvarene analitičke povrate, a imajući u vidu i negativne učinke koekstrahirane matrice, metanol s dodatkom amonijaka odabran je kao ekstrakcijsko otapalo u daljnjem postupku optimiranja metode.

Budući da je razvoj metode u početnoj fazi proveden na liofiliziranim uzorcima ribljeg mišića, rezultati odabranog ekstrakcijskog postupka uspoređeni su za uzorke liofiliziranog (0,5 g) i svježeg (2,0 g) uzorka (Slika 12), što bi u pogledu suhe matrice trebao biti maseni ekvivalent. Za oba tipa uzorka, ostvareni su vrlo dobri analitički povrati većine analita (59 – 97 % za svježe i 53 – 91 % za liofilizirane uzorke), koji su bili slični ili bolji od povrata postignutih u ranije objavljenim metodama^{33,183,199}. Međutim, ekstrakcijom mokrog tkiva ostvareni su znatno viši analitički povrati norfloksacina, ciprofloksacina, amlodipina, sertralina i terbinafina u odnosu na liofilizirani uzorak. Osim toga, supresija većine analita bila je značajno niža u mokrim uzorcima, što je najvjerojatnije povezano s nižim stupnjem koekstrakcije lipida

valsartan i loratadin. Kako bi se odabrao optimalan postupak pročišćavanja, preliminarno je istraženo više postupaka (poglavlje 3.2.2. *Priprema uzoraka ribe za instrumentnu analizu*), uključujući izmućkivanje završnog ekstrakta *n*-heksanom (LLE), sorpciju nečistoća na dispergiranom sorbentu (NH₂, PSA, C₁₈), sorpciju nečistoća na kolonicama punjenim sorbentom (NH₂, PSA, C₁₈) te frakcionaciju na stupcu silikagela i na kolonicama Oasis HLB. Postupci pročišćavanja opisani su u spomenutom poglavlju, sumarni rezultati pokusa prikazani na slici 13, dok se rezultati za pojedinačne analite nalaze u tablici III u poglavlju 8. *Dodatak*.



Slika 13. Prosječne srednje vrijednosti i standardne devijacije utjecaja matrice određene analizom uzoraka ribljeg mišića ekstrahiranih metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5\%$) prije i nakon pročišćavanja pomoću: i) izmućkavanja ekstrakta *n*-heksanom (LLE), ii) sorpcijom nečistoća na dispergiranom sorbentu (NH₂, PSA, C₁₈), iii) sorpcijom nečistoća na kolonicama punjenim s tri tipa sorbensa (NH₂, PSA, C₁₈); te iv) frakcionacijom na stupcu silikagela i na kolonicama Oasis HLB pri pH 3 i pH 7.

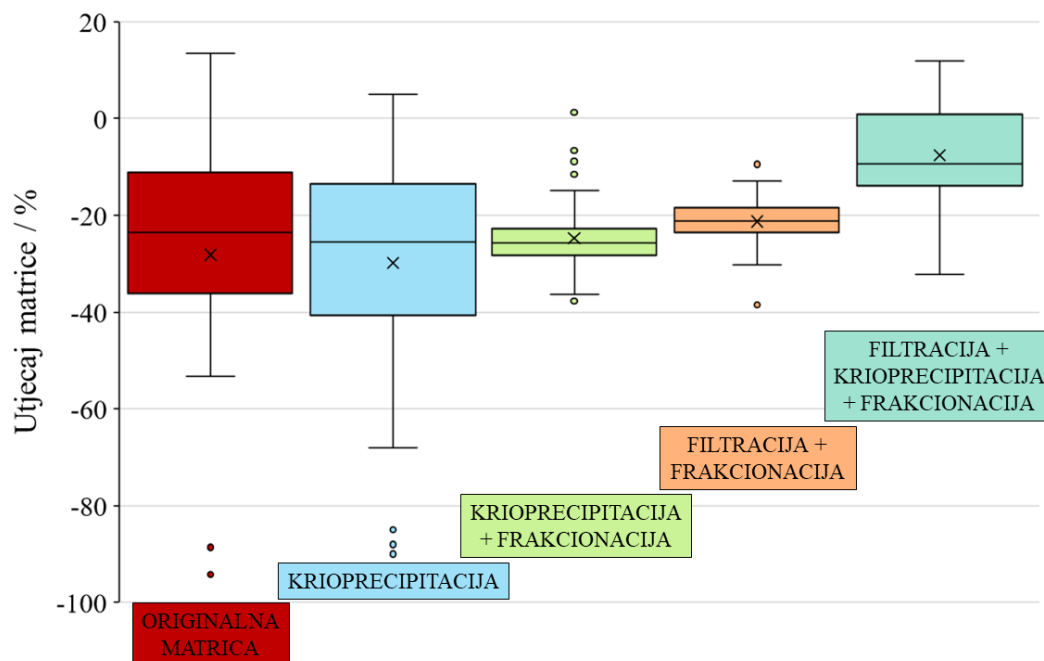
Od svih navedenih postupaka, značajnija redukcija supresije signala većine analita postignuta je isključivo primjenom frakcioniranja ekstrakta na stupcu silikagela i na kolonicama Oasis HLB. Nadalje, usprkos razmjerno dobrim preliminarnim rezultatima, postupak pročišćavanja na silikagelu nije odabran za daljnji rad, primarno zbog dugotrajnosti postupka (oko 2 h po uzorku) i učestalog začepeljivanja sorbensa koje je dodatno otežavalo i usporavalo rad.

Frakcioniranje vodom razrijeđenog ekstrakta na kolonicama Oasis HLB smanjilo je supresiju signala većine analita, no za 16 analita (od 44) supresija je i dalje bila viša od 40 %, a za neke od njih (npr. desloratadin, amlodipin, sertralin, terbinafin i loratadin) i iznad 70 %.

Jedan od postupaka pročišćavanja uzoraka biote koji se navodi u literaturi^{16,20,33} je selektivno taloženje koekstrahiranih lipida pri niskim temperaturama, odnosno krioprecipitacija. U ovom istraživanju, utjecaj krioprecipitacije na supresiju signala ispitan je skladištenjem metanolnih ekstrakata preko noći na tri temperature (+4 °C, -20 °C i -80 °C), te pospješivanjem odvajanja precipitata centrifugiranjem pri sniženoj i sobnoj temperaturi (Tablica IV u poglavlju 8. *Dodatak*). Međutim, i nakon primjene najrigoroznijih istraženih uvjeta (-80 °C preko noći; centrifugiranje pri 0 °C i 15 000 rpm), supresija 11 analita bila je i dalje iznad 40 % kada je krioprecipitacija bila jedini primijenjeni postupak pročišćavanja. Nasuprot tome, sukcesivnom primjenom krioprecipitacije metanolnog ekstrakta i frakcionacije vodom razrijeđenog supernatanta na kolonicama Oasis HLB, postignuto je značajno smanjenje supresije gotovo svih istraživanih analita koja je za sve analite bila ispod ili blizu 40 % (Slika 14; Tablica V u poglavlju 8. *Dodatak*).

U daljnjem je postupku optimizacije metode, osim slabije topljivosti lipida u organskom otapalu pri niskim temperaturama, iskorištena i njihova slabija topljivost u vodi u odnosu na metanol. Naime, pri razrjeđivanju metanolnog ekstrakta vodom (1:100, v/v) prije propuštanja kroz kolonice Oasis HLB, uočeno je taloženje pahuljastog lipidnog materijala. Kada je taj materijal prije propuštanja kroz kolonice uklonjen filtracijom (GF/F), supresija signala svih analita svedena je u raspon od -38 % do -9 % (Tablica V u poglavlju 8. *Dodatak*), što predstavlja značajno poboljšanje u odnosu na rezultate ostvarene bez prethodne filtracije vodenastog ekstrakta (Slika 14).

U skladu s postignutim rezultatima, kreiran je finalni trostupanjski postupak pročišćavanja ekstrakata ribljeg tkiva utemeljen na sekvencijalnoj primjeni krioprecipitacije lipida u metanolnom ekstraktu, uklanjanju istaloženih lipida iz razvodnjenog ekstrakta filtracijom, te frakcionacije dobivenog filtrata na Oasis HLB kolonicama pri pH 3 koji je detaljno opisan u poglavlju 3.2.2. *Priprema uzoraka ribe za instrumentnu analizu*. Primjenom navedenog pažljivo optimiranog postupka, maksimalni utjecaj matrice sveden je ispod 20 % za čak 40 od 44 analita, dok je za preostala četiri bio između -32 % i -21 %, što predstavlja vrlo dobar rezultat u kontekstu postojeće literature (Tablica 7).



Slika 14. Prosječne srednje vrijednosti (i sd) utjecaja matrice određene analizom svježih modelnih uzoraka ribljeg mišića ($m = 1,0 \text{ g}$, $\omega = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 3$) ekstrahiranih metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$) bez i uz pročišćavanje postupcima filtracije, krioprecipitacije i frakcionacije na Oasis HLB kolonicama.

4.1.5. Stabilnost farmaceutskih spojeva u uzorcima vode i njihovim ekstraktima

Pouzdanost određivanja koncentracija farmaceutskih spojeva u uzorcima uvelike ovisi o načinu i vremenu skladištenja uzoraka. U idealnom slučaju, uzorci se obrađuju i analiziraju neposredno nakon prikupljanja, no budući da to nije uvijek moguće osigurati, istražena je stabilnost istraživanih analita tijekom čuvanja: i) zamrznutih uzoraka vode ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$), ii) kolonica Oasis HLB ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$), iii) metanolnih ekstrakata ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$) i iv) završnih ekstrakata ($+4 \text{ }^\circ\text{C}$), a rezultati ovih ispitivanja prikazani su u tablici VI u poglavlju 8. *Dodatak.*

Kod svih ispitanih uvjeta polovica analita (22 od 44) bila je vrlo stabilna ($> 80 \%$). Najbolji rezultati dobiveni su zamrzavanjem uzoraka vode na $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, koje se inače često koristi u analitici raznih tipova zagađivala voda^{7,8,93}. Kod tih uvjeta je, na kraju istraživanog razdoblja (41 dan), zabilježen gubitak pojedinih analita, kao što su azitromicin i njegovi metaboliti (*N*- i *N*-demetil azitromicin) te verapamil, amlodipin, oksazepam, terbinafin i atorvastatin i do 70 %. Kod ostalih načina čuvanja, stabilnost gotovo svih analita bila je vrlo dobra ($> 85 \%$) tijekom cijelog istraženog razdoblja (41 dan). Iznimka je bio eritromicin koji je u 41. danu u zamrznutim

uzorcima vode bio značajno stabilniji (78 %) nego kod ostalih načina pohrane (5 – 9 %) te amoksisilin kod kojeg je u tom razdoblju zabilježen pad koncentracije u metanolnom ekstraktu za oko 70 % unatoč vrlo dobroj stabilnosti tijekom prvih sedam dana (92 %). Na temelju dobivenih rezultata, odlučeno je da će se u daljnjem radu za čuvanje uzoraka koristiti čuvanje uzoraka na kolonicama Oasis HLB.

4.2. Validacija analitičkih metoda za određivanje farmaceutskih spojeva

Validacija metode razvijene za analizu 44 istraživana analita (Tablica 8) u uzorcima vode i ribljeg tkiva provedena je prema metodologiji opisanoj u poglavljima 3.2.1. *Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu* i 3.2.2. *Priprema uzoraka ribe za instrumentnu analizu*, a uključivala je određivanje sljedećih parametara: linearni rasponi odziva, instrumentne granice detekcije (IGD), granice kvantitativnog određivanja metode (GK), analitički povrati, utjecaji matrice te točnost i ponovljivost metode. Razvijene metode validirane su primjenom instrumenta TSQ Quantum AM, dok su za XEVO TQ-XS dodatno evaluirani parametri specifični za taj instrument; linearnost odziva, IGD i GK.

Uporabom oba instrumenta postignuta je dobra linearnost odziva istraživanih analita u zadovoljavajuće širokom rasponu koncentracija (Tablica 15). Instrumentom TSQ Quantum AM odziv je za većinu analita bio linearan ($r^2 > 0,996$) u koncentracijskom rasponu od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ do $500 \mu\text{g L}^{-1}$, osim za morfin čije je područje linearnog raspona odziva bilo nešto uže ($0,5 - 200 \mu\text{g L}^{-1}$). Uporabom osjetljivijeg instrumenta (XEVO TQ-XS) područje linearnog raspona variralo je od $0,0005 \mu\text{g L}^{-1}$ do $20 \mu\text{g L}^{-1}$ za 13 najosjetljivijih analita, te od $0,1 \mu\text{g L}^{-1}$ do $20 \mu\text{g L}^{-1}$ za nekoliko slabije osjetljivih analita (lizinopril, amoksisilin, norfloksacin i ciprofloksacin). Instrumentne granice detekcije ispitivanih analita, izražene kao masa analita injektiranog na kolonu, iznosile su između $1,5 \text{ pg}$ i 30 pg za instrument TSQ Quantum AM te $2,5 - 500 \text{ fg}$ za XEVO TQ-XS.

Tablica 15. Područje linearnosti signala i instrumentne granice detekcije (IGD) uporabom LC-MS/MS instrumenata TSQ Quantum AM i XEVO TQ-XS. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	TSQ Quantum AM			XEVO TQ-XS		
	Raspon / $\mu\text{g L}^{-1}$	Linearnost (r^2)	IGD / pg	Raspon / $\mu\text{g L}^{-1}$	Linearnost (r^2)	IGD / fg
COT	0,5 – 500	0,9998	7,5	0,005 – 20	0,9994	25
MOR	0,5 – 200	0,9990	15	0,005 – 20	0,9984	25
DC-AZI	1 – 500	0,9960	15	0,05 – 20	0,9985	250
COD	0,5 – 500	0,9991	7,5	0,002 – 20	0,9995	10
O-DM-TRAM	0,5 – 500	0,9980	7,5	0,001 – 20	0,9981	5
LIS	0,5 – 500	0,9981	7,5	0,1 – 20	0,9983	500
AMOX	0,5 – 500	0,9987	7,5	0,1 – 20	0,9987	500
MDMA	0,5 – 500	0,9991	1,5	0,0005 – 20	0,9994	2,5
SPY	0,5 – 500	0,9988	15	0,002 – 20	0,9988	10
TRAM	0,5 – 500	0,9992	1,5	0,002 – 20	0,9997	10
BE	0,5 – 500	0,9996	3	0,0005 – 20	0,9992	2,5
N-DM-TRAM	0,5 – 500	0,9991	15	0,0005 – 20	0,9996	2,5
NOR	2 – 500	0,9990	30	0,1 – 20	0,9933	500
CIP	1 – 500	0,9993	15	0,1 – 20	0,9948	500
SMX	1 – 500	0,9987	7,5	0,008 – 20	0,9991	40
COC	0,5 – 500	0,9993	1,5	0,0005 – 20	0,9994	2,5
N'-DM-AZI	0,5 – 500	0,9988	15	0,05 – 20	0,9989	250
AZI	0,5 – 500	0,9994	7,5	0,02 – 20	0,9996	100
N-DM-AZI	1 – 500	0,9987	15	0,02 – 20	0,9996	100
CAFF	1 – 500	0,9992	7,5	0,005 – 20	0,9993	25
DLOR	0,5 – 500	0,9991	1,5	0,005 – 20	0,9997	25
N-Ac-SMX	0,5 – 500	0,9982	30	0,01 – 20	0,9995	50
ZOLP	0,5 – 500	0,9993	1,5	0,0005 – 20	0,9996	2,5
OXCARB	0,5 – 500	0,9990	15	0,002 – 20	0,9997	10
TOR	0,5 – 500	0,9990	1,5	0,0005 – 20	0,9996	2,5
ESC	0,5 – 500	0,9990	3	0,0005 – 20	0,9995	2,5
QUE	0,5 – 500	0,9990	1,5	0,0005 – 20	0,9990	2,5
EDDP	0,5 – 500	0,9997	1,5	0,0005 – 20	0,9994	2,5
CARB	0,5 – 500	0,9990	1,5	0,002 – 20	0,9996	10
ERY	0,5 – 500	0,9989	7,5	0,01 – 20	0,9993	50
RAM	0,5 – 500	0,9996	3	0,005 – 20	0,9996	25
VER	0,5 – 500	0,9998	1,5	0,001 – 20	0,9994	5
AML	0,5 – 500	0,9972	15	0,005 – 20	0,9993	25
ERY-H2O	0,5 – 500	0,9992	3	0,01 – 20	0,9982	50
OXA	0,5 – 500	0,9991	7,5	0,01 – 20	0,9996	100
MTHD	0,5 – 500	0,9997	1,5	0,001 – 20	0,9992	5
CLA	0,5 – 500	0,9988	1,5	0,005 – 20	0,9991	25
SER	0,5 – 500	0,9997	3	0,002 – 20	0,9993	10
TERB	0,5 – 500	0,9995	1,5	0,0005 – 20	0,9993	2,5
WAR	0,5 – 500	0,9991	3	0,005 – 20	0,9994	25
VAL	0,5 – 500	0,9994	7,5	0,05 – 20	0,9990	250
DIA	0,5 – 500	0,9994	7,5	0,0005 – 20	0,9992	2,5
LOR	0,5 – 500	0,9987	7,5	0,0005 – 20	0,9994	2,5
ATOR	0,5 – 500	0,9993	3	0,0005 – 20	0,9993	2,5

4.2.1. Validacija metode za analizu farmaceutskih spojeva u vodi

Prikladnost metode za određivanje ciljanih spojeva u zadanom tipu uzorka u velikoj mjeri ovisi o postignutim granicama kvantifikacije metode koje ne određuju samo instrumentne granice detekcije, nego i stupanj koncentriranja uzorka, kompleksnost koekstrahirane matrice te analitički povrati. Granice kvantifikacije za površinsku vodu (500 mL) bile su u rasponu od $0,1 \text{ ng L}^{-1}$ do $11,5 \text{ ng L}^{-1}$ uporabom instrumenta TSQ Quantum AM te od $0,01 \text{ ng L}^{-1}$ do 1 ng L^{-1} uporabom instrumenta XEVO TQ-XS (Tablica 16). U skladu s tim, instrument XEVO TQ-XS korišten je za analizu riječne vode i riječnih riba dok je instrument TSQ Quantum AM uglavnom korišten za analizu dijela uzoraka iz modelnih pokusa koji su provedeni kod viših koncentracija. Važno je naglasiti da su postignute granice kvantifikacije bile usporedive ili bolje od do sada objavljenih (Tablica 7) zbog čega se razvijena metoda može smatrati prikladnom za određivanje istraživanih farmaceutskih spojeva u modelnim i okolišnim uvjetima.

Utjecaj matrice i analitički povrati određeni tijekom validacije metode za analizu uzoraka površinskih voda (Tablica 16) bili su slični vrijednostima određenim tijekom razvoja metode, a koji su detaljno raspravljani ranije (poglavlje 4.1.2. *Optimiranje postupka ekstrakcije tekućih uzoraka*). U validacijskim pokusima je za većinu analita (36 od 44) ostvaren analitički povrat iznad 70 % dok su se utjecaji matrice kretali u rasponu od -49 % za norfloksacin do 42 % za loratadin.

Točnost i ponovljivost metode bila je vrlo dobra za sva tri testirana koncentracijska nivoa (5 ng L^{-1} , 50 ng L^{-1} i 500 ng L^{-1}). Na najnižoj koncentracijskoj razini točnost određivanja bila je u rasponu od 83 – 124 %, a na najvišoj $105 \pm 21 \%$. Preciznost metode bila je vrlo dobra, uz relativnu standardnu devijaciju nižu od 10 %, posebice pri višim koncentracijama (50 i 500 ng L^{-1}). Nešto lošija ponovljivost postignuta je za najnižu modelnu koncentraciju (5 ng L^{-1}), posebice za morfin, kofein, sulfametoksazol, eritromicin i *N*-acetil sulfametoksazol (21 – 28 %).

Tablica 16. Validacijski parametri metode određivanja farmaceutskih spojeva u površinskoj vodi ($V = 0,5$ L, $n = 4$). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Analitički povrat / %	Utjecaj matrice / %	Točnost / %			Preciznost / %			GK _Q / ng L ⁻¹	GK _X / ng L ⁻¹
			5*	50*	500*	5*	50*	500*		
COT	9 ± 1	-12 ± 1	122	99	115	16	4	10	5,5	0,1
MOR	9 ± 1	-43 ± 3	84	91	113	28	10	9	11,5	0,4
DC-AZI	88 ± 12	-24 ± 1	105	105	116	18	8	9	1,0	1,0
COD	98 ± 6	-47 ± 4	102	89	101	14	2	7	0,5	0,1
O-DM-TRAM	65 ± 3	-20 ± 1	83	79	84	16	4	6	0,5	0,01
LIS	80 ± 2	-7 ± 0	102	101	98	13	3	20	0,5	1,0
AMOX	70 ± 4	-5 ± 0	90	85	92	8	4	19	0,5	1,0
MDMA	103 ± 4	-31 ± 3	111	96	103	14	1	4	0,1	0,02
SPY	104 ± 6	-51 ± 5	97	115	97	19	3	13	1,0	0,05
TRAM	102 ± 6	-17 ± 1	109	94	106	16	3	5	0,1	0,02
BE	105 ± 4	-18 ± 1	100	87	96	6	2	1	0,2	0,01
N-DM-TRAM	102 ± 5	-22 ± 1	106	87	101	12	2	8	1,0	0,01
NOR	71 ± 10	-49 ± 5	NO	90	90	NO	2	1	2,8	1,0
CIP	68 ± 7	-43 ± 3	NO	79	110	NO	1	14	1,0	1,0
SMX	118 ± 9	-53 ± 6	109	94	100	22	6	7	0,5	0,04
COC	98 ± 4	-12 ± 1	111	95	98	10	1	4	0,1	0,01
N'-DM-AZI	97 ± 11	-29 ± 4	95	104	99	18	11	9	1,0	0,4
AZI	72 ± 4	-19 ± 1	103	91	106	20	3	7	0,5	0,4
N-DM-AZI	92 ± 8	-28 ± 2	92	98	106	20	4	7	1,0	0,4
CAFF	108 ± 5	-46 ± 3	97	84	103	32	6	2	0,5	0,1
DLOR	90 ± 5	-44 ± 4	114	88	99	2	2	1	0,1	0,2
N-Ac-SMX	109 ± 6	-25 ± 3	96	91	95	26	4	11	2,0	0,1
ZOLP	96 ± 4	-9 ± 0	104	93	104	3	2	2	0,1	0,01
OXCARB	111 ± 5	-25 ± 3	105	90	111	19	1	7	1,0	0,02
TOR	98 ± 4	2 ± 0	111	94	110	8	2	4	0,1	0,01
ESC	94 ± 5	-18 ± 1	124	90	93	5	7	5	0,2	0,01
QUE	87 ± 4	-14 ± 1	115	87	100	5	4	5	0,1	0,01
EDDP	70 ± 7	-10 ± 0	105	90	98	8	2	2	0,1	0,01
CARB	104 ± 6	-24 ± 1	104	92	93	8	1	7	0,1	0,02
ERY	37 ± 5	-23 ± 8	103	101	149	21	13	10	1,3	0,2
RAM	98 ± 4	-13 ± 1	105	97	98	5	1	3	0,2	0,1
VER	88 ± 6	-14 ± 1	96	91	97	6	1	1	0,1	0,02
AML	89 ± 8	-27 ± 3	87	97	104	12	4	5	1,0	0,4
ERY-H2O	109 ± 6	-19 ± 1	101	106	109	15	5	9	0,2	0,1
OXA	99 ± 4	-4 ± 0	102	89	98	4	2	6	0,5	0,2
MTHD	95 ± 3	-11 ± 1	100	88	100	6	1	2	0,1	0,04
CLA	92 ± 8	-12 ± 1	99	98	98	18	2	5	0,1	0,1
SER	93 ± 6	-28 ± 3	101	89	93	13	3	4	0,2	0,01
TERB	80 ± 6	-7 ± 0	98	88	99	4	3	1	0,1	0,01
WAR	103 ± 9	-29 ± 3	111	88	106	5	4	7	0,2	0,01
VAL	93 ± 6	-12 ± 1	99	100	97	10	7	2	0,5	0,5
DIA	104 ± 6	-26 ± 3	100	93	96	14	2	1	0,5	0,01
LOR	51 ± 8	42 ± 12	99	89	99	6	3	5	0,5	0,01
ATOR	59 ± 6	-17 ± 1	98	89	102	6	4	5	0,2	0,01

*γ/ng L⁻¹; GK, granica kvantifikacije; Q, Quantum; X, XEVO TQ-XS; NO, nije određeno

Kod izlaganja modelnih riba višim koncentracijama ($10 \mu\text{g L}^{-1}$), za analizu uzoraka vode primjenjivan je modificirani postupak obrade (poglavlje 3.2.1. *Priprema uzoraka vode za instrumentnu analizu*) temeljen na nižem stupnju obogaćenja, a rezultati postupka validacije prikazani su u tablici 17. Kako je pokus izlaganja proveden smjesom 20 odabranih farmaceutskih spojeva, puna validacija, uključujući određivanje analitičkog povrata, utjecaja matrice, točnosti i preciznosti metode, napravljena je za te spojeve i za dodatnih šest metabolita, dok su za preostale istraživane metabolite, čije su referentne tvari nabavljene naknadno, određene samo granice kvantifikacije.

Tablica 17. Validacijski parametri metode prilagođene za analizu akvarijske vode ($V = 5 \text{ mL}$, $n = 4$) u modelnim izlaganjima riba. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Analitički povrat / %	Utjecaj matrice / %	Točnost* / %	Preciznost* / %	GK _Q / ng L ⁻¹
COD	93 ± 8	21 ± 3	107	2	4
norCOD	NO	NO	NO	NO	6
MOR	88 ± 12	18 ± 3	106	3	10
TRAM	63 ± 7	35 ± 3	108	3	1
O-DM-TRAM	70 ± 8	37 ± 4	128	3	0,4
N-DM-TRAM	66 ± 8	37 ± 4	113	2	0,2
EDDP	12 ± 6	32 ± 2	100	7	0,2
EMDP	NO	NO	NO	NO	0,2
BE	87 ± 8	31 ± 3	106	3	0,2
NOR	56 ± 7	-49 ± 5	90	3	20
SMX	103 ± 9	17 ± 3	106	7	1,6
N-Ac-SMX	96 ± 12	26 ± 4	108	14	4
AZI	71 ± 7	24 ± 2	109	4	10
DC-AZI	72 ± 10	27 ± 3	114	2	10
N'-DM-AZI	85 ± 8	26 ± 2	136	6	16
CLA	65 ± 6	33 ± 2	105	4	1
DC-CLA	NO	NO	NO	NO	1
DM-CLA	NO	NO	NO	NO	50
ZOLP	79 ± 8	34 ± 3	104	3	0,2
ZOLP-COOH	NO	NO	NO	NO	0,4
SER	60 ± 7	28 ± 3	104	2	0,4
DIA	76 ± 7	29 ± 3	104	3	0,4
OXA	108 ± 11	18 ± 3	108	5	4
TEM	NO	NO	NO	NO	1,6
DLOR	70 ± 8	18 ± 2	82	6	2
CARB	83 ± 7	30 ± 2	102	3	1
CAFF	95 ± 9	26 ± 4	104	4	1,6
RAM	92 ± 9	27 ± 3	106	4	1,6
VER	64 ± 7	34 ± 3	105	2	0,4
VER D617	NO	NO	NO	NO	1,6
norVER	NO	NO	NO	NO	0,2
WAR	76 ± 7	28 ± 3	106	3	1
VAL	82 ± 11	22 ± 3	93	2	10
ATOR	18 ± 3	29 ± 4	102	1	0,2

* $\gamma = 50 \text{ ng L}^{-1}$; GK, granica kvantifikacije; NO, nije određeno

Modificirana metoda rezultirala je vrlo zadovoljavajućom točnošću (82 – 136 %) i preciznošću (2 – 14 %) svih validiranih analita te dobrim granicama kvantifikacije koje su bile prikladne za analize medija iz pokusa izlaganja. Osim toga, važno je uočiti da su pokusi provedeni s 5 mL uzorka (faktor koncentriranja 10) rezultirali prosječnim analitičkim povratom morfina i kodeina od 88 % odnosno 93 %, što je izrazito više analitičkih povrata tih spojeva iz uzoraka volumena 500 mL (Tablica 16). Ovaj rezultat sugerira da su niski analitički povrati najpolarnijih analita morfina i kodeina iz uzoraka većeg volumena posljedica nedovoljnog zadržavanja na sorbensu, a ne nepotpune desorpcije sa sorbensa.

4.2.2. Validacija metode za analizu farmaceutskih spojeva u ribljem tkivu

Razvoj metode proveden je na homogeniziranom mišićnom tkivu, dok je njena validacija provedena na tri odabrana tipa uzoraka ribljeg tkiva, uključujući homogenate ribljeg mišića, jetre i cijele ribe. Validacijski postupak koji je detaljno opisan u poglavlju 3.3. *Validacija analitičkih metoda* uključio je iste parametre kao i za uzorke vode. Točnost i ponovljivost metode ispitane su za tri odabrana koncentracijska nivoa ($10 \mu\text{g kg}^{-1}$, $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ i $250 \mu\text{g kg}^{-1}$), a rezultati su prikazani u tablicama 18 i 19.

Analitički povrati određeni tijekom validacijskog postupka bili su usporedivi s onima prikazanim i raspravljenim u postupku razvoja metode (poglavlje 4.1.4. *Razvoj postupka pročišćavanja ekstrakata ribljeg tkiva*) pri čemu je većina analita (31 od 44) imala povrate više od 80 %, dok su povrati kotinina (22 %) i morfina (7 %) bili niski primarno zbog slabog zadržavanja na sorbensu tijekom pročišćavanja ekstrakata što je već raspravljeno ranije. Utjecaji matrice uzoraka ribljeg mišića (–32 – 12 %), jetre (–35 – –11 %) i homogenata cijelog tijela ribe (–41 – 14 %) bili su na relativno sličnoj razini za sva tri tkiva, premda se homogenat cijele ribe izdvojio kao vrsta tkiva s nešto višom razinom supresije za neke od analita (npr. MDMA, *N*-acetil sulfametoksazol i oksazepam). Ipak, validacijski postupak je potvrdio primjenjivost postupka pročišćavanja razvijenog na ribljem mišiću za pouzdanu analizu kompleksnijih tipova ribljih matrica, kao što su jetra i cijela riba.

Tablica 18. Validacijski parametri (analitički povrat i utjecaj matrice) metode određivanja farmaceutskih spojeva u tri riblje matrice (klen, $m = 1,0$ g, $n = 4$): mišić, jetra i homogenat cijelog tijela. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Mišić		Jetra		Cijelo tijelo
	Analitički povrat / %	Utjecaj matrice / %	Utjecaj matrice / %	Utjecaj matrice / %	Utjecaj matrice / %
COT	22 ± 2	-8 ± 0	-22 ± 2	-24 ± 1	
MOR	7 ± 1	-24 ± 2	-28 ± 3	-21 ± 1	
DC-AZI	48 ± 11	-4 ± 1	-27 ± 2	-32 ± 2	
COD	65 ± 8	-21 ± 2	-25 ± 3	-27 ± 2	
O-DM-TRAM	47 ± 5	-16 ± 1	-23 ± 2	-28 ± 2	
LIS	70 ± 8	1 ± 0	-22 ± 3	-25 ± 3	
AMOX	51 ± 7	4 ± 0	-17 ± 1	-10 ± 1	
MDMA	67 ± 11	-23 ± 2	-23 ± 2	-33 ± 3	
SPY	102 ± 14	12 ± 1	-27 ± 2	-20 ± 2	
TRAM	90 ± 15	-11 ± 0	-20 ± 3	-25 ± 2	
BE	105 ± 14	3 ± 0	-14 ± 1	-21 ± 1	
N-DM-TRAM	83 ± 12	-10 ± 1	-20 ± 1	-27 ± 2	
NOR	77 ± 25	8 ± 4	-17 ± 4	NO	
CIP	103 ± 37	10 ± 3	-16 ± 4	NO	
SMX	111 ± 18	-4 ± 0	-16 ± 2	-26 ± 3	
COC	82 ± 10	-8 ± 1	-20 ± 2	-28 ± 2	
N'-DM-AZI	88 ± 27	10 ± 1	-20 ± 2	-33 ± 4	
AZI	93 ± 17	-1 ± 0	-27 ± 1	-22 ± 2	
N-DM-AZI	93 ± 14	0 ± 0	-22 ± 2	-22 ± 2	
CAFF	98 ± 12	-5 ± 1	-23 ± 2	-35 ± 4	
DLOR	98 ± 13	3 ± 0	-22 ± 4	-20 ± 1	
N-Ac-SMX	115 ± 27	5 ± 1	-12 ± 1	-34 ± 1	
ZOLP	92 ± 14	-9 ± 1	-21 ± 2	-29 ± 3	
OXCARB	97 ± 22	-15 ± 2	-11 ± 1	-25 ± 2	
TOR	87 ± 11	-14 ± 1	-25 ± 2	-26 ± 2	
ESC	93 ± 13	-14 ± 1	-21 ± 2	-27 ± 2	
QUE	114 ± 24	10 ± 2	-20 ± 2	-7 ± 1	
EDDP	71 ± 6	-5 ± 0	-18 ± 2	-26 ± 2	
CARB	108 ± 16	-16 ± 1	-20 ± 2	-20 ± 2	
ERY	23 ± 4	-13 ± 6	-35 ± 3	14 ± 1	
RAM	94 ± 15	-13 ± 1	-22 ± 2	-26 ± 3	
VER	91 ± 12	-9 ± 0	-21 ± 2	-24 ± 2	
AML	85 ± 12	-20 ± 2	-26 ± 1	-36 ± 3	
ERY-H2O	113 ± 16	-11 ± 1	-33 ± 3	-34 ± 3	
OXA	89 ± 9	-8 ± 1	-22 ± 1	-32 ± 2	
MTHD	90 ± 11	-14 ± 1	-20 ± 2	-24 ± 2	
CLA	89 ± 10	-12 ± 1	-23 ± 2	-26 ± 1	
SER	65 ± 10	-32 ± 2	-27 ± 3	-32 ± 2	
TERB	68 ± 6	-20 ± 1	-21 ± 2	-41 ± 5	
WAR	97 ± 11	-4 ± 0	-22 ± 2	-21 ± 3	
VAL	89 ± 11	-11 ± 2	-27 ± 5	-29 ± 2	
DIA	92 ± 13	3 ± 0	-21 ± 1	-14 ± 1	
LOR	87 ± 18	-19 ± 2	-28 ± 1	-22 ± 2	
ATOR	84 ± 9	-12 ± 0	-29 ± 2	-22 ± 2	

NO, nije određeno

Točnost određivanja većine analita, neovisno o vrsti tkiva i koncentracijskoj razini, bila je vrlo dobra i u globalu se kretala između 80 % i 120 %, dok su odstupanja od ovog raspona bila nepravilna te se ne mogu sustavno povezati s određenim analitom, koncentracijskom razinom i tipom uzorka. Vrlo dobra točnost za kotinin (85 – 129 %) i morfin (97 – 110 %) postignuta je primjenom njihovih izotopno označenih strukturnih analoga kao unutarnjih standarda u postupku kvantifikacije, što je omogućilo kompenzaciju značajnih gubitaka tijekom pročišćavanja. Time se dodatno potvrđuje ključna važnost uporabe izotopno označenih surogata u LC-MS analizama, osobito za korekciju utjecaja matrice i gubitka tijekom pripreme uzoraka. Ponovljivost određivanja koncentracije u globalu je bila vrlo dobra, uglavnom niža od 15 %, dok je nešto lošija preciznost određivanja (> 20 %) postignuta za kotinin, dekladinozil azitromicin, *N*-demetil azitromicin, okskarbazepin i eritromicin u uzorcima mišića na nižim koncentracijskim razinama (10 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i/ili 50 $\mu\text{g kg}^{-1}$).

Granice kvantifikacije metode uporabom instrumenta TSQ Quantum bile su između 0,1 $\mu\text{g kg}^{-1}$ i 5 $\mu\text{g kg}^{-1}$, osim za norfloksacin (6,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$), kotinin (9,2 $\mu\text{g kg}^{-1}$) i morfin (26,7 $\mu\text{g kg}^{-1}$), dok su za instrument XEVO TQ-XS bile nekoliko redova veličine niže i uglavnom su se kretale u rasponu od 0,005 $\mu\text{g kg}^{-1}$ do 0,05 $\mu\text{g kg}^{-1}$, uz nešto slabiju osjetljivost za morfin, dekladinozil azitromicin, lizinopril i amoksisicilin (0,5 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (Tablica 19). Na temelju ovih rezultata, sve daljnje analize uzoraka ribljeg tkiva napravljene su instrumentom XEVO TQ-XS pri čemu su, za sve tipove ribljih matrica, primjenjivane granice kvantifikacije određene za riblju jetru kao jedno od najkompleksnijih ribljih tkiva.

Puna validacija provedena je i za homogenat cijelog tijela zebrica za 20 odabranih FAS-ova i njihovih 5 metabolita, a rezultati su prikazani u tablici VII u poglavlju 8. *Dodatak*. Za osam metabolita koji su naknadno nabavljeni, određene su samo granice kvantifikacije. Analitički povrati i utjecaji matrice usporedivi su s onima dobivenim za cijelo tijelo klana (Tablica 18), s visokom točnošću određivanja (87 – 117 %) i preciznošću (3 – 21 %) za većinu spojeva. Granice kvantifikacije bile su u rasponu 0,005 – 3 $\mu\text{g kg}^{-1}$.

Tablica 19. Validacijski parametri (točnost i preciznost) metode određivanja farmaceutskih spojeva u tri riblje matrice (klen, $m = 1,0$ g, $n = 4$): mišić, jetra i homogenat cijelog tijela. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Mišić						GK _Q / µg kg ⁻¹	Jetra						GK _X / µg kg ⁻¹	Homogenat cijelog tijela					
	Točnost / %			Preciznost / %				Točnost / %			Preciznost / %				Točnost / %			Preciznost / %		
	10*	50*	250*	10*	50*	250*		10*	50*	250*	10*	50*	250*		10*	50*	250*	10*	50*	250*
COT	85	129	99	23	8	10	9,2	104	105	107	4	2	4	0,05	109	106	105	7	8	5
MOR	104	103	100	16	11	9	26,7	99	99	100	8	12	4	0,5	104	97	110	16	3	11
DC-AZI	113	108	100	23	17	12	1,0	124	133	108	14	6	5	0,5	97	94	70	6	15	7
COD	89	129	103	11	17	7	1,0	99	101	98	10	4	4	0,05	95	98	99	6	5	7
O-DM-TRAM	100	95	83	8	7	9	0,5	104	99	98	3	5	4	0,01	94	82	68	8	9	9
LIS	94	103	96	10	11	14	1,0	108	106	77	10	5	6	0,5	110	80	59	6	13	8
AMOX	89	121	82	8	12	13	1,0	88	103	114	12	9	5	0,5	110	94	94	4	9	8
MDMA	94	114	91	9	11	9	0,5	97	97	98	5	4	1	0,01	94	99	105	2	7	7
SPY	82	106	92	15	4	14	2,0	93	107	88	11	7	8	0,02	84	98	97	18	5	7
TRAM	102	102	91	5	11	8	0,5	101	103	105	5	4	5	0,01	107	101	107	3	6	6
BE	100	112	96	10	9	6	0,5	99	102	94	6	5	3	0,005	100	100	101	3	10	7
N-DM-TRAM	105	100	88	11	13	12	2,0	97	98	98	7	6	4	0,005	87	94	93	6	8	4
NOR	121	131	99	11	4	4	6,5	NO	103	96	NO	11	2	0,2	NO	NO	NO	NO	NO	NO
CIP	98	105	96	17	3	10	1,0	NO	105	100	NO	4	6	0,2	NO	NO	NO	NO	NO	NO
SMX	85	117	91	15	22	10	1,0	86	116	97	14	10	3	0,02	105	103	98	13	8	10
COC	85	109	91	9	8	9	0,5	98	102	94	2	4	3	0,01	93	98	98	5	7	5
N'-DM-AZI	107	102	90	26	14	15	2,0	105	114	93	5	4	6	0,2	98	114	104	5	8	7
AZI	101	105	87	13	5	12	1,0	100	117	97	5	3	2	0,1	97	102	103	10	7	8
N-DM-AZI	103	105	89	18	15	13	1,0	94	100	83	14	4	5	0,2	94	95	96	6	8	8
CAFF	105	121	86	12	7	9	0,5	94	108	110	14	3	8	0,1	100	110	102	29	10	6
DLOR	102	114	92	18	7	9	0,1	95	98	96	5	3	2	0,1	100	97	99	8	9	10
N-Ac-SMX	100	125	92	13	13	32	2,0	106	102	105	16	30	7	0,02	124	98	96	10	16	2
ZOLP	97	114	96	10	7	6	0,1	96	100	96	6	5	2	0,005	96	101	105	4	7	8
OXCARB	89	106	95	26	22	15	1,0	98	104	99	13	8	9	0,01	83	91	83	16	11	6
TOR	90	108	92	11	5	10	0,5	96	98	92	2	9	2	0,01	93	101	95	1	6	11
ESC	98	108	93	12	6	9	0,5	105	119	101	4	8	3	0,005	98	101	94	5	5	9
QUE	99	115	95	10	6	5	0,5	104	104	93	7	5	1	0,01	82	100	93	4	8	5
EDDP	89	113	93	6	7	5	0,1	94	94	90	3	3	2	0,005	88	91	92	4	8	7
CARB	94	115	95	9	13	15	0,5	103	104	90	9	6	4	0,01	102	107	105	3	8	6
ERY	67	116	81	32	8	16	4,3	96	110	113	11	17	13	0,1	88	106	110	18	14	3

Tablica 19. nastavak

FAS	Mišić						GK _Q / μg kg ⁻¹	Jetra						GK _X / μg kg ⁻¹	Homogenat cijelog tijela					
	Točnost / %			Preciznost / %				Točnost / %			Preciznost / %				Točnost / %			Preciznost / %		
	10*	50*	250*	10*	50*	250*		10*	50*	250*	10*	50*	250*		10*	50*	250*	10*	50*	250*
RAM	90	114	96	6	10	8	0,5	97	104	89	5	7	2	0,05	95	103	93	6	6	8
VER	95	116	96	12	6	7	0,1	104	106	96	7	2	1	0,01	105	110	92	1	9	7
AML	83	117	96	16	11	10	2,4	93	110	91	4	5	6	0,2	103	110	96	2	14	11
ERY-H2O	106	116	112	8	7	8	0,5	110	137	141	3	3	4	0,02	115	126	106	5	8	6
OXA	98	114	99	17	12	9	0,5	94	103	94	4	6	4	0,01	102	101	92	10	12	8
MTHD	95	113	94	10	8	8	0,1	104	108	90	3	4	1	0,02	104	108	97	3	7	6
CLA	90	118	93	6	10	9	0,1	100	95	96	5	8	4	0,05	98	93	93	3	9	7
SER	100	105	98	10	6	14	0,5	99	99	102	10	6	7	0,02	99	100	99	5	6	11
TERB	101	115	100	8	9	8	0,1	86	78	80	12	9	5	0,005	86	87	93	10	5	6
WAR	98	107	99	8	14	11	0,5	87	91	86	4	5	3	0,005	86	90	91	3	9	10
VAL	103	111	98	13	9	13	0,5	100	106	100	8	4	2	0,2	100	101	88	19	5	10
DIA	95	111	97	8	10	7	1,0	107	103	101	5	7	3	0,01	101	100	96	4	9	5
LOR	92	112	101	11	14	8	0,5	107	101	94	9	5	3	0,02	94	97	92	4	7	5
ATOR	91	118	97	9	8	10	0,5	86	95	101	8	5	3	0,005	80	88	92	7	10	6

* ω/μg kg⁻¹; GK, granica kvantifikacije; Q, Quantum; X, XEVO TQ-XS; NO, nije određeno

4.3. Bioakumulacija i transformacija farmaceutskih spojeva u modelnim ribama

Primjenom razvijenih analitičkih metoda istražena je kinetika akumulacije i depuracije, metaboličke transformacije te bioakumulacijski potencijal odabranih farmaceutskih spojeva u laboratorijskim pokusima s modelnim ciprinidnim organizmom *Danio rerio*. Provedeni modelni pokusi uključivali su istraživanje kinetike akumulacije i depuracije modelne smjese odabranih farmaceutskih spojeva te kronično izlaganje (28 dana) riba modelnoj smjesi farmaceutskih spojeva i razrijeđenoj pročišćenoj otpadnoj vodi. Detalji provedbe pokusa opisani su u Eksperimentalnom dijelu disertacije (poglavlje 3.5. *Modelni pokus izlaganja zebrića farmaceutskim spojevima*). Istraživanje je provedeno za kodein, tramadol, benzoilekgonin, norfloksacin, sulfametoksazol, azitromicin, kofein, desloratadin, zolpidem, EDDP, karbamazepin, ramipril, verapamil, oksazepam, klaritromicin, sertralin, varfarin, valsartan, diazepam, atorvastatin i njihove metabolite (Tablica 1).

4.3.1. Kinetika akumulacije i depuracije odabranih farmaceutskih spojeva

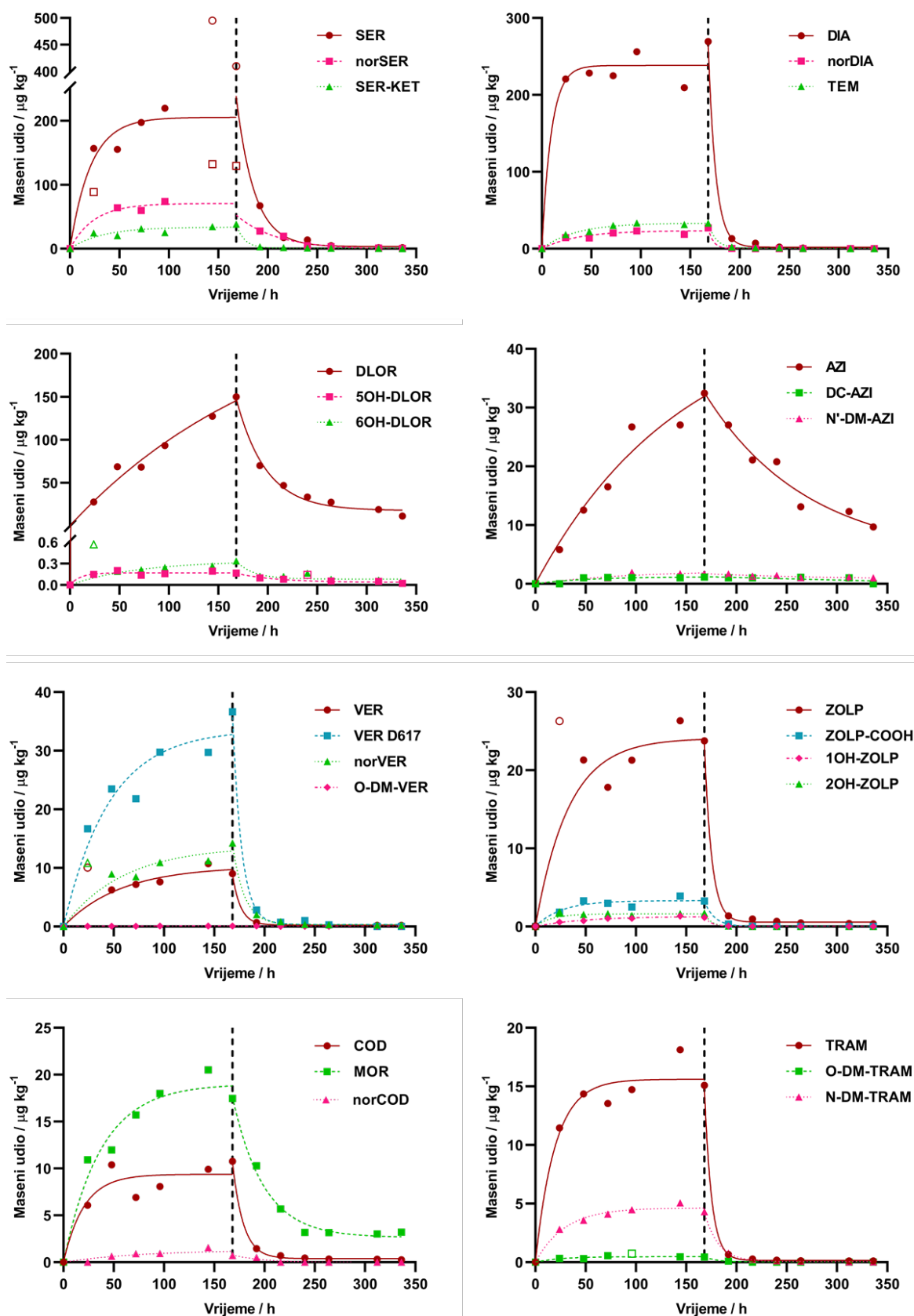
Istraživanje kinetike akumulacije i depuracije uključivalo je sedmodnevno izlaganje riba zebrića modelnoj smjesi 20 farmaceutskih spojeva te sedmodnevno razdoblje njihove depuracije u čistom mediju, a izmjerene koncentracije u mediju i zebrićama prikazane su tablicama VIII i IX u poglavlju 8. *Dodatak*.

Tijekom faze akumulacije, prosječne masene koncentracije većine ispitivanih FAS-ova u mediju izlaganja bile su bliske ciljanoj razini od $10 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tablica VIII u poglavlju 8. *Dodatak*). Iznimku je činilo nekoliko spojeva, kao što su sertralin ($4,3 \pm 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$), desloratadin ($5,6 \pm 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$), verapamil ($6,2 \pm 0,9 \mu\text{g L}^{-1}$) i zolpidem ($7,4 \pm 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$), čije su koncentracije bile značajno niže. Uočeni gubici mogli bi biti rezultat niza abiotičkih i biotičkih procesa, a poteškoće u postizanju i održavanju stabilnih koncentracija izlaganja zabilježene su i u drugim sličnim istraživanjima. Primjerice, Liu i suradnici¹⁵¹ utvrdili su da je koncentracija sertralina u mediju izlaganja bila za 60 % niža od nominalne vrijednosti ($4 \mu\text{g L}^{-1}$), što je u skladu s gubitkom sertralina u ovom istraživanju. Na temelju rezultata kontrolnog pokusa provedenog bez prisutnosti zebrića (poglavlje 3.5.1. *Istraživanje kinetike akumulacije i depuracije farmaceutskih spojeva u zebrićama*), samo se manji udio ukupnog

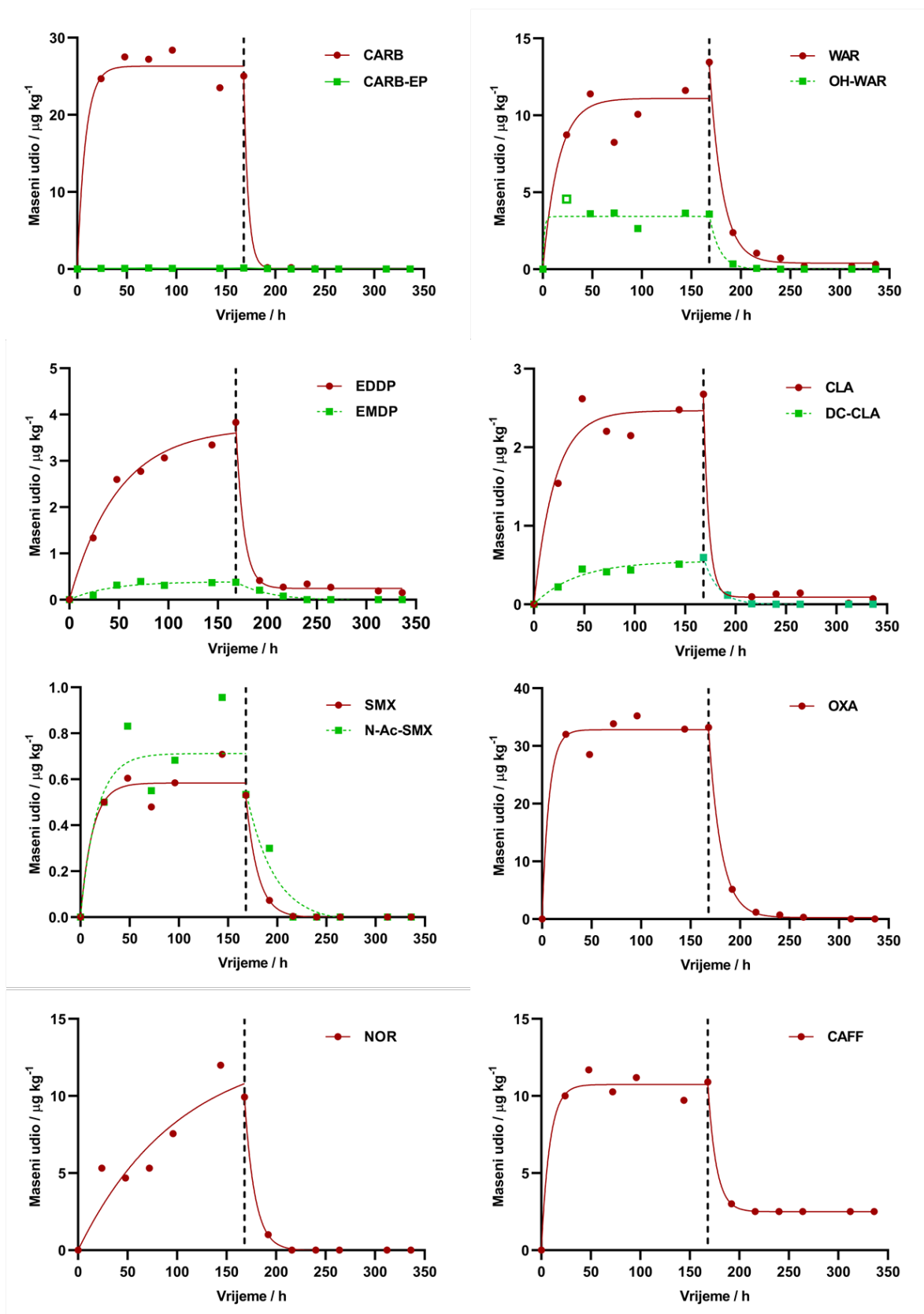
gubitka sertralina (13,4 %) mogao pripisati abiotičkim procesima, pri čemu je adsorpcija na stijenke akvarija činila tek 5,4 % (Tablica X u poglavlju 8. *Dodatak*). Međutim, koncentracije izlaganja većine analita mjerene prije i nakon svakodnevnog obnove vodenog medija pokazale su zadovoljavajuću stabilnost, s prosječnom varijabilnošću od oko 20 %, što je prihvatljivo u kontekstu ovog istraživanja¹⁴. Također, treba napomenuti da mediji kontrolnih spremnika, kao ni svježe pripremljeni mediji korišteni tijekom faze depuracije, nisu sadržavali mjerljive koncentracije niti jednog od 20 ispitivanih farmaceutskih spojeva.

Tijekom faze akumulacije, u izloženim ribama su zabilježene mjerljive koncentracije svih ispitivanih spojeva (Slika 15; Tablica VIII u poglavlju 8. *Dodatak*), dok njihove koncentracije nisu bile detektabilne u kontrolnim skupinama (podaci nisu prikazani). Ravnotežna koncentracija većine spojeva postignuta je u izloženim ribama unutar relativno kratkog razdoblja, najčešće za dva do tri dana, ili najkasnije do kraja sedmodnevnog razdoblja akumulacije. Iznimke su azitromicin i desloratadin koji nisu postigli ravnotežno stanje unutar 7 dana. Maksimalno postignute koncentracije varirale su u rasponu od 0,3 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za ramipril do 409,9 $\mu\text{g kg}^{-1}$ za sertralin (Slika 15; Tablica IX u poglavlju 8. *Dodatak*). Najviše koncentracije u zebicama ($> 150 \mu\text{g kg}^{-1}$) zabilježene su za diazepam, sertralin i desloratadin, a najniže ($< 5 \mu\text{g kg}^{-1}$) za sulfametoksazol, ramipril, atorvastatin, valsartan, klaritromicin, EDDP i benzoilekgonin.

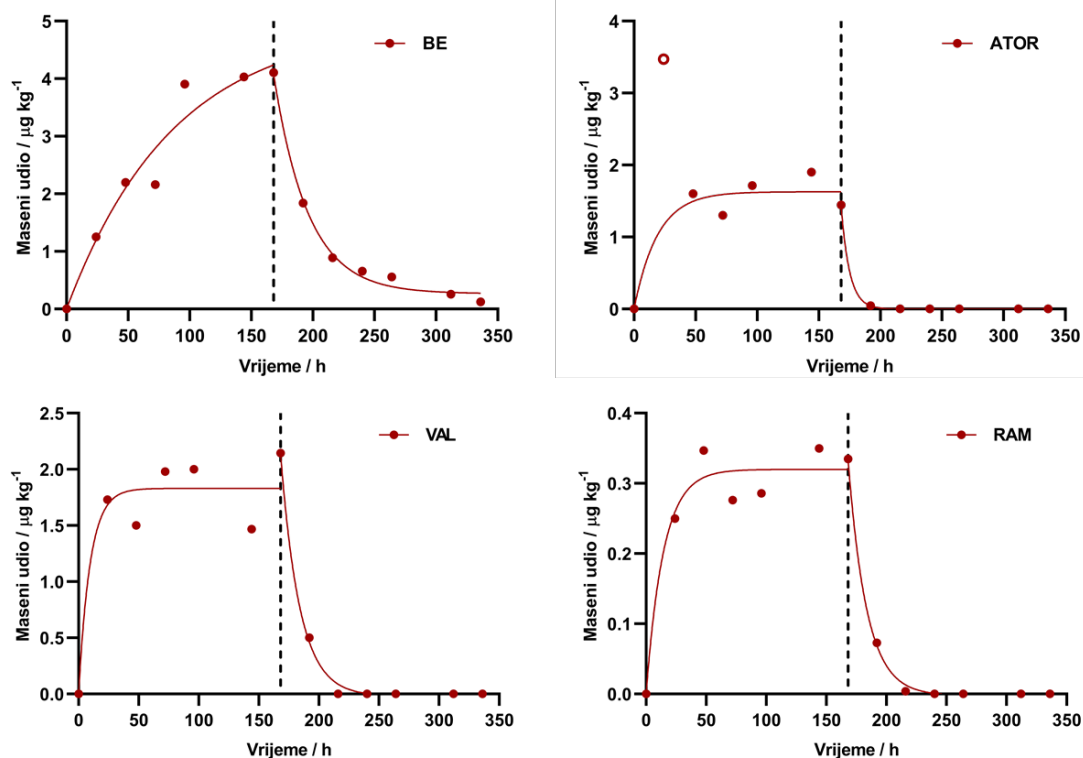
Proces depuracije bio je vrlo efikasan (Slika 15; Tablica IX u poglavlju 8. *Dodatak*) i karakteriziran naglim padom koncentracije većine istraživanih spojeva (iznimke azitromicin i desloratadin) već tijekom prva 24 h od prestanka izlaganja.



Slika 15. Kinetika akumulacije i depuracije ispitivanih farmaceutskih spojeva i njihovih identificiranih metabolita u organizmu *Danio rerio*. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.



Slika 15. (nastavak)



Slika 15. (nastavak)

Eksperimentalno određene koncentracije istraživanih FAS-ova iskorištene su za određivanje kinetičkih pokazatelja akumulacije i depuracije (Tablica 20) primjenom odabranih kinetičkih modela (poglavlje 3.6.1. *Određivanje kinetike akumulacije i depuracije ispitivanih farmaceutskih spojeva*), pri čemu je kinetika akumulacije zadovoljavajuće aproksimirana modelom jednofazne asocijacije ($r^2 \geq 0,850$) i Michaelis-Mentenovim modelom, a kinetika depuracije modelom jednofaznog raspada ($r^2 \geq 0,968$). Visoki stupanj usklađenosti eksperimentalno određenih podataka s modelom osigurao je pouzdano određivanje konstanti brzine depuracije (k_d) i akumulacije (k_a) istraživanih farmaceutskih spojeva (Tablica 20), koje su uglavnom upućivale na relativno brzu kinetiku akumulacije i depuracije.

Tijekom istraživanog sedmodnevnog razdoblja akumulacije, koncentracija većine spojeva u ribama približila se ili izjednačila ravnotežnoj koncentraciji (c_{ss}), aproksimiranoj s pomoću primijenjenog kinetičkog modela. Međutim, ukupno trajanje izlaganja (168 h) nije bilo dovoljno dugo za postizanje ravnotežne koncentracije svih spojeva, posebice za azitromicin i desloratadin. Minimalno trajanje izlaganja potrebno za postizanje ravnotežne koncentracije azitromicina procijenjeno je na 400 h, a za desloratadin na 600 h. Konstante brzine akumulacije

(k_a) varirale su unutar približno tri reda veličine, u rasponu od 0,002 L kg⁻¹ h⁻¹ do 3,752 L kg⁻¹ h⁻¹ (Tablica 20).

Tablica 20. Konstante brzine akumulacije (k_a) i depuracije (k_d , k_m i k_i) te poluvrijeme depuracije ($t_{1/2}$) istraživanih farmaceutskih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	k_a / L kg ⁻¹ h ⁻¹	r_a^2	k_d / h ⁻¹	r_d^2	$t_{1/2}$ / h	k_m / h ⁻¹	k_i / h ⁻¹
COD	0,093	0,853	0,093	0,999	7,5	0,065	0,029
TRAM	0,233	0,950	0,141	0,999	4,9	0,036	0,105
EDDP	0,053	0,981	0,126	0,998	5,5	0,013	0,117
BE	0,022	0,948	0,036	0,994	19,4	NO	NO
NOR	0,138	0,855	0,098	1,000	7,1	NO	NO
SMX	0,005	0,904	0,083	0,999	8,4	0,042	0,040
AZI	0,036	0,968	0,010	0,968	70,5	0,001	0,009
CLA	0,052	0,935	0,187	0,998	3,7	0,041	0,146
ZOLP	0,452	0,934	0,139	0,999	5,0	0,027	0,112
SER	3,706	0,952	0,078	0,999	8,9	0,027	0,051
DIA	3,752	0,953	0,131	0,999	5,3	0,025	0,106
OXA	0,299	0,973	0,079	0,999	8,8	NO	NO
DLOR	1,590	0,980	0,033	0,990	20,8	<0,001	0,033
CARB	0,790	0,973	0,217	1,000	3,2	0,001	0,216
CAFF	0,119	0,975	0,125	0,998	5,5	NO	NO
RAM	0,002	0,938	0,065	0,999	10,7	NO	NO
VER	0,205	0,957	0,124	0,999	5,6	0,109	0,016
WAR	0,075	0,870	0,076	0,998	9,2	0,017	0,058
VAL	0,019	0,879	0,092	0,999	7,5	NO	NO
ATOR	0,029	0,908	0,145	1,000	4,8	NO	NO

k_a , sumarna konstanta brzine depuracije (izlučivanje + metabolička transformacija); k_m , konstanta brzine metaboličke transformacije; k_i , konstanta brzine izlučivanja; **NO**, nije određeno

Najbrža kinetika akumulacije određena je za diazepam (3,752 L kg⁻¹ h⁻¹), sertralin (3,706 L kg⁻¹ h⁻¹) i desloratadin (1,590 L kg⁻¹ h⁻¹), dok je kinetika akumulacije spojeva karakteriziranih najnižim ravnotežnim koncentracijama (npr. sulfametoksazol i ramipril), bila oko 1000 puta sporija (SMX: 0,005 L kg⁻¹ h⁻¹; RAM: 0,002 L kg⁻¹ h⁻¹). Vrijednosti k_a određene za sertralin (3,706 L kg⁻¹ h⁻¹) i karbamazepin (0,790 L kg⁻¹ h⁻¹) bile su vrlo slične ranije objavljenim vrijednostima za odabrana tkiva zebrica¹⁴² i nilske tilapije (*O. niloticus*)¹⁵¹. Nasuprot tome, Wang i Gardinali¹²⁵ odredili su znatno niže k_a za kofein (0,0011 L kg⁻¹ h⁻¹) i karbamazepin (0,0085 L kg⁻¹ h⁻¹) u tkivu komarče (*G. holbrooki*). Međutim, valja naglasiti da je usporedivost dobivenih kinetičkih parametara s literaturno dostupnim podacima ograničena zbog razlika u eksperimentalnim uvjetima, uključujući izbor modelnog organizma i istraživanih spojeva te metodologiju obrade uzorka i prikaza rezultata (Tablica 6).

Konstante brzine depuracije (k_d) bile su u rasponu od 0,010 h⁻¹ za azitromicin do 0,217 h⁻¹ za karbamazepin, a poluvrijeme depuracije od 3,2 h do 70,5 h (Tablica 20). Većina spojeva,

osim azitromicina ($t_{1/2} = 70,5$ h) i desloratadina ($t_{1/2} = 20,8$ h), imala je poluvrijeme depuracije kraće od 10 h. Depuracija karbamazepina ($t_{1/2} = 3,2$ h) i sertralina ($t_{1/2} = 8,9$ h) određena u ovom istraživanju za cijelu zebriću bila je znatno brža od one prethodno određene za pojedinačna tkiva zebriće (CARB: $t_{1/2} = 11,5$ h; SER: $t_{1/2} = 29 - 39$ h)¹⁴² i nilske tilapije (CARB: $t_{1/2} = 9,9 - 26,9$ h; SER: $t_{1/2} = 6,9 - 13,9$ h)¹⁵¹, dok je kinetika depuracije kofeina ($t_{1/2} = 5,5$ h) bila slična kao kod tkiva nilske tilapije ($t_{1/2} = 4,08 - 4,95$ h)¹⁴⁸.

Potrebno je naglasiti da konstante brzine depuracije (k_d) predstavljaju sumarnu konstantu brzine svih depuracijskih procesa, uključujući izlučivanje putem kemijske difuzije, urina i fecesa, metaboličku biotransformaciju i razrjeđenje zbog rasta^{228,229}. Budući da je, u kontekstu ovog pokusa, razrjeđenje zbog rasta bilo zanemarivo, k_d vrijednosti prikazane u Tablici 20 predstavljaju zbroj konstante brzine izlučivanja (k_i) i konstante brzine metaboličke biotransformacije (k_m). Pri tome je, za spojeve koji se slabo metaboliziraju i za koje nijedan metabolit nije određen, k_d jednak k_i . Posljedično, za spojeve s kvantificiranim metabolitima izračunate su vrijednosti k_m i k_i (Tablica 20) primjenom jednadžbe 6 (poglavlje 3.6.2. *Određivanje kinetike metaboličke biotransformacije i izlučivanja*) prema radu Chena i suradnika¹⁴². Najviše vrijednosti k_m određene su za spojeve koji su bili karakterizirani visokom zastupljenošću metabolita u sumarnoj ravnotežnoj koncentraciji, kao što su npr. kodein ($0,065$ h⁻¹) i verapamil ($0,109$ h⁻¹), dok je najviša vrijednost k_i ($0,216$ h⁻¹) određena za karbamazepin.

4.3.2. Biokoncentracijski faktori i utjecaj biotransformacije

U istraživanju kinetike akumulacije i depuracije, vrijednosti BCF-a određene su na nekoliko načina, primjenom jednadžbi 7 – 9 (poglavlje 3.6.3. *Određivanje bioakumulacijskog potencijala*), a rezultati su prikazani u tablici 21. Pri tome su BCF_k određeni na temelju kinetičkih parametara, BCF_{ss} na temelju procijenjene ravnotežne koncentracije primjenom Michaelis-Mentenova modela, a BCF_{7d} na temelju koncentracija određenih u ribljem homogenatu nakon sedam dana izlaganja.

Tablica 21. Biokoncentracijski faktori (BCF) istraživanih farmaceutskih spojeva u zebrići određeni na temelju kinetičkog modela (BCF_k i $BCF_{k,uk}$), ravnotežne koncentracije aproksimirane na temelju Michaelis-Mentenovog modela (BCF_{ss}) te pretpostavljenog ravnotežnog stanja na kraju sedmodnevnog izlaganja (BCF_{7d}). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$BCF_k / L\ kg^{-1}$	$BCF_{ss} / L\ kg^{-1}$	$BCF_{7d} / L\ kg^{-1}$	$BCF_{k,uk} / L\ kg^{-1}$
COD	1,0	1,2	1,1	3,0
TRAM	1,7	1,8	1,8	2,2
EDDP	0,4	0,5	0,4	0,5
BE	0,6	0,9	0,5	NO
NOR	1,4	2,0	0,5	NO
SMX	0,1	0,1	0,1	0,1
AZI	3,6	5,9	2,3	3,6
CLA	0,3	0,3	0,3	0,4
ZOLP	3,3	3,7	3,4	3,8
SER	47,8	59,1	48,5	67,2
DIA	28,6	29,8	28,8	32,2
OXA	3,8	3,9	3,8	NO
DLOR	47,6	78,4	24,3	36,9
CARB	3,6	3,7	3,5	NO
CAFF	0,9	1,0	0,9	NO
RAM	0,03	0,04	0,04	NO
VER	1,7	2,1	1,6	9,6
WAR	1,0	1,1	1,1	1,3
VAL	0,2	0,2	0,2	NO
ATOR	0,2	0,2	0,2	NO

NO, nije određeno; $BCF_{k,uk}$, BCF prema kinetičkom modelu za ukupnu koncentraciju (roditeljski spoj + metaboliti)

Najniže BCF vrijednosti određene su za ramipril (0,03 – 0,04 L kg⁻¹), a najviše za diazepam (28,6 – 29,8 L kg⁻¹), sertralin (47,8 – 59,1 L kg⁻¹) i desloratadin (24,3 – 78,4 L kg⁻¹). Za spojeve koji su tijekom faze akumulacije postigli ravnotežnu koncentraciju u ribama, vrijednosti BCF_k , BCF_{ss} i BCF_{7d} bile su vrlo slične. Nasuprot tome, za spojeve čija ravnotežna koncentracija nije postignuta (npr. azitromicin i desloratadin), vrijednosti BCF_{7d} bile su znatno niže od vrijednosti BCF_k i BCF_{ss} , premda su i dalje bili unutar istog reda veličine. Nadalje, svi biokoncentracijski faktori određeni u ovom istraživanju bili su znatno niži od 2000 L kg⁻¹, te se, na temelju ovog istraživanja, nijedan od istraživanih spojeva ne razvrstava u bioakumulativne tvari^{119,120}. Za razliku od toga, prema istraživanju koje za objavili Grabicová i suradnici²², sertralin bi se, na temelju BAF vrijednosti određenih za jetru (880 – 2400 L kg⁻¹), bubreg (2800 – 4400 L kg⁻¹) i mozak divljih riba (680 – 1500 L kg⁻¹), mogao smatrati umjereno bioakumulativnim^{119,120}. Međutim, nijedna od studija provedenih u kontroliranim laboratorijskim uvjetima to ne potvrđuje. Štoviše, BCF vrijednosti određene za cijelu zebriću¹⁹¹ te odabrana tkiva zebrića¹⁴² i

nilske tilapije¹⁵¹ bile su vrlo sličnog reda veličine kao u ovom istraživanju. Odstupanje u BAF vrijednostima određenih u divljim ribama od onih određenih u laboratorijskim uvjetima upućuje na mogućnost podcjenjivanja stvarnog bioakumulacijskog potencijala pojedinih tvari u modelnim pokusima. S druge strane, koncentracije izmjerene u divljim ribama ne moraju uvijek odgovarati ravnotežnom stanju, a koncentracija izlaganja može značajno varirati, što može utjecati na pouzdanost određenih BAF-a.

Vrijednosti BCF_k , BCF_{ss} i BCF_{7d} (Tablica 21) te većina literaturno dostupnih BCF vrijednosti utemeljene su na određivanju koncentracija ciljanih roditeljskih spojeva u vodi i ribi, bez razmatranja potencijalnog utjecaja metaboličkih transformacija na izmjerenu koncentraciju roditeljskog spoja. Međutim, kako bi se dobio uvid u sveukupni bioakumulacijski potencijal istraživanih tvari, u ovom istraživanju su određene i vrijednosti $BCF_{k,uk}$ (Tablica 21) u čijem su izračunu, umjesto koncentracija roditeljskih spojeva, korištene sumarne koncentracije roditeljskih spojeva i njihovih glavnih metabolita (jednadžba 9 i 10, poglavlje 3.6.3. *Određivanje bioakumulacijskog potencijala*). Pri tome su, za približno trećinu istraživanih tvari (npr. kodein, tramadol, zolpidem, sertralin, diazepam, verapamil i varfarin), vrijednosti $BCF_{k,uk}$ bile više od njihovih BCF_k vrijednosti što upućuje na važnu ulogu metaboličke detoksikacije u procjeni sveukupnog bioakumulacijskog potencijala istraživanih tvari.

Budući da su podaci o metaboličkim transformacijama istraživanih farmaceutskih spojeva u ribama izrazito malobrojni, odabir metabolita određivanih u ovom istraživanju (Tablica 1) bio je utemeljen pretežno na podacima o ljudskom metabolizmu³⁹. Za ukupno 13 od 20 ispitivanih farmaceutskih spojeva potvrđeno je prisustvo barem jednog od odabranih metabolita te je, na temelju koncentracija određenih u mediju i ribama tijekom prva 24 sata izlaganja, napravljena masena bilanca (Tablica XI u poglavlju 8. *Dodatak*) izražena kao postotni udio sume masa roditeljskog spoja, njegovih metabolita i procijenjenog abiotičkog gubitka nakon 24 sata izlaganja u masi roditeljskog spoja određenoj u mediju na početku pokusa. Za gotovo sve spojeve, uključujući i one za koje nije identificiran niti jedan metabolit, tako određena masena bilanca bila je u rasponu između 85 % i 100 %. Iz toga proizlazi da je većina relevantnih metabolita bila identificirana i zadovoljavajuće kvantificirana.

Iznimka je bio sertralin, kod kojeg je uočen značajan gubitak, oko 70 %, što bi moglo upućivati da je stvarni abiotički gubitak u prisustvu zebrića bio značajno veći nego što je procijenjeno u kontrolnom pokusu bez zebrića. Naime, Calza i suradnici²³⁰ su pokazali da je

brzina fotolize sertralina izravno ovisna o koncentraciji otopljene organske tvari pri čemu je poluvrijeme razgradnje bilo izrazito duže u čistoj vodi ($t_{1/2} = 58$ h) nego u prisustvu organske tvari (2,5 mg L⁻¹, $t_{1/2} = 36$ h; 5 mg L⁻¹, $t_{1/2} = 22$ h; 10 mg L⁻¹, $t_{1/2} = 7$ h). Stoga, ne može se isključiti mogućnost da je 60 zebrića u 6 L medija tijekom 24 h proizvelo organsku tvar koja je ubrzala fotolizu sertralina, no, radi se o pretpostavci budući da organska tvar nije mjerena. Osim toga, potencijalno je moguć i gubitak sertralina zbog adsorpcije na riblji feces kao i njegova transformacija u neki neidentificirani metabolit. Međutim, na temelju literaturnih podataka o sorpcijskim svojstvima²³¹ i humanom metabolizmu ovog spoja³⁹, nijedna od ovih opcija ne čini se vrlo vjerojatna.

Rezultati provedene masene bilance potvrdili su vjerodostojnost k_m vrijednosti (Tablica 20) i procjenu doprinosa metaboličkih transformacija sveukupnom bioakumulacijskom potencijalu iskazanom preko $BCF_{k,uk}$ (Tablica 21). Za usporedbu, doprinos metabolizma procijenjen je i primjenom modela kvantitativnog odnosa strukture i reaktivnosti EPI Suite BCFWIN²³², a postignuti rezultati su prikazani u tablici XII u poglavlju 8. *Dodatak*. Međutim, taj je pristup rezultirao izrazito nerealnim procjenama udjela metaboličke transformacije (značajno većima od 100 %) u sveukupnoj depuraciji istraživanih spojeva za čak 60 % istraživanih spojeva, a sličan rezultat primjenom modela EPI Suite BCFWIN dobili su i Chen i sur¹⁴². Ovi rezultati sugeriraju ograničenu primjenjivost ovog modela na ionske organske spojeve u koje pripada većina farmaceutskih spojeva zbog čega su k_m vrijednosti određene njegovom primjenom često nepouzdanе. S druge strane, k_m vrijednosti određene na temelju određivanja koncentracija roditeljskih spojeva i njihovih metabolita u ovom istraživanju bile su u dobroj suglasnosti s ostalim kinetičkim pokazateljima, što predstavlja značajno unaprjeđenje u odnosu na ostala slična istraživanja koja su uglavnom fokusirana isključivo na roditeljske spojeve.

Rezultati prikazani u tablicama 20 i 21 potvrdili su da je metabolička transformacija bila bitan čimbenik koji utječe na ukupni biokoncentracijski potencijal čak i za izrazito nisko bioakumulativne tvari poput kodeina, sulfametoksazola i tramadola. Nadalje, važno je istaknuti da su se uočeni metabolički obrasci za neke spojeve razlikovali od ljudskih³⁹. Primjerice, glavni metabolit kodeina bio je morfin čija je ravnotežna koncentracija bila dvostruko viša od koncentracije roditeljskog spoja (Slika 15; Tablica VIII u poglavlju 8. *Dodatak*), a njegov doprinos vrijednosti $BCF_{k,uk}$ iznosio je 65 % (Tablica 22). Nasuprot tome, doprinos norkodeina bio je šesnaest puta niži od doprinosa morfina, što upućuje da je kod riba *O*-demetilacija dominantan mehanizam transformacije kodeina, što nije u skladu s podacima o ljudskom

metabolizmu. To je posebno značajno s obzirom da je morfin deset puta potentniji opioid od kodeina.

Tablica 22. Biokoncentracijski faktori i poluvremena depuracije ($t_{1/2}$) ispitivanih farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u zebricama te procjena doprinosa roditeljskih spojeva i njihovih metabolita sumarnom biokoncentracijskom faktoru ($BCF_{k,uk}$). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$BCF_k / L\ kg^{-1}$	Doprinos spoja $BCF_{k,uk}$ (%)	$t_{1/2} / h$
COD	1,00	30,7	7,5
norCOD	0,13	4,1	16,6
MOR	2,13	65,3	21,4
TRAM	1,65	74,3	4,9
O-DM-TRAM	0,05	2,4	10,5
N-DM-TRAM	0,52	23,3	9,5
EDDP	0,42	90,1	5,5
EMDP	0,05	9,9	23,3
SMX	0,06	48,9	8,4
N-Ac-SMX	0,07	51,1	15,8
AZI	3,63	92,5	70,5
DC-AZI	0,11	2,9	106,0
N'-DM-AZI	0,18	4,6	86,2
CLA	0,27	77,9	3,7
DC-CLA	0,08	22,1	10,1
ZOLP	3,26	80,7	5,0
ZOLP-COOH	0,41	10,1	7,0
2OH-ZOLP	0,21	5,1	4,7
1OH-ZOLP	0,16	4,1	5,4
SER	47,80	65,3	8,9
norSER	17,22	23,5	11,2
SER-KET	8,23	11,2	5,8
DIA	28,64	80,9	5,3
norDIA	2,97	8,4	3,6
TEM	3,80	10,7	5,5
DLOR	47,64	99,8	20,8
6OH-DLOR	0,06	0,1	14,0
5OH-DLOR	0,03	0,1	28,7
CARB	3,65	99,6	3,2
CARB-EP	0,01	0,4	15,1
VER	1,65	12,5	5,6
VER D617	9,30	70,2	6,4
O-DM-VER	0,01	0,1	29,5
norVER	2,27	17,2	8,2
WAR	0,99	77,3	9,2
OH-WAR	0,29	22,7	7,0

Slično odstupanje od ljudskog metabolizma vidljivo je i kod metabolizma tramadola gdje je *N*-demetil tramadol bio višestruko zastupljeniji metabolit tramadola od *O*-demetil tramadola. Zanimljivi metabolički putevi zabilježeni su i za diazepam i verapamil. Glavni mehanizmi transformacije diazepama uključivali su hidroksilaciju i *N*-demetilaciju što je rezultiralo

nastankom temazepama i nordiazepama, dok je glavni ljudski metabolit diazepama oksazepam-glukuronid³⁹. Transformacija verapamila uključivala je *O*- i *N*-demetilaciju pri čemu nastaju *O*-demetil verapamil i norverapamil te *N*-dealkilaciju koja je rezultirala nastankom verapamil metabolita D-617 čiji je doprinos vrijednosti $BCF_{k,uk}$ bio 70 %.

Nadalje, ako se usporede depuracijska poluvremena metabolita i roditeljskih spojeva prikazana u tablici 22, može se uočiti da se većina metabolita u organizmu riba zadržava dulje od roditeljskih spojeva. To nije zanemarivo budući da metaboliti lijekova često posjeduju značajnu farmakološku aktivnost koja u nekim slučajevima može biti i jača nego kod roditeljskih spojeva (npr. morfin u odnosu na kodein).

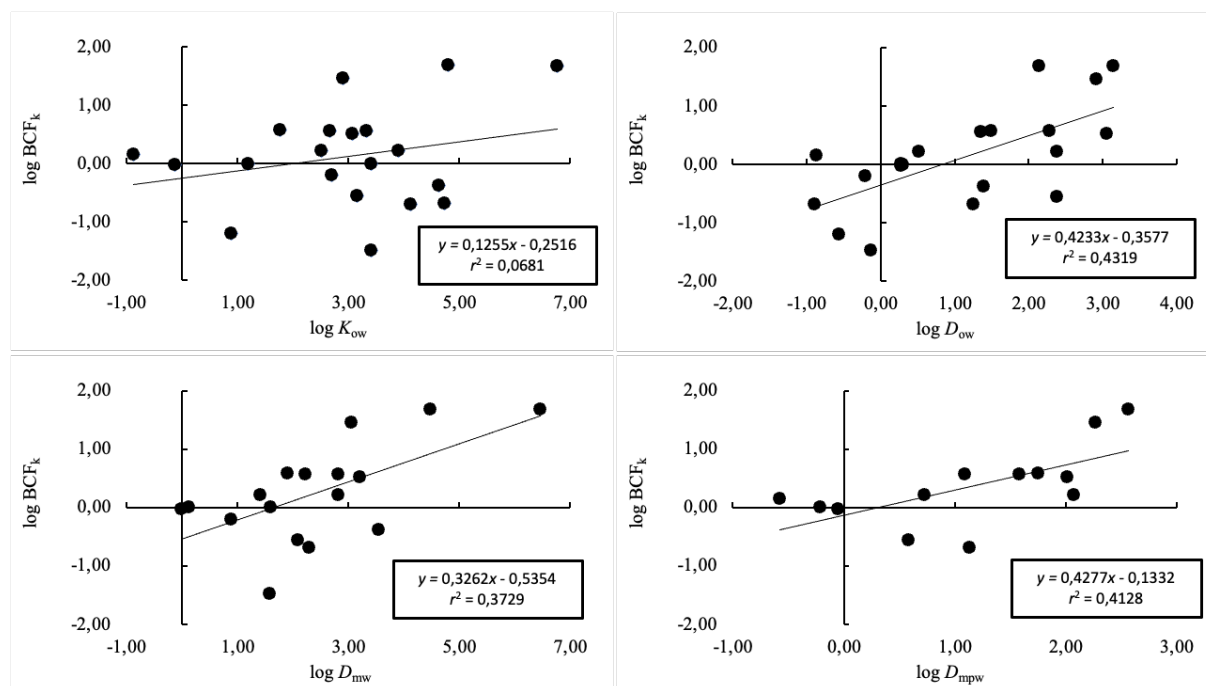
4.3.3. Utjecaj fizikalno-kemijskih parametara na biokoncentracijske faktore

Lipofilnost neutralnih organskih spojeva definira se pomoću koeficijenta raspodjele oktanol-voda (K_{ow}), dok su za ionske organske spojeve prikladniji koeficijenti raspodjele oktanol-voda ovisni o pH (D_{ow}) koji u obzir uzimaju zastupljenost ioniziranog i neioniziranog oblika. Nadalje, ionski spojevi se slabije vežu na masti, ali se mogu vezati na fosfolipide i proteine, zbog čega se njihova bioakumulativnost može opisati i s pomoću koeficijenta raspodjele membrana-voda (D_{mw}) i koeficijenta raspodjele mišićni proteini-voda (D_{mpw}).

U skladu s tim, u ovom je istraživanju učinjena korelacija eksperimentalno određenih vrijednosti BCF_k s logaritamskim vrijednostima K_{ow} , D_{ow} , D_{mw} i D_{mpw} prikazanim u tablici XIII u poglavlju 8. *Dodatak*, a rezultati te usporedbe prikazani su na slici 16.

Vrijednosti $\log BCF_k$ nisu bile u korelaciji s vrijednostima $\log K_{ow}$ što je potvrdilo da modeli utemeljeni na $\log K_{ow}$ vrijednostima²³³ nisu prikladni za procjenu bioakumulativnosti ionskih organskih tvari¹⁴². Nasuprot tome, korelacija vrijednosti $\log BCF_k$ s vrijednostima $\log D_{ow}$, $\log D_{mw}$ i $\log D_{mpw}$ pokazala je postojanje statistički značajne linearne ovisnosti ($p < 0,01$) (Slika 16), što je u skladu s istraživanjem koje su objavili Chen i suradnici¹⁴².

Iz ovih rezultata može se zaključiti da je bioakumulacijski potencijal ispitivanih farmaceutskih tvari, od kojih većina pripada ionskim organskim spojevima, definiran vrlo kompleksnim mehanizmima raspodjele između lipida, fosfolipida i proteina s jedne strane te vode s druge strane.



Slika 16. Korelacija kinetičkih biokoncentracijskih faktora (BCF_k) i fizikalno-kemijskih parametara.

4.3.4. Biokoncentracija farmaceutskih spojeva u zebrićama pri kroničnom izlaganju

Regulatorne smjernice za procjenu bioakumulativnosti kemijskih tvari naglašavaju da su za pouzdanu procjenu okolišnog rizika neophodni podaci dobiveni u uvjetima dugotrajne (kronične) izloženosti. Kinetički parametri akumulacije koji su raspravljani u prethodnim poglavljima pokazali su da se sedmodnevnim izlaganjem ne postiže uvijek ravnotežno stanje između vode i organizma zbog čega bi BCF vrijednosti određene u pokusima kratkotrajnog izlaganja mogle biti nepouzdana (npr. za azitromicin i desloratadin).

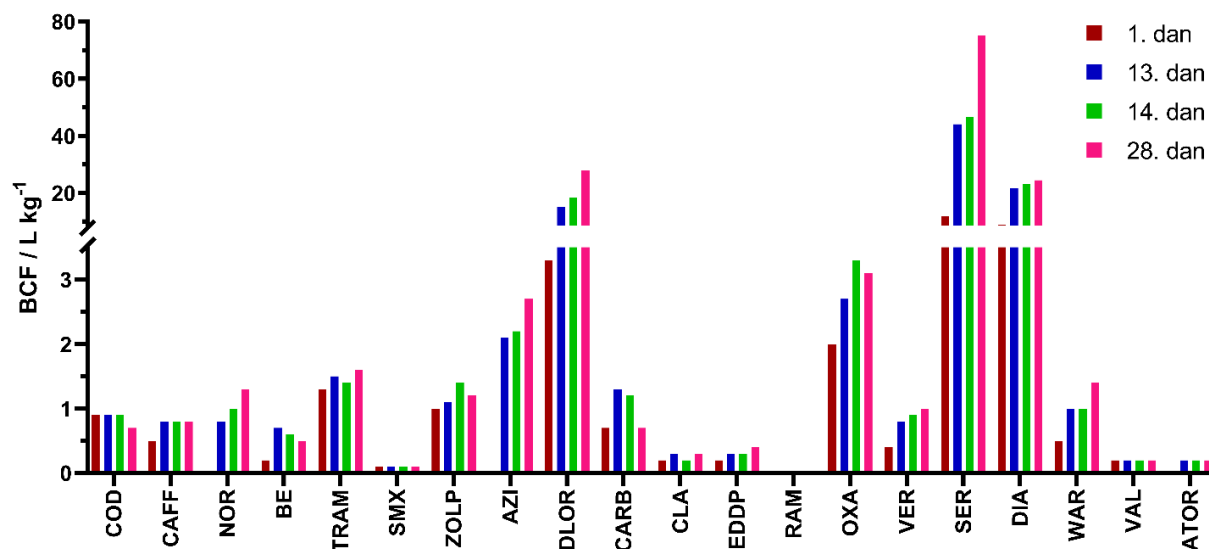
U skladu s tim, provedeno je istraživanje kronične izloženosti zebrića u trajanju od 28 dana s ciljem validacije pokazatelja utvrđenih tijekom kratkotrajnog izlaganja. Detalji provedbe pokusa opisani su u poglavlju 3.5.2. *Istraživanje kroničnog izlaganja zebrića farmaceutskim spojevima*, a izlaganje je provedeno kod sljedećih eksperimentalnih uvjeta: A) izlaganje modelnoj smjesi 20 farmaceutskih spojeva kod koncentracije od $1 \mu\text{g L}^{-1}$, B) izlaganje modelnoj smjesi 20 farmaceutskih spojeva kod koncentracije od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ uz dva kratkotrajna (24 h) izlaganja kod povišene koncentracije ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) na početku (1. dan) i na sredini pokusa (14. dan) i C) izlaganje razrijeđenom sekundarnom efluentu (SE). Primijenjeni eksperimentalni dizajn omogućuje procjenu robusnosti prethodno određenih pokazatelja bioakumulacije u

realnim okolišnim uvjetima (dugotrajna izloženost, nagle promjene koncentracija izloženosti i prisustvo složene okolišne matrice kao što je otpadna voda), što je preduvjet za pouzdanu procjenu bioakumulacijskog potencijala ispitivanih tvari.

Koncentracije istraživanih tvari određene u uvjetima kronične izloženosti prikazane su u tablicama XIV – XVI u poglavlju 8. *Dodatak*. Rezultati analiza uzoraka riba i vode iz kontrolnih akvarija nisu prikazani budući da nijedan uzorak nije sadržavao mjerljive koncentracije istraživanih tvari. Na temelju izmjerenih koncentracija izračunati su BCF-ovi prikazani u tablicama XVII – XIX u poglavlju 8. *Dodatak* te na slikama 17 – 19.

Rezultati prikazani na slici 17 (Tablica XVII u poglavlju 8. *Dodatak*) prikazuju BCF vrijednosti određene u pokusu kronične izloženosti modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih tvari pri stabilnoj koncentraciji tijekom cijelog razdoblja izlaganja (scenarij izlaganja A). Kod tih je uvjeta vremenska dinamika biokoncentracijskih faktora (Slika 17) određenih na početku (1. dan), u sredini (13. i 14. dan) te na kraju (28. dan) izlaganja vrlo dobro odražavala prethodno određene kinetičke pokazatelje. BCF vrijednosti većine najslabije akumulativnih tvari ($BCF < 1 \text{ L kg}^{-1}$) bile su međusobno vrlo slične na početku, sredinom i na kraju izlaganja. Nasuprot tome, BCF-ovi tvari čija se ravnotežna koncentracija u ribama postiže sporije (npr. desloratadin, azitromicin, sertralin i diazepam) bili su višestruko viši tijekom 13., 14. i 28. dana u odnosu na 1. dan izlaganja. Pri tome su razlike između BCF-ova određenih sredinom (13. i 14. dan) i na završetku izlaganja (28. dan) za dio tvari (npr. tramadol, oksazepam, azitromicin i diazepam) bile vrlo male, dok su kod drugih (npr. sertralin i desloratadin) bile značajne.

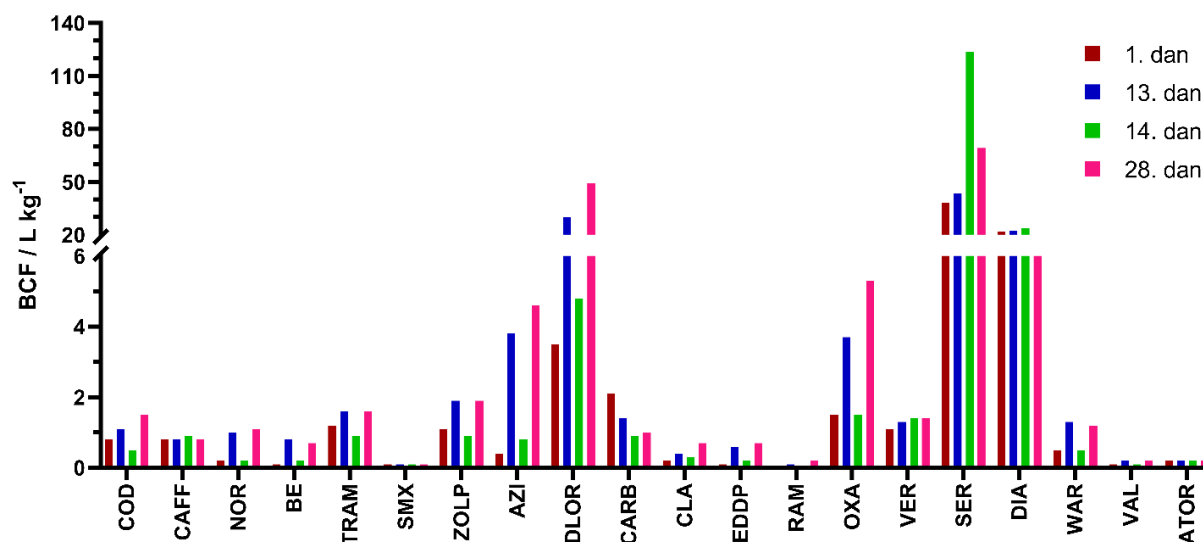
Međutim, većina BCF-ova određenih na kraju dugotrajnog izlaganja (BCF_{28d}) bili su u korelaciji s ranije određenim BCF_k ($y = 0,7636x + 1,9025$; $r^2 = 0,8098$; $p < 0,01$), a najveće razlike određene su za sertralin i desloratadin. Još bolja korelacija zabilježena je između vrijednosti $BCF_{k,uk}$ i $BCF_{28d,uk}$ koje su izračunate na temelju ukupnih koncentracija istraživanih tvari (roditeljski spoj + metaboliti) ($y = 0,9243x + 1,8699$; $r^2 = 0,9714$; $p < 0,01$), što dodatno potvrđuje važnost uloge metabolizma u razumijevanju bioakumulacijskog potencijala istraživanih tvari.



Slika 17. Biokoncentracijski faktori (BCF) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrića modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Budući da u vodenom okolišu, posebice u blizini ispusta farmaceutske industrije, koncentracije farmaceutskih spojeva mogu varirati unutar više redova veličine^{5,46}, potrebno je istražiti kako povremeni pulsni unosi visokih koncentracija FAS-ova utječu na njihovu bioakumulaciju u kronično izloženim ribama. Zbog toga je jedan od primijenjenih scenarija kroničnog izlaganja, uz dugotrajnu izloženost modelnoj smjesi tvari stabilne koncentracije ($1 \mu\text{g L}^{-1}$), uključio i dva kratkotrajna (24 h) izlaganja pri povišenoj koncentraciji ($100 \mu\text{g L}^{-1}$) na početku (1. dan) i na sredini (14. dan) izlaganja koje je trajalo ukupno 28 dana. Rezultati tog pokusa prikazani su u tablicama XV i XVIII u poglavlju 8. *Dodatak* te na slici 18.

Kao što se na temelju kinetičkih pokazatelja moglo očekivati, za određeni broj spojeva tijekom dvokratnog kratkotrajnog izlaganja povišenoj koncentraciji nije postignuta ravnotežna koncentracija u ribama. Zbog toga su BCF-ovi tih spojeva određeni u 1. i 14. danu izlaganja bili višestruko niži nego tijekom dugotrajnog izlaganja nižoj koncentraciji (13. i 28. dan), što je najizraženije bilo za azitromicin i desloratadin. Nadalje, nakon prvog izlaganja povišenoj koncentraciji, za sertralin je određen višestruko niži BCF ($\text{BCF}_{1\text{d}} = 38,1 \text{ L kg}^{-1}$) nego nakon drugog takvog događaja ($\text{BCF}_{14\text{d}} = 123,6 \text{ L kg}^{-1}$). Nasuprot tome, BCF vrijednosti diazepama nisu značajnije varirale tijekom kratkotrajnog izlaganja povišenim koncentracijama, što je u skladu s prethodno određenom brzom kinetikom akumulacije i depuracije (Tablica 20).

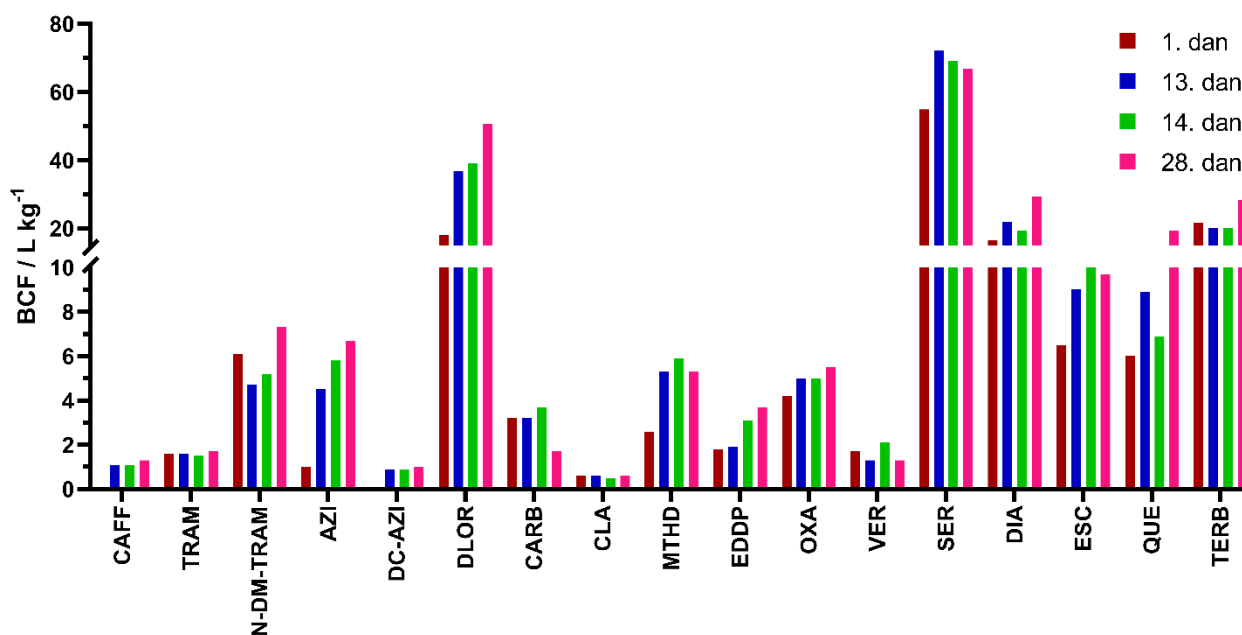


Slika 18. Biokoncentracijski faktori (BCF) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrića modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$, uz dva akutna izlaganja (24 h) nominalnoj koncentraciji $100 \mu\text{g L}^{-1}$, 1. i 14. dan izlaganja. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Unatoč uočenim razlikama između pojedinih spojeva, vrijednosti $\text{BCF}_{28\text{d}}$ određene u uvjetima stabilne (A: $1 \mu\text{g L}^{-1}$) i promjenjive (B: $1 \mu\text{g L}^{-1}/26$ dana + $2 \times 100 \mu\text{g L}^{-1}/1$ dan) koncentracije bile su međusobno vrlo slične ($y = 0,9879x + 0,9739$; $r^2 = 0,9215$; $p < 0,01$) što upućuje na razmjerno mali utjecaj povremenih kratkotrajnih izloženosti povišenim koncentracijama analita na bioakumulacijski potencijal istraživanih tvari u ribama. Međutim, značajno niže ili više vrijednosti BCF-ova određene za pojedine spojeve (npr. azitromicin, desloratadin i sertralin) neposredno nakon pulsni unosa povišenih koncentracija, upućuju na mogućnost precjenjivanja ili podcjenjivanja stvarnih BCF-ova u divljoj populaciji riba porijeklom iz vodenog okoliša izloženog izrazito promjenjivom unosu pojedinih tvari.

Za razliku od izlaganja modelnim smjesama FAS-ova pripremljenima u čistoj akvarijskoj vodi, divlja populacija riba izložena je znatno kompleksnijim matricama, kao što je otpadna voda, koje mogu utjecati na bioakumulativni potencijal istraživanih tvari. Zbog toga je posljednji istražen scenarij kroničnog izlaganja uključio izlaganje zebrića razrijeđenom sekundarnom efluentu. Premda je većina od 44 spoja uključena u razvijenu analitičku metodu imala mjerljive koncentracije u mediju izlaganja (Tablica XVI u poglavlju 8. *Dodatak*), BCF-ove je bilo moguće odrediti samo za 17 spojeva čije su koncentracije bile mjerljive u zebrićama (Slika 19; Tablica XIX u poglavlju 8. *Dodatak*). Od tih 17 spojeva, 11 ih je bilo

uključeno u sastav modelne smjese kojoj su zebrice izlagane u scenarijima A i B. Biokoncentracijski faktori određeni na kraju izlaganja (BCF_{28d}) kretali su se u rasponu od $1,3 \text{ L kg}^{-1}$ za kofein i verapamil do $66,7 \text{ L kg}^{-1}$ za sertralin (Slika 19; Tablica XIX u poglavlju 8. Dodatak).



Slika 19. Biokoncentracijski faktori (BCF) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrica razrijeđenoj pročišćenoj otpadnoj vodi. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Izračunate vrijednosti BCF_{28d} bile su vrlo slične onima koje su ranije određene za modelne smjese u akvarijskoj vodi (BCF_k) te postoji visoka korelacija među njima ($y = 0,8083x + 0,2993$; $r^2 = 0,9670$; $p < 0,01$) što upućuje na razmjerno mali utjecaj kompleksne matrice na bioakumulacijski potencijal istraživanih tvari u ribama. Međutim, za neke spojeve kao što su azitromicin, karbamazepin i EDDP, biokoncentracijski faktori određeni nakon dugotrajnog izlaganja sekundarnom efluentu (Slika 19) bili su znatno viši nego nakon izlaganja modelnoj smjesi (Slike 17 i 18), što može sugerirati porast njihove bioakumulativnosti u prisustvu složene okolišne matrice i/ili utjecaj na metaboličke transformacije u ribama.

U tom kontekstu, zanimljivo je napomenuti da su, osim spomenutih spojeva, u ribama određene mjerljive koncentracije šest dodatnih analita: metadona, escitaloprama, kvetiapina, terbinafina, dekladinozil azitromicina i *N*-demetil tramadola (Tablica XVI u poglavlju 8. Dodatak), od kojih neki dostižu značajan stupanj akumulacije, od $1,0 \text{ L kg}^{-1}$ za dekladinozil azitromicin do $28,3 \text{ L kg}^{-1}$ za terbinafin (Slika 19; Tablica XIX u poglavlju 8. Dodatak).

Primjerice, opioidni analgetik metadon na kraju izlaganja je izmjeren u zebricama u koncentraciji od $0,03 \mu\text{g kg}^{-1}$ s pripadajućim $\text{BCF}_{28\text{d}}$ od $5,3 \text{ L kg}^{-1}$ (Slika 19; Tablice XVI i XIX u poglavlju 8. *Dodatak*). Budući da je glavni metabolit ovog opioida EDDP³⁹, relativni porast vrijednosti $\text{BCF}_{28\text{d}}$ EDDP kod izlaganja sekundarnom efluentu ($3,7 \text{ L kg}^{-1}$), u usporedbi s modelnom smjesom ($\text{BCF}_k = 0,4 \text{ L kg}^{-1}$), najvjerojatnije je rezultat metaboličke transformacije metadona u ribama. Drugi zanimljiv primjer je *N*-demetil tramadol, čiji je $\text{BCF}_{28\text{d}}$ ($7,3 \text{ L kg}^{-1}$) bio višestruko viši nego za njegov lipofilniji roditeljski spoj tramadol ($\text{BCF}_{28\text{d}} = 1,7 \text{ L kg}^{-1}$). Ranije je pokazano da je *N*-demetil tramadol glavni metabolit tramadola u ribama (poglavlje 4.3.1. *Kinetika akumulacije i depuracije odabranih farmaceutskih spojeva*, Slika 15), zbog čega je moguće pretpostaviti da bi njegov BCF određen kod izlaganja sekundarnom efluentu mogao biti precijenjen, odnosno bitan doprinos akumuliranog *N*-demetil tramadola vjerojatno potječe od biotransformacije akumuliranog tramadola.

Ukratko, rezultati kroničnog izlaganja zebrica potvrdili su robusnost većine kinetičkih i biokoncentracijskih pokazatelja određenih u pokusima kratkotrajnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi farmaceutskih spojeva. Postoji visoka korelacija između vrijednosti BCF-ova u širokom koncentracijskom rasponu FAS-ova te u različitim uvjetima izlaganja (modelne otopine naspram razrijeđenog realnog efluenta). Nowakowska i suradnici¹³⁰ su na temelju svoje studije bioakumulacije sertralina u embrijima zebrica postavili hipotezu da je bioakumulacijski proces ovisan o koncentraciji izlaganja, međutim, rezultati ovog istraživanja ne ukazuju na postojanje ovisnosti biokoncentracijskih faktora o koncentraciji izlaganja što je u skladu s rezultatima istraživanja na odraslim ribama koje su objavili Lahti i suradnici¹⁴⁰ te Chen i suradnici¹⁴². Rezultati ovog istraživanja također potvrđuju važnost primjene sveobuhvatnog analitičkog pristupa, koji osim roditeljskih, biološki aktivnih, farmaceutskih spojeva treba uključivati i analizu njihovih metabolita. Takav pristup osigurava sveobuhvatnu i pouzdaniju procjenu okolišnog rizika vezanog uz izloženost riba farmaceutskim spojevima u vodenom okolišu.

4.4. Rasprostranjenost farmaceutskih spojeva u rijeci Savi

Završna verifikacija bioakumulacijskog ponašanja FAS-ova u ribama provedena je sustavnim terenskim pokusima kojima je istražena njihova rasprostranjenost u rijeci Savi na odabranim lokacijama koje karakteriziraju značajne razlike u stupnju izloženosti antropogenim izvorima zagađenja. Kao što je opisano u eksperimentalnom dijelu rada u poglavlju 3.7. *Istraživanje rasprostranjenosti farmaceutskih spojeva u rijeci Savi*, istraživanja su obuhvatila praćenje koncentracija farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita u riječnoj vodi te u divljoj populaciji riba na odsječku rijeke Save, od Otoka Samoborskog do Oborova, u lipnju 2022.

4.4.1. Rasprostranjenost farmaceutskih spojeva u vodi i populaciji riba rijeke Save

Svi FAS-ovi odabrani za praćenje u ovom istraživanju detektirani su u prikupljenim uzorcima riječne vode pri čemu su koncentracije varirale u vrlo širokom rasponu od $0,01 \mu\text{g L}^{-1}$ do $117,5 \mu\text{g L}^{-1}$ (Tablica 23). Za većinu FAS-ova učestalost detekcije bila je viša od 90 %, a iznimke su eritromicin (33 %), ciprofloksacin (67 %) i norfloksacin (83 %). Najviše masene koncentracije određene su za torasemid ($117,5 \mu\text{g L}^{-1}$), kofein ($38,4 \mu\text{g L}^{-1}$), azitromicin ($4,0 \mu\text{g L}^{-1}$), valsartan ($2,9 \mu\text{g L}^{-1}$), *O*-demetil tramadol ($1,9 \mu\text{g L}^{-1}$), dekladinozil azitromicin ($1,9 \mu\text{g L}^{-1}$), kotinin ($1,8 \mu\text{g L}^{-1}$) i oksazepam ($0,96 \mu\text{g L}^{-1}$) što prvenstveno odražava visoke stope njihove terapijske potrošnje, ali za neke spojeve (npr. torasemid i azitromicinski spojevi) treba se uzeti u obzir i utjecaj ispusta otpadnih voda farmaceutske industrije smještene na području grada Zagreba. Posebnu kategoriju predstavljaju kofein i kotinin, koji dostižu visoke koncentracije ($\mu\text{g L}^{-1}$) zbog rasprostranjene uporabe napitaka koji sadrže kofein (kava, čaj i energetska pića) te značajnog broja pušača. Tipične koncentracije ostalih FAS-ova znatno su niže i rijetko premašuju $1 \mu\text{g L}^{-1}$ (raspon medijalnih vrijednosti koncentracija je $0,1 - 218 \text{ ng L}^{-1}$).

Svi analizirani uzorci ribljeg tkiva sadržavali su mjerljive koncentracije FAS-ova, pri čemu su koncentracije ovisile o lokaciji i vrsti analiziranog tkiva. Određivanje koncentracija FAS-ova sustavno je provedeno u svim prikupljenim primjercima riba na šest vrsta tkiva/organa, a u tablici 23 prikazan je sumarni pregled rezultata. Vidljiva je visoka učestalost detekcije ($\geq 80 \%$) azitromicina i njegovih metabolita (dekladinozil azitromicin te *N*- i *N'*-demetil azitromicin), tramadola i njegovih metabolita (*O*- i *N*-demetil tramadol), diazepam,

escitaloprama, sertralina, kvetiapina, kokaina, benzoilekgonina, kofeina, kotinina i desloratadina. S druge strane, eritromicin, amoksicilin, ramipril, lizinopril i morfin detektirani su u samo nekoliko analiziranih uzoraka riba, zbog čega nisu uključeni u daljnje statističke analize. Unutar iste lokacije, prosječne ukupne koncentracije FAS-ova u ribljim tkivima uglavnom su slijedile rastući redoslijed: mišić < škrge < gonade < srce < jetra < bubreg. U pojedinim primjercima riba analizirana su i dodatna tkiva kao što su slezena, masno tkivo, crijeva i mozak te je uočeno da se povišene koncentracije, slične onima u bubrezima, mogu pronaći i u slezeni. Dobiveni rezultati o koncentracijskim razinama i raspodjeli u različitim tkivima (Tablica 23) u skladu su s drugim istraživanjima objavljenim u literaturi (Tablica 5), međutim, odražavaju i neke specifičnosti istraživanog područja (npr. doprinos farmaceutske industrije te stupanj pročišćavanja otpadnih voda).

Tablica 23. Koncentracijski rasponi i učestalost detekcije (%) odabranih farmaceutskih spojeva u vodi i ribljim tkivima uzoraka prikupljenih na rijeci Savi u lipnju 2022. godine. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

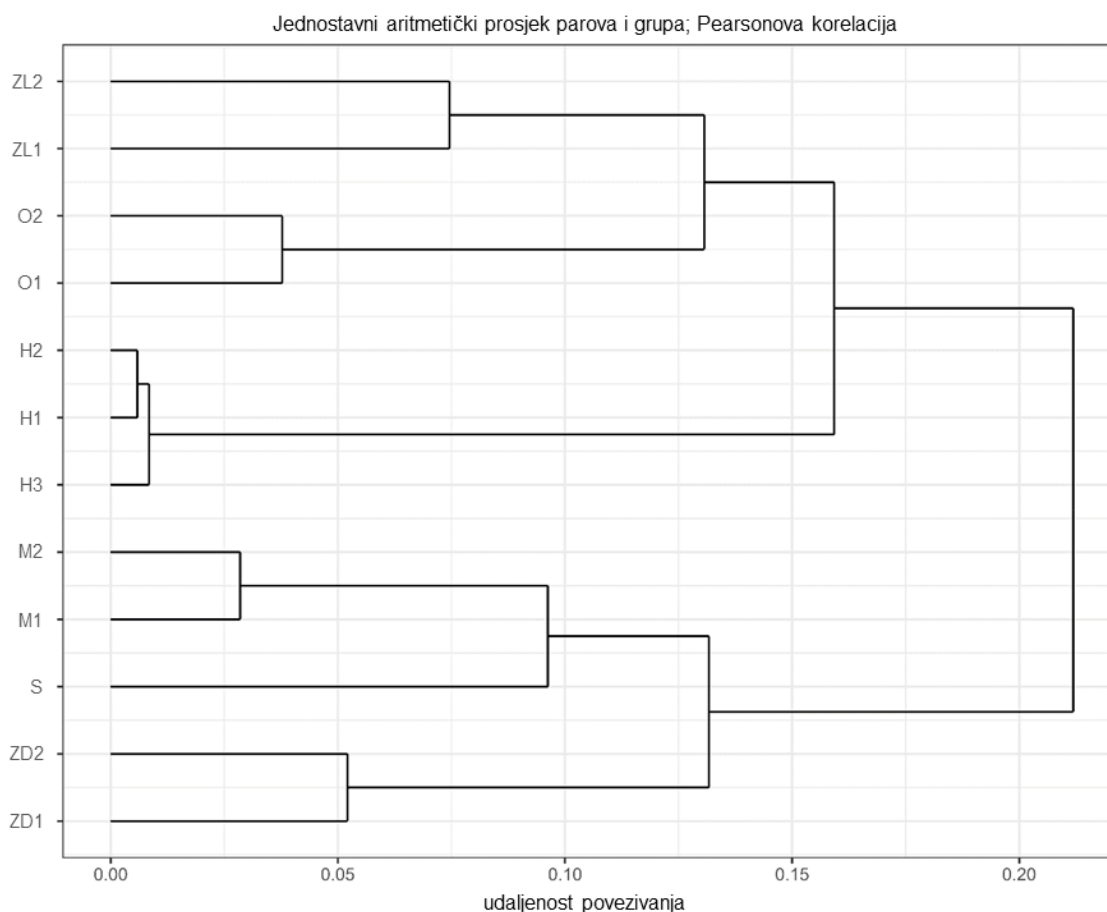
FAS	γ_v / ng L ⁻¹	ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$					
	Površinska voda (n = 12)	Mišić (n = 38)	Škrge (n = 33)	Jetra (n = 34)	Bubrezi (n = 30)	Gonade (n = 12)	Srce (n = 9)
AZI	2,1 – 3964 (100)	<0,1 – 28 (87)	0,1 – 117 (100)	0,3 – 236 (100)	0,6 – 491 (100)	13 – 222 (100)	19 – 278 (100)
DC-AZI	1,3 – 1794 (100)	<0,5 – 2,2 (71)	<0,5 – 12 (76)	<0,5 – 23 (79)	<0,5 – 77 (87)	5 – 32 (100)	<0,5 – 12 (79)
N'-DM-AZI	<0,4 – 102 (92)	<0,2 – 1,8 (53)	<0,2 – 18 (70)	<0,2 – 15 (74)	<0,2 – 10 (73)	<0,2 – 14 (92)	0,8 – 50 (100)
N-DM-AZI	1,0 – 249 (100)	<0,2 – 1,6 (61)	<0,2 – 23 (64)	<0,2 – 6,0 (74)	<0,2 – 8,1 (57)	<0,2 – 11 (83)	0,4 – 12 (100)
CLA	4,2 – 149 (100)	<0,05 – 0,3 (53)	<0,05 – 0,83 (94)	<0,05 – 0,6 (91)	<0,05 – 0,7 (90)	<0,05 – 0,7 (92)	0,3 – 0,4 (100)
ERY	<0,2 – 13 (33)	<0,1 (0)	<0,1 – 0,6 (6)	<0,1 – 0,1 (3)	<0,1 – 0,2 (7)	<0,1 (0)	<0,1 (0)
ERY-H2O	0,4 – 13 (100)	<0,02 – 0,2 (29)	<0,02 – 0,4 (55)	<0,02 – 0,8 (65)	<0,02 – 0,3 (50)	<0,02 (0)	<0,02 – 0,1 (56)
CIP	<1 – 126 (67)	<0,2 – 0,9 (50)	<0,2 – 1,7 (27)	<0,2 – 0,8 (35)	<0,2 – 1,1 (37)	<0,2 – 0,3 (17)	<0,2 – 0,5 (11)
NOR	<1 – 135 (83)	<0,2 – 3,7 (45)	<0,2 – 4,3 (55)	<0,2 – 1,6 (62)	<0,2 – 2,8 (37)	<0,2 – 0,4 (25)	<0,2 – 1,5 (67)
SMX	11 – 319 (100)	<0,02 – 0,05 (87)	<0,02 – 1,0 (73)	<0,02 – 1,0 (26)	<0,02 – 1,5 (63)	<0,02 – 3,1 (42)	0,02 – 0,2 (100)
N-Ac-SMX	4,0 – 71 (100)	<0,02 – 0,1 (16)	<0,02 – 0,1 (30)	<0,02 – 0,4 (21)	<0,02 – 0,07 (20)	<0,02 (0)	<0,02 – 0,03 (33)
SPY	1,7 – 202 (100)	<0,02 – 0,1 (39)	<0,02 – 0,8 (76)	<0,02 – 0,4 (29)	<0,02 – 0,9 (50)	<0,02 – 0,06 (17)	<0,02 – 0,34 (66)
AML	0,5 – 69 (100)	<0,2 – 1,7 (34)	<0,2 – 5,2 (67)	<0,2 – 6,1 (68)	<0,2 – 5,7 (63)	<0,2 – 3,5 (75)	<0,2 – 2,1 (88)
ATOR	0,2 – 60 (100)	<0,005 – 0,013 (47)	<0,005 – 0,05 (64)	<0,005 – 0,04 (35)	<0,005 – 0,03 (20)	<0,005 – 0,03 (42)	<0,005 – 0,03 (33)
LIS	1,2 – 335 (100)	<0,5 (0)	<0,5 (0)	<0,5 (0)	<0,5 – 2,0 (3)	<0,5 – 1,3 (8)	<0,5 (0)
RAM	0,6 – 21 (100)	<0,05 (0)	<0,05 (0)	<0,05 (0)	<0,05 (0)	<0,05 (0)	<0,05 (0)
VAL	41 – 2899 (100)	<0,2 – 0,5 (21)	<0,2 – 3,2 (58)	<0,2 – 2,9 (35)	<0,2 – 5,1 (33)	<0,2 – 0,4 (17)	<0,2 – 3,3 (44)
WAR	0,1 – 18 (100)	<0,005 – 0,01 (3)	<0,005 – 0,07 (70)	<0,005 – 0,3 (68)	<0,005 – 0,08 (33)	<0,005 – 0,1 (42)	<0,005 – 0,2 (78)
VER	0,05 – 6,5 (100)	<0,01 – 0,01 (3)	<0,01 – 0,09 (64)	<0,01 – 0,2 (74)	<0,01 – 0,09 (63)	<0,01 – 0,1 (92)	<0,01 – 0,1 (89)
COD	0,5 – 93 (100)	<0,05 – 0,2 (29)	<0,05 – 0,3 (45)	<0,05 – 0,5 (65)	<0,05 – 0,6 (50)	<0,05 – 1,1 (8)	<0,05 – 0,2 (66)
MTHD	0,3 – 48 (100)	<0,02 – 0,1 (47)	<0,02 – 0,5 (79)	<0,02 – 0,7 (91)	<0,02 – 0,6 (80)	<0,02 – 0,3 (83)	<0,02 – 0,4 (89)
EDDP	0,9 – 125 (100)	<0,005 – 0,02 (47)	<0,005 – 0,8 (85)	<0,005 – 0,5 (79)	<0,005 – 1,5 (77)	0,04 – 0,3 (100)	<0,005 – 0,9 (89)
TRAM	17 – 742 (100)	<0,01 – 0,6 (95)	0,04 – 1,2 (100)	0,02 – 1,9 (100)	0,1 – 2,3 (100)	0,1 – 1,2 (100)	0,09 – 1,1 (100)
O-DM-TRAM	6 – 1888 (100)	<0,01 – 0,06 (82)	<0,01 – 0,6 (88)	<0,01 – 0,6 (79)	<0,01 – 0,1 (80)	<0,01 – 0,09 (92)	<0,01 – 0,08 (88)
N-DM-TRAM	2,6 – 203 (100)	<0,005 – 0,2 (95)	0,01 – 0,5 (100)	0,02 – 1,5 (100)	<0,005 – 1,1 (97)	0,07 – 1,0 (100)	0,04 – 0,7 (100)
CARB	4,8 – 273 (100)	0,01 – 0,2 (55)	<0,01 – 0,4 (61)	<0,01 – 0,7 (59)	<0,01 – 0,4 (60)	<0,01 – 0,3 (92)	0,01 – 0,4 (100)
OXCARB	0,4 – 338 (100)	0,01 – 0,04 (42)	<0,01 – 0,1 (33)	<0,01 – 0,06 (35)	<0,01 – 0,4 (30)	<0,01 – 0,01 (33)	<0,01 – 0,02 (11)
DIA	0,3 – 13 (100)	<0,01 – 0,1 (92)	<0,01 – 0,3 (70)	<0,01 – 1,1 (88)	<0,01 – 0,05 (80)	0,01 – 1,6 (100)	0,01 – 0,3 (100)
OXA	0,8 – 965 (100)	<0,01 – 0,8 (63)	<0,01 – 2,1 (70)	<0,01 – 4,9 (62)	<0,01 – 2,5 (57)	0,04 – 0,8 (100)	0,03 – 1,7 (100)
ESC	1,3 – 66 (100)	<0,005 – 0,1 (95)	<0,005 – 0,2 (91)	0,009 – 2 (100)	0,01 – 0,5 (100)	0,06 – 0,5 (100)	0,08 – 0,9 (100)

Tablica 23. nastavak

FAS	γ_v / ng L ⁻¹ Površinska voda (n = 12)	ω / $\mu\text{g kg}^{-1}$					
		Mišić (n = 38)	Škrge (n = 33)	Jetra (n = 34)	Bubrezi (n = 30)	Gonade (n = 12)	Srce (n = 9)
SER	0,6 – 17 (100)	<0,02 – 1,5 (95)	0,02 – 4,7 (100)	0,2 – 5,0 (100)	0,4 – 6,4 (100)	0,7 – 2,5 (100)	0,7 – 5,0 (100)
QUE	2,6 – 21 (100)	<0,01 – 2,8 (84)	0,03 – 1,0 (100)	0,04 – 4,5 (100)	0,01 – 0,9 (100)	0,05 – 0,5 (100)	0,04 – 0,2 (100)
ZOLP	0,1 – 3,3 (100)	<0,005 – 0,005 (5)	<0,005 – 0,01 (24)	<0,005 – 0,02 (41)	<0,005 – 0,08 (57)	<0,005 – 0,09 (50)	<0,005 – 0,05 (66)
COC	0,5 – 103 (100)	<0,01 – 0,3 (66)	<0,01 – 0,6 (82)	<0,01 – 0,4 (85)	<0,01 – 0,7 (97)	0,04 – 0,2 (100)	<0,01 – 0,4 (85)
BE	1,1 – 614 (100)	<0,005 – 0,2 (74)	<0,005 – 0,2 (94)	<0,005 – 0,5 (85)	<0,005 – 0,5 (93)	0,007 – 0,1 (100)	0,03 – 0,3 (100)
MDMA	0,1 – 22 (100)	<0,01 – 0,03 (29)	<0,01 – 0,09 (52)	<0,01 – 0,04 (41)	<0,01 – 0,1 (60)	0,01 – 0,04 (100)	0,01 – 0,05 (100)
MOR	<0,4 – 30 (92)	<0,5 (0)	<0,5 – 1,2 (3)	<0,5 – 0,8 (6)	<0,5 – 4,1 (27)	<0,5 – 1,3 (8)	<0,5 (0)
CAFF	115 – 38 363 (100)	0,1 – 12 (100)	0,1 – 11 (100)	0,2 – 19 (100)	1,0 – 19 (100)	1,7 – 12 (100)	2,2 – 18 (100)
COT	8,8 – 1799 (100)	<0,05 – 0,9 (97)	<0,05 – 2,2 (97)	0,07 – 4,4 (100)	<0,05 – 8,8 (97)	0,1 – 1,0 (100)	0,2 – 2,8 (100)
LOR	0,1 – 14 (100)	<0,02 – 0,2 (58)	<0,02 – 0,6 (73)	<0,02 – 1,9 (82)	<0,02 – 0,9 (97)	0,02 – 2,2 (100)	0,03 – 0,6 (100)
DLOR	2,6 – 171 (100)	0,1 – 2,1 (100)	0,1 – 1,6 (100)	0,2 – 8,6 (100)	0,2 – 14 (100)	1,3 – 8,6 (100)	0,5 – 5,2 (100)
TERB	<0,01 – 2,3 (92)	<0,005 – 0,07 (63)	<0,005 – 0,09 (64)	<0,005 – 0,1 (62)	<0,005 – 0,3 (77)	0,09 – 0,8 (100)	0,04 – 0,2 (100)
TOR	1,5 – 117 500 (100)	<0,01 – 0,1 (42)	<0,01 – 0,4 (82)	<0,01 – 4,2 (88)	<0,01 – 1,2 (47)	<0,01 – 0,2 (100)	<0,01 – 0,3 (89)

4.4.2. Prostorna raspodjela farmaceutskih spojeva u vodi i populaciji riba rijeke Save

Uzorkovanja riječne vode i riba u rijeci Savi provedena su uzimajući u obzir očekivane gradijente zagađenja u odnosu na poznate izvore unošenja FAS-ova s ciljem da se procjena bioakumulacijskog potencijala odredi u što širem rasponu koncentracija. Hijerarhijska klasteraska analiza rezultata određivanja FAS-ova u vodi (Slika 20) pokazala je jasne, statistički značajne razlike između lokacija uzorkovanja (Slika 4), pri čemu je najveća udaljenost utvrđena između klastera onečišćenijih lokacija Hruščica (H), Zaprešić-lijeva obala (ZL) i Oborovo (O) te preostalih, manje onečišćenih lokacija; Otok Samoborski (S), Medsave (M) i Zaprešić-desna obala (ZD).



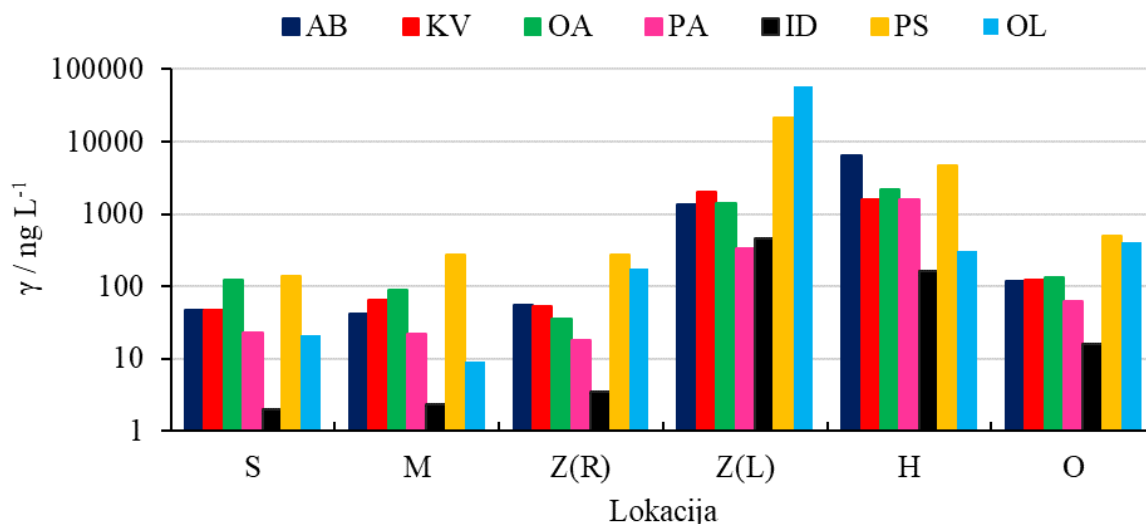
Slika 20. Hijerarhijska klasteraska analiza sličnosti lokacija provedena na temelju rezultata određivanja farmaceutskih spojeva u vodi rijeke Save na odsječku između Otoka Samoborskog i Oborova. Puni nazivi i pozicije lokacija prikazani su na slici 4.

Analiza je ujedno potvrdila i visoku sličnost među uzorcima vode prikupljenih na istoj lokaciji, osim za lokaciju Zaprešić, gdje su uzorci vode s lijeve (ZL) i desne (ZD) obale pokazali značajne razlike. Razlika na ovoj lokaciji može se objasniti činjenicom da se lokacija ispusta otpadnih voda grada Zaprešića nalazi na lijevoj obali rijeke Save, a hidrološki uvjeti su takvi da onemogućavaju učinkovito transverzalno miješanje otpadne vode s riječnom maticom zbog čega se perjanica otpadne vode širi u vrlo uskoj zoni uz lijevu obalu. S druge strane, omjer prosječnih protoka rijeke Save i otpadne vode grada Zaprešića je izrazito velik (najčešće > 1000) zbog čega se na ovom odsječku rijeke Save stvara vrlo izražen poprečni gradijent koncentracija.

Prostorna raspodjela prosječnih masenih koncentracija FAS-ova u vodi na uzdužnom profilu rijeke Save prikazana je na slici 21. Zbog velikog broja pojedinačnih pokazatelja, prikaz rezultata pojednostavljen je na način da su istraživani FAS-ovi razvrstani u sedam terapijskih skupina: AB, antibiotici; KV, kardiovaskularni lijekovi; OA, opioidni analgetici; PA, psihoaktivni lijekovi; ID, ilegalne droge; PS, psihostimulansi i OL, ostali lijekovi (Tablica 1). Potrebno je naglasiti i da ordinata koja prikazuje koncentracije ima logaritamsku skalu jer su razlike između prosječnih masenih koncentracija za pojedine kategorije FAS-ova varirale u rasponima od preko četiri reda veličine. Prostorna raspodjela jasno pokazuje da su najniže razine promatranih podskupina FAS-ova određene na uzvodnim postajama Otok Samoborski (S) i Medsave (M) s ukupnim prosječnim masenim koncentracijama nižim od $1 \mu\text{g L}^{-1}$ ($\gamma_S = 0,4 \mu\text{g L}^{-1}$; $\gamma_M = 0,5 \mu\text{g L}^{-1}$). Vrlo slične razine FAS-ova ($\gamma = 0,6 \mu\text{g L}^{-1}$) izmjerene su i na desnoj obali rijeke Save kod Zaprešića (ZD).

Nasuprot tome, na lokacijama Zaprešić-ljeva obala (ZL) i Hrušćica (H), koje su smještene u blizini ispusta otpadnih voda grada Zaprešića i Zagreba, masene koncentracije FAS-ova značajno su povišene ($\gamma_{ZL} = 86 \mu\text{g L}^{-1}$; $\gamma_H = 17 \mu\text{g L}^{-1}$), dok je prosječna ukupna masena koncentracija FAS-ova na lokaciji kod Oborova, oko 15 km nizvodno od ispusta otpadnih voda grada Zagreba, znatno niža ($\gamma_O = 1,4 \mu\text{g L}^{-1}$). Niža masena koncentracija na lokaciji Oborovo u odnosu na uzvodnu lokaciju kod Hrušćice u velikoj se mjeri može objasniti relativno visokim omjerom razrjeđenja otpadne vode grada Zagreba u rijeci Savi koji u tipičnim suhim hidrološkim prilikama, kakve su prevladavale tijekom tjedna uzorkovanja, iznosi približno 50 puta. Omjer je procijenjen dijeljenjem prosječnog protoka rijeke Save u sušnoj sezoni ($180 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ ²³⁴) s prosječnim dotokom otpadnih voda grada Zagreba ($3,5 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$). Treba uočiti

da je prosječna ukupna masena koncentracija FAS-ova na lokaciji Oborovo ipak bila oko tri puta viša u usporedbi s referentnom uzvodnom lokacijom Otok Samoborski.



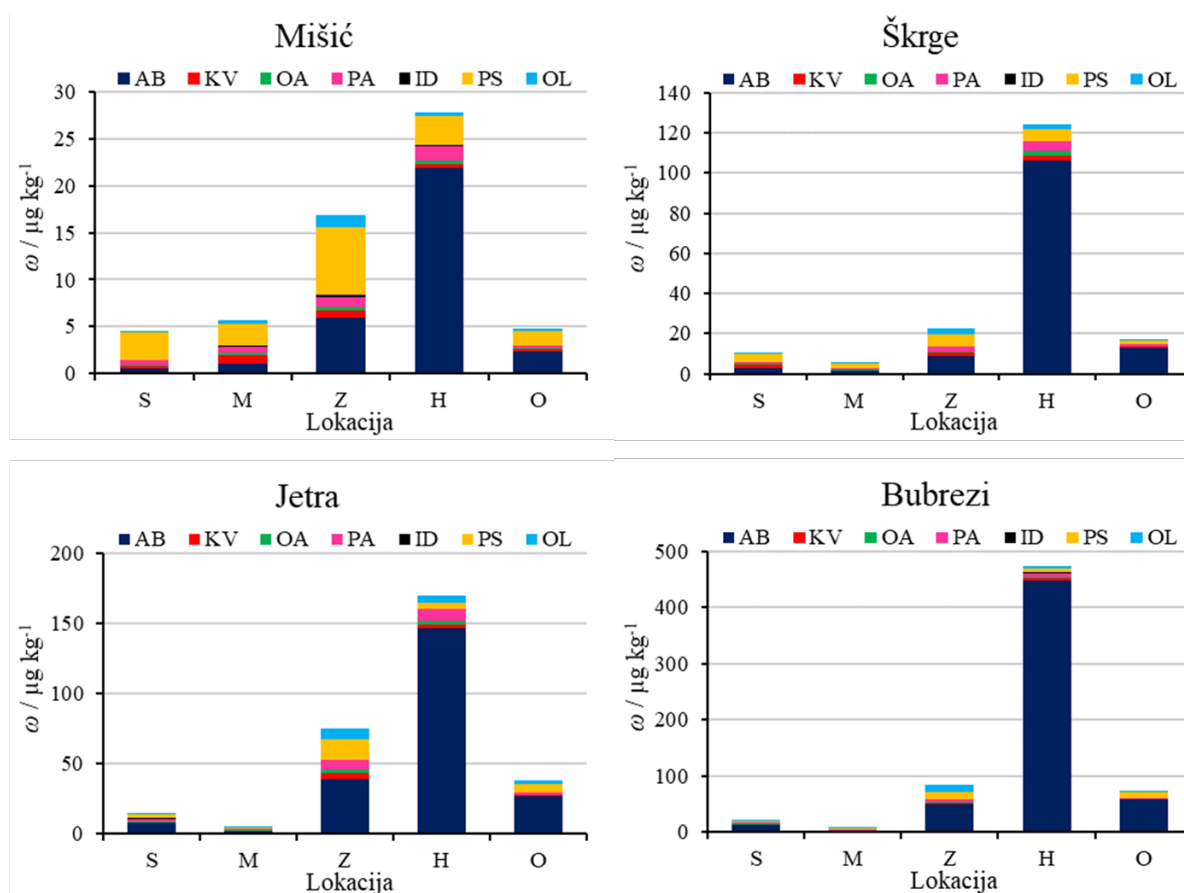
Slika 21. Prostorna raspodjela ispitivanih skupina farmaceutskih spojeva u rijeci Savi na temelju prosječnih koncentracija u uzorcima vode prikupljenim u lipnju 2022. godine. Puni nazivi i lokacije prikazane su na slici 4, dok su kratice za analizirane kategorije FAS-ova i popis pojedinačnih FAS-ova unutar skupine prikazani u tablici 1.

Osim prosječnih koncentracija, na uzdužnom profilu rijeke Save značajno se mijenjaju i relativni omjeri različitih tipova FAS-ova (Slika 21). Na manje onečišćenim, uzvodnim lokacijama Otok Samoborski (S) i Medsave (M) određeni su visoki doprinosi opioidnih analgetika ($\gamma_{OA} = 18 - 31 \%$), kardiovaskularnih lijekova ($\gamma_{KV} = 12 - 13 \%$) te antibiotika i njihovih metabolita ($\gamma_{AB} = 8,3 - 12 \%$), pri čemu su najistaknutiji pojedinačni predstavnici tih skupina bili tramadol ($62 - 93 \text{ ng L}^{-1}$), valsartan ($45 - 65 \text{ ng L}^{-1}$) i sulfametoksazol (13 ng L^{-1}).

Nasuprot tome, dvije najviše onečišćene lokacije, Zaprešić-lijeva obala i Hrušćica, pokazale su međusobno vrlo različite sastave FAS-ova, koji tako predstavljaju svojevrstan prepoznatljivi otisak za te specifične lokacije. Na lokaciji Zaprešić-lijeva obala određene su iznimno visoke koncentracije dvaju spojeva, diuretika torasemida ($\gamma_{TOR} = 59 \mu\text{g L}^{-1}$) i psihostimulansa kofeina ($\gamma_{CAFF} = 20 \mu\text{g L}^{-1}$), zbog čega preko 92 % ukupne koncentracije FAS-ova na toj lokaciji pripada kategoriji ostalih lijekova (OL) i psihostimulansa (PS). Ovakav jedinstven sastav FAS-ova ukazuje na posebnosti lokacije kod Zaprešića. Ekstremno visoka koncentracija torasemida ne

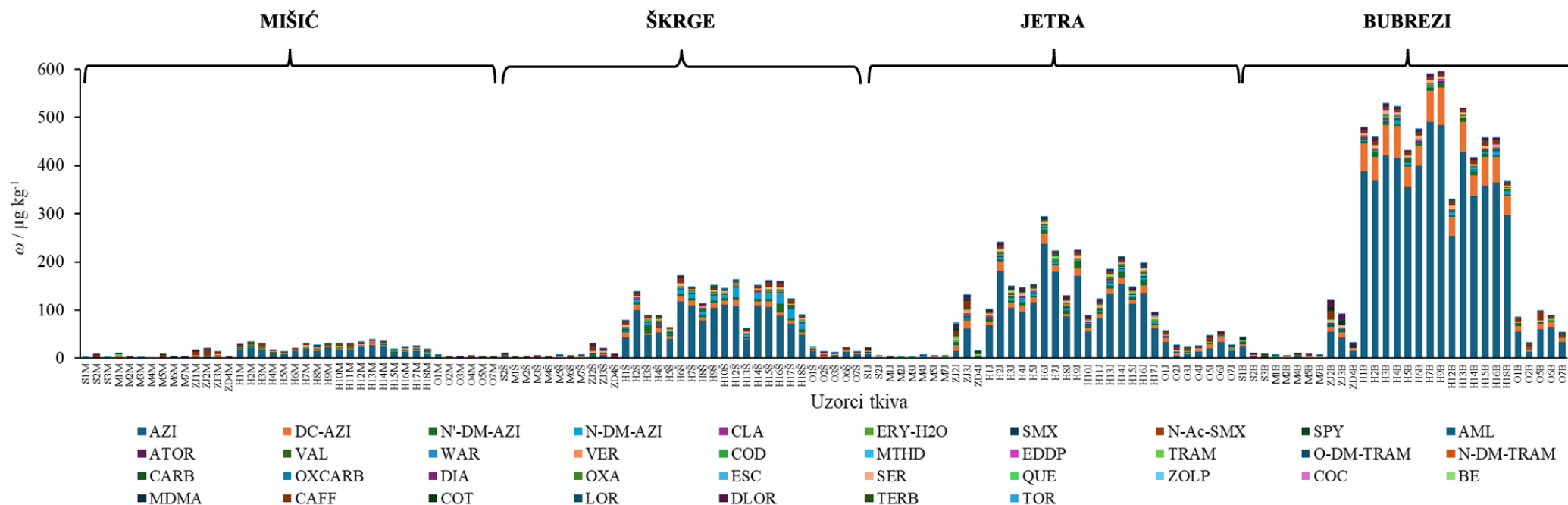
može se objasniti uobičajenom terapijskom uporabom već se mora pretpostaviti da dominantan doprinos potječe od otpadnih voda farmaceutske industrije koja je smještena u neposrednoj blizini te ispušta svoje otpadne vode u kanalizacijski sustav grada Zaprešića. Povišene koncentracije kofeina nešto su niže od tipičnih koncentracija koje su određene u nepročišćenim otpadnim vodama hrvatskih gradova²³⁵ te se mogu objasniti nepostojanjem stupnja biološkog pročišćavanja otpadne vode u Uređaju za pročišćavanje otpadnih voda grada Zaprešića te niskim stupnjem miješanja otpadne vode s vodama rijeke Save na toj lokaciji²³⁶. Sastav FAS-ova na lokaciji Hrušćica pokazao je visoku zastupljenost antibiotika (AB; 38 %) i psihoaktivnih lijekova (PA; 28 %) kao dominantnih terapijskih skupina. Glavni doprinosi u kategoriji antibiotika potjecali su od makrolidnog antibiotika azitromicina ($\gamma_{AZI} = 3,8 \mu\text{g L}^{-1}$; 58,9 %) i njegovih metabolita, prvenstveno dekladinozil azitromicina ($\gamma_{DC-AZI} = 1,7 \mu\text{g L}^{-1}$; 26 %). Povišene koncentracije azitromicina i njegovih metabolita na ovoj lokaciji kumulativni su rezultat visoke stope potrošnje, ali i periodičnog izravnog unosa iz lokalnih pogona za proizvodnju i formulaciju azitromicina^{45,46}. Od ostalih FAS-ova, u značajnijoj koncentraciji detektirani su i kardiovaskularni lijek valsartan ($\gamma_{VAL} = 1,5 \mu\text{g L}^{-1}$), opioidni analgetik tramadol ($\gamma_{TRAM} = 0,7 \mu\text{g L}^{-1}$) i njegov metabolit *O*-demetil tramadol ($\gamma_{O-DM-TRAM} = 1,1 \mu\text{g L}^{-1}$) te psihoaktivni lijek oksazepam ($\gamma_{OXA} = 0,9 \mu\text{g L}^{-1}$).

Prostorna raspodjela FAS-ova u rijeci Savi, određena na temelju njihove koncentracije u ribljim tkivima i organima (Slike 22 i 23), slična je raspodjeli dobivenoj na temelju određivanja u vodi (Slika 21), ali postoje i razlike koje odražavaju promjene u sastavu FAS-ova kojima su ribe izložene na specifičnim lokacijama. Vidljivo je da uzorci tkiva riba prikupljenih na lokaciji Hrušćica sadrže znatno višu razinu ukupnih FAS-ova u odnosu na uzorke s drugih lokacija, čak i u usporedbi s lokacijom Zaprešić-lijeva obala gdje su zabilježene najviše ukupne koncentracije FAS-ova u vodi. Razlog za ovo opažanje treba tražiti u različitom sastavu FAS-ova kojima su ribe bile izložene na tim dvjema lokacijama te u značajnim razlikama u bioakumulacijskom potencijalu glavnih predstavnika FAS-ova za svaku od promatranih lokacija. U odnosu na vodu, u ribama na svim postajama snažno raste udio antibiotika, posebno na najzagađenijim lokacijama Zaprešić-lijeva obala i Hrušćica. Primjerice, udio antibiotika u vodi na lokaciji Zaprešić-lijeva obala bio manji od 5 %, dok u mišiću ribe, koji je dobra aproksimacija za prosječnu koncentraciju u cijeloj ribi, taj udio raste do približno 30 %. Na isti način, na postaji Hrušćica udio antibiotika raste s 38 % u vodi na oko 75 % u mišiću. Takvi pomaci udjela u raspodjeli dodatno su izraženi u drugim tkivima, posebno jetri i bubregu.



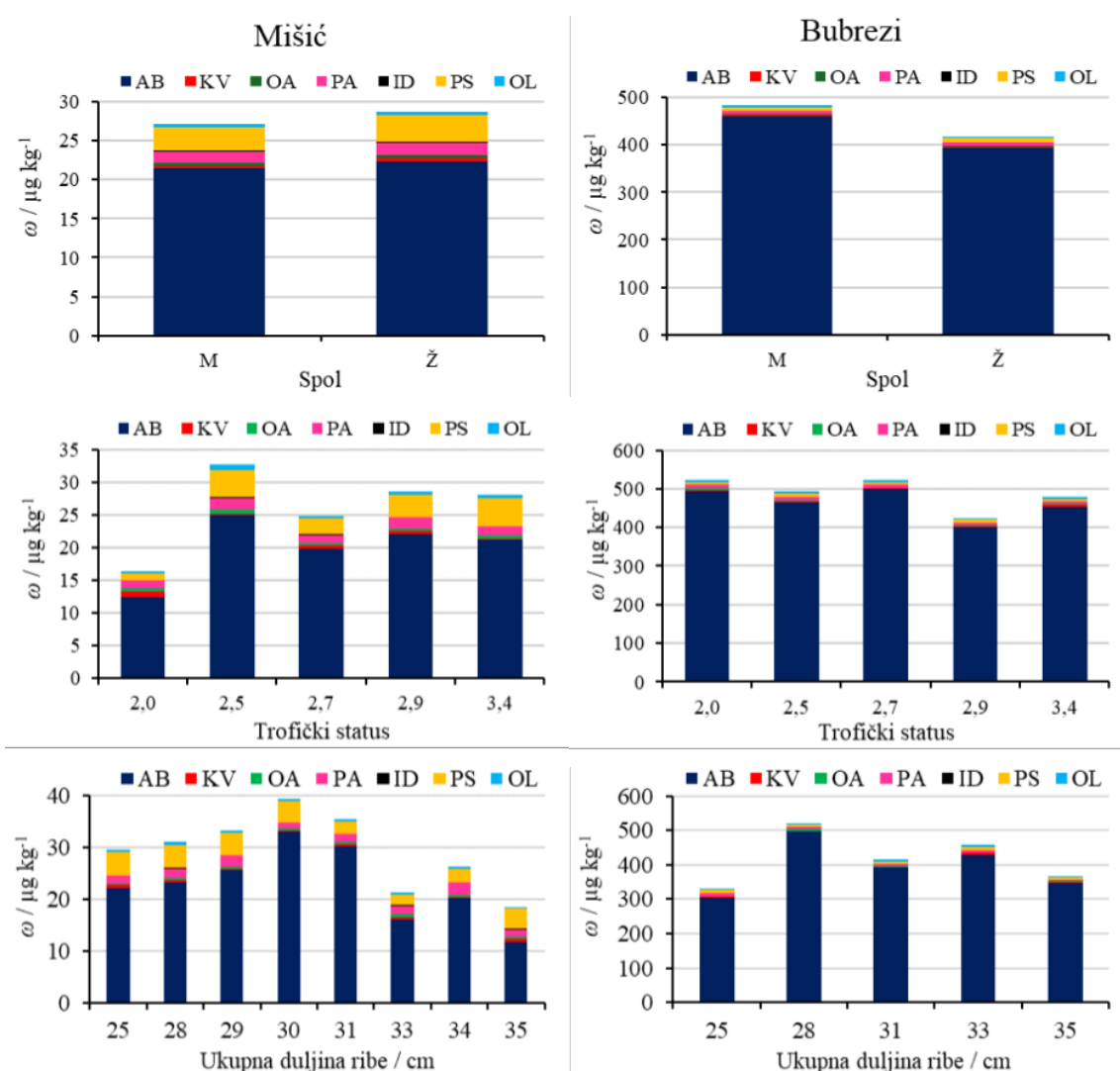
Slika 22. Prostorna raspodjela ispitivanih skupina farmaceutskih spojeva u rijeci Savi na temelju prosječnih koncentracija u mišiću, škragama, jetri i bubrezi riba prikupljenih u lipnju 2022. godine. Puni nazivi i lokacije prikazane su na slici 4, dok su kratice za analizirane kategorije FAS-ova i popis pojedinačnih FAS-ova unutar skupine prikazani u tablici 1.

Na slici 23 prikazani su detaljni rezultati raspodjele analiziranih FAS-ova u pojedinačnim uzorcima riba, na temelju analize četiri različita tipa tkiva koji pokazuju značajne razlike u pogledu potencijala akumulacije FAS-ova. U tom kompleksnom višedimenzionalnom prikazu mogu se iščitati osnovne značajke raspodjele FAS-ova u ribama koje istovremeno ilustriraju prostornu raspodjelu, ali i stupanj bioakumulativnosti u različitim tkivima. Pri tome treba naglasiti da su primjerci riba prikupljeni za analizu pripadali različitim vrstama te su se značajno razlikovali prema biometrijskim pokazateljima, spolu, starosti i trofičkoj razini (Tablica 12).



Slika 23. Raspodjela istraživanih farmaceutskih spojeva u pojedinačnim primjercima divlje populacije riba iz rijeke Save na temelju analiza uzoraka četiri tipa tkiva (mišića, škrge, jetre i bubrega). Oznake uzorka kreirane su u obliku kombinacije slovo-broj-slovo; prvo slovo označava lokaciju (puni nazivi i lokacije prikazane su na slici 4), broj označava redni broj uzorka, a drugo slovo označava vrstu tkiva (**M**, mišić; **Š**, škrge; **J**, jetra; **B**, bubregi). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Usprkos heterogenosti, varijabilnost koncentracija u analiziranim primjercima riba unutar jedne lokacije bila je u pravilu znatno manja nego između različitih lokacija. Zbog toga prosječne koncentracije u svim ribljim tkivima konzistentno odražavaju gradijente izloženosti FAS-ovima u vodenom mediju, a što je jasnije vidljivo u tkivima s većim stupnjem akumulacije (npr. bubreg). Korelacija koncentracija s biometrijskim parametrima nije dala značajnije razlike koje bi upućivale na važnost spola, starosti ili trofičkog statusa ispitivanih riba, kao što se može vidjeti na slici 24 gdje je prikazana usporedba prema parametrima za tkivo mišića i bubrega.



Slika 24. Prosječne koncentracije ispitivanih farmaceutskih spojeva u rijeci Savi u uzorcima mišića i bubrega riba prikupljenih 2022. godine na lokaciji Hrušćica prema spolu (M, mužjak; Ž, ženka), trofičkom statusu i ukupnoj duljini ribe (na primjeru vrste *S. erythrophthalmus*). Kratice za analizirane kategorije FAS-ova i popis pojedinačnih FAS-ova unutar skupine prikazani u tablici 1.

Kako nije uočena pojačana akumulacija FAS-ova u ribama višeg trofičkog nivoa, mogući utjecaj biomagnifikacije među ribama vjerojatno je vrlo nizak. Ovo zapažanje ujedno upućuje i da je izloženost FAS-ovima kroz vodeni medij vrlo vjerojatno dominantan mehanizam akumulacije, dok alternativni mehanizmi putem hrane i/ili onečišćenih sedimenata imaju manji značaj.

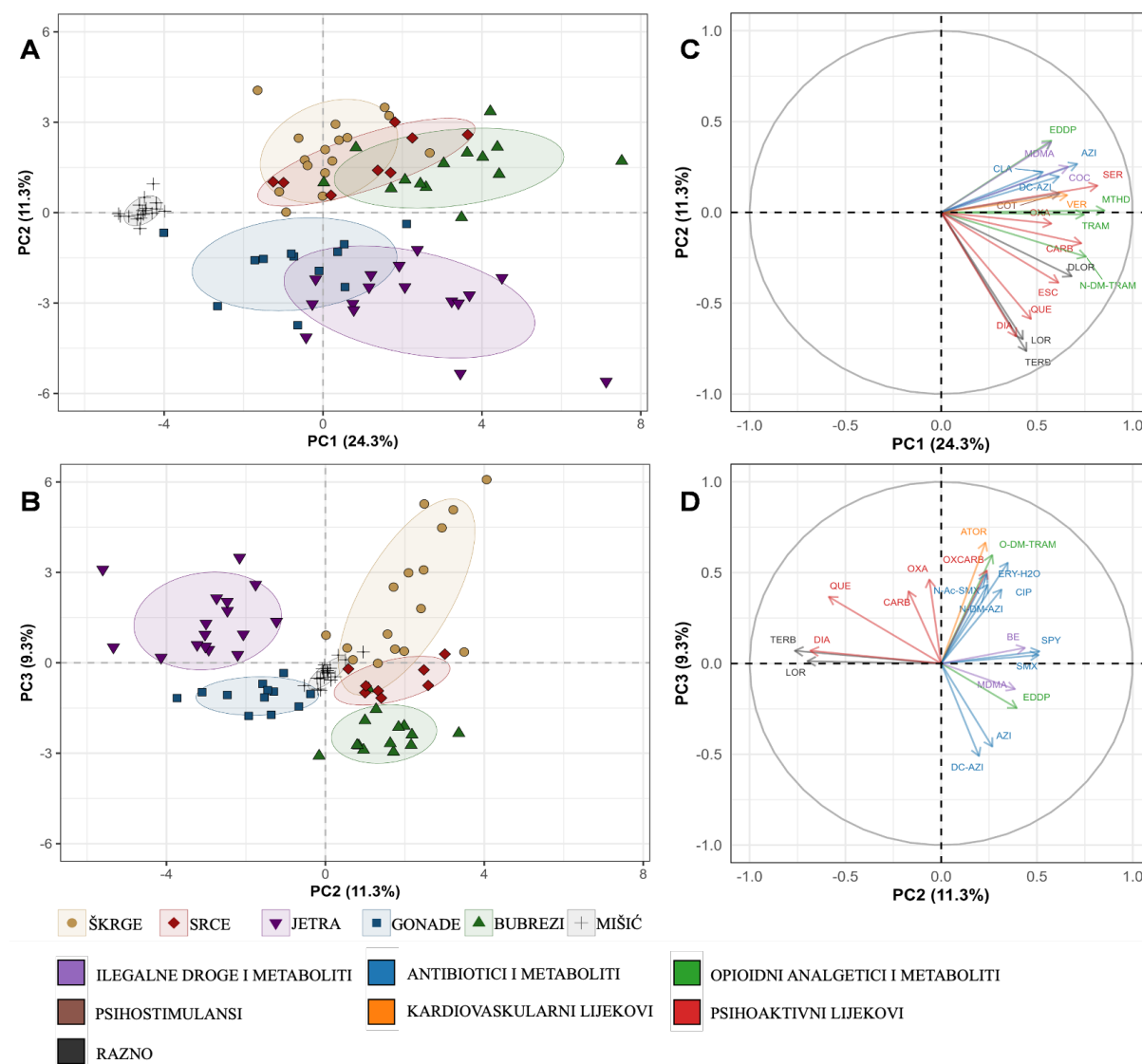
4.4.3. Tkivna raspodjela i bioakumulacijski potencijal farmaceutskih spojeva

Značajke tkivno-specifične akumulacije odabranih FAS-ova detaljnije su proučene obradom rezultata mjerenja za šest tipova ribljih tkiva (mišić, škrge, jetra, bubreg, srce i gonade) uporabom analize glavnih komponenata (PCA). Za analizu su korištene samo koncentracije određene za uzorke s lokacije Hrušćica koja se pokazala najprikladnijom zbog najvećeg broja uzoraka te veće učestalosti detekcije različitih FAS-ova u odnosu na druge lokacije.

Projekcija koncentracija FAS-ova određenih u različitim tkivima na faktorske ravnine 1×2 i 2×3 (Slika 25; A i B) pokazala je jasno razdvajanje klastera podataka za pojedina tkiva. Za PC1, čiji doprinos ukupnoj varijanci iznosi 24,3 %, najveće udaljenosti utvrđene su između skupova podataka dobivenih za mišić i dva tkiva metabolički aktivnih organa, bubrega i jetre. S druge strane, PC2 (11,3 %) povezana je sa značajkama koje dovode do sustavnog razdvajanja skupova podataka za jetru i gonade od onih za bubreg, srce i škrge. PC3 (9,3 %) upućuje na postojanje specifičnih značajki povezanih s pojačanom varijabilnošću u uzorcima škrge. Treba ipak naglasiti da prve tri glavne komponente objašnjavaju tek 44,9 % ukupne varijance, što ukazuje na visoku složenost čimbenika koji određuju biokoncentracijski potencijal i tkivnu raspodjelu istraživanih FAS-ova u ribama. Uočene varijacije u obrascima raspodjele vjerojatno odražavaju različito farmakokinetičko ponašanje pojedinih spojeva u ribama, što ukazuje na potrebu za specifičnijim istraživanjima ponašanja FAS-ova u ribama, a za što bi trebalo provesti sustavne modelne pokuse u kontroliranim uvjetima. Takve je pokuse vrlo teško provesti na zebricama jer je analiza akumulacije po organima za ovu vrstu vrlo zahtjevna zbog vrlo male količine specifičnih tkiva koja se mogu prikupiti sekcijom.

Prema projekciji rezultata za pojedine FAS-ove na faktorske ravnine 1×2 i 2×3 (Slika 25; C i D), najveći doprinos varijanci PC1 bio je povezan s nekoliko glavnih predstavnika FAS-ova, prvenstveno metadon, sertralin i tramadol. S druge strane, terbinafin, loratadin, diazepam i kvetiapin značajno su doprinijeli ukupnoj varijanci PC2. Nešto niži doprinos varijanci PC2

potječe od MDMA i EDDP, pri čemu su oni u negativnoj korelaciji s glavnom komponentom PC2. Varijanca PC3 bila je primarno povezana s koncentracijom atorvastatina, *O*-demetil tramadola i bezvodnog eritromicina, pri čemu je utvrđena negativna korelacija tih spojeva s azitromicinom i njegovim glavnim metabolitom dekladinozil azitromicinom.



Slika 25. Analiza glavnih komponenti koncentracija istraživanih farmaceutskih spojeva u šest ribljih tkiva (mišić, škrge, srce, gonade, bubrezi, jetra), prikupljenih u lipnju 2022. godine na lokaciji Hrušćica, rijeka Sava.

Bioakumulacijski potencijal ispitivanih FAS-ova u različitim tkivima procijenjen je na temelju BAF-ova koji su određeni kao omjer koncentracije u promatranom tkivu i vodi. Rezultati su prikazani u tablici 24.

Tablica 24. Prosječni bioakumulacijski faktori (\pm sd; $L\ kg^{-1}$) u različitim tkivima riba prikupljenih u lipnju 2022. godine na lokaciji Hrušćica, rijeka Sava. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	BAF / $L\ kg^{-1}$					
	Mišić	Škrge	Jetra	Bubrezi	Gonade	Srce
AZI	4,6 \pm 1,5	21,5 \pm 7,8	33,8 \pm 12,6	95,4 \pm 27,4	29,8 \pm 13,2	52,1 \pm 13,7
DC-AZI	0,9 \pm 0,2	4,8 \pm 1,7	7,1 \pm 2,9	30,5 \pm 10,1	10,2 \pm 6,7	5,2 \pm 1,7
N'-DM-AZI	14,9 \pm 5,8	74,8 \pm 53,5	86,1 \pm 40,3	68,6 \pm 28,2	100,0 \pm 62,1	193,6 \pm 217,3
N-DM-AZI	20,5 \pm 8,6	228,3 \pm 176,4	84,2 \pm 43,7	94,4 \pm 61,9	119,8 \pm 106,7	116,4 \pm 99,3
CLA	0,8 \pm 0,3	3,4 \pm 1,0	2,2 \pm 0,9	3,2 \pm 1,0	2,6 \pm 1,2	2,4 \pm 0,4
ERY-H2O	4,1 \pm 5,0	11,1 \pm 8,9	5,7 \pm 3,5	7,9 \pm 4,3	NO	5,0 \pm 3,5
CIP	4,6 \pm 2,6	13,0 \pm 3,9	4,9 \pm 2,4	5,9 \pm 3,9	3,0 \pm 0	6,0 \pm 0
NOR	5,2 \pm 2,2	5,0 \pm 3,8	6,3 \pm 5,7	7,2 \pm 3,3	3,0 \pm 0,7	8,4 \pm 4,0
SMX	0,1 \pm 0,02	0,4 \pm 0,5	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,4	0,1 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2
N-Ac-SMX	0,4 \pm 0,04	0,8 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,03	NO	0,4 \pm 0,1
SPY	0,3 \pm 0,1	2,1 \pm 1,2	0,2 \pm 0	2,6 \pm 1,2	0,2 \pm 0	1,1 \pm 0,6
AML	13,2 \pm 5,7	55,2 \pm 42,7	72,8 \pm 42,8	52,5 \pm 20,7	46,2 \pm 39,8	38,4 \pm 20,0
ATOR	0,2 \pm 0,02	0,5 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2	0,1 \pm 0,04	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,2
VAL	0,2 \pm 0,1	0,9 \pm 0,5	1,2 \pm 0,6	2,1 \pm 1,0	0,2 \pm 0,04	1,2 \pm 0,9
WAR	0,2 \pm 0,1	5,1 \pm 1,9	19,3 \pm 14,7	6,9 \pm 5,8	5,9 \pm 9,0	12,0 \pm 11,4
VER	1,3 \pm 0	5,8 \pm 3,5	7,1 \pm 5,6	8,3 \pm 3,3	5,0 \pm 6,6	9,0 \pm 8,5
COD	1,0 \pm 0,6	1,9 \pm 1,0	1,6 \pm 1,7	1,8 \pm 2,3	14,1 \pm 0	1,0 \pm 1,0
MTHD	0,8 \pm 0,3	5,4 \pm 2,1	6,6 \pm 3,3	6,3 \pm 2,9	2,7 \pm 1,7	5,4 \pm 2,4
EDDP	0,1 \pm 0,1	2,2 \pm 2,0	1,5 \pm 0,9	5,1 \pm 4,2	1,4 \pm 0,8	5,1 \pm 2,3
TRAM	0,3 \pm 0,1	1,1 \pm 0,3	1,4 \pm 0,6	1,4 \pm 0,7	0,8 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3
O-DM-TRAM	0,02 \pm 0,01	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,05 \pm 0,03	0,03 \pm 0,02	0,1 \pm 0,02
N-DM-TRAM	0,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,5	3,0 \pm 1,6	2,8 \pm 1,4	2,0 \pm 1,4	1,9 \pm 1,0
CARB	0,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	1,5 \pm 0,6	1,0 \pm 0,2	0,6 \pm 0,3	1,0 \pm 0,3
OXCARB	0,1 \pm 0,03	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,1	0,03 \pm 0,02	0,03 \pm 0,02	0,1 \pm 0
DIA	7,8 \pm 2,6	14,8 \pm 5,4	45,9 \pm 16,6	21,3 \pm 8,9	46,7 \pm 31,1	15,4 \pm 6,1
OXA	0,4 \pm 0,2	1,4 \pm 0,6	2,3 \pm 1,5	1,2 \pm 0,6	0,5 \pm 0,2	1,3 \pm 0,3
ESC	0,8 \pm 0,4	5,0 \pm 2,3	16,2 \pm 15,7	9,7 \pm 4,3	7,4 \pm 4,9	10,6 \pm 8,5
SER	90,6 \pm 31,1	281,4 \pm 114,9	330,1 \pm 122,8	504,3 \pm 115,9	186,2 \pm 44,2	312,6 \pm 109,1
QUE	1,6 \pm 0,5	22,9 \pm 13,0	103,8 \pm 18,9	24,0 \pm 25,9	11,3 \pm 7,9	6,4 \pm 1,9
ZOLP	1,7 \pm 0,01	2,8 \pm 0,9	2,3 \pm 0,8	7,8 \pm 6,0	8,4 \pm 11,7	8,4 \pm 6,7
COC	1,0 \pm 0,4	5,1 \pm 4,1	4,4 \pm 2,5	8,7 \pm 5,7	3,2 \pm 1,7	4,5 \pm 3,3
BE	0,5 \pm 0,2	0,7 \pm 0,3	0,5 \pm 0,3	0,7 \pm 0,5	0,4 \pm 0,33	1,1 \pm 0,6
MDMA	0,4 \pm 0,2	1,7 \pm 1,1	0,9 \pm 0,6	1,7 \pm 1,2	0,7 \pm 0,7	1,4 \pm 0,7
CAFF	0,7 \pm 0,3	1,3 \pm 0,5	0,9 \pm 0,3	1,6 \pm 0,5	1,6 \pm 0,7	2,0 \pm 1,1
COT	0,5 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	1,4 \pm 0,6	1,5 \pm 0,7	1,0 \pm 0,5	1,6 \pm 0,5
LOR	35,8 \pm 13,4	87,6 \pm 34,9	322,7 \pm 142,7	167,0 \pm 73,6	312,6 \pm 181,6	92,7 \pm 42,6
DLOR	8,7 \pm 4,5	44,8 \pm 31,8	121,9 \pm 34,4	117,4 \pm 48,8	94,1 \pm 46,8	30,7 \pm 12,8
TERB	45,9 \pm 24,5	77,7 \pm 26,3	783,9 \pm 260,4	271,5 \pm 146,4	500,1 \pm 230,6	138,1 \pm 75,4
TOR	0,1 \pm 0,03	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,03	0,04 \pm 0,02	0,2 \pm 0,3	0,3 \pm 0,2

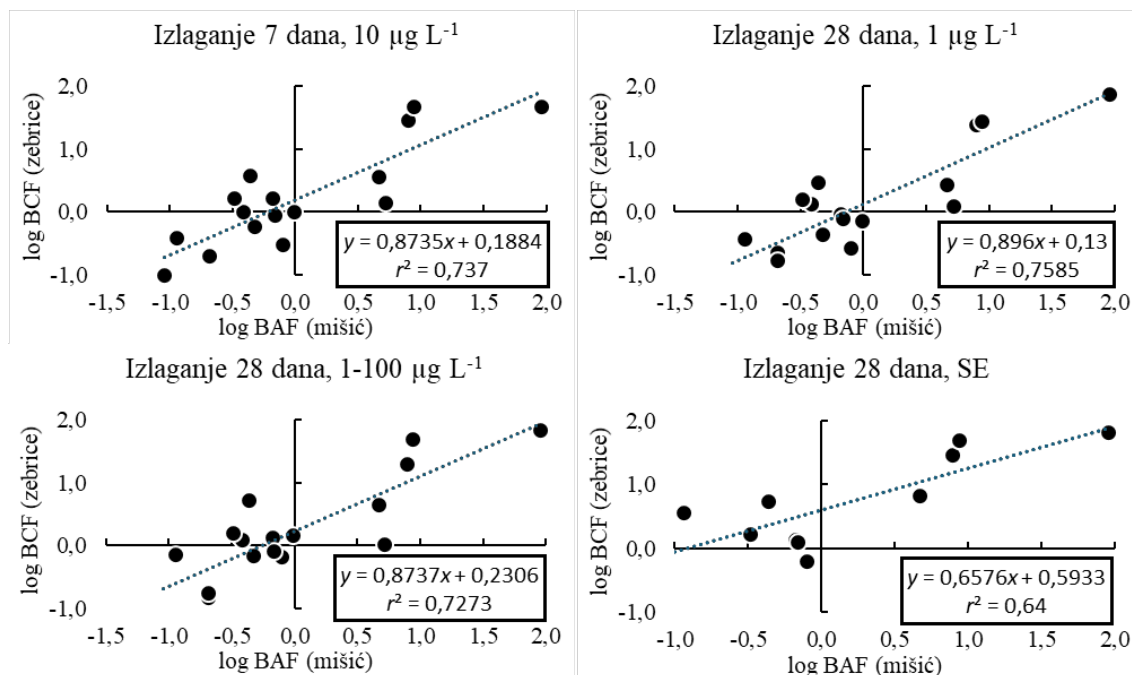
NO, nije određeno, koncentracije ispod granice kvantifikacije

Treba napomenuti da ovako izračunate vrijednosti BAF-ova ne predstavljaju prave BAF-ove koji se prema smjernicama računaju na temelju koncentracije u cijeloj ribi^{118,119,237}. Međutim, ovakav izračun je čest u literaturi stoga vrijednosti prikazane u tablici 24 omogućuju izravnu usporedbu rezultata dobivenih u ovom istraživanju s literaturnim podacima. Nadalje, u realnom okolišu očekuju se i drugi putevi unosa (npr. sediment, hrana) koji mogu doprinijeti povećanju

ukupne koncentracije FAS-ova u organizmima iz realnog okoliša što posljedično može dovesti do precjenjivanja vrijednosti BAF-ova u odnosu na BCF vrijednosti koje su određene u modelnim pokusima u kojima je akumulacija provedena isključivo putem prijenosa iz vodenog medija.

Rezultati pokazuju da su BAF-ovi za uzorke mišića ($0,02 - 91 \text{ L kg}^{-1}$) u skladu s ranije objavljenim istraživanjima^{14,21,22,50,96,122,142}. Samo 14 od 39 FAS-ova koji su bili kvantificirani u uzorcima mišića imalo je BAF veći od 1 L kg^{-1} . Najviši BAF-ovi u uzorcima mišića određeni su za sertralin ($36 - 156 \text{ L kg}^{-1}$), terbinafin ($12,2 - 85 \text{ L kg}^{-1}$), loratadin ($9,1 - 58 \text{ L kg}^{-1}$), *N*-demetil azitromicin ($5,8 - 40 \text{ L kg}^{-1}$), *N'*-demetil azitromicin ($5,9 - 22 \text{ L kg}^{-1}$), amlodipin ($6,2 - 22 \text{ L kg}^{-1}$) i desloratadin ($2,7 - 21 \text{ L kg}^{-1}$). U kategoriju blago akumulativnih spojeva ($\text{BAF} = 1 - 10 \text{ L kg}^{-1}$) mogu se svrstati azitromicin, ciprofloksacin, norfloksacin i diazepam.

Važno je napomenuti da su BAF-ovi određeni za mišić riba iz rijeke Save u pozitivnoj korelaciji ($p < 0,01$; Slika 26) s BCF-ovima dobivenim za cijelu ribu u modelnim pokusima izlaganja zebrića kroz 7 dana (Tablica 21) odnosno 28 dana (Slike 17 – 19; Tablice XVII – XIX u poglavlju 8. *Dodatak*). Temeljem ove korelacije, opravdano je pretpostaviti da se koncentracije u mišiću mogu koristiti kao zamjenski pokazatelj za koncentraciju u cijeloj ribi, što olakšava procjenu BCF-ova u realnim okolišnim uvjetima. Naime, neki od ulovljenih primjeraka riba premašivali su masu od 1 kg te bi priprema reprezentativnog prosječnog uzorka zahtijevala vrlo kompliciran postupak mljevenja i homogenizacije, dok je priprema uzorka dorzalnog mišića relativno jednostavna. Osim toga, upravo je koncentracija FAS-ova u mišiću najrelevantnija za procjenu mogućeg utjecaja farmaceutskog zagađenja na čovjeka putem konzumacije riba.



Slika 26. Korelacije između bioakumulacijskih faktora određenih na temelju analize ribljeg mišića prikupljenog na lokaciji Hrušćica [log BAF (mišić)] i biokoncentracijskih faktora određenih u modelnim pokusima akumulacije/depuracije (7 dana) i kroničnog izlaganja (28 dana) zebrica [log BCF (zebrice)]. Sve četiri korelacije su statistički značajne ($p < 0,01$).

Svi BAF-ovi određeni za ispitivane FAS-ove u uzorcima mišića divljih riba bili su manji od 1000 L kg^{-1} pa se prema kriterijima Američke agencije za zaštitu okoliša (US EPA)^{118,119} i europske regulative¹²⁰ ne mogu klasificirati kao visoko bioakumulativni. Iako su BAF-ovi određeni u preostalim pet tkiva bili općenito viši od onih u mišiću, što je u skladu s dostupnim literaturnim podacima^{13,22,72,101}, nijedan od ovih tkivno-specifičnih BAF-ova nije premašivao 1000 L kg^{-1} . Grabicová i suradnici²² objavili su visoke vrijednosti BAF-a sertralina u jetri ($880 - 2400 \text{ L kg}^{-1}$) i bubrezima ($2800 - 4400 \text{ L kg}^{-1}$) potočne pastrve izložene na lokaciji u blizini ispusta otpadne vode koje su povezali s relativno visokom trofičkom razinom potočne pastrve (3,4). Međutim, u našim istraživanjima u kojima su analizirane divlje ribe raspona trofičkog statusa 2,0 – 3,8 (Tablica 12), nije se pokazalo da trofička razina ima značajan utjecaj na BAF-ove. Drugi razlog za značajne razlike između BAF-ova određenih u realnim uvjetima u različitim istraživanjima leže i u činjenici da koncentracije FAS-ova u otpadnim vodama mogu značajno varirati te je teško odrediti reprezentativnu prosječnu koncentraciju izloženosti.

Selektivnost obogaćivanja pojedinih FAS-ova u specifičnim tkivima, a time i povišene akumulacijske koncentracije, pružaju mogućnost osjetljivijeg praćenja izloženosti organizama

u realnom vodenom okolišu, nego na temelju najčešće primjenjivanog pristupa u monitoringu kvalitete vodenog okoliša, praćenjem akumulacije u mišiću ili cijelom tijelu ribe. Kako bi se bolje ilustrirale razlike u akumulativnosti pojedinih FAS-ova u specifičnim tkivima, uveden je pojam relativnog faktora obogaćenja (engl. *relative enrichment factors*, REF) koji je definiran omjerom BAF-ova u specifičnim tkivima s BAF-om u mišiću. Dobivene REF vrijednosti varirale su u širokom rasponu od 1 do 65 (Slika 27).

AZI	1.0	4.6	6.5	11.3	20.7	7.3	
DC-AZI	1.0	5.3	11.3	5.8	34.0	7.9	
N'-DM-AZI	1.0	5.0	6.7	13.0	4.6	5.8	
N-DM-AZI	1.0	11.2	5.9	5.7	4.6	4.1	
CLA	1.0	4.3	3.2	3.1	4.0	2.7	
ERY-H2O	1.0	2.7	0.3	1.2	1.9	1.4	
CIP	1.0	2.9	0.7	1.3	1.3	1.1	
NOR	1.0	1.0	0.6	1.6	1.4	1.2	
SMX	1.0	4.6	1.6	4.9	4.5	1.3	
SPY	1.0	7.9	0.8	4.2	9.6	0.7	
AML	1.0	4.2	3.5	2.9	4.0	5.5	
ATOR	1.0	2.5	1.3	2.0	0.7	1.8	
VAL	1.0	4.6	1.0	6.1	10.1	6.1	
WAR	1.0	13.4	15.4	31.5	18.3	50.9	
VER	1.0	8.9	7.6	13.6	12.6	10.8	
COD	1.0	2.0	14.6	1.1	1.9	1.7	
MTHD	1.0	7.0	3.5	6.9	8.1	8.4	
EDDP	1.0	19.6	12.6	45.3	45.3	13.1	
TRAM	1.0	3.5	2.3	3.3	4.4	4.4	
O-DM-TRAM	1.0	13.6	1.7	2.6	2.8	5.4	
N-DM-TRAM	1.0	2.7	3.9	3.7	5.5	5.8	
CARB	1.0	2.4	1.4	2.3	2.2	3.5	
OXCARB	1.0	2.8	0.4	0.7	0.4	1.0	
DIA	1.0	1.9	6.0	2.0	2.7	5.9	
OXA	1.0	3.3	1.1	3.1	2.9	5.4	
ESC	1.0	6.2	9.2	13.2	12.1	20.2	
SER	1.0	3.1	2.1	3.5	5.6	3.6	
QUE	1.0	14.6	7.2	4.1	15.3	66.0	
ZOLP	1.0	1.7	4.9	4.9	4.5	1.3	
COC	1.0	5.1	3.2	4.5	8.7	4.4	
BE	1.0	1.5	0.9	2.4	1.4	1.2	
MDMA	1.0	4.2	1.7	3.5	4.3	2.2	
CAFF	1.0	1.9	2.3	2.9	2.3	1.3	
COT	1.0	2.0	2.0	3.3	3.1	2.9	
LOR	1.0	2.4	8.7	2.6	4.7	9.0	
DLOR	1.0	5.1	10.8	3.5	13.5	14.0	
TERB	1.0	1.7	10.9	3.0	5.9	17.1	
TOR	1.0	0.8	2.4	3.1	0.3	0.6	
		MIŠIĆ	ŠKRGE	GONADE	SRCE	BUBREZI	JETRA

Slika 27. Relativni faktori obogaćenja istraživanih farmaceutskih spojeva u škrgama, gonadama, srcu, bubrezima i jetri divljih riba izlovljenih u rijeci Savi na lokaciji Hrušćica. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Prema karakterističnim REF-ovima identificirano je nekoliko tipova FAS-ova. Najbrojniji su FAS-ovi s vrijednostima REF-a većim od 10 u barem jednom tkivu. Tu pripadaju azitromicin i njegovi metaboliti, valsartan, varfarin, verapamil, kodein, EDDP, *O*-demetil tramadol, escitalopram, kvetiapin, desloratadin i terbinafin. Za neke FAS-ove utvrđeno je preferentno nakupljanje u bubrežima (azitromicin, dekladinozil azitromicin, valsartan, EDDP i kokain), dok su drugi pokazali veći afinitet prema jetri (kvetiapin, varfarin, escitalopram i terbinafin), što je u skladu s prethodnim istraživanjima^{101,102}. Metaboliti loratadina, tramadola, kokaina i diazepama pokazali su sličan obrazac raspodjele kao i njihovi roditeljski spojevi. Nasuprot tome, demetilirani metaboliti azitromicina (*N'*- i *N*-demetil azitromicin) nisu slijedili isti obrazac raspodjele kao roditeljski spoj, a slično je ponašanje opaženo i kod metadona i njegovog metabolita EDDP-a. Zanimljivo je da je visoko bioakumulativni sertralina, čije vrijednosti BAF-a dostižu i do 504 L kg⁻¹, pokazao relativno niske REF vrijednosti (1,9 – 5,5) i relativno ujednačenu raspodjelu među tkivima, dok pojedini literaturni izvori navode izraženiju akumulaciju sertralina u bubrežima²², gonadama¹⁴² ili mozgu²³⁹.

4.4.4. Utjecaj metabolizma na biokoncentracijski potencijal u populaciji divljih riba

U modelnim pokusima sa zebričama (poglavlje 4.3.2. *Biokoncentracijski faktori i utjecaj biotransformacije*) pokazano je da metabolička transformacija može značajno utjecati na procjenu akumulacije FAS-ova u ribama. Pritom je pokazano da BCF-ovi koji su određeni samo na temelju praćenja roditeljskog spoja mogu dovesti do podcjenjivanja stvarnog stupnja bioakumulacije. Stoga, bitno je odrediti doprinos metabolizma FAS-ova u samoj ribi procijenjenom stupanju akumulativnosti nekog spoja. Iako je za potpuno razumijevanje doprinosa metaboličke transformacije bioakumulaciji FAS-ova najbolje primijeniti modelne pokuse u strogo kontroliranim uvjetima, važno je procijeniti značaj tih procesa i u uzorcima iz realnog okoliša, u kojima su ribe istovremeno izložene i roditeljskim FAS-ovima i njihovim metabolitima.

Da bi se ilustrirala moguća važnost metaboličke transformacije u procesu bioakumulacije, uspoređeni su relativni udjeli nekoliko odabranih roditeljskih spojeva (azitromicin, metadon, tramadol, diazepam, kokain i loratadin) i njihovih glavnih metabolita u vodi i četiri tipa ribljih tkiva (mišić, škrge, jetra i bubrezi) prikupljenih na lokaciji Hrušćica. Eksperimentalno određene raspodjele uspoređene su sa sastavom istraživanih spojeva koji je izračunat primjenom

jednostavnog raspodjelnog modela, a koji se temelji na pretpostavci da postoji pozitivna korelacija između BCF-a FAS-a i njihovih raspodjelnih koeficijenata (D_{ow}) (Tablica 25). Uporište za ovaj model predstavljaju rezultati modelnih pokusa sa zebričama u kojima je utvrđena značajna korelacija D_{ow} i BCF-ova (Slika 16).

Tablica 25. Relativni doprinosi (%) odabranih roditeljskih farmaceutskih spojeva i njihovih metabolita ukupnoj koncentraciji u riječnoj vodi i ribljim tkivima u usporedbi s jednostavnim raspodjelnim modelom na temelju literaturnih vrijednosti raspodjelnih koeficijenata D_{ow} . Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$\log D_{ow}$	$\bar{v}_v / \text{ng L}^{-1}$	Relativni doprinos (%)					Particijski model (%)
			Voda	Mišić	Škrge	Jetra	Bubrezi	
AZI	1,4	3789,6	67,9	83,1	77,8	84,9	85,7	97,6
DC-AZI	0,1	1672,8	29,9	7,1	7,6	8,0	12,2	2,2
N'-DM-AZI	0,29	83,6	1,5	5,9	6,0	4,9	1,3	0,2
N-DM-AZI	0,12	39,2	0,7	3,8	8,6	2,1	0,8	0,1
MTHD	2,8	44,4	28,0	70,1	48,6	63,7	31,1	90,9
EDDP	1,39	114,5	72,0	29,9	51,4	36,3	68,9	9,1
TRAM	0,52	692,0	35,8	66,3	60,7	60,6	62,7	63,8
O-DM-TRAM	0,07	1054,7	54,5	5,4	19,3	5,7	3,4	34,5
N-DM-TRAM	-0,54	188,1	9,7	28,3	20,0	33,6	33,9	1,7
DIA	2,9	11,8	1,3	18,1	11,9	21,3	17,2	24,5
OXA	1,5	913,8	98,7	81,9	88,1	78,7	82,8	75,5
COC	1,23	33,8	23,2	39,0	68,0	71,4	79,4	89,4
BE	-0,21	111,8	76,8	61,0	32,0	28,6	20,6	10,6
LOR	5,32	3,4	9,5	29,0	17,0	22,0	12,1	99,4
DLOR	2,14	32,5	90,5	71,0	83,0	78,0	87,9	0,6

\bar{v}_v , prosječna koncentracija FAS-a u uzorcima vode prikupljenim s lokacije Hrušćica, rijeka Sava

Za azitromicin je zabilježen visok doprinos metabolita ukupnoj koncentraciji u vodi s dominacijom metabolita dekladinozil azitromicina koji je poznat kao glavni okolišni transformacijski produkt azitromicina^{45,46}. Međutim, njegov se relativni doprinos znatno smanjio u svim tkivima, što se može objasniti njegovom značajno nižom vrijednošću $\log D_{ow}$. Nadalje, usporedba relativnog udjela dekladinozil azitromicina u tkivima (7,1 – 12,2 %) s udjelom procijenjenim na temelju raspodjelnog modela (2,2 %) upućuje da, nakon akumulacije u tkivo, dolazi do metaboličke transformacije azitromicina, što je u skladu s rezultatima ranije opisanog modelnog pokusa na zebričama. Isto tako, u ribljim tkivima su povišeni i relativni doprinosi demetiliranih metabolita azitromicina (*N'*- i *N*-demetil azitromicin), što također upućuje na mogućnost njihovog metaboličkog nastajanja nakon ulaska azitromicina u ribu.

Omjer koncentracija metadona i njegovog glavnog metabolita EDDP-a u riječnoj vodi (otprilike 1:3) odražavao je sastav koji je najčešće prisutan u komunalnim otpadnim vodama i

predstavlja tipični obrazac humanog metabolizma³⁹. U tom kontekstu, zanimljivo je primijetiti da je u većini ribljih tkiva, osim u bubrezima, omjer MTHD/EDDP bio obrnut. To se može objasniti jedino višim BAF-om metadona, što nije u skladu s procjenama temeljenim na raspodjelnim koeficijentima u ACD bazi podataka³⁷ ($\log D_{ow}$ (EDDP) = 4,4 i $\log D_{ow}$ (MTHD) = 2,8), prema kojima bi BAF za EDDP trebao biti značajno veći od BAF-a metadona. Budući da je BCF EDDP-a određen u modelnom pokusu izlaganja zebrica bio manji od 1, pretpostavka je da je vrijednost $\log D_{ow}$ za EDDP-a u bazi ACD precijenjena. Zbog toga je za modelni izračun korištena značajno niža procjena dobivena programom Chemaxon³⁶ ($\log D_{ow} = 1,39$). Primjenom tako korigiranog raspodjelnog koeficijenta, dobije se povećanje udjela EDDP-a u ribljim tkivima u odnosu na raspodjelni model što ukazuje da dio metadona metabolički prelazi u EDDP, a što je u skladu s rezultatima kroničnog izlaganja zebrica sekundarnom efluentu raspravljenim u poglavlju 4.3.4. *Biokoncentracija farmaceutskih spojeva u zebricama pri kroničnom izlaganju.*

Vrlo zanimljive odnose pokazala je analiza tramadola i njegovih metabolita. U riječnoj vodi prevladava glavni humani metabolit tramadola, *O*-demetil tramadol (54,5 %), dok je relativni udio *N*-demetil tramadola vrlo nizak (9,7 %). Takav sastav pokazuje da tramadol i njegovi metaboliti potječu primarno iz terapijske potrošnje³⁹. Udio tramadola u ribljim tkivima dva puta je veći nego u riječnoj vodi, što je u skladu s raspodjelnim modelom. Istodobno, udio *O*-demetil tramadola manji je u ribljim tkivima i do 10 puta (3,4 – 19,3 %), što je mnogo niže nego što predviđa raspodjelni model (34,5 %). To upućuje na njegov daljnji gubitak nakon unosa u organizam, a najvjerojatniji mehanizam je daljnja biotransformacija. Nažalost, najvjerojatniji metabolit, *N,O*-didemetil tramadol nije bio uključen u ove analize. Međutim, zabilježen je snažan porast udjela *N*-demetil tramadola u tkivima (20,0 – 33,9 %) u odnosu na vodu (9,7 %) i raspodjelni model (1,7 %) što ukazuje na njegovo metaboličko stvaranje u ribama djelomičnom transformacijom tramadola. Važno je napomenuti da su i modelni pokusi na zebricama pokazali da se, za razliku od humanog metabolizma, tramadol u ribama metabolizira gotovo isključivo u *N*-demetil tramadol.

Diazepam i oksazepam su dva od tri najčešće korištena anksiolitika koji se prema posljednjim podacima o potrošnji lijekova u Hrvatskoj¹ koriste otprilike u omjeru 1 : 10. Diazepam se u humanom organizmu učinkovito metabolizira u oksazepam³⁹, što potvrđuje i bilanca određena u riječnoj vodi s izraženom dominacijom koncentracije oksazepama od gotovo 99 %. Međutim, u ribljim tkivima udio diazepama značajno je veći (11,9 – 21,3 %),

nego u riječnoj vodi (1,3 %). Kako transformacija oksazepama u diazepam nije moguća, udio u tkivima ukazuje da je BAF diazepama značajno veći u odnosu na BAF oksazepama. Raspodjelni model u ribljem tkivu (24,5 %) sugerira da je određeni postotak akumuliranog diazepama metaboliziran, međutim, pri tome najvjerojatnije ne nastaje oksazepam. Naime, modelni pokusi na zeblicama pokazali su da je glavni metabolit diazepama u ribama temazepam koji nije bio uključen u ovo istraživanje.

Slično ponašanje kao što je opisano za DIA/OXA opaženo je i za LOR/DLOR. Loratadin je bio samo manjinski sastojak u riječnoj vodi (9,5 %), ali je njegov udio u ribljim tkivima, zbog razmjerno većeg BAF-a, veći i do 3 puta (12,1 – 29,0 %). Ipak, raspodjelni model sugerira da se značajan dio loratadina akumuliranog u ribama metabolizira u desloratadin koji u ribama dostiže udio od 71,0 % do 87,9 %.

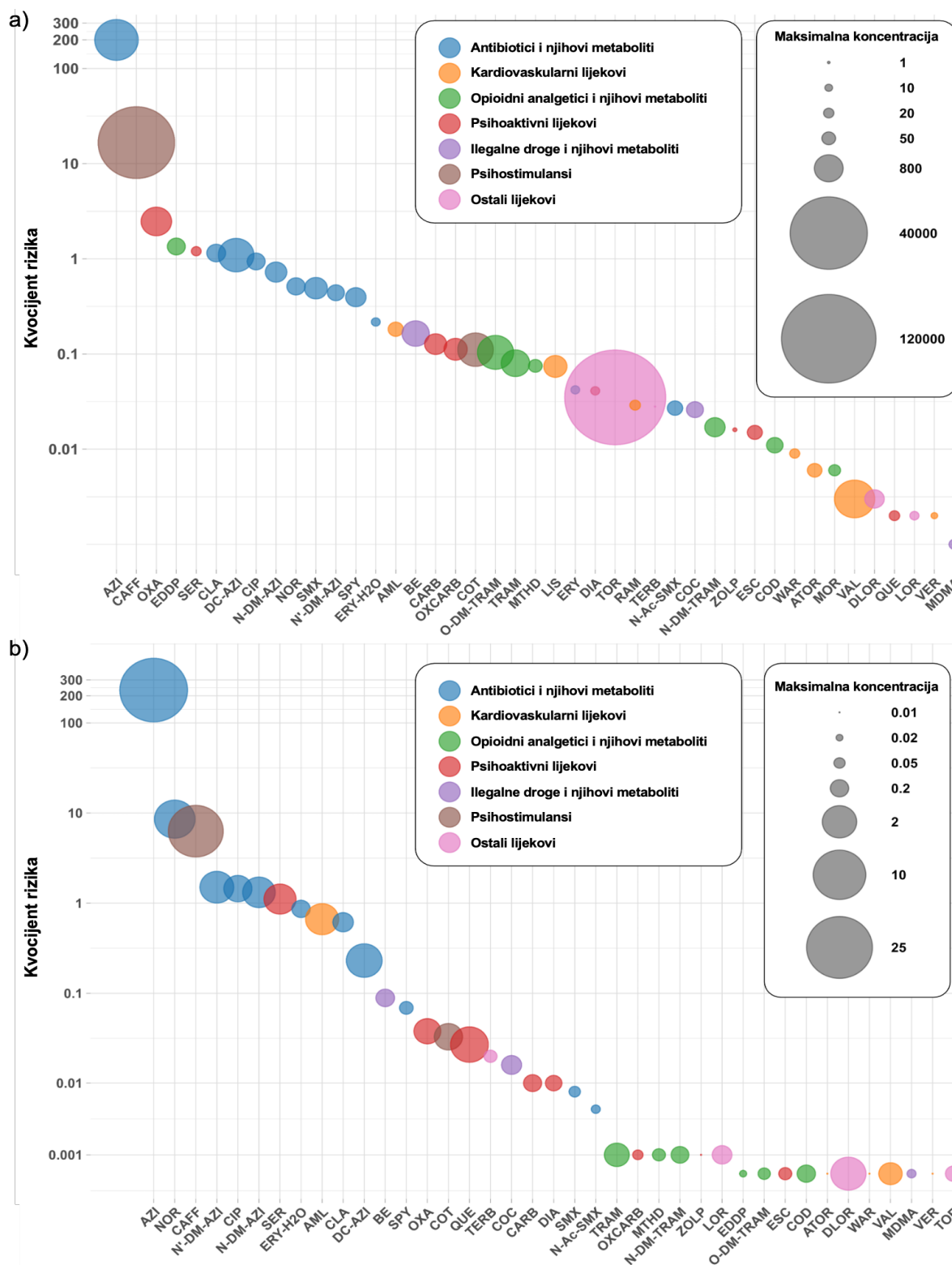
Kokain i benzoilekgonin detektirani su u ribljim tkivima u vrlo niskim koncentracijama, ali su ipak pokazali zanimljivu promjenu udjela u usporedbi s vodom. U riječnoj vodi omjer koncentracija BE/COC bio je oko 3,5 što je tipično za humani urin nakon konzumacije kokaina. U većini tkiva, osim u mišiću, taj je omjer bio obrnut te je udio kokaina postao dominantan (68,0 – 79,4 %). Budući da transformacija benzoilekgonina u kokain nije moguća, rezultati ukazuju da BAF kokaina mora biti znatno veći od BAF-a benzoilekgonina što je u skladu s omjerom njihovih D_{ow} vrijednosti. Udio kokaina prema raspodjelnom modelu trebao bi biti 89,4 %, dok su u tkivima udjeli bili od 66,0 % do 78,5 %, što potvrđuje pretpostavku o djelomičnoj transformaciji kokaina u benzoilekgonin u ribljem organizmu.

4.5. Ekotoksikološka procjena i prioritizacija farmaceutskih spojeva u rijeci Savi

Ekotoksikološka procjena odabranih FAS-ova u rijeci Savi provedena je određivanjem njihovih kvocijenata rizika (RQ) za uzorke vode i riba koji su izračunati kao omjer izmjerene maksimalne koncentracije u rijeci Savi i procijenjene koncentracije kod koje se ne očekuju štetni učinci (PNEC) za svaku od matrica. Dobiveni rezultati detaljno su prikazani u tablicama XX i XXI u poglavlju 8. *Dodatak*. Što se tiče riba, korištene su koncentracije FAS-ova u mišiću za koje je pokazano da se mogu koristiti kao zamjenski pokazatelji za koncentracije u cijelom tijelu ribe.

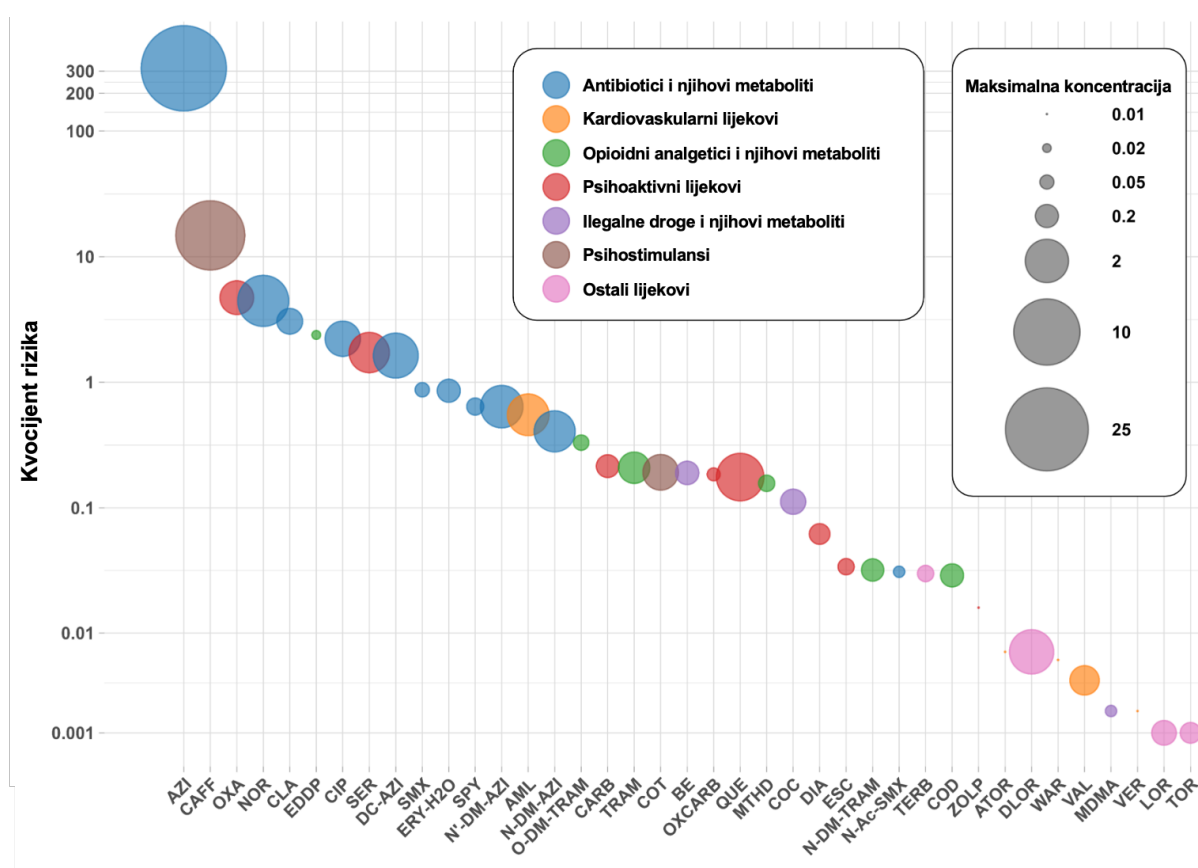
Dobivene RQ vrijednosti za ispitivane spojeve variraju u širokom rasponu, od 0,001 za MDMA do gotovo 200 za azitromicin. Visoka vrijednost RQ za azitromicin nije neobična s obzirom na to da se radi o makrolidnom antibiotiku s raširenom terapijskom primjenom u Hrvatskoj, uz prisutne proizvodne pogone za proizvodnju na širem području grada Zagreba, koji svoje otpadne vode ispuštaju u kanalizacijske sustave grada Zaprešića i Zagreba^{45,46}. Osim azitromicina koji daje najveći pojedinačni doprinos RQ vrijednosti, preporučenu graničnu vrijednosti (RQ = 1) premašivali su i kofein (16,6), oksazepam (2,5), EDDP (1,3), sertralin (1,2), klaritromicin (1,2) te dekladenozil azitromicin (1,1). Procijenjene vrijednosti RQ pokazuju da FAS-ovi, unatoč relativno niskom bioakumulacijskom potencijalu, predstavljaju značajnu potencijalnu opasnost za osjetljive organizme u ekosustavu rijeke Save.

Na slici 28, prikazani su izračunati RQ-i za vodu i ribu, poredani od najviše prema najnižoj vrijednosti, a iz prikaza je jasno vidljiva široka varijabilnost i relativna važnost različitih terapijskih kategorija FAS-ova. Budući da glavni stresori u sustavu rijeke Save pripadaju makrolidnim antibioticima (azitromicin i klaritromicin) i njihovim metabolitima, štetan se učinak može prije svega očekivati na populacijama fitoplanktona, osobito cijanobakterija, koje pokazuju najveću osjetljivost prema makrolidima^{210,240}.



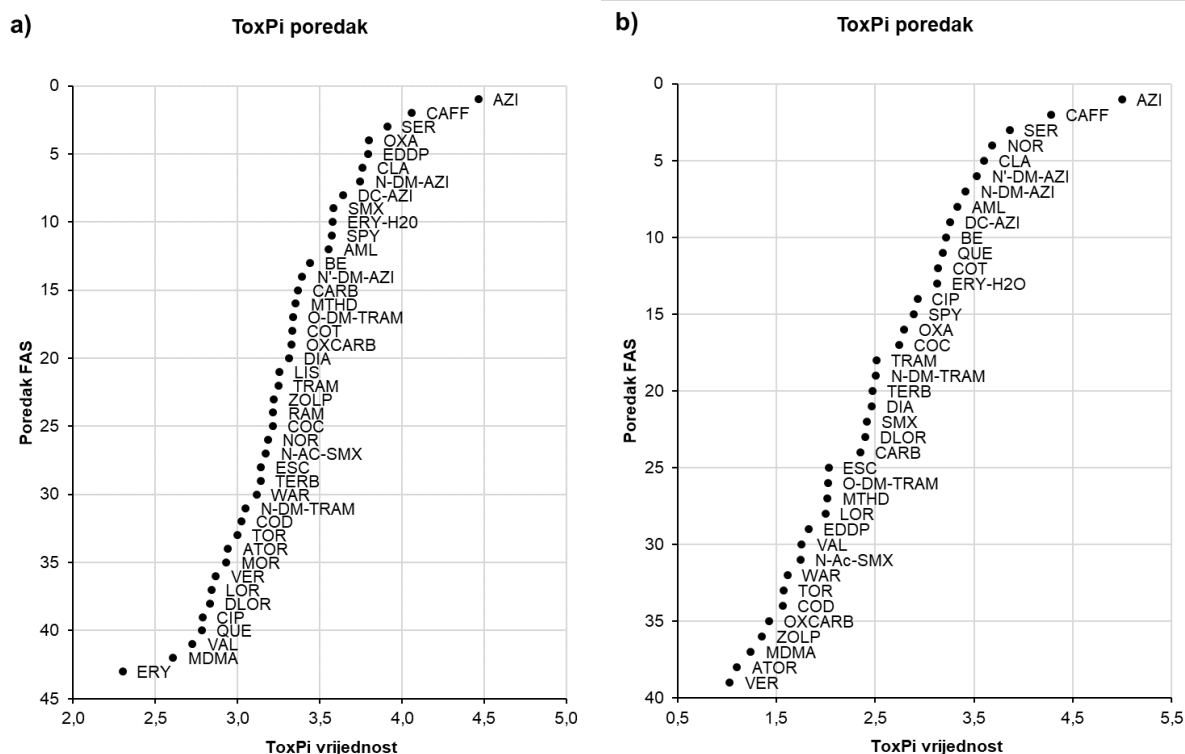
Slika 28. Ekotoksikološka analiza onečišćenja rijeke Save različitim kategorijama farmaceutskih spojeva na temelju izmjerene (a) maksimalne koncentracije u vodi i (b) maksimalne koncentracije u ribljem mišiću (PNEC vrijednosti preuzete su iz baze podataka NORMAN²⁰⁹). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Iz slike 28 vidljivo je kako su vrijednosti RQ izvedene iz koncentracija u riječnoj vodi bile osjetljiviji pokazatelj mogućeg rizika. Glavni razlog krije se u činjenici da je vrijednost $PNEC_{\text{riba}}$ u bazi podataka NORMAN²⁰⁹ izvedena iz teorijski izračunatih BAF-ova koji su često precijenjeni za lipofilne FAS-ove kao što su torasemid, verapamil, valsartan, desloratadin i atorvastatin. Kada se teorijski BAF-ovi zamijene s BAF-ovima određenim u ovom istraživanju (Tablica 24), obrazac poretka temeljen na vrijednosti RQ postaje vrlo sličan obrascu opaženom za vodenu matricu (Slika 29) što rezultira visokom korelacijom rezultata za te dvije matrice. Iako FAS-ovi ne spadaju u izrazito bioakumulativne spojeve, navedena korekcija naglašava važnost eksperimentalno određenih vrijednosti BAF-ova za pravilno predviđanje ponašanja i ekotoksikološkog značaja FAS-ova.



Slika 29. Ekotoksikološka analiza onečišćenja rijeke Save različitim kategorijama farmaceutskih spojeva na temelju izmjerene maksimalne koncentracije u mišiću ribe i korigiranih $PNEC$ vrijednosti za mišić, dobivenih iz $PNEC_{\text{voda}}$ vrijednosti za vodu i BAF vrijednosti za mišić. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

Osim određivanja kvocijenta rizika, primijenjen je i alternativni način prioritizacije istraživanih FAS-ova primjenom ToxPi pristupa²¹¹. Rezultati za dvije matrice, vodu i mišić ribe, prikazani su na slici 30 (Tablice XXII i XXIII u poglavlju 8. *Dodatak*). Prednost ToxPi pristupa u odnosu na RQ jest uključivanje kriterija učestalosti određivanja FAS-ova te raspona određenih koncentracija za usporedbu različitih FAS-ova.



Slika 30. Rangiranje istraživanih farmaceutskih spojeva u rijeci Savi na transektu od lokacije Otok Samoborski do lokacije Oborovo prema ToxPi vrijednostima izračunatim na temelju njihovih maksimalnih koncentracija u (a) vodi i (b) ribljem mišiću. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

ToxPi vrijednosti izračunate za uzorke vode i mišića riba varirale su od 2,302 do 4,466 odnosno od 1,030 do 5,000. Vrlo slično kao kod poretka prema RQ vrijednostima, prvorangirani FAS prema poretku ToxPi rezultata bio je azitromicin, a slijede ga kofein, sertralin, oksazepam, klaritromicin i EDDP. U pogledu različitih terapijskih skupina snažno dominiraju antibiotici, osobito makrolidi i njihovi metaboliti. Među visoko rangiranim FAS-ovima, nalaze se i neki psihoaktivni lijekovi, pri čemu su najistaknutiji sertralin i oksazepam. Kardiovaskularni lijekovi pokazali su umjereno visoke rezultate, a najviši rang među njima ima amlodipin. Nadalje, osim

EDDP-a, koji je bio rangiran kao peti po prioritetu, ostali spojevi iz skupine opioidnih analgetika bili su rangirani ispod 15. mjesta.

Treba naglasiti da su procjena rizika i prioritizacija FAS-ova provedene na cijelom skupu podataka, uzimajući u obzir najviše izmjerene koncentracije te stoga predstavljaju tzv. scenarij najnepovoljnijeg slučaja. Ekotoksikološka analiza manje onečišćenih lokacija (Otok Samoborski i Medsave) pokazuje, očekivano, manje dramatičnu sliku, pri čemu su sumarne vrijednosti RQ, dobivene zbrajanjem RQ za sve pojedinačne FAS-ove, manje od jedan. Važno je istaknuti i to da su takve sumarne RQ vrijednosti, dobivene na temelju analize odabrana 44 farmaceutska spoja, bile dosljedno blizu vrijednosti jedan na svim postajama uzorkovanja. Relativni doprinosi pojedinih terapijskih skupina ukupnoj toksičnosti uglavnom su ostali nepromijenjeni, pri čemu su antibiotici i kofein najviše doprinosili ukupnoj vrijednosti RQ. Nadalje, iako su istraživani FAS-ovi odabrani na temelju njihove visoke uporabe u Hrvatskoj¹, oni predstavljaju samo mali dio od više od 3000 FAS-ova koji su dopušteni za humanu i veterinarsku uporabu. Stoga, ukupna izloženost FAS-ovima zasigurno je mnogo veća, zbog čega bi se farmaceutsko onečišćenje trebalo smatrati značajnom prijetnjom kakvoći vode s mogućim utjecajem na živi svijet u rijeci Savi.

§ 5. ZAKLJUČAK

Farmaceutski aktivni spojevi (FAS-ovi) čine široku grupu sveprisutnih biološki aktivnih spojeva, različitih fizikalno-kemijskih svojstava, zbog čega predstavljaju veliki izazov u analitičkom određivanju u uzorcima iz okoliša. Dodatan doprinos tome su i relativno niske koncentracije većine FAS-ova u okolišu zbog čega je selektivna, osjetljiva, točna i precizna analitička metoda imperativ svakog istraživanja okolišnih uzoraka.

U ovom doktorskom radu razvijene su analitičke metode za multirezidualno određivanje tragova odabrana 44 farmaceutski aktivna spoja i njihovih metabolita u površinskoj vodi i ribljim tkivima uporabom vezanog sustava tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i tandemne spektrometrije masa s trostrukim kvadrupolom s ciljem procjene bioakumulacije ovih, sve prisutnijih, zagađivala u slatkovodnim ribama. Razvijen je i optimiran protokol obrade uzoraka površinske vode i ribljih tkiva s ciljem postizanja bolje osjetljivosti i selektivnosti metode postupcima obogaćivanja uzoraka uz istovremeno smanjenje prisutnosti interferirajućih tvari. Optimirana metoda ekstrakcije farmaceutski aktivnih spojeva iz uzoraka vode uključivala je obogaćivanje uzorka na polimernom hidrofilno-lipofilnom sorbensu u kiselim uvjetima, a rezultirala je zadovoljavajućim validacijskim parametrima poput analitičkih povrata, točnosti i preciznosti. Nadalje, nova razvijena metoda ekstrakcije farmaceutskih spojeva iz uzoraka ribljeg tkiva, zasnovana na ultrazvučno potpomognutoj ekstrakciji metanolom s dodatkom lužine, omogućila je visoke analitičke povrate ekstrakcije iz ribljeg tkiva, dok je kombinacija krioprecipitacije, filtracije ekstrakta razrijeđenog u vodi i frakcionacije na Oasis HLB kolonicama učinkovito smanjila prisutnost interferencija, a time i supresije signala.

Optimirane metode za analizu vode i ribljeg tkiva pokazale su se, u postupku validacije, izrazito pouzdanima i robusnima za analizu tragova 44 farmaceutskih spojeva te prikladnima za rutinske analize velikog broja različitih uzoraka. Razvoj ovih metoda zadovoljava ključan preduvjet za analizu okolišnih uzoraka s ciljem određivanja bioakumulacijskog potencijala, rasprostranjenosti i ekotoksikološke prioritizacije spojeva.

Budući da toksični učinci prvenstveno ovise o unutarnjoj koncentraciji farmaceutskih spojeva, razumijevanje mehanizama koji reguliraju bioakumulaciju složenih smjesa

farmaceutika u organizmima od ključne je važnosti. Stoga su razvijene metode primijenjene za sustavno istraživanje farmakokinetičkog ponašanja odabranih farmaceutskih spojeva u modelnom ribljem organizmu zebricama (lat. *Danio rerio*), ali i prisutnosti i rasprostranjenosti u vodenom okolišu, konkretno površinskoj vodi te tkivu divlje populacije riba rijeke Save na širem području grada Zagreba.

Rezultati ispitivanja farmakokinetičkog ponašanja 20 odabranih farmaceutskih spojeva u modelnim ribama zebricama pokazuju relativno brze kinetike akumulacije i depuracije za većinu spojeva, s iznimkom za makrolidni antibiotik azitromicin i antihistaminik desloratadin čije kinetike su značajno sporije. Rezultati određivanja biokoncentracijskih faktora upućuju da ispitivani farmaceutski spojevi uglavnom pripadaju skupini nisko do umjereno bioakumulativnih tvari, a među akumulativnijima se izdvajaju antidepresiv sertralin, desloratadin i anksiolitik diazepam. Neovisno o duljini izlaganja, postojanju kratkotrajnih akutnih izlaganja visokim koncentracijama ili organske tvari i drugih zagađivala (otpadna voda), dobiveni biokoncentracijski faktori su međusobno vrlo slični. Kod spojeva sa sporijom kinetikom, postoje određene razlike u trenucima akutnih kroničnih izlaganja, međutim nakon određenog vremena uspostavlja se ravnoteža i za te spojeve.

Istraživanje je također pokazalo da metaboličke transformacije farmaceutskih spojeva u ribama mogu značajno utjecati na prividni bioakumulacijski potencijal, pri čemu nastali metaboliti, zbog duljeg poluvremena depuracije i moguće farmakološke aktivnosti, mogu predstavljati važan ekotoksikološki rizik. Također, uočene su razlike između metabolizma pojedinih farmaceutskih spojeva u humanom i ribljem organizmu što naglašava potrebu za daljnjim detaljnijim istraživanjima metabolizma tih spojeva u ribama u kontroliranim laboratorijskim uvjetima.

Usporedbe eksperimentalnih rezultata biokoncentracijskih faktora i predviđanja postojećih teorijskih modela ukazuju na potrebu njihove dorade na temelju novih eksperimentalnih podataka radi pouzdanije procjene ekotoksikološkog rizika. Trenutačno dostupni teorijski modeli za predviđanja često ne uzimaju u obzir utjecaj biotransformacije ili precjenjuju biokoncentraciju ionizirajućih organskih spojeva na temelju fizikalno-kemijskih parametara koji pretpostavljaju lipofilnost molekula što uzrokuje značajne razlike u odnosu na eksperimentalne podatke.

Rezultati istraživanja prisutnosti i rasprostranjenosti farmaceutskih spojeva u rijeci Savi potvrdili su sveprisutnost farmaceutskih spojeva, kako u uzorcima riječne vode, tako i u

uzorcima različitih tkiva populacija divljih riba. Koncentracije farmaceutskih spojeva u riječnoj vodi rijeke Save na širem području Zagreba u pravilu su ispod $0,5 \mu\text{g L}^{-1}$ s iznimkom za azitromicin i njegov metabolit dekladinozil azitromicin, antihipertenziv valsartan, opioidni analgetik tramadol i njegov metabolit *O*-demetil tramadol, anksiolitik oksazepam, metabolit kokaina benzoilekgonin, stimulans kofein, kotinin i diuretik torasemid. U uzorcima ribljeg tkiva, koncentracije su reda veličine nekoliko desetaka do stotina $\mu\text{g kg}^{-1}$, a unutar iste lokacije prosječne koncentracije su slijedile rastući redosljed: mišić < škrge < gonade < srce < jetra < bubreg. Koncentracije u uzorcima jasno su prikazivale prostornu raspodjelu prema lokacijama uzorkovanja na rijeci Savi, pri čemu su povišene koncentracije određene u neposrednoj blizini ispusta otpadnih voda, posebice na lokaciji Hrušćica u blizini ispusta otpadne vode grada Zagreba te na lijevoj obali lokacije Zaprešić u blizini ispusta otpadne vode grada Zaprešića.

Bioakumulacijski faktori određeni za pojedina riblja tkiva potvrdili su nisku do umjerenu bioakumulativnost farmaceutskih spojeva. Korelacijom rezultata iz modelnih pokusa i divlje populacije riba utvrđeno je da su faktori bioakumulacije u mišićnom tkivu dobar pokazatelj ukupne biokoncentracije u ribi, a da su tkiva poput škrge, jetre i bubrega pogodnija za biomonitoring zbog veće relativne akumulacije spojeva, ali i za praćenje lokacijsko specifičnih otisaka. Velika podudarnost između terenski određenih bioakumulacijskih i eksperimentalno dobivenih biokoncentracijskih faktora upućuje na to da je glavni mehanizam akumulacije biokoncentracija iz riječne vode. Također, na testiranim ribama različitog trofičkog statusa nije zamijećen utjecaj biomagnifikacije, kao ni utjecaj starosti i spola. Uključivanje metabolita i transformacijskih produkata u analizu dodatno je naglasilo važnost biotransformacije u procesu biokoncentracije te potvrdilo nepodudaranja teorijskih modela s realnim stanjem.

U konačnici, na temelju rezultata iz rijeke Save provedene su procjene rizika i prioritizacija farmaceutskih spojeva, pri čemu su kao najrizičnija farmaceutska zagađivala u rijeci Savi identificirani antibiotici, psihoaktivne tvari i opioidni analgetici. Od pojedinačnih spojeva, posebno se ističu azitromicin, kofein, oksazepam, EDDP, sertralin i klaritromicin koji, prema kriterijima učestalosti detekcije, visokim koncentracijama i utjecaju na sam organizam, predstavljaju ekotoksikološki rizik za vodene organizme u rijeci Savi. Svakako treba imati na umu da je provedena procjena rizika i prioritizacija u obzir uzela samo 44 ispitivana farmaceutska spoja koji čine mali udio u ukupno više od 3000 trenutačno odobrenih i korištenih farmaceutskih spojeva u humanoj i veterinarskoj medicini. Stoga, stvarna razina izloženosti

zasigurno je znatno veća te je moguće da postoje i drugi farmaceutski spojevi koji bi po ovim kriterijima trebali biti prioritizirani, a nisu bili zahvaćeni ovim istraživanjem.

§ 6. POPIS OZNAKÂ, KRATICÂ I SIMBOLÂ

D_{ow} – korigirani koeficijent raspodjele oktanol-voda
 k_a – konstanta brzine akumulacije
 pK_a – negativni logaritam konstante disocijacije kiseline
 k_d – konstanta brzine depuracije
 k_m – konstanta brzine metaboličke transformacije
 K_{ow} – koeficijent raspodjele oktanol-voda
 $t_{1/2}$ – poluvrijeme
1OH-ZOLP – 4-(hidroksimetil)fenil zolpidem
2OH-ZOLP – 6-hidroksimetil zolpidem
3OH-DLOR – 3-hidroksi desloratadin
5OH-DLOR – 5-hidroksi desloratadin
6OH-DLOR – 6-hidroksi desloratadin
AML – amlodipin
AMOX – amoksicilin
ATK – anatomsko-terapijsko-kemijska
ATOR – atorvastatin
ATOR-LAC – 2-hidroksi atorvastatin lakton
AZI – azitromicin
BAF – bioakumulacijski faktor
BCF – biokoncentracijski faktor
BE – benzoilekgonin
BMF – biomagnifikacijski faktor
C6G – kodein-6-glukuronid
CAFF – kofein
CARB – karbamazepin
CARB-EP – 10,11-epoksi karbamazepin
CIP – ciprofloksacin
CLA – klaritromicin

COC – kokain
COD – kodein
COT – kotinin
DC-AZI – dekladinozil azitromicin
DC-CLA – dekladinozil klaritromicin
DDD – definirana dnevna doza
DIA – diazepam
DLOR – desloratadin
DM-CLA – *N*-demetil klaritromicin
d-SPE – disperzivna ekstrakcija na čvrstoj fazi
EDDP – 2-etilidien-1,5-dimetil-3,3-difenilpirolidin
EMDP – 2-etil-5-metil-3,3-difenil-1-pirolin
ERY – eritromicin
ERY-H₂O – bezvodni eritromicin
ESC – escitalopram
ESI – ionizacija elektroraspršenjem
FAS – farmaceutski aktivni spoj
GD – granica detekcije
GK – granica kvantifikacije
GPC – gel propusna kromatografija
H – Hrušćica, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi
HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
IS – izotopno obilježeni analozi farmaceutski aktivnih spojeva (surogati)
LC – tekućinska kromatografija
LC-MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i spektrometrije masa
LC-MS/MS – vezani sustav tekućinske kromatografije i tandemne spektrometrije masa
LIS – lizinopril
LLE – ekstrakcija tekuće-tekuće
LOR – loratadin
M – Medsave, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi
M3G – morfin-3-glukuronid
M6G – morfin-6-glukuronid

MDMA – 3,4-metilen-dioksimetamfetamin
MOR – morfin
MRM – tehnika praćenja višestrukih reakcijskih tranzicijskih iona
MS – spektrometrija masa
MS/MS – tandemna spektrometrija masa
MTHD – metadon
N-Ac-SMX – *N*-acetil sulfametoksazol
N-DM-AZI – *N*-demetil azitromicin
N'-DM-AZI – *N'*-demetil azitromicin
N-DM-TRAM – *N*-demetil tramadol
NOR – norfloksacin
norCOD – *N*-demetil kodein
norDIA – demetil diazepam
norSER – *N*-demetil sertralin
norVER – *N*-demetil verapamil
O – Oborovo, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi
O-DM-TRAM – *O*-demetil tramadol
O-DM-VER – *O*-demetil verapamil
OECD – Organizacija za ekonomsku suradnju i razvoj
OH-CARB – 3-hidroksi karbamazepin
OH-CLA – 14-hidroksi klaritromicin
OH-WAR – 10-hidroksi varfarin
*o*OH-ATOR – *o*-hidroksi atorvastatin
OXA – oksazepam
OXAG – oksazepam glukuronid
OXCARB – okskarbazepin
OZ – druga organska zagađivala
PCA – analiza glavnih komponenti
PLE – ekstrakcija potpomognuta visokim tlakom
PNEC – predviđena koncentracija bez učinka
*p*OH-ATOR – *p*-hidroksi atorvastatin
PTFE – politetrafluoroetilen

QqQ – MS analizator s trostrukim kvadrupolom
QUE – kvetiapin
RAM – ramipril
RAM-COOH – ramiprilat
REF – relativni faktor obogaćenja
RQ – kvocijent rizika
RSD – relativna standardna devijacija
S – Otok Samoborski, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi
SGC – kolonska kromatografija sa silika gel stacionarnom fazom
SD – standardna devijacija
SE – sekundarni efluent, pročišćena otpadna voda
SER – sertralin
SERG – sertralin glukuronid
SER-KET – sertralin keton
SMX – sulfametoksazol
SPE – ekstrakcija na čvrstoj fazi
SPY – sulfapiridin
sur. – suradnici
TEM – temazepam
TERB – terbinafin
TOR – torasemid
ToxPi – indeks toksikološke prioriteta
TRAM – tramadol
UAE – ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom
UHPLC – tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti
US – unutarnji standardi
VAL – valsartan
VER – verapamil
VER D617 – verapamil metabolit D-617
WAR – varfarin
Z – Zaprešić, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi
ZD – Zaprešić, desna obala, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi

ZL – Zaprešić, lijeva obala, lokacija uzorkovanja na rijeci Savi

ZOLP – zolpidem

ZOLP-COOH – zolpidem fenil-4-karboksilna kiselina

§ 7. LITERATURNI IZVORI

1. <https://www.halmed.hr/Promet-proizvodnja-i-inspekcija/Promet/Potrosnja-lijekova/Izvjescia-oprometu-lijekova/> (preuzeto 26. prosinca 2025.)
2. R. Kanda, P. Griffin, H. A. James i J. Fothergill, *J. Environ. Monit.* **5** (2003) 823–830.
3. B. Petrie, R. Barden i B. Kasprzyk-Hordern, *Water Res.* **72** (2015) 3–27.
4. M. Mezzelani, S. Gorbi i F. Regoli, *Mar. Environ. Res.* **140** (2018) 41–60.
5. R. Moreno-González, S. Rodríguez-Mozaz, M. Gros, D. Barceló i V. M. León, *Environ. Res.* **138** (2015) 326–344.
6. T. S. Oliveira, M. Murphy, N. Mendola, V. Wong, D. Carlson i L. Waring, *Sci. Total Environ.* **518–519** (2015) 459–478.
7. I. Krizman-Matasic, P. Kostanjevecki, M. Ahel i S. Terzic, *J. Chromatogr. A.* **1533** (2018) 102–111.
8. D. Muir, D. Simmons, X. Wang, T. Peart, M. Villella, J. Miller i J. Sherry, *Sci. Rep.* **7** (2017) 16999.
9. T. aus der Beek, F. A. Weber, A. Bergmann, S. Hickmann, I. Ebert, A. Hein i A. Küster, *Environ. Toxicol. Chem.* **35** (2016) 823–835.
10. C. G. Daughton, *Sci. Total Environ.* **562** (2016) 391–426.
11. T. H. Miller, N. R. Bury, S. F. Owen, J. I. MacRae i L. P. Barron, *Environ. Pollut.* **239** (2018) 129–146.
12. R. Álvarez-Ruiz i Y. Picó, *Trends Environ. Anal. Chem.* **25** (2020) e00082.
13. K. Grabicová, R. Grabic, G. Fedorova, J. Kolářová, J. Turek, B. W. Brooks i T. Randák, *Environ. Pollut.* **261** (2020) 114150.
14. M. C. Gómez-Regalado, J. Martín, J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso i A. Zafra-Gómez, *Sci. Total Environ.* **861** (2023) 160638.
15. T. Brodin, S. Piovano, J. Fick, J. Klaminder, M. Heynen i M. Jonsson, *Phil. Trans. R. Soc. B.* **369** (2014) 20130580.
16. J. Liu, G. Lu, Z. Zhang, Y. Bao, F. Liu, D. Wu i Y. Wang, *Environ. Sci. Process. Impacts.* **17** (2015) 54–61.
17. T. Brodin, J. Nordling, A. Lagesson, J. Klaminder, G. Hellström, B. Christensen i J. Fick, *J. Toxicol. Environ. Health A.* **80** (2017) 963–970.
18. R. van der Oost, J. Beyer i N. P. E. Vermeulen, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **13** (2003) 57–149.

19. L. Gao, Y. Shi, W. Li, J. Liu i Y. Cai, *J. Environ. Monit.* **14** (2012) 1248–1255.
20. J. Liu, G. Lu, Z. Xie, Z. Zhang, S. Li i Z. Yan, *Sci. Total Environ.* **511** (2015) 54–62.
21. S. R. de Solla, È. A. M. Gilroy, J. S. Klinck, L. E. King, R. McInnis, J. Struger, S. M. Backus i P. L. Gillis, *Chemosphere.* **146** (2016) 486–496.
22. K. Grabicová, R. Grabic, G. Fedorova, J. Fick, D. Cerveny, J. Kolarova, J. Turek, V. Zlabek i T. Randak, *Water Res.* **124** (2017) 654–662.
23. H. Kim, I. Lee i J. Oh, *Sci. Total Environ.* **579** (2017) 940–949.
24. C. G. Franks, D. W. Pearce i S. B. Rood, *Environ. Manag.* **63** (2019) 136–147.
25. M. Petrović, M. D. Hernando, M. S. Díaz-Cruz i D. Barceló, *J. Chromatogr. A.* **1067** (2005) 1–14.
26. V. Pérez-Fernández, L. M. Rocca, P. Tomai, S. Fanali i A. Gentili, *Anal. Chim. Acta.* **983** (2017) 9–41.
27. S. Knoll, T. Rösch i C. Huhn, *Anal. Bioanal. Chem.* **412** (2020) 6149–6165.
28. B. Huerta, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barceló, *Anal. Bioanal. Chem.* **404** (2012) 2611–2624.
29. A. Puckowski, K. Mioduszevska, P. Łukaszewicz, M. Borecka, M. Caban, J. Maszkowska i P. Stepnowski, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **127** (2016) 232–255.
30. M. C. Gómez-Regalado, L. Martín-Pozo, J. Martín, J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso i A. Zafra-Gómez, *Molecules.* **27** (2022) 7569.
31. I. Yakubu, T. F. T. Omar, A. Ghazali i O. M. Chuan, *J. Sustainability Sci. Manage.* **20** (2025) 1320–1343.
32. B. Huerta, A. Jakimska, M. Gros, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barceló, *J. Chromatogr. A.* **1288** (2013) 63–72.
33. K. Grabicová, A. V. Staňová, O. K. Uzun, A. Borik, T. Randak i R. Grabic, *Anal. Chim. Acta.* **1022** (2018) 53–60.
34. B. Subedi, M. A. Mottaleb, C. K. Chambliss i S. Usenko, *J. Chromatogr. A.* **1218** (2011) 6278–6284.
35. <https://go.drugbank.com/stats> (pristup 4. travnja 2026.)
36. <http://www.chemaxon.com/> (pristup 4. ožujka 2026.)
37. <http://www.chemspider.com/> (pristup 4. ožujka 2026.)
38. <https://data-explorer.oecd.org/> (pristup 26. prosinca 2025.)
39. R. C. Baselt, Disposition of toxic drugs and chemicals in man, 8. izdanje, Biomedical Publications, Kalifornija, 2008.
40. B. Reder-Hilz, M. Ullrich, M. Ringel, N. Hewitt, D. Utesch, F. Oesch i J. G. Hengstler, *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **369** (2004) 408–417.
41. M. D. Celiz, J. Tso i D. S. Aga, *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2473–2484.

42. E. Mulkiwicz, D. Wolecki, K. Świacka, J. Kumirska, P. Stepnowski i M. Caban, *Sci. Total Environ.* **791** (2021) 148251.
43. C. Trautwein, K. Kümmerer i J. W. Metzger, *Chemosphere.* **72** (2008) 442–450.
44. A. Bahlmann, W. Brack, R. J. Schneider i M. Krauss, *Water Res.* **57** (2014) 104–114.
45. I. Senta, I. Krizman-Matasic, S. Terzic i M. Ahel, *J. Chromatogr. A.* **1509** (2017) 60–68.
46. I. Senta, P. Kostanjevecki, I. Krizman-Matasic, S. Terzic i M. Ahel, *Environ. Sci. Technol.* **53** (2019) 7463–7472.
47. H. Zhang, D. Kato, M. O. Ihara, M. D. Jürgens, A. C. Johnson, J. Chen, H. Tanaka i M. Ihara, *Environ. Sci. Technol.* **57** (2023) 6444–6454.
48. C. E. Rodríguez-Rodríguez, D. Ramírez-Morales, M. Masis-Mora, J. R. Montiel-Mora, C. Soto-Garita, E. Araya-Valverde, J. C. Cambronero-Heinrichs, A. Sánchez-Melsió, S. Briceño-Guevara, M. Mendez-Rivera i J. L. Balcázar, *Chemosphere.* **339** (2023) 139746.
49. D. Ramírez-Morales, M. Masis-Mora, J. R. Montiel-Mora, M. Méndez-Rivera, J. A. Gutiérrez-Quirós, L. Brenes-Alfaro i C. E. Rodríguez-Rodríguez, *Chemosphere.* **346** (2024) 140443.
50. B. Huerta, S. Rodriguez-Mozaz, J. Lazorchak, D. Barcelo, A. Batt, J. Wathen i L. Stahl, *Sci. Total Environ.* **634** (2018) 542–549.
51. S. Fekadu, E. Alemayehu, R. Dewil i B. Van der Bruggen, *Sci. Total Environ.* **654** (2019) 324–337.
52. J. L. Wilkinson, A. B. A. Boxall, D. W. Kolpin, K. M. Y. Leung, R. W. S. Lai, C. Galbán-Malagón, A. D. Adell, J. Mondon, M. Metian, R. A. Marchant, A. Bouzas-Monroy, A. Cuni-Sanchez, A. Coors, P. Carriquiriborde, M. Rojo, C. Gordon, M. Cara, M. Moermond, T. Luarte, V. Petrosyan, Y. Perikhanyan, C. S. Mahon, C. J. McGurk, T. Hofmann, T. Kormoker, V. Iniguez, J. Guzman-Otazo, J. L. Tavares, F. G. De Figueiredo, M. T. P. Razzolini, V. Dougnon, G. Gbaguidi, O. Traoré, J. M. Blais, L. E. Kimpe, M. Wong, D. Wong, R. Ntchantcho, J. Pizarro, G. Ying, C. Chen, M. Páez, J. Martínez-Lara, J. Otamonga, J. Poté, S. A. Ifo, P. Wilson, S. Echeverría-Sáenz, N. Udikovic-Kolic, M. Milakovic, D. Fatta-Kassinou, L. Ioannou-Ttofa, V. Belušová, J. Vymazal, M. Cárdenas-Bustamante, B. A. Kassa, J. Garric, A. Chaumot, P. Gibba, I. Kunchulia, S. Seidensticker, G. Lyberatos, H. P. Halldórsson, M. Melling, T. Shashidhar, M. Lamba, A. Nastiti, A. Supriatin, N. Pourang, A. Abedini, O. Abdullah, S. S. Gharbia, F. Pilla, B. Chefetz, T. Topaz, K. M. Yao, B. Aubakirova, R. Beisenova, L. Olaka, J. K. Mulu, P. Chatanga, V. Ntuli, N. T. Blama, S. Sherif, A. Z. Aris, L. J. Looi, M. Niang, S. T. Traore, R. Oldenkamp, O. Ogunbanwo, M. Ashfaq, M. Iqbal, Z. Abdeen, A. O’Dea, J. M. Morales-Saldaña, M. Custodio, H. de la Cruz, I. Navarrete, F. Carvalho, A. B. Gogra, B. M. Koroma, V. Cerkvénik-Flajs, M. Gombač, M. Thwala, K. Choi, H. Kang, J. L. C. Ladu, A. Rico, P. Amerasinghe, A. Sobek, G. Horlitz, A. K. Zenker, A. C. King, J. Jiang, R. Kariuki, M. Tumbo, U. Tezel, T. T. Onay, J. B.

- Lejju, Y. Vystavna, Y. Vergeles, H. Heinzen, A. Pérez-Parada, D. B. Sims, M. Figy, D. Good i C. Teta, *PNAS*. **119** (2022) e2113947119.
53. N. Mheidli, A. Malli, F. Mansour i M. Al-Hindi, *Sci. Total Environ.* **851** (2022) 158302.
54. P. Vazquez-Roig, V. Andreu, C. Blasco i Y. Picó, *Sci. Total Environ.* **440** (2012) 24–32.
55. D. Sadutto, V. Andreu, T. Ilo, J. Akkanen i Y. Picó, *Environ. Pollut.* **271** (2021) 116353.
56. C. Elles-Pérez, M. Guzman-Tordecilla, Y. Ramos, M. Castillo-Ramírez, A. Moreno-Ríos, C. Garzón-Rodríguez i J. Rojas-Solano, *Heliyon*. **10** (2024) e39005.
57. C. Martínez-Megías, A. Arenas-Sánchez, D. Manjarrés-López, S. Pérez, Y. Sorlano, Y. Picó i A. Rico, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **31** (2024) 14593–14609.
58. M. Mezzelani, S. Gorbi, Z. Da Ros, D. Fattorini, G. d’Errico, M. Milan, L. Bargelloni i F. Regoli, *Mar. Environ. Res.* **121** (2016) 31–39.
59. C. Y. Ojemaye i L. Petrik, *Environ. Pollut.* **252** (2019) 562–572.
60. R. Zhang, K. Yu, A. Li, Y. Wang, C. Pan i X. Huang, *Sci. Total Environ.* **704** (2020) 135288.
61. S. Martínez-Morcillo, J. L. Rodríguez-Gil, J. Fernández-Rubio, S. Rodríguez-Mozaz, M. P. Míguez-Santiyán, M. E. Valdes, D. Barceló i Y. Valcárcel, *Int. J. Hyg. Environ. Health.* **223** (2020) 10–21.
62. C. G. Daughton i T. A. Ternes, *Environ. Health Perspect.* **107** (1999) 907–938.
63. T. Heberer, *Toxicol. Lett.* **131** (2002) 5–17.
64. D. W. Kolpin, E. T. Furlong, M. T. Meyer, E. M. Thurman, S. D. Zaugg, L. B. Barber i H. T. Buxton, *Environ. Sci. Technol.* **36** (2002) 1202–1211.
65. K. Fent, A. A. Weston i D. Caminada, *Aquat. Toxicol.* **76** (2006) 122–159.
66. A. B. A. Boxall, M. A. Rudd, B. W. Brooks, D. J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J. P. Staveley, T. Verslycke, G. T. Ankley, K. F. Beazley, S. E. Belanger, J. P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P. C. Deleo, S. D. Dyer, J. F. Ericson, F. Gagné, J. P. Giesy, T. Guoin, L. Hallstorm, M. V. Karlsson, D. G. J. Larsoon, J. M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. McLaughlin, M. E. McMaster, R. D. Meyerhoff, R. Moore, J. L. Parrott, J. R. Snape, R. Murray-Smith, M. R. Servos, P. K. Sibley, J. O. Straub, N. D. Szabo, E. Topp, G. R. Tetreault, V. L. Trudeau i G. Van der Kraak, *Environ. Health Perspect.* **120** (2012) 1221–1229.
67. Directive of the European Parliament and of the Council amending Directive 2000/60/EC establishing a framework for Community action in the field of water policy, Directive 2006/118/EC on the protection of groundwater against pollution and deterioration and Directive 2008/105/EC on environmental quality standards in the field of water policy, Brussels, 2025.
68. Selection of substances for the 5th Watch List under the Water Framework Directive, Publications Office of the European Union, Luxembourg, 2025.

69. S. Groumnitz i D. Jungmann, Pharmaceuticals in the Environment, Update for the period 2017–2020, German Environment Agency, Dresden, 2021.
70. R. Hernández-Tenorio, E. González-Juárez, J. L. Guzmán-Mar, L. Hinojosa-Reyes i A. Hernández-Ramírez, *J. Hazard. Mater. Adv.* **8** (2022) 100172.
71. P. Y. Nguyen, G. Carvalho, M. A. M. Reis i A. Oehmen, *Water Res.* **188** (2021) 116446.
72. J. L. Zhao, Y. S. Liu, W. R. Liu, Y. X. Jiang, H. C. Su, Q. Q. Zhang, X. W. Chen, Y. Y. Yang, J. Chen, S. S. Liu, C. G. Pan, G. Y. Huang i G. G. Ying, *Environ. Pollut.* **198** (2015) 15–24.
73. H. Waldetoft, B. Esfahani, T. Viktor i O. M. Karlsson, *J. Environ. Res.* **79** (2023) 86–101.
74. J. Watkinson, E. J. Murby, D. W. Kolpin i S. D. Costanzo, *Sci. Total Environ.* **407** (2009) 2711–2723.
75. E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Bagnati, M. Melis i R. Fanelli, *J. Hazard. Mater.* **179** (2010) 1042–1048.
76. B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale i A. J. Guwy, *J. Chromatogr. A.* **1161** (2007) 132–145.
77. B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale i A. J. Guwy, *Water Res.* **42** (2008) 3498–3518.
78. Y. Yoon, J. Ryu, J. Oh, B. Choi i S. A. Snyder, *Sci. Total Environ.* **408** (2010) 636–643.
79. J. M. Conley, S. J. Symes, S. A. Kindelberger i S. M. Richards, *J. Chromatogr. A.* **1185** (2008) 206–215.
80. J. M. Conley, S. J. Symes, M. S. Schorr i S. M. Richards, *Chemosphere.* **73** (2008) 1178–1187.
81. A. K. Richardson, S. Stürzenbaum, D. A. Cowan, D. J. Neep i L. P. Barron, *Environ. Sci. Processes Impacts.* **28** (2026) 42–55.
82. O. Malev, M. Lovrić, D. Stipaničev, S. Repec, D. Martinović-Weigelt, D. Zanella, T. Ivanković, V. Sindičić Đuretec, J. Barišić, M. Li i G. Klobučar, *Environ. Pollut.* **266** (2020) 115162.
83. N. Nakada, K. Komori, Y. Suzuki, C. Konishi, I. Houwa i H. Tanaka, *Water Sci. Technol.* **56** (2007) 133–140.
84. J. M. Castaño-Ortiz, R. Gil-Solsona, N. Ospina-Álvarez, J. D. Alcaraz-Hernández, M. Ferré, V. M. León, D. Barceló, L. H. M. L. M. Santos i S. Rodríguez-Mozaz, *Sci. Total Environ.* **906** (2024) 167467.
85. B. Du, S. P. Haddad, A. Luek, W. C. Scott, G. N. Saari, S. R. Burket, C. S. Breed, M. Kelly, L. Broach, J. B. Rasmussen, C. K. Chambliss i B. W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* **35** (2016) 966–974.
86. E. Vulliet i C. Cren-Olivé, *Environ. Pollut.* **159** (2011) 2929–2934.
87. F. Regan i D. O’Flynn, Effect-based Monitoring for Pharmaceutical Pollution in Ireland, Dublin, 2025.
88. O. Murgatroyd, L. Petrik, C. Y. Ojemaye i D. Pillay, *Water.* **17** (2025) 2289.

89. Y. Weng, H. Yang, H. Chen, Y. Xu, X. Gu, Z. Zhao, M. Jin, Z. Mao, O. Zeng, J. Zhai i C. J. Martyniuk, *ACS EST Water*. **3** (2023) 520–531.
90. D. Kötke, J. Gandrass, C. P. M. Bento, C. S. S. Ferreira i A. J. D. Ferreira, *Heliyon*. **10** (2024) e34825.
91. C. L. Chitescu, G. Kaklamanos, A. I. Nicolau i A. A. M. L. Stolker, *Sci. Total Environ*. **532** (2015) 501–511.
92. L. Batt, T. M. Kincaid, M. S. Kostich, J. M. Lazorchak i A. R. Olsen, *Environ. Toxicol. Chem*. **35** (2016) 874–881.
93. B. Huerta, A. Jakimska, M. Llorca, A. Ruhí, G. Margoutidis, V. Acuña, S. Sabater, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barcelò, *Talanta*. **132** (2015) 373–381.
94. T. H. Miller, G. L. McEneff, R. J. Brown, S. F. Owen, N. R. Bury i L. P. Barron, *Sci. Total Environ*. **511** (2015) 153–160.
95. A. Mendoza, J. L. Rodríguez-Gil, S. González-Alonso, N. Mastroianni, M. López de Alda, D. Barceló i Y. Valcárcel, *Environ. Int*. **70** (2014) 76–87.
96. P. Arnnok, R. R. Singh, R. Burakham, A. Pérez-Fuentetaja i D. S. Aga, *Environ. Sci. Technol*. **51** (2017) 10652–10662.
97. I. Senta, I. Krizman, M. Ahel i S. Terzic, *J. Chromatogr. A*. **1425** (2015) 204–212.
98. M. Schultz, E. T. Furlong, D. W. Kolpin, S. L. Werner, H. L. Schoenfuss, L. B. Barber, V. S. Blazer, D. O. Norris i A. M. Vajda, *Environ. Sci. Technol*. **44** (2010) 1918–1925.
99. R. Tanoue, K. Nomiyama, H. Nakamura, J. Kim, T. Isobe, R. Shinohara, T. Kunisue i S. Tanabe, *Environ. Sci. Technol*. **49** (2015) 11649–11658.
100. J. Ramirez, M. A. Mottaleb, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *Anal. Chem*. **79** (2007) 3155–3163.
101. S. Liu, T. Bekele, H. Zhao, X. Cai i J. Chen, *Sci. Total Environ*. **631–632** (2018) 1398–1405.
102. L. Zhang, S. Du, D. Liu, D. Dong, W. Zhang i Z. Guo, *Sci. Total Environ*. **821** (2022) 153354.
103. M. A. Edwards, K. Kimbrough, N. Fuller, E. Davenport, M. Rider, A. Freitag, S. Regan, A. K. Leight, H. Burkart, A. Jacob i E. Johnson, *Environ. Monit. Assess*. **196** (2024) 345.
104. C. Salgado Costa, F. Bahl, G. S. Natale, T. M. Mac Loughlin, D. J. G. Marino, A. Venturino, S. Rodríguez-Mozaz i L. H. M. L. M. Santos, *Environ. Pollut*. **334** (2023) 122231.
105. T. F. T. Omar, A. Z. Aris, F. M. Yusoff i S. Mustafa, *Environ. Pollut*. **248** (2019) 763–773.
106. K. Grabicová, R. Grabic, M. Blaha, V. Kumar, D. Cerveny, G. Fedorova i T. Randak, *Water Res*. **72** (2015) 145–153.
107. D. Cerveny, R. Grabic, K. Grabicová, T. Randák, D. G. J. Larsson, A. C. Johnson, M. D. Jürgens, M. Tysklind, R. H. Lindberg i J. Fick, *Environ. Int*. **146** (2021) 106188.
108. B. Du, S. P. Haddad, W. C. Scott, C. K. Chambliss i B. W. Brooks, *Chemosphere*. **119** (2015) 927–934.

109. P. M. Ondarza, S. P. Haddad, E. Avigliano, K. S. B. Miglioranza i B. W. Brooks, *Sci. Total Environ.* **649** (2019) 1029–1037.
110. M. Duny, A. Cortéjade, L. Wiest, M. Nicolas i E. Vulliet, *J. Chromatogr. A.* **1720** (2024) 464778.
111. R. Tanoue, K. Nomiyama, H. Nakamura, T. Hayashi, J. Kim, T. Isobe, R. Shinohara i S. Tanabe, *J. Chromatogr. A.* **1355** (2014) 193–205.
112. B. Du, P. Perez-Hurtado, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *J. Chromatogr. A.* **1253** (2012) 177–183.
113. J. L. Sims, A. R. Cole, Z. S. Moran, C. M. Mansfield, B. Possamai, M. Rojo, R. S. King, C. W. Matson i B. W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* **43** (2024) 1894–1902.
114. S. N. Garcia, M. Foster, L. A. Constantine i D. B. Huggett, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **84** (2012) 207–211.
115. J. Ramirez, R. A. Brain, S. Usenko, M. A. Mottaleb, J. G. O'Donnell, L. L. Stahl, J. B. Wathen, B. D. Snyder, J. L. Pitt, P. Perez-Hurtado, L. L. Dobbins, B. W. Brooks i C. K. Chambliss, *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2587–2597.
116. H. Shaaban i A. Mostafa, *Toxicol. Rep.* **10** (2023) 1–10.
117. W. Brooks, C. K. Chambliss, J. K. Stanley, A. Ramirez, K. E. Banks, R. D. Johnson i R. J. Lewis, *Environ. Toxicol. Chem.* **24** (2005) 464–469.
118. Bioaccumulation Testing and Interpretation for the Purpose of Sediment Quality Assessment: Status and Needs (EPA/823/R-00/001), United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2000.
119. TSCA New Chemicals Program (NCP) Chemical Categories, United States Environmental Protection Agency, Washington, DC, 2010.
120. Commission Regulation No. 253/2011 amending Regulation (EC) No. 1907/2006 of the European Parliament and of the Council on the Registration, Evaluation, Authorisation and Restriction of Chemicals (REACH) as regards Annex XIII (Document 32011R0253), Official Journal of the European Union, 2011.
121. F. Chen, Z. Gong i B. C. Kelly, *J. Chromatogr. A.* **1383** (2015) 104–111.
122. K. E. Terechovs, A. J. Ansari, J. A. McDonald, S. J. Khan, F. I. Hai, N. A. Knott, J. Zhou i L. D. Nghiem, *Sci. Total Environ.* **650** (2019) 585–593.
123. C. Rendal, K. O. Kusk i S. Trapp, *Environ. Toxicol. Chem.* **30** (2011) 2395–2406.
124. A. Lagesson, J. Fahlman, T. Brodin, J. Fick, M. Jonsson, P. Byström i J. Klaminder, *Sci. Total Environ.* **568** (2016) 208–215.
125. J. Wang i P. R. Gardinali, *Environ. Toxicol. Chem.* **32** (2013) 1752–1758.
126. E. S. McCallum, E. Krutzelmann, T. Brodin, J. Fick, A. Sundelin i S. Balshine, *Sci. Total Environ.* **605–606** (2017) 578–588.

127. T. W. Valenti Jr., P. Perez-Hurtado, C. K. Chambliss i B. W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* **28** (2009) 2685–2694.
128. C. Pan, M. Yang, H. Xu, B. Xu, L. Jiang i M. Wu, *Chemosphere.* **205** (2018) 8–14.
129. M. Saaristo, A. Lagesson, M. G. Bertram, J. Fick, J. Klaminder, C. P. Johnstone, B. B. M. Wong i T. Brodin, *Sci. Total Environ.* **655** (2019) 1311–1320.
130. K. Nowakowska, J. Giebułtowicz, M. Kamaszewski, A. Adamski, H. Szudrowicz, T. Ostaszewska, U. Solarz-Dzięciołowska, G. Nałęcz-Jawecki, P. Wroczyński i A. Drobniewska, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **229** (2020) 108670.
131. D. Rebelo, A. T. Correia i B. Nunes, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **80** (2020) 103468.
132. C. Espinosa-Ruiz, S. Manuguerra, M. Morghese, J. M. García-Beltrán, M. Á. Esteban, M. Giuga, C. M. Messina i A. Santulli, *Fish Shellfish Immunol.* **111** (2021) 25–35.
133. M. Sóle, N. Montemurro i S. Pérez, *Chemosphere.* **277** (2021) 130283.
134. C. Trombini, J. Kazakova, A. Montilla-López, R. Fernández-Cisnal, M. Hampel, R. Fernández-Torres, M. Á. Bello-López, N. Abril i J. Blasco, *Environ. Res.* **200** (2021) 111396.
135. M. Mezzelani, L. Peruzza, G. d'Errico, M. Milan, S. Gorbi i F. Regoli, *Sci. Total Environ.* **860** (2023) 160465.
136. M. Nkoom, G. Lu, J. Liu i H. Dong, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **205** (2020) 111106.
137. C. Passignat, J. Flayac, R. Lerebourg i L. Minguez, *J. Hazard. Mater.* **482** (2025) 136628.
138. S. R. Burket, J. L. Sims, R. Dorman, N. Kemble, E. Brunson, J. A. Steevens i B. W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* **6** (2023) 1183–1189.
139. J. Zhao, E. T. Furlong, H. L. Schoenfuss, D. W. Kolpin, K. L. Bird, D. J. Feifarek, E. A. Schwab i G. Ying, *Environ. Sci. Technol.* **51** (2017) 4434–4444.
140. M. Lahti, J. Brozinski, A. Jylhä, L. Kronberg i A. Oikari, *Environ. Toxicol. Chem.* **30** (2011) 1403–1411.
141. M. E. Valdés, M. V. Amé, M. de los Angeles Bistoni i D. A. Wunderlin, *Sci. Total Environ.* **472** (2014) 389–396.
142. F. Chen, Z. Gong i B. C. Kelly, *Environ. Sci. Technol.* **51** (2017) 11085–11095.
143. V. Contardo-Jara, C. Lorenz, S. Pflugmacher, G. Nützmann, W. Kloas i C. Wiegand, *Aquat. Toxicol.* **105** (2011) 428–437.
144. Y. Nakamura, H. Yamamoto, J. Sekizawa, T. Kondo, N. Hirai i N. Tatarazako, *Chemosphere.* **70** (2008) 865–873.
145. J. W. Nicholas, B. Du, J. P. Berninger, K. A. Connors, C. K. Chambliss, R. J. Erickson, A. D. Hoffman i B. W. Brooks, *Environ. Toxicol. Chem.* **34** (2015) 1425–1435.
146. Y. Chen, J. L. Zhou, L. Cheng, Y. Y. Zheng i J. Xu, *Chemosphere.* **180** (2017) 467–475.

147. W. C. Scott, S. P. Haddad, G. N. Saari, C. K. Chambliss, J. L. Conkle, C. W. Matson i B. W. Brooks, *Chemosphere*. **229** (2019) 434–442.
148. L. E. Gómez-Martínez, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **60** (2011) 654–664.
149. T. H. Miller, N. R. Bury, S. F. Owen i L. P. Barron, *Chemosphere*. **183** (2017) 389–400.
150. M. Meredith-Williams, L. J. Carter, R. Fussell, D. Raffaelli, R. Ashauer i A. B. A. Boxall, *Environ. Pollut.* **165** (2012) 250–258.
151. Y. Liu, Y. Lv, Z. Huang, Y. Guan, J. Huang, J. Zhao i G. Ying, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **226** (2021) 112874.
152. K. Grabicová, R. H. Lindberg, M. Östman, R. Grabic, T. Randak, D. G. J. Larsson i Jerker Fick, *Sci. Total. Environ.* **488–489** (2014) 46–50.
153. C. Mejías, T. G. Fonseca, N. García-Criado, J. Martín, J. L. Santos, I. Aparicio i E. Alonso, *Molecules*. **29** (2024) 5478.
154. E. S. McCallum, A. Sundelin, J. Fick, A. Alanärrä, J. Klaminder, G. Hellström i T. Brodin, *Aquat. Toxicol.* **207** (2019) 170–178.
155. R. Tanoue, L. Margiotta-Casaluci, B. Huerta, T. J. Runnalls, K. Nomiyama, T. Kunisue, S. Tanabe i J. P. Sumpter, *Environ. Sci. Technol.* **51** (2017) 12825–12835.
156. G. C. Nallani, R. E. Edziyie, P. M. Paulos, B. J. Venables, L. A. Constantine i D. B. Huggett, *Environ. Toxicol. Chem.* **35** (2016) 593–603.
157. K. D. Daniels, M. Park, Z. Huang, A. Jia, G. S. Flores, H. K. Lee i S. A. Snyder, *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **50** (2020) 2271–2299.
158. D. Sadutto i Y. Pico, *Molecules*. **25** (2020) 5204.
159. S. D. Richardson i T. A. Ternes, *Anal. Chem.* **94** (2022) 382–416.
160. H. Martínez-Pérez-Cejuela i E. Gionfriddo, *Annu. Rev. Anal. Chem.* **18** (2025) 73–95.
161. O. V. Kuznetsova i A. R. Timerbaev, *Anal. Chim. Acta.* **1209** (2022) 339640.
162. A. D. Aouant i D. Hela, *Sustainability*. **17** (2025) 10025.
163. M. Xu, H. Huang, N. Li, F. Li, D. Wang i Q. Luo, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **175** (2019) 289–298.
164. B. J. A. Berendsen, I. J. W. Elbers i A. A. M. Stolker, *Food Addit. Contam.: Part A*. **28** (2011) 1657–1666.
165. D. Álvarez-Muñoz, B. Huerta, M. Fernandez-Tejedor, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barceló, *Talanta*. **136** (2015) 174–182.
166. N. G. Dodder, K. A. Maruya, P. L. Ferguson, R. Grace, S. Klosterhaus, M. J. La Guardia, G. G. Lauenstein i J. Ramirez, *Mar. Pollut. Bull.* **81** (2014) 340–346.
167. A. Serra-Compte, D. Álvarez-Muñoz, S. Rodríguez-Mozaz i D. Barceló, *Food Chem. Toxicol.* **104** (2017) 3–13.
168. Y. Yu i L. Wu, *Front. Environ. Sci. Eng.* **9** (2015) 475–481.

169. Foods of plant origin – Determination of pesticide residues using GC-MS and/or LC-MS/MS following acetonitrile extraction/partitioning and cleanup by dispersive SPE – QuEChERS-method (EN 15662:2008), European Committee for Standardization, Brussels, 2008.
170. K. Kim, Y. Choi, S. Mok, H. B. Moon i J. Jeon, *Food Chem.* **399** (2023) 133958.
171. S. C. Campanharo, A. F. B. da Silva, A. Bleuzen, J. Joaquim, M. da Silva, L. V. P. de Freitas, I. M. Assane, F. Pilarski i J. A. R. Paschoal, *Food Chem.* **405** (2023) 134852.
172. T. Diallo, Y. Makni, A. Lerebours, H. Thomas, T. Guérin i J. Parinet, *Food Chem.* **426** (2023) 136572.
173. M. E. Dasenaki i N. S. Thomaidis, *Anal. Chim. Acta.* **880** (2015) 103–121.
174. S. Chu i C. D. Metcalfe, *J. Chromatogr. A.* **1163** (2007) 112–118.
175. L. Mijangos, H. Ziarrusta, I. Zabaleta, A. Usobiaga, M. Olivares, O. Zuloaga, N. Etxebarria i A. Prieto, *Anal. Bioanal. Chem.* **411** (2018) 493–506.
176. R. Zhang, J. Pei, R. Zhang, S. Wang, W. Zeng, D. Huang, Y. Wang, Y. Zhang, Y. Wang i K. Yu, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **154** (2018) 27–35.
177. P. Steinbach i W. Schwack, *J. Chromatogr. A.* **1323** (2014) 28–38.
178. C. Baduel, J. F. Muellera, H. Tsaib i M. J. Gomez Ramosa, *J. Chromatogr. A.* **1426** (2015) 33–47.
179. S. Bayen, E. S. Estrada, G. Juhel i B. C. Kelly, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 5553–5558.
180. H. Xie, H. Hao, N. Xu, X. Liang, D. Gao, Y. Xu, Y. Gao, H. Tao i M. Wong, *Sci. Total Environ.* **659** (2019) 230–239.
181. T. H. Miller, K. T. Ng, S. T. Bury, S. E. Bury, N. R. Bury i L. P. Barron, *Environ. Int.* **129** (2019) 595–606.
182. E. López-García, C. Postigo i M. López de Alda, *Mar. Pollut. Bull.* **146** (2019) 985–992.
183. L. Boulard, P. Parrhysius, B. Jacobs, G. Dierkes, A. Wick, G. Buchmeier, J. Koschorreck i T. A. Ternes, *J. Chromatogr. A.* **1633** (2020) 461612.
184. D. P. Manjarrés, N. Montemurro i S. Pérez, *MethodsX.* **9** (2022) 101705.
185. Z. Yan, Y. Zhou, Y. Zhang i X. Zhang, *Int. J. Environ. Res. Public Health* **20** (2023) 2967.
186. N. Interino, R. Comito, P. Simoni, S. Franzellitti, G. Palladino, S. Rampelli, A. Mosendz, R. Gotti, A. Roda, M. Candela, E. Porru i J. Fiori, *Food Chem.* **425** (2023) 136453.
187. A. M. P. T. Pereira, A. Freitas, A. Pena i L. J. G. Silva, *Antibiotics.* **12** (2023) 913.
188. S. Royano, I. Navarro, A. de la Torre i M. Á. Martínez, *Chemosphere.* **368** (2024) 143759.
189. A. Becchi, M. Mantovani, M. Lasagni, E. Collina, S. Montano, P. Galli i F. Saliu, *Chemosphere.* **356** (2024) 141781.
190. V. W. O. Wanjeri, E. Okuku, J. C. Ngila, E. Waiyaki, J. K. Nyingib i P. G. Ndungu, *Environ. Sci.: Adv.* **4** (2025) 938.

191. N. Molina-Fernandez, C. Perez-Conde, S. Rainieri i J. Sanz-Landaluze, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **24** (2017) 10907–10918.
192. J. N. Brown, N. Paxéus, L. Förlin i D. G. J. Larsson, *Environ. Toxicol. Pharmacol.* **24** (2007) 267–274.
193. G. C. Nallani, P. M. Paulos, L. A. Constantine, B. J. Venables i D. B. Huggett, *Chemosphere.* **84** (2011) 1371–1377.
194. M. Dévier, P. Labadie, A. Togola i H. Budzinski, *Anal. Chim. Acta.* **657** (2010) 28–35.
195. M. Al-Ansari, A. Saleem, L. E. Kimpe, J. P. Sherry, M. E. McMaster, V. L. Trudeau i J. M. Blais, *Environ. Pollut.* **158** (2010) 2566–2571.
196. K. Wille, J. A. L. Kiebooms, M. Claessens, K. Rappé, J. Vanden Bussche, H. Noppe, N. Van Praet, E. De Wulf, P. Van Caeter, C. R. Janssen, H. F. De Brabander i L. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.* **400** (2011) 1459–1472.
197. M. J. Martínez Bueno, C. Boillot, D. Munaron, H. Fenet, C. Casellas i E. Gómez, *Anal. Bioanal. Chem.* **406** (2014) 601–610.
198. C. Caballo, M. D. Sicilia i S. Rubio, *Anal. Bioanal. Chem.* **407** (2015) 4721–4731.
199. J. M. Peña-Herrera, N. Montemurro, D. Barceló i S. Pérez, *Talanta.* **199** (2019) 370–379.
200. S. Terzic i M. Ahel, *Environ. Pollut.* **159** (2011) 557–566.
201. M. G. Barron, G. R. Stehly i W. L. Hayton, *Aquat. Toxicol.* **17** (1990) 187–212.
202. J. M. Armitage, J. A. Arnot, F. Wania i D. Mackay, *Environ. Toxicol. Chem.* **32** (2013) 115–128.
203. S. Endo, B. I. Escher i K. Goss, *Environ. Sci. Technol.* **45** (2011) 5912–5921.
204. L. Henneberger, K. Goss i S. Endo, *Environ. Sci. Technol.* **50** (2016) 7029–7036.
205. <https://web.app.ufz.de/compbc/lserd/public/start/#searchresult> (pristup 15. travnja 2024.)
206. M. H. Abraham, *J. Pharm. Sci.* **100** (2011) 1690–1701.
207. HRN EN 14011:2005, TO 147/PO 7, Kvaliteta vode; Mikrobiološka i biološka ispitivanja, Glasilo DZNM 1-2/2005 (15.02.2005.)
208. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes, Official Journal of the European Union, Strasbourg, 2010.
209. <https://www.norman-network.com/nds/ecotox/lowestPnecsIndex.php> (pristup 15. travnja 2026.)
210. P. Löffler, B. I. Escher, C. Baduel, M. P. Virta i F. Y. Lai, *Environ. Sci. Technol.* **57** (2023) 9474–9494.
211. D. M. Reif, M. T. Martin, S. W. Tan, K. A. Houck, R. S. Judson, A. M. Richard, T. B. Knudsen, D. J. Dix i R. J. Kavlock, *Environ. Health Perspect.* **118** (2010) 1714–1720.
212. X. Feng, H. Sun, X. Liu, B. Zhu, W. Liang, T. Ruan i G. Jiang, *Environ. Sci. Technol.* **56** (2022) 10681–10690.

213. R Core Team, R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Beč, Austrija.
214. S. Grujic, T. Vasiljevic, M. Lausevic i T. Ast, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **22** (2008) 67–74.
215. S. Strano Rossi, L. Anzillotti, E. Castrignanò, G. Frison, F. Zancanaro i M. Chiarotti, *Drug Test. Anal.* **6** (2014) 226–233.
216. T. Gornik, A. Kovacic, E. Heath, J. Hollender i T. Kosjek, *Water Res.* **181** (2020) 115864.
217. R. S. Obach, L. M. Cox i L. M. Tremaine, *Drug. Metab. Dispos.* **33** (2005) 262–270.
218. Z. Liu, J. Short, A. Rose, S. Ren, N. Contel, S. Grossman i S. Unger, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **26** (2001) 321–330.
219. R. Wang, X. Wang, C. Liang, C. Ni, L. Xiong, Y. Rao i Y. Zhang, *Forensic Sci. Int.* **233** (2013) 304–311.
220. Y. Zhang, Y. Lu, L. Wang, Y. Tian i Z. Zhang, *Drug. Res.* **70** (2020) 528–540.
221. X. Miao i C. D. Metcalfe, *Anal. Chem.* **75** (2003) 3731–3738.
222. Z. Zhu, A. Vachareau i L. Neirinck, *J. Chromatogr. B.* **779** (2002) 297–306.
223. L. Sun, S. Zhang i D. Zhong, *Acta. Pharmacol. Sin.* **25** (2004) 121–128.
224. L. Cai, Z. Zheng, X. Wang, L. Tang, L. Mai, G. He, H. Lei i S. Zhong, *Anal. Methods.* **9** (2017) 1038–1045.
225. S. L. Klosterhaus, R. Grace, M. C. Hamilton i D. Yee, *Environ. Int.* **54** (2013) 92–99.
226. A. M. Ali, H. T. Rønning, L. K. Sydnes, W. M. Alarif, R. Kallenborn i S. S. Al-Lihaibi, *Sci. Total Environ.* **621** (2018) 654–662.
227. I. Senta, S. Terzic i M. Ahel, *Environ. Pollut.* **273** (2021) 116433.
228. M. C. Barber, *Environ. Toxicol. Chem.* **22** (2003) 1963–1992.
229. J. A. Arnot, D. Mackay i M. Bonnell, *Environ. Toxicol. Chem.* **27** (2008) 341–351.
230. P. Calza, C. Jiménez-Holgado, M. Coha, C. Chrimatopoulos, F. Dal Bello, C. Medana i V. Sakkas, *Sci. Total Environ.* **756** (2021) 143805.
231. L. Costa Jr., C. Schinneider Machado, A. Lowe Pletsch i Y. Reyes Torres, *Int. J. Sediment Res.* **37** (2022) 346–354.
232. <https://episuite.dev/> (pristup 10. veljače 2024.)
233. W. B. Neely, D. B. Branson i G. E. Blau, *Environ. Sci. Technol.* **8** (1974) 1113–1115.
234. T. Šegota i A. Filipčić, *Geoadria.* **12** (2007) 47–58.
235. I. Jeličić i M. Ahel, *Fresenius Environ. Bull.* **12** (2003) 46–50.
236. M. Česen, M., Ahel, S., Terzić, D. J. Heath i E. Heath, *Sci. Total Environ.* **650** (2019) 2446–2453.
237. Test No. 305: Bioaccumulation in Fish: Aqueous and Dietary Exposure, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3, OECD Publishing, Paris, 2012.

-
238. D. P. Manjarrés-López, J. M. Peña-Herrera, L. Benejam, N. Montemurro i S. Pérez, *Environ. Pollut.* **324** (2023) 121374.
239. P. Hubená, P. Horký, R. Grabic, K. Grabicová, O. Slavík i T. Randák, *PeerJ.* **8** (2020) e9356.
240. L. Minguéz, J. Pedelucq, E. Farcy, C. Ballandonne, H. Budzinski, M. P. Halm-Lemeille, *Environ. Sci. Pollut. Res.* **23** (2016) 4992–5001.

§ 8. DODATAK

Popis tablica:

- Tablica I.** Srednje vrijednosti (\pm sd; %) analitičkih povrata analita ekstrahiranih iz modelnih uzoraka površinske vode ($V = 500$ mL, $\gamma = 50$ ng L⁻¹, $n = 3$) pri pH 3 na kolonicama Oasis HLB (200 mg/6 mL) postignute desorpcijom s pomoću odabranih kombinacija i volumena otapala. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XX
- Tablica II.** Srednje vrijednosti (\pm sd; %) analitičkih povrata i utjecaja matrice analita ekstrahiranih iz liofiliziranog modelnog uzorka ribljeg mišića ($m = 0,5$ g, $\omega = 50$ µg kg⁻¹, $n = 3$) ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u dva ciklusa, korištenjem različitih ekstrakcijskih otapala. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXII
- Tablica III.** Utjecaji matrice (%) određeni u preliminarnim pokusima analizom modelnih uzoraka ribljeg mišića ($\omega = 50$ µg kg⁻¹) ekstrahiranih metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5$ %) prije i nakon primjene odabranih postupaka pročišćavanja. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXIV
- Tablica IV.** Utjecaji matrice (%) određeni u modelnim uzorcima ribljeg mišića ($\omega = 50$ µg kg⁻¹) nakon pročišćavanja krioprecipitacijom provedenom na tri temperature. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXV
- Tablica V.** Srednje vrijednosti (\pm sd; %) utjecaja matrice određene analizom svježih modelnih uzoraka ribljeg mišića ($m = 1,0$ g, $\omega = 50$ µg kg⁻¹, $n = 3$) prije i nakon pročišćavanja postupcima filtracije, krioprecipitacije i frakcionacije na Oasis HLB kolonicama. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXVI
- Tablica VI.** Rezultati ispitivanja stabilnosti farmaceutskih spojeva ovisno o načinu i vremenu skladištenja prikazani kao udio preostale koncentracije od početne koncentracije (% , $n = 3$). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXVII
- Tablica VII.** Validacijski parametri metode određivanja farmaceutskih spojeva u homogenatu cijelog tijela zebrića ($m = 1,0$ g, $n = 4$). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. ... XXIX
- Tablica VIII.** Srednje vrijednosti (\pm sd) koncentracija farmaceutskih spojeva u mediju (γ_m) i masenih udjela u zebrićama (ω_z) za vrijeme ispitivanja akumulacije farmaceutskih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXX

- Tablica IX.** Srednje vrijednosti (\pm sd) masenih udjela farmaceutskih spojeva u zebricama (w_z) za vrijeme ispitivanja eliminacije farmaceutskih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXXII
- Tablica X.** 24-satna procjena gubitaka farmaceutskih spojeva uslijed abiotičkih procesa. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXXIV
- Tablica XI.** Masena bilanca (μg) farmaceutskih spojeva tijekom prvog dana akumulacijske faze (24 h). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXXV
- Tablica XII.** Procjena utjecaja metabolizma na ukupnu depuraciju farmaceutskih spojeva u zebrici s pomoću izračunate konstante brzine depuracije (k_d) i procijenjene konstante brzine metaboličke transformacije (k_m) korištenjem modela kvantitativnog odnosa strukture i reaktivnosti EPI Suite BCFWIN. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXXVI
- Tablica XIII.** Fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih farmaceutskih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.XXXVII
- Tablica XIV.** Koncentracije farmaceutskih spojeva u mediju i zebricama u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XXXVIII
- Tablica XV.** Koncentracije farmaceutskih spojeva u mediju i zebricama u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$, uz dva akutna izlaganja nominalnoj koncentraciji $100 \mu\text{g L}^{-1}$, 1. i 14. dan izlaganja u trajanju od 24 h. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. ... XXXIX
- Tablica XVI.** Koncentracije farmaceutskih spojeva u mediju i zebricama u pokusu kroničnog izlaganja zebrica razrijeđenoj pročišćenoj otpadnoj vodi. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XL
- Tablica XVII.** Biokoncentracijski faktori (BCF i BCF_{uk}) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XLII
- Tablica XVIII.** Biokoncentracijski faktori (BCF i BCF_{uk}) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$, uz dva akutna izlaganja nominalnoj koncentraciji $100 \mu\text{g L}^{-1}$, 1. i 14. dan izlaganja u trajanju od 24 h. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. XLIII

Tablica XIX. Biokoncentracijski faktori (BCF i BCF _{uk}) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrića razrijeđenoj pročišćenoj otpadnoj vodi. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.	XLIV
Tablica XX. Ekotoksikološka procjena onečišćenja rijeke Save farmaceutskim spojevima na temelju maksimalne koncentracije izmjerene u uzorcima vode rijeke Save i PNEC vrijednosti. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.	XLV
Tablica XXI. Ekotoksikološka procjena onečišćenja rijeke Save farmaceutskim spojevima na temelju maksimalnih masenih udjela određenih u mišiću riba i odgovarajućih (a) PNEC vrijednosti za ribe prema podacima iz baze NORMAN i (b) PNEC vrijednosti korigiranih za bioakumulacijske faktore određene u ovom radu. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.	XLVI
Tablica XXII. Rangiranje istraživanih farmaceutskih spojeva u rijeci Savi prema toksičnosti, upotrebom ToxPi rangiranja na temelju njihovih koncentracija u vodi na odsječku Save od Otoka Samoborskog do Oborova. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1. ...	XLVII
Tablica XXIII. Rangiranje istraživanih farmaceutskih spojeva u rijeci Savi prema toksičnosti, upotrebom ToxPi rangiranja na temelju njihovih masenih udjela u mišiću ribe na odsječku Save od Otoka Samoborskog do Oborova. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.	XLVIII

Tablica I. Srednje vrijednosti (\pm sd; %) analitičkih povrata analita ekstrahiranih iz modelnih uzoraka površinske vode ($V = 500$ mL, $\gamma = 50$ ng L⁻¹, $n = 3$) pri pH 3 na kolonicama Oasis HLB (200 mg/6 mL) postignute desorpcijom s pomoću odabranih kombinacija i volumena otapala. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	MeOH	NH ₃ ^a u MeOH	MeOH + NH ₃ ^a u MeOH				MeOH + NH ₃ ^a u MeOH + HCOOH ^b u MeOH		MeOH + NH ₃ ^c u MeOH	
	4 mL	4 mL	4 mL + 2 mL	2 mL + 2 mL	2 mL + 4 mL	2 mL + 6 mL	2 mL + 4 mL + 4 mL	2 mL + 2 mL	2 mL + 4 mL	
COT	12 ± 2	12 ± 3	13 ± 2	13 ± 2	13 ± 2	13 ± 4	12 ± 5	15 ± 3	15 ± 3	
MOR	5 ± 6	4 ± 9	5 ± 3	5 ± 4	5 ± 4	4 ± 7	5 ± 6	5 ± 10	4 ± 7	
DC-AZI	68 ± 9	73 ± 9	81 ± 3	82 ± 4	85 ± 4	83 ± 6	75 ± 11	93 ± 5	87 ± 4	
COD	73 ± 4	70 ± 4	77 ± 2	75 ± 2	76 ± 2	75 ± 3	56 ± 7	84 ± 4	78 ± 7	
O-DM-TRAM	50 ± 3	52 ± 3	53 ± 3	52 ± 3	53 ± 3	52 ± 7	72 ± 6	62 ± 3	58 ± 4	
LIS	49 ± 9	64 ± 3	64 ± 2	63 ± 2	66 ± 2	68 ± 3	63 ± 7	69 ± 7	70 ± 5	
AMOX	50 ± 7	52 ± 9	55 ± 9	53 ± 8	56 ± 8	58 ± 9	58 ± 6	53 ± 10	49 ± 15	
MDMA	79 ± 5	81 ± 2	86 ± 3	84 ± 2	85 ± 2	87 ± 5	88 ± 5	94 ± 2	90 ± 4	
SPY	88 ± 4	88 ± 4	94 ± 3	92 ± 4	93 ± 4	90 ± 7	90 ± 7	103 ± 8	97 ± 8	
TRAM	82 ± 5	84 ± 5	90 ± 5	89 ± 5	91 ± 5	94 ± 3	89 ± 3	106 ± 4	101 ± 7	
BE	92 ± 5	92 ± 5	99 ± 5	97 ± 5	100 ± 5	98 ± 5	96 ± 5	105 ± 4	101 ± 6	
N-DM-TRAM	80 ± 5	79 ± 5	84 ± 5	82 ± 5	88 ± 5	94 ± 6	89 ± 7	94 ± 3	90 ± 4	
NOR	11 ± 16	48 ± 3	49 ± 5	56 ± 13	61 ± 13	5 ± 18	23 ± 74	45 ± 15	53 ± 7	
CIP	11 ± 13	56 ± 7	42 ± 21	51 ± 4	59 ± 4	7 ± 15	29 ± 72	44 ± 12	56 ± 11	
SMX	76 ± 3	77 ± 3	82 ± 4	82 ± 3	81 ± 3	114 ± 20	77 ± 3	83 ± 5	76 ± 9	
COC	83 ± 4	85 ± 4	91 ± 4	87 ± 3	93 ± 3	94 ± 6	94 ± 6	103 ± 3	99 ± 6	
N'-DM-AZI	69 ± 6	74 ± 6	78 ± 4	76 ± 4	82 ± 4	82 ± 6	70 ± 15	86 ± 9	88 ± 10	
AZI	63 ± 12	64 ± 9	72 ± 7	71 ± 5	82 ± 5	74 ± 11	78 ± 5	86 ± 7	82 ± 7	
N-DM-AZI	73 ± 9	67 ± 6	77 ± 5	77 ± 7	83 ± 7	80 ± 13	77 ± 5	89 ± 4	84 ± 5	
CAFF	87 ± 3	86 ± 3	92 ± 3	92 ± 4	93 ± 4	105 ± 8	110 ± 2	94 ± 5	89 ± 6	
DLOR	48 ± 12	71 ± 5	77 ± 3	71 ± 4	76 ± 4	68 ± 15	70 ± 5	72 ± 7	68 ± 7	
N-Ac-SMX	85 ± 5	82 ± 5	88 ± 5	90 ± 5	96 ± 5	90 ± 8	91 ± 9	95 ± 11	92 ± 10	
ZOLP	84 ± 6	86 ± 3	89 ± 2	85 ± 3	92 ± 3	91 ± 7	91 ± 4	96 ± 4	89 ± 5	
OXCARB	87 ± 5	89 ± 4	91 ± 4	88 ± 1	95 ± 1	95 ± 4	97 ± 4	96 ± 3	89 ± 3	
TOR	85 ± 7	86 ± 3	90 ± 3	88 ± 3	92 ± 3	91 ± 7	94 ± 4	97 ± 4	93 ± 6	
ESC	73 ± 5	81 ± 6	80 ± 7	81 ± 3	84 ± 3	77 ± 10	91 ± 2	90 ± 5	88 ± 4	
QUE	69 ± 6	75 ± 5	83 ± 4	77 ± 4	84 ± 4	76 ± 12	81 ± 3	86 ± 6	78 ± 7	
EDDP	83 ± 4	42 ± 4	67 ± 8	62 ± 10	61 ± 10	47 ± 5	97 ± 4	41 ± 8	31 ± 6	

Tablica I. nastavak

FAS	MeOH	NH ₃ ^a u MeOH	MeOH + NH ₃ ^a u MeOH				MeOH + NH ₃ ^a u MeOH + HCOOH ^b u MeOH	MeOH + NH ₃ ^c u MeOH	
	4 mL	4 mL	4 mL + 2 mL	2 mL + 2 mL	2 mL + 4 mL	2 mL + 6 mL	2 mL + 4 mL + 4 mL	2 mL + 2 mL	2 mL + 4 mL
CARB	84 ± 5	86 ± 3	91 ± 4	87 ± 4	93 ± 4	93 ± 5	55 ± 6	99 ± 3	94 ± 7
ERY	20 ± 15	17 ± 14	19 ± 31	20 ± 10	21 ± 10	17 ± 7	21 ± 22	49 ± 15	36 ± 19
RAM	83 ± 5	82 ± 3	87 ± 3	87 ± 3	89 ± 3	89 ± 5	89 ± 2	94 ± 3	90 ± 5
VER	80 ± 8	76 ± 4	81 ± 7	83 ± 4	87 ± 4	77 ± 11	78 ± 8	84 ± 12	79 ± 9
AML	59 ± 7	47 ± 13	66 ± 1	63 ± 2	70 ± 2	69 ± 28	58 ± 8	57 ± 8	53 ± 10
ERY-H2O	93 ± 5	85 ± 2	98 ± 4	96 ± 2	107 ± 2	118 ± 4	102 ± 6	108 ± 10	96 ± 7
OXA	84 ± 2	89 ± 4	93 ± 3	87 ± 2	92 ± 2	87 ± 6	88 ± 6	92 ± 4	88 ± 5
MTHD	85 ± 3	84 ± 7	90 ± 3	89 ± 7	90 ± 7	89 ± 8	91 ± 4	99 ± 4	94 ± 4
CLA	76 ± 7	66 ± 4	76 ± 9	80 ± 2	86 ± 2	89 ± 6	85 ± 10	93 ± 16	84 ± 5
SER	78 ± 5	73 ± 1	84 ± 3	75 ± 3	83 ± 3	68 ± 34	84 ± 6	81 ± 8	76 ± 8
TERB	78 ± 4	58 ± 5	84 ± 3	78 ± 5	89 ± 5	76 ± 23	83 ± 4	83 ± 8	79 ± 4
WAR	78 ± 3	81 ± 3	85 ± 5	78 ± 3	87 ± 3	73 ± 8	81 ± 6	82 ± 14	76 ± 8
VAL	78 ± 3	74 ± 3	84 ± 6	79 ± 6	90 ± 6	73 ± 18	76 ± 6	79 ± 13	71 ± 9
DIA	78 ± 2	82 ± 3	88 ± 2	81 ± 2	86 ± 2	80 ± 10	86 ± 5	85 ± 9	81 ± 6
LOR	71 ± 6	76 ± 3	83 ± 3	72 ± 6	84 ± 6	68 ± 12	78 ± 5	76 ± 17	75 ± 6
ATOR	19 ± 11	27 ± 6	28 ± 8	15 ± 10	35 ± 15	26 ± 28	23 ± 28	20 ± 19	18 ± 22

^a $\varphi(\text{NH}_3) = 0,2 \%$; ^b $\varphi(\text{HCOOH}) = 1 \%$; ^c $\varphi(\text{NH}_3) = 1,0 \%$

Tablica II. Srednje vrijednosti (\pm sd; %) analitičkih povrata i utjecaja matrice analita ekstrahiranih iz liofiliziranog modelnog uzorka ribljeg mišića ($m = 0,5$ g, $\omega = 50$ $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 3$) ekstrakcijom potpomognutom ultrazvukom u dva ciklusa, korištenjem različitih ekstrakcijskih otapala. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Analitički povrat / %					Utjecaj matrice / %				
	MeOH-K	MeOH-B1	MeOH-B2	ACN-B1	ACN-B2	MeOH-K	MeOH-B1	MeOH-B2	ACN-B1	ACN-B2
COT	69 \pm 24	87 \pm 4	67 \pm 49	24 \pm 1	41 \pm 14	-80 \pm 12	-76 \pm 1	-97 \pm 25	5 \pm 1	-10 \pm 12
MOR	56 \pm 34	88 \pm 5	71 \pm 41	13 \pm 78	12 \pm 42	-70 \pm 23	-77 \pm 3	-94 \pm 32	2 \pm 3	9 \pm 23
DC-AZI	50 \pm 24	85 \pm 16	63 \pm 47	14 \pm 56	6 \pm 137	-61 \pm 6	-54 \pm 5	-75 \pm 20	14 \pm 5	-4 \pm 6
COD	57 \pm 11	79 \pm 4	89 \pm 23	18 \pm 78	16 \pm 10	-45 \pm 10	-49 \pm 4	-71 \pm 22	12 \pm 4	5 \pm 10
O-DM-TRAM	57 \pm 14	88 \pm 9	73 \pm 15	17 \pm 53	37 \pm 8	-35 \pm 5	-32 \pm 2	-85 \pm 9	13 \pm 2	-2 \pm 5
LIS	36 \pm 8	81 \pm 4	67 \pm 25	2 \pm 97	1 \pm 103	4 \pm 7	-1 \pm 2	-27 \pm 12	18 \pm 2	3 \pm 7
AMOX	55 \pm 15	84 \pm 7	81 \pm 13	4 \pm 75	1 \pm 1	-35 \pm 5	-34 \pm 0	-40 \pm 9	21 \pm 0	-12 \pm 5
MDMA	61 \pm 10	80 \pm 5	78 \pm 26	24 \pm 11	36 \pm 6	-45 \pm 5	-40 \pm 1	-79 \pm 13	13 \pm 1	-15 \pm 5
SPY	52 \pm 20	79 \pm 16	80 \pm 22	17 \pm 51	18 \pm 3	-61 \pm 3	-68 \pm 3	-75 \pm 20	5 \pm 3	-35 \pm 3
TRAM	43 \pm 17	88 \pm 6	111 \pm 37	18 \pm 32	42 \pm 22	128 \pm 16	-8 \pm 4	38 \pm 12	22 \pm 4	57 \pm 16
BE	59 \pm 14	88 \pm 5	102 \pm 12	16 \pm 58	13 \pm 9	6 \pm 2	-31 \pm 3	-66 \pm 6	15 \pm 3	-12 \pm 2
N-DM-TRAM	80 \pm 9	82 \pm 8	81 \pm 17	18 \pm 50	41 \pm 14	69 \pm 9	-33 \pm 4	-68 \pm 12	13 \pm 4	23 \pm 9
NOR	46 \pm 18	65 \pm 7	66 \pm 27	13 \pm 16	15 \pm 15	93 \pm 15	-16 \pm 3	15 \pm 25	48 \pm 3	90 \pm 15
CIP	43 \pm 13	61 \pm 12	70 \pm 28	14 \pm 73	9 \pm 33	90 \pm 13	-13 \pm 8	-12 \pm 22	22 \pm 8	69 \pm 13
SMX	65 \pm 16	62 \pm 10	86 \pm 32	10 \pm 57	13 \pm 16	-64 \pm 12	-55 \pm 6	-68 \pm 30	13 \pm 6	-5 \pm 12
COC	62 \pm 13	88 \pm 8	87 \pm 12	21 \pm 35	28 \pm 6	-1 \pm 2	-15 \pm 1	-72 \pm 5	16 \pm 1	-7 \pm 2
N'-DM-AZI	65 \pm 22	85 \pm 6	84 \pm 33	14 \pm 82	4 \pm 25	-59 \pm 17	-51 \pm 6	-81 \pm 25	15 \pm 6	20 \pm 17
AZI	59 \pm 21	91 \pm 13	89 \pm 31	16 \pm 55	12 \pm 21	-49 \pm 19	-43 \pm 3	-71 \pm 28	10 \pm 3	-11 \pm 19
N-DM-AZI	56 \pm 18	69 \pm 4	72 \pm 33	17 \pm 77	10 \pm 21	-46 \pm 18	-49 \pm 3	-78 \pm 31	17 \pm 3	4 \pm 18
CAFF	67 \pm 8	91 \pm 15	92 \pm 21	27 \pm 6	48 \pm 14	-24 \pm 6	-41 \pm 3	-48 \pm 16	12 \pm 3	11 \pm 6
DLOR	52 \pm 9	53 \pm 12	77 \pm 26	18 \pm 58	15 \pm 19	-50 \pm 9	-59 \pm 4	-49 \pm 21	-4 \pm 4	-33 \pm 9
N-Ac-SMX	65 \pm 16	83 \pm 6	81 \pm 16	9 \pm 56	9 \pm 79	-43 \pm 7	-43 \pm 2	-52 \pm 12	10 \pm 2	-25 \pm 7
ZOLP	60 \pm 10	87 \pm 7	90 \pm 13	19 \pm 41	21 \pm 9	14 \pm 1	-8 \pm 2	-34 \pm 7	12 \pm 2	-1 \pm 1
OXCARB	52 \pm 10	67 \pm 11	79 \pm 25	15 \pm 46	19 \pm 10	-52 \pm 8	-48 \pm 2	-61 \pm 23	15 \pm 2	-6 \pm 8
TOR	54 \pm 12	87 \pm 8	82 \pm 22	14 \pm 82	9 \pm 8	-28 \pm 8	-31 \pm 2	-40 \pm 17	9 \pm 2	-14 \pm 8
ESC	60 \pm 10	71 \pm 3	80 \pm 20	18 \pm 41	24 \pm 10	-28 \pm 8	-37 \pm 1	-47 \pm 15	12 \pm 1	-24 \pm 8
QUE	55 \pm 5	64 \pm 8	85 \pm 14	20 \pm 46	23 \pm 11	-37 \pm 2	-43 \pm 2	-48 \pm 10	2 \pm 2	-29 \pm 2
EDDP	58 \pm 9	64 \pm 11	74 \pm 12	15 \pm 39	18 \pm 17	-5 \pm 3	-21 \pm 2	-11 \pm 7	8 \pm 2	-10 \pm 3
CARB	58 \pm 15	79 \pm 4	84 \pm 27	19 \pm 40	23 \pm 16	-54 \pm 13	-54 \pm 3	-57 \pm 26	6 \pm 3	-15 \pm 13

Tablica II. nastavak

FAS	Analitički povrat / %					Utjecaj matrice / %				
	MeOH-K	MeOH-B1	MeOH-B2	ACN-B1	ACN-B2	MeOH-K	MeOH-B1	MeOH-B2	ACN-B1	ACN-B2
ERY	56 ± 36	87 ± 8	82 ± 46	13 ± 88	14 ± 136	268 ± 35	1 ± 5	-39 ± 40	10 ± 5	152 ± 35
RAM	54 ± 12	87 ± 7	88 ± 13	11 ± 82	6 ± 8	-18 ± 5	-24 ± 1	-33 ± 12	10 ± 1	-11 ± 5
VER	59 ± 13	80 ± 4	81 ± 12	21 ± 41	24 ± 16	-9 ± 5	-23 ± 1	-29 ± 11	12 ± 1	-16 ± 5
AML	51 ± 9	56 ± 34	78 ± 22	17 ± 45	12 ± 38	-68 ± 8	-68 ± 4	-23 ± 21	-33 ± 4	-47 ± 8
ERY-H2O	56 ± 18	90 ± 10	87 ± 25	18 ± 65	11 ± 31	-47 ± 14	-58 ± 2	-70 ± 24	15 ± 2	-11 ± 14
OXA	49 ± 13	74 ± 1	83 ± 13	17 ± 65	15 ± 10	-32 ± 4	-45 ± 1	-24 ± 8	-4 ± 1	-28 ± 4
MTHD	62 ± 14	70 ± 4	94 ± 12	20 ± 44	21 ± 6	-30 ± 2	-41 ± 1	-11 ± 6	1 ± 1	-31 ± 2
CLA	60 ± 16	83 ± 4	80 ± 13	17 ± 47	14 ± 7	-12 ± 5	-22 ± 2	-41 ± 12	13 ± 2	-14 ± 5
SER	49 ± 10	26 ± 10	75 ± 24	21 ± 32	30 ± 10	-91 ± 9	-87 ± 4	-86 ± 23	-62 ± 4	-84 ± 9
TERB	58 ± 11	36 ± 7	84 ± 10	26 ± 11	53 ± 17	-85 ± 4	-81 ± 7	-84 ± 9	-46 ± 7	-78 ± 4
WAR	49 ± 17	71 ± 11	71 ± 29	16 ± 86	11 ± 21	-57 ± 13	-56 ± 7	-56 ± 29	-14 ± 7	-23 ± 13
VAL	30 ± 20	81 ± 8	76 ± 21	5 ± 91	1 ± 77	-13 ± 13	-14 ± 2	-28 ± 13	4 ± 2	-20 ± 13
DIA	58 ± 21	66 ± 11	86 ± 15	19 ± 20	26 ± 7	-56 ± 5	-52 ± 2	-49 ± 15	-12 ± 2	-35 ± 5
LOR	66 ± 15	37 ± 22	82 ± 12	19 ± 45	28 ± 6	-85 ± 5	-75 ± 10	-29 ± 10	-49 ± 10	-81 ± 5
ATOR	57 ± 14	73 ± 2	83 ± 9	11 ± 100	5 ± 13	-36 ± 6	-2 ± 2	-15 ± 8	-10 ± 2	-44 ± 6

ACN-B1, acetonitril s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5\%$); ACN-B2, smjesa acetonitrila i acetona (3 : 1, v/v) s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5\%$); MeOH-K, metanol s dodatkom mravlje kiseline ($\varphi = 0,2\%$); MeOH-B1, metanol s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5\%$); MeOH-B2, smjesa metanola i acetona (3 : 1, v/v) s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5\%$)

Tablica III. Utjecaji matrice (%) određeni u preliminarnim pokusima analizom modelnih uzoraka ribljeg mišića ($\omega = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$) ekstrahiranih metanolom s dodatkom amonijaka ($\varphi = 0,5 \%$) prije i nakon primjene odabranih postupaka pročišćavanja. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Matrica ^a	LLE ^b	Disperzivna sorpcija			Kolonska sorpcija			Frakcionacija		
			NH ₂	PSA	C ₁₈	NH ₂	PSA	C ₁₈	SiO ₂	HLB pH 3	HLB pH 7
COT	-97 ± 25	-89	-98	-97	-90	-97	-96	-86	-38	-16	-28
MOR	-94 ± 32	-88	-56	-54	-56	-68	-55	-61	-51	-59	-22
DC-AZI	-75 ± 20	-76	-66	-82	-65	-74	-72	-69	-40	-41	-2
COD	-71 ± 22	-51	-30	-55	-47	-46	-59	-54	-25	-41	-19
O-DM-TRAM	-85 ± 9	-40	-43	-43	-40	-49	-45	-45	-6	-30	-17
LIS	-27 ± 12	-31	-35	-45	-46	-49	-55	-46	-15	10	-9
AMOX	-40 ± 9	-99	-96	-98	-97	-81	-84	-77	-6	-3	-4
MDMA	-79 ± 13	-77	-62	-71	-76	-78	-76	-73	-14	-49	-26
SPY	-75 ± 20	-70	-79	-82	-77	-84	-83	-78	-40	-49	-12
TRAM	38 ± 12	-82	-82	-98	-98	-99	-99	-98	-3	-30	-24
BE	-66 ± 6	-50	-50	-67	-65	-67	-61	-65	-12	-14	-8
N-DM-TRAM	-68 ± 12	-76	-53	-61	-71	-71	-72	-64	-7	-26	-23
NOR	15 ± 25	32	8	-6	-15	-22	-34	50	27	-41	27
CIP	-12 ± 22	12	-6	-6	-6	-47	-32	12	0	-21	16
SMX	-68 ± 30	-59	-47	-68	-49	-70	-56	-55	-48	-32	-25
COC	-72 ± 5	-98	-72	-79	-77	-74	-77	-74	-8	-11	4
N'-DM-AZI	-81 ± 25	-77	-51	-82	-65	-60	-82	-68	-31	-30	-24
AZI	-71 ± 28	-70	-44	-55	-61	-73	-61	-61	-12	-27	-24
N-DM-AZI	-78 ± 31	-70	-63	-81	-52	-71	-76	-45	-56	-31	-13
CAFF	-48 ± 16	-46	-38	-42	-51	-57	-51	-55	-25	-12	-38
DLOR	-49 ± 21	-75	-20	-37	-38	-47	-35	-42	-26	-73	-64
N-Ac-SMX	-52 ± 12	-54	-53	-67	-65	-46	-55	-57	-14	-7	-23
ZOLP	-34 ± 7	-29	-38	-49	-51	-52	-57	-47	-3	0	-35
OXCARB	-61 ± 23	-76	-44	-55	-56	-63	-64	-67	-16	-19	-44
TOR	-40 ± 17	-25	-33	-45	-44	-51	-48	-40	-21	-4	-29
ESC	-47 ± 15	-76	-41	-54	-65	-59	-65	-61	-16	-44	-25
QUE	-48 ± 10	-62	-53	-66	-68	-66	-70	-64	-17	-47	-40
EDDP	-11 ± 7	-81	-18	-32	-36	-35	-41	-38	-18	-18	-34
CARB	-57 ± 26	-45	-35	-49	-51	-62	-57	-53	-23	-32	-1
ERY	-39 ± 40	-28	-47	-69	-77	-49	-61	-63	-20	7	-25
RAM	-33 ± 12	-27	-25	-42	-47	-45	-51	-41	-24	-10	-53
VER	-29 ± 11	-71	-37	-52	-58	-57	-58	-56	-18	-27	-52
AML	-23 ± 21	-83	2	-24	-39	-30	-38	-13	-70	-76	-59
ERY-H ₂ O	-70 ± 24	-56	-51	-59	-56	-69	-68	-68	-20	-27	-69
OXA	-24 ± 8	-64	-29	-43	-45	-40	-49	-43	-29	-13	-34
MTHD	-11 ± 6	-92	-18	-27	-39	-34	-41	-40	-28	-43	-88
CLA	-41 ± 12	-58	-42	-58	-58	-59	-66	-61	-19	-14	-20
SER	-86 ± 23	-96	-24	-39	-49	-50	-58	-59	-71	-91	-69
TERB	-84 ± 9	-87	-37	-44	-61	-57	-58	-55	-63	-85	-88
WAR	-56 ± 29	-41	-37	-52	-50	-60	-59	-52	-36	-51	-48
VAL	-28 ± 13	-23	-37	-33	-32	-33	-47	-46	-29	-2	-14
DIA	-49 ± 15	-64	-53	-66	-66	-64	-67	-63	-30	-53	-37
LOR	-29 ± 10	-74	-28	-60	-63	-39	-50	-47	-61	-76	-87
ATOR	-15 ± 8	-30	-42	-43	-27	-23	-50	-46	-32	-39	-24

^abez pročišćavanja, $n = 3$; ^bizmućkavanje s n -heksanom

Tablica IV. Utjecaji matrice (%) određeni u modelnim uzorcima ribljeg mišića ($\omega = 50 \mu\text{g kg}^{-1}$) nakon pročišćavanja krioprecipitacijom provedenom na tri temperature. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	4 200 rpm / sobna temperatura			15 000 rpm / 0 °C		
	+4 °C	-20 °C	-80 °C	+4 °C	-20 °C	-80 °C
COT	-36	-40	-32	-31	-21	-25
MOR	-59	-58	-55	-56	-48	-46
DC-AZI	-42	-43	-43	-35	-29	-32
COD	-48	-47	-43	-44	-37	-32
O-DM-TRAM	-40	-42	-35	-32	-24	-25
LIS	-35	-31	-26	-19	-7	-21
AMOX	-32	-33	-22	-21	-14	-15
MDMA	-49	-47	-44	-44	-38	-34
SPY	-13	-18	-9	2	12	5
TRAM	-34	-30	-20	-27	-18	-13
BE	-14	-19	-8	-10	14	2
N-DM-TRAM	-46	-40	-35	-39	-29	-23
SMX	-29	-31	-22	-15	-8	-13
COC	-30	-29	-23	-23	-10	-10
N'-DM-AZI	-46	-42	-41	-46	-42	-26
AZI	-47	-38	-42	-43	-33	-26
N-DM-AZI	-56	-45	-51	-54	-47	-34
CAFF	-30	-35	-23	-19	-4	-11
DLOR	-78	-68	-76	-77	-72	-64
N-Ac-SMX	-31	-28	-8	-7	23	-12
ZOLP	-39	-36	-30	-28	-22	-23
OXCARB	-32	-28	-13	-18	-2	-2
TOR	-36	-32	-29	-28	-17	-17
ESC	-54	-48	-51	-52	-44	-37
QUE	-66	-55	-56	-58	-53	-44
EDDP	-43	-37	-39	-40	-34	-29
CARB	-41	-40	-31	-35	-20	-20
ERY	-43	-42	-37	-38	-28	-27
RAM	-39	-37	-32	-30	-20	-23
VER	-67	-60	-63	-62	-57	-49
AML	-80	-73	-79	-80	-75	-68
ERY-H2O	-60	-56	-53	-53	-48	-43
OXA	-35	-38	-36	-34	-19	-25
MTHD	-68	-61	-69	-67	-62	-57
CLA	-55	-49	-52	-52	-41	-42
SER	-94	-91	-95	-93	-92	-88
TERB	-95	-92	-96	-94	-93	-90
WAR	-50	-45	-39	-38	-31	-27
VAL	-30	-20	-23	-15	-1	-10
DIA	-46	-42	-41	-41	-31	-30
LOR	-90	-90	-92	-91	-87	-85
ATOR	-35	-34	-27	-29	-13	-22

rpm, okretaji u minuti

Tablica V. Srednje vrijednosti (\pm sd; %) utjecaja matrice određene analizom svježih modelnih uzoraka ribljeg mišića ($m = 1,0$ g, $\omega = 50$ $\mu\text{g kg}^{-1}$, $n = 3$) prije i nakon pročišćavanja postupcima filtracije, krioprecipitacije i frakcionacije na Oasis HLB kolonicama. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Matrica ^a	Krio-precipitacija ^b	Krioprecipitacija ^b + Frakcionacija ^c	Filtracija ^d + Frakcionacija ^c	Krioprecipitacija ^b + Filtracija ^d + Frakcionacija ^c
COT	-53 ± 8	-25	-25 ± 2	-23 ± 3	-8 ± 0
MOR	-48 ± 15	-46	-31 ± 4	-25 ± 8	-24 ± 2
DC-AZI	-27 ± 16	-32	-33 ± 4	-38 ± 7	-4 ± 1
COD	-24 ± 2	-32	-35 ± 3	-19 ± 4	-21 ± 2
O-DM-TRAM	-6 ± 11	-25	-36 ± 3	-23 ± 7	-16 ± 1
LIS	-6 ± 7	-21	-29 ± 5	-9 ± 6	1 ± 0
AMOX	-11 ± 8	-15	-23 ± 3	-25 ± 9	4 ± 0
MDMA	-14 ± 7	-34	-38 ± 4	-23 ± 8	-23 ± 2
SPY	-33 ± 11	5	-7 ± 1	-13 ± 7	12 ± 1
TRAM	-12 ± 8	-13	-25 ± 2	-21 ± 5	-11 ± 0
BE	2 ± 6	2	-9 ± 1	-18 ± 7	3 ± 0
N-DM-TRAM	-10 ± 7	-23	-30 ± 3	-19 ± 8	-10 ± 1
NOR	-17 ± 11	NO	NO	-15 ± 4	8 ± 4
CIP	-16 ± 8	NO	NO	-22 ± 6	10 ± 3
SMX	-43 ± 2	-13	-15 ± 1	-17 ± 8	-4 ± 1
COC	-9 ± 5	-10	-24 ± 3	-16 ± 7	-8 ± 1
N'-DM-AZI	-14 ± 18	-26	-27 ± 3	-19 ± 4	10 ± 1
AZI	-25 ± 6	-26	-26 ± 2	-22 ± 2	-1 ± 0
N-DM-AZI	-42 ± 14	-34	-28 ± 2	-25 ± 10	0 ± 0
CAFF	-25 ± 11	-11	-16 ± 1	-17 ± 7	-5 ± 1
DLOR	-52 ± 4	-64	-18 ± 2	-16 ± 10	3 ± 0
N-Ac-SMX	-17 ± 11	-12	1 ± 0	-27 ± 5	5 ± 1
ZOLP	13 ± 3	-23	-27 ± 2	-19 ± 6	-9 ± 1
OXCARB	-11 ± 4	-2	-12 ± 1	-21 ± 5	-15 ± 2
TOR	-10 ± 5	-17	-25 ± 2	-19 ± 8	-14 ± 1
ESC	-29 ± 5	-37	-23 ± 2	-22 ± 7	-14 ± 1
QUE	-28 ± 3	-44	-28 ± 4	-21 ± 8	10 ± 2
EDDP	-10 ± 3	-29	-21 ± 2	-18 ± 6	-5 ± 0
CARB	-25 ± 4	-20	-24 ± 2	-21 ± 4	-16 ± 1
ERY	-10 ± 24	-27	-36 ± 6	-30 ± 7	-13 ± 6
RAM	-12 ± 6	-23	-26 ± 2	-20 ± 7	-13 ± 1
VER	-20 ± 4	-49	-21 ± 2	-16 ± 8	-9 ± 0
AML	-89 ± 12	-68	-29 ± 2	-28 ± 4	-20 ± 2
ERY-H2O	-23 ± 7	-43	-36 ± 2	-21 ± 3	-11 ± 1
OXA	-15 ± 4	-25	-25 ± 2	-20 ± 3	-8 ± 1
MTHD	-47 ± 3	-57	-26 ± 2	-19 ± 8	-14 ± 1
CLA	-11 ± 7	-42	-26 ± 2	-19 ± 4	-12 ± 1
SER	-94 ± 10	-88	-28 ± 2	-29 ± 8	-32 ± 2
TERB	-94 ± 3	-90	-26 ± 2	-23 ± 7	-20 ± 1
WAR	-31 ± 8	-27	-26 ± 2	-25 ± 6	-4 ± 0
VAL	-36 ± 20	-10	-28 ± 2	-23 ± 6	-11 ± 2
DIA	-36 ± 20	-30	-25 ± 2	-20 ± 5	3 ± 0
LOR	-87 ± 10	-85	-27 ± 3	-26 ± 4	-19 ± 2
ATOR	-31 ± 8	-22	-22 ± 2	-24 ± 4	-12 ± 0

^abez pročišćavanja; ^b-80 °C preko noći, 15 000 rpm, $n = 1$; ^ckolonice Oasis HLB, pH 3; ^dGF/F filteri
NO, nije određeno

Tablica VI. Rezultati ispitivanja stabilnosti farmaceutskih spojeva ovisno o načinu i vremenu skladištenja prikazani kao udio preostale koncentracije od početne koncentracije (% , $n = 3$). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Završni ekstrakt ^a			Metanolni ekstrakt ^b			SPE kolonice ^b			Originalni uzorak ^b		
	3. dan	7. dan	41. dan	3. dan	7. dan	41. dan	3. dan	7. dan	41. dan	3. dan	7. dan	41. dan
COT	101 ± 4	104 ± 3	102 ± 3	100 ± 5	103 ± 5	102 ± 5	95 ± 5	101 ± 7	101 ± 3	87 ± 12	83 ± 12	79 ± 4
MOR	108 ± 8	109 ± 7	116 ± 7	101 ± 8	104 ± 7	106 ± 9	97 ± 9	99 ± 10	107 ± 11	91 ± 15	85 ± 18	79 ± 7
DC-AZI	100 ± 9	100 ± 6	117 ± 6	97 ± 11	105 ± 3	110 ± 6	93 ± 4	98 ± 12	99 ± 12	73 ± 7	68 ± 15	77 ± 6
COD	107 ± 8	104 ± 7	100 ± 7	101 ± 8	104 ± 5	101 ± 8	97 ± 7	98 ± 10	100 ± 5	87 ± 11	78 ± 15	83 ± 6
O-DM-TRAM	104 ± 10	105 ± 5	94 ± 6	101 ± 11	103 ± 2	95 ± 3	99 ± 5	98 ± 12	99 ± 3	81 ± 11	72 ± 9	85 ± 3
LIS	105 ± 19	95 ± 19	100 ± 19	102 ± 18	100 ± 19	98 ± 18	102 ± 18	104 ± 19	102 ± 18	97 ± 40	76 ± 22	77 ± 25
AMOX	101 ± 19	93 ± 19	92 ± 19	100 ± 18	92 ± 18	32 ± 26	100 ± 27	101 ± 20	98 ± 18	91 ± 36	94 ± 21	85 ± 18
MDMA	107 ± 5	106 ± 4	105 ± 4	102 ± 7	103 ± 5	104 ± 3	100 ± 6	99 ± 7	100 ± 2	87 ± 9	82 ± 13	85 ± 2
SPY	106 ± 7	110 ± 7	110 ± 7	107 ± 9	109 ± 7	107 ± 8	100 ± 7	104 ± 8	106 ± 7	90 ± 12	84 ± 15	85 ± 7
TRAM	96 ± 6	101 ± 3	97 ± 3	95 ± 6	103 ± 4	102 ± 7	90 ± 5	96 ± 8	97 ± 4	79 ± 11	79 ± 10	83 ± 3
BE	101 ± 5	102 ± 7	103 ± 7	96 ± 7	101 ± 6	99 ± 8	94 ± 7	96 ± 9	100 ± 7	85 ± 12	85 ± 15	84 ± 6
N-DM-TRAM	100 ± 7	99 ± 4	97 ± 4	99 ± 6	103 ± 6	105 ± 6	98 ± 4	100 ± 11	95 ± 5	90 ± 13	82 ± 10	70 ± 3
NOR	104 ± 12	99 ± 21	113 ± 18	111 ± 8	113 ± 8	108 ± 4	109 ± 5	105 ± 14	97 ± 8	95 ± 18	81 ± 15	92 ± 13
CIP	108 ± 19	100 ± 21	94 ± 22	108 ± 17	101 ± 16	106 ± 15	106 ± 15	110 ± 15	109 ± 16	98 ± 20	82 ± 22	84 ± 21
SMX	107 ± 8	108 ± 7	101 ± 7	100 ± 10	99 ± 9	102 ± 8	100 ± 8	97 ± 11	101 ± 8	86 ± 17	81 ± 17	79 ± 9
COC	105 ± 5	101 ± 3	99 ± 3	101 ± 8	102 ± 4	97 ± 6	96 ± 5	94 ± 7	88 ± 12	84 ± 10	77 ± 11	76 ± 3
N'-DM-AZI	97 ± 11	105 ± 10	104 ± 10	97 ± 10	101 ± 9	108 ± 9	97 ± 9	85 ± 11	104 ± 9	76 ± 10	71 ± 18	53 ± 12
AZI	95 ± 11	102 ± 5	111 ± 5	91 ± 8	101 ± 3	107 ± 8	91 ± 7	95 ± 13	106 ± 3	71 ± 6	71 ± 11	52 ± 6
N-DM-AZI	95 ± 11	97 ± 7	105 ± 7	92 ± 10	96 ± 6	95 ± 11	89 ± 7	92 ± 9	100 ± 5	78 ± 11	71 ± 12	59 ± 9
CAFF	93 ± 11	95 ± 8	108 ± 8	100 ± 6	92 ± 6	100 ± 8	87 ± 6	93 ± 13	98 ± 6	82 ± 11	75 ± 13	80 ± 6
DLOR	93 ± 6	88 ± 4	96 ± 4	90 ± 9	91 ± 6	92 ± 8	83 ± 10	91 ± 6	94 ± 7	84 ± 8	85 ± 14	72 ± 4
N-Ac-SMX	88 ± 17	98 ± 18	96 ± 18	90 ± 21	89 ± 17	94 ± 18	88 ± 15	82 ± 15	92 ± 18	67 ± 16	69 ± 16	77 ± 15
ZOLP	103 ± 7	104 ± 7	106 ± 7	97 ± 8	102 ± 6	101 ± 6	95 ± 7	96 ± 9	99 ± 5	93 ± 9	94 ± 9	84 ± 6
OXCARB	102 ± 4	103 ± 4	111 ± 4	98 ± 6	101 ± 5	103 ± 3	92 ± 6	97 ± 7	105 ± 6	81 ± 9	79 ± 10	90 ± 4
TOR	99 ± 5	99 ± 6	106 ± 6	96 ± 6	98 ± 5	101 ± 4	93 ± 5	93 ± 7	98 ± 4	83 ± 12	78 ± 13	80 ± 3
ESC	98 ± 6	106 ± 8	105 ± 8	89 ± 8	97 ± 8	98 ± 14	87 ± 6	90 ± 9	100 ± 5	81 ± 13	80 ± 15	78 ± 5
QUE	97 ± 4	99 ± 6	105 ± 6	89 ± 9	94 ± 10	97 ± 12	89 ± 5	88 ± 10	98 ± 8	88 ± 14	83 ± 12	85 ± 3
EDDP	100 ± 7	102 ± 4	98 ± 4	96 ± 7	103 ± 4	99 ± 5	94 ± 9	98 ± 7	97 ± 4	86 ± 14	83 ± 13	81 ± 4
CARB	94 ± 5	94 ± 5	91 ± 5	92 ± 8	93 ± 6	89 ± 6	89 ± 6	89 ± 7	89 ± 7	81 ± 10	81 ± 11	76 ± 4
ERY	106 ± 20	70 ± 2	5 ± 5	92 ± 19	91 ± 18	5 ± 3	97 ± 24	86 ± 12	9 ± 26	81 ± 15	55 ± 8	78 ± 37
RAM	100 ± 6	101 ± 6	107 ± 6	98 ± 9	102 ± 5	105 ± 6	94 ± 7	94 ± 8	104 ± 6	85 ± 12	83 ± 10	82 ± 5

Tablica VI. nastavak

FAS	Završni ekstrakt ^a			Metanolni ekstrakt ^b			SPE kolonice ^b			Originalni uzorak ^b		
	3. dan	7. dan	41. dan	3. dan	7. dan	41. dan	3. dan	7. dan	41. dan	3. dan	7. dan	41. dan
VER	100 ± 6	99 ± 6	114 ± 6	96 ± 7	98 ± 5	110 ± 7	105 ± 7	106 ± 9	122 ± 6	87 ± 8	90 ± 10	41 ± 6
AML	111 ± 14	105 ± 14	122 ± 14	109 ± 19	99 ± 14	103 ± 15	110 ± 15	112 ± 17	110 ± 15	92 ± 17	93 ± 16	40 ± 16
ERY-H2O	105 ± 3	114 ± 7	106 ± 8	95 ± 6	109 ± 7	101 ± 7	108 ± 8	119 ± 7	113 ± 7	81 ± 8	91 ± 12	46 ± 5
OXA	96 ± 4	101 ± 3	99 ± 3	93 ± 7	97 ± 2	94 ± 6	91 ± 3	95 ± 4	92 ± 3	80 ± 7	80 ± 11	77 ± 3
MTHD	99 ± 7	102 ± 7	103 ± 7	96 ± 8	100 ± 6	95 ± 7	94 ± 8	95 ± 7	94 ± 5	85 ± 9	87 ± 12	77 ± 5
CLA	92 ± 4	101 ± 6	106 ± 6	91 ± 5	102 ± 4	102 ± 6	102 ± 7	107 ± 8	114 ± 5	63 ± 4	64 ± 10	29 ± 2
SER	101 ± 5	101 ± 6	100 ± 6	98 ± 9	101 ± 6	96 ± 8	94 ± 8	95 ± 6	93 ± 6	84 ± 9	86 ± 8	65 ± 10
TERB	101 ± 4	99 ± 4	109 ± 4	97 ± 7	98 ± 3	102 ± 7	115 ± 6	116 ± 6	126 ± 3	37 ± 15	57 ± 6	27 ± 15
WAR	102 ± 3	100 ± 4	96 ± 5	100 ± 5	101 ± 4	98 ± 4	97 ± 6	97 ± 7	93 ± 3	88 ± 10	83 ± 12	76 ± 4
VAL	100 ± 6	103 ± 9	110 ± 9	97 ± 11	96 ± 6	102 ± 8	98 ± 7	101 ± 9	101 ± 7	82 ± 10	75 ± 11	82 ± 6
DIA	104 ± 8	101 ± 7	105 ± 7	101 ± 10	100 ± 6	100 ± 7	97 ± 8	97 ± 8	97 ± 6	87 ± 10	84 ± 13	82 ± 6
LOR	110 ± 6	104 ± 5	113 ± 5	102 ± 7	102 ± 4	104 ± 6	117 ± 7	118 ± 6	123 ± 4	106 ± 6	111 ± 7	59 ± 10
ATOR	101 ± 10	104 ± 10	109 ± 9	101 ± 6	105 ± 6	106 ± 8	104 ± 8	111 ± 12	113 ± 6	63 ± 10	73 ± 22	48 ± 6

^askladištenje na +4 °C; ^bskladištenje na -20 °C

Tablica VII. Validacijski parametri metode određivanja farmaceutskih spojeva u homogenatu cijelog tijela zebrića ($m = 1,0$ g, $n = 4$). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Analitički povrat / %	Utjecaj matrice / %	Točnost / %	Preciznost / %	GK / $\mu\text{g kg}^{-1}$
COD	72 ± 10	7 ± 9	103	8	0,3
norCOD	NO	NO	NO	NO	0,5
MOR	8 ± 24	2 ± 12	110	24	0,5
TRAM	82 ± 11	1 ± 13	104	7	0,05
N-DM-TRAM	76 ± 17	11 ± 13	99	10	0,02
O-DM-TRAM	69 ± 7	-14 ± 8	112	15	0,02
EDDP	54 ± 12	5 ± 9	100	3	0,005
EMDP	NO	NO	NO	NO	0,01
BE	75 ± 16	17 ± 11	100	16	0,05
NOR	49 ± 29	-4 ± 19	104	7	1,0
SMX	61 ± 22	17 ± 12	90	37	0,08
N-Ac-SMX	70 ± 21	31 ± 22	142	10	0,3
AZI	70 ± 21	-17 ± 15	104	22	1,0
DC-AZI	85 ± 22	-15 ± 22	110	20	1,0
N-DM-AZI	68 ± 29	-18 ± 34	94	9	1,0
N'-DM-AZI	73 ± 45	3 ± 20	108	28	1,0
CLA	74 ± 16	-7 ± 10	114	15	0,08
DC-CLA	NO	NO	NO	NO	0,05
DM-CLA	NO	NO	NO	NO	3,0
ZOLP	76 ± 8	1 ± 8	105	5	0,01
ZOLP-COOH	NO	NO	NO	NO	0,05
SER	24 ± 19	-4 ± 13	117	18	0,05
DIA	75 ± 11	-5 ± 11	110	4	0,05
OXA	63 ± 14	7 ± 12	104	11	0,3
TEM	NO	NO	NO	NO	0,08
DLOR	57 ± 20	2 ± 8	102	11	0,1
CARB	70 ± 13	5 ± 9	103	10	0,05
CAFF	79 ± 26	28 ± 14	132	19	0,1
RAM	71 ± 14	4 ± 11	106	11	0,08
VER	76 ± 10	-1 ± 10	116	3	0,02
VER D617	NO	NO	NO	NO	0,08
norVER	NO	NO	NO	NO	0,02
WAR	60 ± 11	18 ± 10	87	7	0,08
VAL	34 ± 17	-7 ± 18	101	21	0,5
ATOR	31 ± 8	-4 ± 8	128	11	0,01

GK, granica kvantifikacije; NO, nije određeno

Tablica VIII. Srednje vrijednosti (\pm sd) koncentracija farmaceutskih spojeva u mediju (γ_m) i masenih udjela u zebricama (ω_z) za vrijeme ispitivanja akumulacije farmaceutskih spojeva.

Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$\gamma_m^a / \mu\text{g L}^{-1}$	$\omega_z^b / \mu\text{g kg}^{-1}$					
		1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	6. dan	7. dan
COD	9,4 \pm 0,6	6,1 \pm 0,1	10,4 \pm 0,5	6,9 \pm 0,6	8,1 \pm 1,8	9,9 \pm 1,6	10,8 \pm 1,6
norCOD	0,4 \pm 0,2	<GK	0,6 \pm 0,0	0,9 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	1,6 \pm 0,5	0,7 \pm 0,2
MOR	0,2 \pm 0,1	10,9 \pm 0,4	12,0 \pm 1,5	15,7 \pm 1,3	18,0 \pm 2,9	20,5 \pm 1,9	17,5 \pm 3,5
COD_{uk}	10,1 \pm 0,4	17,6 \pm 0,5	23,6 \pm 1,1	24,3 \pm 0,4	27,9 \pm 4,6	33,1 \pm 3,1	29,8 \pm 5,1
TRAM	9,5 \pm 0,4	11,5 \pm 0,4	14,4 \pm 1,0	13,5 \pm 0,2	14,7 \pm 4,8	18,1 \pm 0,0	15,1 \pm 0,0
O-DM-TRAM	<GK	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,6 \pm 0,2	0,7 \pm 0,0	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1
N-DM-TRAM	0,1 \pm 0,0	2,8 \pm 0,0	3,6 \pm 0,3	4,1 \pm 0,0	4,5 \pm 0,7	5,1 \pm 0,7	4,3 \pm 0,3
TRAM_{uk}	9,5 \pm 0,3	14,8 \pm 0,5	18,5 \pm 0,7	18,5 \pm 0,5	20,2 \pm 5,5	24,0 \pm 0,9	20,1 \pm 0,2
EDDP	8,9 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	2,6 \pm 0,2	2,8 \pm 0,1	3,1 \pm 0,7	3,3 \pm 0,8	3,8 \pm 0,1
EMDP	<GK	0,1 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0
EDDP_{uk}	9,0 \pm 0,3	1,4 \pm 0,4	3,2 \pm 0,2	3,2 \pm 0,0	3,4 \pm 0,9	3,7 \pm 0,9	4,2 \pm 0,2
BE	7,9 \pm 0,2	1,3 \pm 0,5	2,2 \pm 0,1	2,2 \pm 0,5	3,9 \pm 1,3	4,0 \pm 1,1	4,1 \pm 0,2
NOR	9,4 \pm 0,6	5,3 \pm 1,4	4,7 \pm 0,1	5,3 \pm 0,9	7,6 \pm 1,0	12,0 \pm 0,7	9,9 \pm 1,4
SMX	9,2 \pm 0,6	0,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,5 \pm 0,0	0,6 \pm 0,2	0,7 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1
N-Ac-SMX	0,3 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	0,8 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1
SMX_{uk}	9,5 \pm 0,5	0,9 \pm 0,2	1,3 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,2 \pm 0,1	1,5 \pm 0,3	1,0 \pm 0,2
AZI	12,8 \pm 1,0	5,8 \pm 1,5	12,5 \pm 2,0	16,5 \pm 3,2	26,7 \pm 1,5	27,1 \pm 4,2	32,4 \pm 5,7
DC-AZI	<GK	<GK	1,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,0	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,2 \pm 0,2
N'-DM-AZI	0,4 \pm 0,1	<GK	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,2	2,0 \pm 0,8	1,7 \pm 0,4	1,7 \pm 0,1
AZI_{uk}	13,3 \pm 1,0	5,8 \pm 1,5	14,5 \pm 2,0	18,9 \pm 3,5	30,0 \pm 2,4	30,1 \pm 4,6	35,6 \pm 5,6
CLA	9,0 \pm 0,4	1,5 \pm 0,1	2,6 \pm 0,5	2,2 \pm 0,2	2,1 \pm 0,1	2,5 \pm 0,6	2,7 \pm 0,7
DC-CLA	<GK	0,2 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	0,5 \pm 0,2	0,6 \pm 0,1
CLA_{uk}	9,3 \pm 0,4	1,8 \pm 0,2	3,2 \pm 0,4	2,7 \pm 0,2	2,7 \pm 0,1	3,1 \pm 0,8	3,4 \pm 0,8
ZOLP	7,4 \pm 0,6	26,3 \pm 3,4	21,3 \pm 0,8	17,8 \pm 0,2	21,3 \pm 2	26,3 \pm 1,6	23,8 \pm 0,4
ZOLP-COOH	0,1 \pm 0,1	1,8 \pm 0,6	3,3 \pm 0,2	3,0 \pm 0,7	2,5 \pm 0,2	3,9 \pm 0,3	3,3 \pm 0,1
2OH-ZOLP*	0,2 \pm 0,1	1,8 \pm 0,0	1,5 \pm 0,1	1,5 \pm 0,4	1,3 \pm 0,3	1,7 \pm 0,6	1,8 \pm 0,3
1OH-ZOLP*	0,1 \pm 0,0	0,6 \pm 0,0	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	1,0 \pm 0,4	1,3 \pm 0,2	1,2 \pm 0,1
ZOLP_{uk}	7,8 \pm 0,5	30,2 \pm 2,9	26,4 \pm 1,0	23,0 \pm 1,4	25,8 \pm 2,9	32,8 \pm 2,7	29,6 \pm 0,3
SER	4,3 \pm 1,0	156,8 \pm 0,2	155,1 \pm 3,0	197,3 \pm 10,8	219,4 \pm 26,9	495,1 \pm 63,9	409,9 \pm 38,6
norSER*	0,1 \pm 0,0	88,5 \pm 5	63,8 \pm 1,9	59,8 \pm 3,5	73,9 \pm 2,7	132,1 \pm 2,8	129,4 \pm 1,5
SER-KET*	0,1 \pm 0,0	24,5 \pm 1,6	20,4 \pm 1,1	31,0 \pm 1,6	25,2 \pm 1,0	34,5 \pm 0,4	38,3 \pm 0,9
SER_{uk}	4,5 \pm 0,9	275,4 \pm 7,2	243,5 \pm 2,2	292,6 \pm 16,2	323,3 \pm 28,6	669,8 \pm 67,2	585,8 \pm 36,1
DIA	8,3 \pm 0,5	220,5 \pm 21,2	228,3 \pm 49,9	224,9 \pm 22,7	256,1 \pm 40,1	209,4 \pm 37,4	269,3 \pm 41,9
norDIA*	0,5 \pm 0,1	14,5 \pm 2,7	13,8 \pm 3,7	20,4 \pm 1,3	23,1 \pm 3,5	18,6 \pm 1,1	27,2 \pm 3,4
TEM	0,3 \pm 0,1	18,3 \pm 1,3	22,2 \pm 0,0	30,1 \pm 2,2	33,3 \pm 2,8	31,4 \pm 0,4	33,2 \pm 3,2
DIA_{uk}	9,1 \pm 0,5	253,2 \pm 25,2	264,1 \pm 53,8	275,0 \pm 19,2	312,2 \pm 39	258,9 \pm 38,9	329,5 \pm 48,5
OXA	8,7 \pm 0,3	32,0 \pm 5,4	28,5 \pm 2,9	33,9 \pm 2,6	35,2 \pm 5,7	32,9 \pm 4,9	33,2 \pm 7,9
DLOR	5,6 \pm 0,4	27,5 \pm 7,0	68,5 \pm 7,5	68,1 \pm 2,8	93,2 \pm 2,4	127,3 \pm 9,0	149,9 \pm 24,5
6OH-DLOR*	0,7 \pm 0,5	0,6 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0
5OH-DLOR*	0,7 \pm 0,5	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
DLOR_{uk}	7,0 \pm 1,0	28,2 \pm 7,1	68,8 \pm 7,7	68,4 \pm 2,8	93,6 \pm 2,4	127,7 \pm 9,1	150,3 \pm 24,5
CARB	7,2 \pm 0,2	24,7 \pm 7,2	26,4 \pm 1,7	26,3 \pm 5,2	28,4 \pm 8,2	29,5 \pm 3,6	25,0 \pm 2,8
CARB-EP*	<GK	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0	0,1 \pm 0
CARB_{uk}	7,2 \pm 0,2	24,8 \pm 7,2	26,5 \pm 1,7	26,4 \pm 5,2	28,5 \pm 8,2	29,6 \pm 3,6	25,2 \pm 2,8
CAFF	11,3 \pm 0,2	10,7 \pm 2,9	11,7 \pm 0,6	10,3 \pm 0,2	11,2 \pm 1,2	9,7 \pm 0,4	10,9 \pm 2,5
RAM	9,7 \pm 0,3	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1

Tablica VIII. nastavak

FAS	$\gamma_m^a / \mu\text{g L}^{-1}$	$\omega_z^b / \mu\text{g kg}^{-1}$					
		1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	6. dan	7. dan
VER	$6,2 \pm 0,9$	$10,1 \pm 1,7$	$6,2 \pm 1,3$	$7,2 \pm 1,8$	$7,6 \pm 1,5$	$10,7 \pm 2,6$	$9,0 \pm 0,3$
VER D617	$0,3 \pm 0,2$	$16,7 \pm 6,5$	$23,5 \pm 0,1$	$21,8 \pm 2,7$	$29,7 \pm 4,1$	$29,7 \pm 2,2$	$36,6 \pm 3,2$
O-DM-VER*	<GK	<GK	<GK	<GK	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$	$0,1 \pm 0,0$
norVER*	$0,6 \pm 0,2$	$10,8 \pm 1,7$	$9,0 \pm 0,3$	$8,5 \pm 1,7$	$10,9 \pm 0,3$	$11,2 \pm 1,2$	$14,2 \pm 1,8$
VER _{uk}	$7,4 \pm 0,7$	$47,4 \pm 13,6$	$52,3 \pm 1,5$	$50,2 \pm 7,7$	$65,6 \pm 8,3$	$69,0 \pm 7,3$	$81,3 \pm 3,4$
WAR	$11,2 \pm 0,4$	$8,7 \pm 0,3$	$11,4 \pm 2,5$	$8,2 \pm 2,3$	$10,1 \pm 4,5$	$11,6 \pm 1,8$	$13,5 \pm 4,3$
WAR-OH	<GK	$4,6 \pm 0,7$	$3,6 \pm 0,3$	$3,7 \pm 0,4$	$2,6 \pm 0,6$	$3,6 \pm 0,1$	$3,6 \pm 0,6$
WAR _{uk}	$11,2 \pm 0,4$	$13,1 \pm 1,0$	$14,8 \pm 2,2$	$11,7 \pm 1,9$	$12,6 \pm 5,1$	$15,1 \pm 1,7$	$16,9 \pm 4,8$
VAL	$8,9 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,0$	$1,5 \pm 0,3$	$2,0 \pm 0,5$	$2,0 \pm 1,0$	$1,5 \pm 1,0$	$2,1 \pm 0,3$
ATOR	$8,1 \pm 0,5$	$3,5 \pm 0,6$	$1,6 \pm 0,1$	$1,3 \pm 0,0$	$1,7 \pm 0,4$	$1,9 \pm 0,3$	$1,4 \pm 0,2$

^an = 14; ^bn = 2; *GK nije određena; **GK**, granica kvantifikacije; **uk**, ukupna masena koncentracija tvari (roditeljski spoj + metaboliti)

Tablica IX. Srednje vrijednosti (\pm sd) masenih udjela farmaceutskih spojeva u zebričama (ω_z) za vrijeme ispitivanja eliminacije farmaceutskih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$\omega_z^a / \mu\text{g kg}^{-1}$					
	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	6. dan	7. dan
COD	1,4 \pm 0,2	0,7 \pm 0,1	0,4 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0
norCOD	0,5 \pm 0,1	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
MOR	10,3 \pm 1,6	5,7 \pm 0,5	3,2 \pm 0,2	3,2 \pm 1,3	3,0 \pm 0,5	3,2 \pm 0,4
COD_{uk}	12,8 \pm 1,5	6,6 \pm 0,5	3,8 \pm 0,2	3,7 \pm 1,5	3,5 \pm 0,6	3,6 \pm 0,4
TRAM	0,7 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
O-DM-TRAM	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
N-DM-TRAM	0,8 \pm 0,2	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1	0,1
TRAM_{uk}	1,6 \pm 0,3	0,5 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
EDDP	0,4 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0
EMDP	0,2 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK
EDDP_{uk}	0,6 \pm 0,0	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0	0,3 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0
BE	1,8 \pm 0,2	0,9 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0
NOR	1,0 \pm 0,2	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
SMX	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
N-Ac-SMX	0,3 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
SMX_{uk}	0,4 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
AZI	27,0 \pm 6,0	21,1 \pm 4,2	20,8 \pm 3,9	13,1 \pm 6,2	12,3 \pm 3,2	9,7 \pm 2,8
DC-AZI	1,0 \pm 0,0	1,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,3	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	<GK
N'-DM-AZI	1,7 \pm 0,3	1,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	1,1 \pm 0,3	1,1 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1
AZI_{uk}	30,0 \pm 6,3	23,7 \pm 4,4	24,1 \pm 4,6	15,5 \pm 6,4	14,7 \pm 3,3	10,7 \pm 2,9
CLA	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	<GK	0,1 \pm 0,0
DC-CLA	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
CLA_{uk}	0,3 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	<GK	0,1 \pm 0,0
ZOLP	1,4 \pm 0,2	1 \pm 0	0,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0
ZOLP-COOH	0,3 \pm 0,0	0,1	<GK	<GK	<GK	<GK
2OH-ZOLP*	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
1OH-ZOLP*	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
ZOLP_{uk}	1,6 \pm 0,2	1,0	0,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,1	0,3 \pm 0,0
SER	67,1 \pm 28,6	17,2 \pm 0,7	13,8 \pm 1,4	4,7 \pm 0,4	1,6 \pm 0,0	1,8 \pm 0,0
norSER*	27,5 \pm 4,3	19,3 \pm 1,0	4,6 \pm 0,4	3,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	0,6 \pm 0,0
SER-KET*	2,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,2	1,0 \pm 0,2	0,8 \pm 0,0	0,6 \pm 0,1	0,2 \pm 0,0
SER_{uk}	98,8 \pm 33,0	39,2 \pm 0,1	19,7 \pm 1,6	8,7 \pm 0,3	3,3 \pm 0,6	2,6 \pm 0,1
DIA	13,0 \pm 0,2	7,1 \pm 2,0	2,0 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2	0,2 \pm 0,2
norDIA*	0,3 \pm 0,1	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
TEM	2,1 \pm 0,2	1,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,5	0,4 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0
DIA_{uk}	15,3 \pm 0,4	8,3 \pm 2,2	3,1 \pm 0,7	1,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2	0,3 \pm 0,2
OXA	5,2 \pm 0,4	1,2 \pm 0,6	0,7 \pm 0,2	0,3 \pm 0,0	<GK	<GK
DLOR	69,9 \pm 7,2	46,9 \pm 2,0	33,4 \pm 2,7	27,3 \pm 2,5	18,8 \pm 1,1	11,2 \pm 3,6
6OH-DLOR*	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	0,1	<GK
5OH-DLOR*	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1 \pm 0,0	0,1	0,1	<GK
DLOR_{uk}	70,1 \pm 7,2	47,1 \pm 2,1	33,7 \pm 2,6	27,4 \pm 2,6	18,9 \pm 1,1	11,2 \pm 3,6
CARB	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK
CARB-EP*	0,1 \pm 0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
CARB_{uk}	0,2 \pm 0,1	0,2 \pm 0,1	0,1 \pm 0	<GK	<GK	<GK
CAFF	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0	2,5 \pm 0,0
RAM	0,1 \pm 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK

Tablica IX. nastavak

FAS	$\omega_z^a / \mu\text{g kg}^{-1}$					
	1. dan	2. dan	3. dan	4. dan	6. dan	7. dan
VER	0,7 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
VER D617	2,8 ± 0,8	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,7	0,5	<GK	<GK
O-DM-VER*	0,1 ± 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
norVER*	0,5 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0	0,2 ± 0,0
VER _{uk}	5,7 ± 1,3	2,0 ± 0,3	2,3 ± 1,2	0,8 ± 0,7	0,4 ± 0,0	0,3 ± 0,0
WAR	2,4 ± 0,0	1,0 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,3	0,3 ± 0,1
WAR-OH	0,3 ± 0,0	0,1 ± 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK
WAR _{uk}	2,7 ± 0,0	1,1 ± 0,4	0,7 ± 0,4	0,2 ± 0,0	0,3	0,3 ± 0,1
VAL	0,5 ± 0,0	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK
ATOR	0,1	<GK	<GK	<GK	<GK	<GK

^a*n* = 2; *GK nije određena; GK, granica kvantifikacije; uk, ukupna masena koncentracija tvari (roditeljski spoj + metaboliti)

Tablica X. 24-satna procjena gubitaka farmaceutskih spojeva uslijed abiotičkih procesa. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Ukupni abiotički gubitak (%)	Adsorpcija na stjenku (%)
COD	-7,5	0,1
CAFF	-5,0	0,0
TRAM	-11,4	0,0
BE	-6,1	0,0
NOR	-3,7	0,0
ZOLP	-10,7	0,0
SMX	-6,1	0,0
CARB	-6,8	0,0
DLOR	-10,4	0,9
AZI	-16,2	2,5
VER	-19,7	10,9
OXA	-12,4	0,0
RAM	-7,8	0,0
EDDP	-4,3	4,1
VAL	-6,3	0,0
WAR	0,4	0,0
DIA	-5,5	0,4
SER	-13,4	5,4
CLA	-8,0	1,8
ATOR	0,4	0,0

Tablica XI. Masena bilanca (μg) farmaceutskih spojeva tijekom prvog dana akumulacijske faze (24 h). Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$m_{R,v,0}$	$m_{R,v,24}$	$m_{R,z,24}$	$m_{M,v,24}$	$m_{M,z,24}$	$m_{R,ab}$	$m_{R,uk,24}$	Masena bilanca u 24 h (%)
COD	63,5	54,1	0,2	3,0	0,5	8,4	66,2	104,3
TRAM	59,9	58,6	0,4	0,4	0,1	4,4	63,9	106,7
EDDP	60,1	51,1	0,1	0,6	0	6,6	58,3	97,1
BE	51,0	44,1	0	0	0	4,5	48,7	95,4
NOR	60,1	58,9	0,2	0	0	0,9	60,0	99,8
SMX	65,6	53,9	0	0,6	0	3,6	58,2	88,6
AZI	86,4	82,9	0,2	1,7	0	6,8	91,7	106,0
CLA	56,2	53,8	0,1	1,0	0	4,5	59,4	105,7
ZOLP	55,8	40,1	1,0	0,8	0,2	8,2	50,2	90,0
SER	59,9	3,4	6,0	1,2	4,5	2,0	17,2	28,8
DIA	59,7	39,9	8,5	2,2	1,3	4,2	56,1	93,9
OXA	55,7	47,5	1,2	0	0	8,1	56,8	102,1
DLOR	42,8	31,8	1,1	0,7	0	3,9	37,5	87,6
CARB	43,9	39,7	1,0	0	0	4,7	45,3	103,1
CAFF	67,0	67,7	0,4	0	0	4,9	72,9	108,8
RAM	64,2	54,3	0	0	0	1,2	55,6	86,5
VER	55,9	32,9	0,4	7,1	1,4	8,2	49,9	89,3
WAR	71,3	62,0	0,3	0,6	0,2	9,7	72,8	102,1
VAL	56,5	50,4	0,1	0	0	-1,4	49,2	87,1
ATOR	51,6	49,5	0,1	0	0	-1,0	48,7	94,4

R, roditeljski spoj; M, metabolit; v, uzorak medija; z, uzorak zebrice; ab, abiotički gubitak nakon 24 h

Tablica XII. Procjena utjecaja metabolizma na ukupnu depuraciju farmaceutskih spojeva u zebrici s pomoću izračunate konstante brzine depuracije (k_d) i procijenjene konstante brzine metaboličke transformacije (k_m) korištenjem modela kvantitativnog odnosa strukture i reaktivnosti EPI Suite BCFWIN. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	k_d / h^{-1}	$t_{1/2,d} / h$	k_m^a / h^{-1}	$k_{m,kor}^b / h^{-1}$	$t_{1/2,m} / h$	$k_{m,corr}/k_d$	Procjena utjecaja metabolizma (%)
COD	0,093	7,5	1,234	2,9	0,2	13,3	>100
TRAM	0,141	4,9	0,166	0,4	1,8	1,2	>100
EDDP	0,126	5,5	0,053	0,1	5,6	0,4	42
BE	0,036	19,4	5,208	12,0	0,1	145,6	>100
NOR	0,096	7,2	2,887	6,7	0,1	29,5	>100
SMX	0,083	8,4	0,465	1,1	0,7	5,6	>100
AZI	0,010	70,5	1,042	2,4	0,3	106,0	>100
CLA	0,187	3,7	0,726	1,7	0,4	3,9	>100
ZOLP	0,139	5,0	0,067	0,2	4,5	0,5	48
SER	0,078	8,9	0,001	0,0	476	0,01	0,8
DIA	0,131	5,3	0,037	0,1	8,1	0,3	28
OXA	0,079	8,8	0,138	0,3	2,2	1,7	>100
DLOR	0,033	20,8	0,095	0,2	3,2	2,9	>100
CARB	0,217	3,2	0,193	0,4	1,6	0,9	89
CAFF	0,125	5,5	1,327	3,1	0,2	10,6	>100
RAM	0,065	10,7	0,176	0,4	1,7	2,7	>100
VER	0,124	5,6	0,099	0,2	3,0	0,8	80
WAR	0,076	9,2	0,347	0,8	0,9	4,6	>100
VAL	0,063	11,1	0,031	0,1	9,8	0,3	33
ATOR	0,145	4,8	0,082	0,2	3,7	0,6	56

^akonstanta brzine metaboličke transformacije procijenjena pomoću EPI Suite BCFWIN²³² za ribu mase 10 g i temperaturu 15 °C; ^bkonstanta brzine metaboličke transformacije procijenjena pomoću modela EPI Suite BCFWIN²³², korigirana na prosječnu masu riba zebrica (0,59 g) i eksperimentalnu temperaturu (28 °C) u ovom pokusu prema Chenu i suradnicima¹⁴²

Tablica XIII. Fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih farmaceutskih spojeva. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	pK _a ^a	log K _{ow} ^a	log D _{ow} ^b (pH 7,4)	log D _{mw} ^c (pH 7,4)	log D _{mpw} ^d
COD	8,89	1,20	0,28	0,12	-0,21
TRAM	9,38	2,51	0,52	1,42	0,73
EDDP	10,99	4,63	1,39 ^a	3,55	3,34
BE	3,15	2,71	-0,21	0,89	-0,38
	9,14				
NOR	5,86	-0,87	-0,87 ^a	-	-0,58
	5,97				
	8,99				
SMX	1,97	0,89	-0,56	-	-
	5,86				
AZI	9,08	3,33	1,36	2,23	1,10
	11,16				
	12,46				
CLA	9,0	3,16	2,38	2,09	1,03
	12,46				
ZOLP	5,39	3,07	3,06	3,21	0,59
SER	9,56	4,81	3,14	4,48	2,02
DIA	2,92	2,91	2,92	3,06	2,56
OXA	1,47	1,77	1,50	1,91	2,27
	10,61				
DLOR	10,13	6,77	2,14	6,46	1,75
CARB	15,96	2,67	2,28	2,82	2,00
CAFF	-	-0,13	0,28	-0,01	1,58
RAM	3,26	3,41	-0,13	1,58	-0,05
	5,19				
VER	9,61	3,90	2,38	2,82	-0,51
WAR	5,56	3,42	0,30	1,60	2,07
VAL	0,85	4,74	-0,89	NO	-0,77
	4,35				
ATOR	4,1	4,13	1,25	2,29	1,13

^aPodaci preuzeti iz programa ChemAxon³⁶; ^bPodaci preuzeti iz baze podataka ChemSpider (ACD/Labs teorijski podaci)³⁷; ^cPodatak izračunat iz težinskog prosjeka koeficijenta raspodjele oktanol-voda za neutralni oblik (log K_{ow,n}) i ionski oblik spoja (log K_{ow,i}) prema Armitageu i suradnicima²⁰²; ^dPodatak procijenjen korištenjem PP-LFER modela prema Hennebergeru i suradnicima²⁰⁴

Tablica XIV. Koncentracije farmaceutskih spojeva u mediju i zebricama u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$\gamma(\text{medij}) / \mu\text{g L}^{-1}$ ($n = 34$)	$\omega(\text{zebrice}) / \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 2$)			
		1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
COD	$1,0 \pm 0,2$	$0,95 \pm 0,07$	$0,89 \pm 0,09$	$0,95 \pm 0,07$	$0,74 \pm 0,02$
MOR	NO	$0,16 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,09$	$0,37 \pm 0,13$	$0,60 \pm 0,06$
norCOD	NO	<GK	$0,03 \pm 0,05$	$0,02 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,07$
CAFF	$1,3 \pm 0,2$	$0,58 \pm 0,10$	$0,97 \pm 0,06$	$0,99 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,08$
NOR	$0,9 \pm 0,1$	<GK	$0,76 \pm 0,01$	$0,94 \pm 0,11$	$1,17 \pm 0$
BE	$0,8 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,02$	$0,53 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,07$	$0,36 \pm 0,03$
TRAM	$1,0 \pm 0,2$	$1,24 \pm 0,01$	$1,41 \pm 0,19$	$1,38 \pm 0,03$	$1,53 \pm 0,04$
O-DM-TRAM	NO	$0,08 \pm 0,03$	$0,07 \pm 0,03$	$0,06 \pm 0,01$	$0,07 \pm 0$
N-DM-TRAM	NO	$0,36 \pm 0,06$	$0,44 \pm 0,03$	$0,45 \pm 0,02$	$0,68 \pm 0,05$
SMX	$0,8 \pm 0,1$	$0,04 \pm 0$	$0,06 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0$	$0,06 \pm 0$
N-Ac-SMX	NO	$0,04 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,06 \pm 0$
ZOLP	$0,8 \pm 0,1$	$0,87 \pm 0,03$	$0,91 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,01$	$1,03 \pm 0,02$
2OH-ZOLP	NO	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
1OH-ZOLP	NO	$0,02 \pm 0$	$0,02 \pm 0$	$0,03 \pm 0$	$0,02 \pm 0$
ZOLP-COOH	NO	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
AZI	$1,1 \pm 0,2$	$0,28 \pm 0,05$	$2,37 \pm 0,35$	$2,39 \pm 0,44$	$3,02 \pm 0,11$
N'-DM-AZI	NO	<GK	$0,52 \pm 0,01$	$0,55 \pm 0,01$	$0,58 \pm 0,01$
DC-AZI	NO	<GK	$0,43 \pm 0,03$	$0,34 \pm 0,08$	$0,38 \pm 0,04$
DLOR	$0,8 \pm 0,2$	$2,64 \pm 0,32$	$12,26 \pm 1,45$	$14,81 \pm 1,47$	$22,69 \pm 1,47$
5OH-DLOR	NO	<GK	$0,59 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,04$	$0,59 \pm 0,02$
6OH-DLOR	NO	<GK	$0,67 \pm 0,08$	$0,70 \pm 0,06$	$0,72 \pm 0,02$
CARB	$0,7 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,14$	$0,94 \pm 0,11$	$0,87 \pm 0,21$	$0,51 \pm 0,02$
CARB-EP	NO	$0,03 \pm 0$	$0,04 \pm 0$	$0,04 \pm 0$	$0,03 \pm 0,01$
CLA	$0,8 \pm 0,1$	$0,15 \pm 0,02$	$0,21 \pm 0,08$	$0,18 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02$
DC-CLA	NO	$0,01 \pm 0$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0,01$	$0,02 \pm 0$
EDDP	$0,9 \pm 0,1$	$0,19 \pm 0,04$	$0,27 \pm 0,02$	$0,29 \pm 0,01$	$0,34 \pm 0,03$
EMDP	NO	<GK	$0,04 \pm 0,05$	$0,04 \pm 0,05$	$0,12 \pm 0,05$
RAM	$0,9 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,01$	$0,03 \pm 0$	$0,04 \pm 0,01$	$0,04 \pm 0,01$
OXA	$0,9 \pm 0,1$	$1,72 \pm 0,46$	$2,32 \pm 0,26$	$2,78 \pm 0,16$	$2,60 \pm 0,11$
VER	$0,8 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,02$	$0,57 \pm 0,06$	$0,68 \pm 0,12$	$0,72 \pm 0,01$
norVER	NO	$0,01 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,01$	$0,81 \pm 0,05$	$0,51 \pm 0,03$
O-DM-VER	NO	<GK	$0,01 \pm 0$	$0,01 \pm 0$	$0,01 \pm 0$
VER D617	NO	$0,76 \pm 0,21$	$0,97 \pm 0,01$	$1,15 \pm 0,06$	$2,00 \pm 0,11$
SER	$0,7 \pm 0,2$	$8,80 \pm 0,57$	$32,82 \pm 3,73$	$34,77 \pm 3,68$	$55,98 \pm 1,37$
norSER	NO	$0,17 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,04$	$0,24 \pm 0,01$	$0,31 \pm 0,01$
SER-KET	NO	<GK	$0,14 \pm 0,06$	$0,22 \pm 0,03$	$0,30 \pm 0,02$
DIA	$1,0 \pm 0,2$	$8,76 \pm 1,34$	$21,23 \pm 1,79$	$22,82 \pm 0,03$	$24,15 \pm 2,37$
norDIA	NO	<GK	$1,02 \pm 0,21$	$0,85 \pm 0,14$	$0,52 \pm 0,06$
TEM	NO	<GK	$1,55 \pm 0,29$	$1,67 \pm 0,23$	$1,90 \pm 0,20$
WAR	$1,2 \pm 0,2$	$0,57 \pm 0,07$	$1,17 \pm 0,04$	$1,21 \pm 0,04$	$1,64 \pm 0,30$
WAR-OH	NO	<GK	$0,08 \pm 0,03$	$0,09 \pm 0,01$	$0,11 \pm 0$
VAL	$0,9 \pm 0,1$	$0,14 \pm 0,01$	$0,16 \pm 0,03$	$0,20 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,05$
ATOR	$0,8 \pm 0,1$	$0,02 \pm 0,01$	$0,19 \pm 0,08$	$0,16 \pm 0,06$	$0,18 \pm 0,02$

GK, granica kvantifikacije; NO, nije određeno

Tablica XV. Koncentracije farmaceutskih spojeva u mediju i zebricama u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije $1 \mu\text{g L}^{-1}$, uz dva akutna izlaganja nominalnoj koncentraciji $100 \mu\text{g L}^{-1}$, 1. i 14. dan izlaganja u trajanju od 24 h. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$\gamma(\text{medij})^a / \mu\text{g L}^{-1}$	$\gamma(\text{medij})^b / \mu\text{g L}^{-1}$	$\omega(\text{zebrice}) / \mu\text{g kg}^{-1} (n = 2)$			
			1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
COD	105,0 ± 8,4	1,0 ± 0,1	81,05 ± 7,78	1,08 ± 0,36	56,58 ± 2,20	1,44 ± 0,06
MOR	NO	NO	92,70 ± 0,98	0,95 ± 0,06	95,85 ± 13,79	0,99 ± 0,19
norCOD	NO	NO	12,89 ± 0,90	0,51 ± 0,09	12,19 ± 2,38	0,47 ± 0,11
CAFF	103,0 ± 12,8	1,4 ± 0,3	79,66 ± 5,28	1,12 ± 0,14	92,19 ± 6,63	1,16 ± 0,10
NOR	92,5 ± 5,9	0,9 ± 0,1	16,98 ± 2,27	0,96 ± 0,06	21,04 ± 2,85	1,00 ± 0,03
BE	80,5 ± 5,0	0,8 ± 0,1	10,90 ± 0,55	0,62 ± 0,11	14,74 ± 2,04	0,54 ± 0,01
TRAM	97,1 ± 8,7	0,9 ± 0,1	120,15 ± 5,81	1,43 ± 0,20	90,64 ± 5,82	1,45 ± 0,10
O-DM-TRAM	NO	NO	2,60 ± 0,28	0,07 ± 0,01	3,95 ± 0,64	0,08 ± 0,01
N-DM-TRAM	NO	NO	43,98 ± 5,71	0,50 ± 0,11	39,52 ± 2,96	0,53 ± 0,04
SMX	98,9 ± 8,0	0,9 ± 0,1	6,11 ± 0,13	0,11 ± 0	7,41 ± 0,89	0,08 ± 0
N-Ac-SMX	NO	NO	8,87 ± 0,72	0,10 ± 0,01	8,02 ± 1,43	0,10 ± 0,01
ZOLP	83,3 ± 7,2	0,8 ± 0,1	93,76 ± 7,47	1,60 ± 0,04	73,69 ± 5,90	1,59 ± 0,20
2OH-ZOLP	NO	NO	5,68 ± 0,06	0,12 ± 0,02	4,06 ± 0,25	0,12 ± 0,02
1OH-ZOLP	NO	NO	1,52 ± 0,01	0,08 ± 0,01	1,32 ± 0,01	0,07 ± 0
ZOLP-COOH	NO	NO	5,94 ± 0,70	0,10 ± 0,01	3,70 ± 0,83	0,10 ± 0,02
AZI	93,4 ± 9,2	1,1 ± 0,1	33,14 ± 7,91	4,22 ± 0,13	74,46 ± 19,77	5,13 ± 1,56
N-DM-AZI	NO	NO	<GK	<GK	0,92 ± 0,28	<GK
N'-DM-AZI	NO	NO	7,95 ± 0,14	0,61 ± 0,01	8,48 ± 0,69	0,77 ± 0,12
DC-AZI	NO	NO	11,60 ± 1,11	1,62 ± 0,20	12,54 ± 0,02	1,76 ± 0,30
DLOR	70,7 ± 9,9	0,8 ± 0,2	249,88 ± 7,40	24,69 ± 2,97	337,24 ± 23,90	40,35 ± 6,08
5OH-DLOR	NO	NO	10,75 ± 0,10	0,62 ± 0,02	11,46 ± 1,05	0,63 ± 0,05
6OH-DLOR	NO	NO	11,32 ± 0,25	0,80 ± 0,06	11,82 ± 0,59	0,82 ± 0,14
CARB	73,8 ± 7,1	0,7 ± 0,1	158,01 ± 7,06	1,03 ± 0,28	69,25 ± 18,33	0,71 ± 0,12
CARB-EP	NO	NO	0,96 ± 0,09	0,04 ± 0	0,90 ± 0,08	0,03 ± 0,01
CLA	48,4 ± 4,7	0,8 ± 0,1	11,33 ± 1,30	0,27 ± 0	15,23 ± 1,70	0,51 ± 0,12
DC-CLA	NO	NO	0,72 ± 0,04	<GK	1,10 ± 0,28	0,08 ± 0,01
EDDP	89,4 ± 8,8	0,9 ± 0,1	11,38 ± 1,58	0,55 ± 0,12	15,90 ± 0,36	0,64 ± 0,16
EMDP	NO	NO	6,52 ± 0,06	0,08 ± 0,02	6,86 ± 0,26	0,09 ± 0
RAM	92,5 ± 8,4	0,9 ± 0,1	2,74 ± 0,72	0,11 ± 0	2,10 ± 0,04	0,14 ± 0,02
OXA	83,9 ± 6,8	0,9 ± 0,1	127,19 ± 22,12	3,26 ± 1,01	128,80 ± 29,42	4,64 ± 0,50
VER	56,9 ± 2,8	0,7 ± 0,1	63,26 ± 4,77	0,92 ± 0,04	78,72 ± 11,62	1,00 ± 0,18
norVER	NO	NO	22,81 ± 0,13	0,56 ± 0,01	16,40 ± 2,13	0,72 ± 0,08
O-DM-VER	NO	NO	2,56 ± 0,03	0,01 ± 0	2,48 ± 0,11	0,01 ± 0
VER D617	NO	NO	94,68 ± 13,96	1,98 ± 0,16	70,52 ± 1,94	2,03 ± 0,46
SER	71,1 ± 6,8	0,8 ± 0,2	2711,84 ± 683,04	36,55 ± 2,78	8788,59 ± 762,36	58,04 ± 2,85
norSER	NO	NO	27,02 ± 1,89	0,34 ± 0,05	80,21 ± 5,33	0,36 ± 0,02
SER-KET	NO	NO	1,99 ± 0,03	0,20 ± 0,12	3,43 ± 0,32	0,28 ± 0,02
DIA	92,5 ± 7,3	1,1 ± 0,2	2004,14 ± 317,46	23,37 ± 2,17	2189,02 ± 392,95	21,03 ± 1,89
norDIA	NO	NO	18,06 ± 1,49	0,96 ± 0,13	9,77 ± 0,90	1,01 ± 0,04
TEM	NO	NO	25,28 ± 1,55	1,10 ± 0,09	16,15 ± 0,49	1,01 ± 0,02
WAR	124,7 ± 6,1	1,2 ± 0,1	58,86 ± 2,19	1,51 ± 0,09	57,28 ± 7,38	1,46 ± 0,02
WAR-OH	NO	NO	7,28 ± 1,68	0,13 ± 0,02	6,72 ± 1,68	0,16 ± 0,04
VAL	98,8 ± 14,8	1,0 ± 0,2	10,22 ± 0,40	0,15 ± 0,04	10,62 ± 0,51	0,18 ± 0,03
ATOR	75,7 ± 2,8	0,8 ± 0,1	14,08 ± 0,34	0,14 ± 0,02	13,68 ± 0,43	0,12 ± 0,01

^aakutno izlaganje, $n = 4$; ^bkronično izlaganje, $n = 30$; **GK**, granica kvantifikacije; **NO**, nije određeno

Tablica XVI. Koncentracije farmaceutskih spojeva u mediju i zebricama u pokusu kroničnog izlaganja zebrica razrijeđenoj pročišćenoj otpadnoj vodi. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	$\gamma(\text{medij}) / \text{ng L}^{-1}$ ($n = 34$)	$\omega(\text{zebrice}) / \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 2$)			
		1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
COD	13,8 ± 2,9	<GK	<GK	<GK	<GK
MOR	3,3 ± 0,9	<GK	<GK	<GK	<GK
norCOD	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
CAFF	360,7 ± 121,8	<GK	0,41 ± 0,01	0,42 ± 0,01	0,47 ± 0,03
NOR	22,1 ± 6,0	<GK	<GK	<GK	<GK
COC	0,9 ± 0,1	<GK	<GK	<GK	<GK
BE	4,8 ± 2,0	<GK	<GK	<GK	<GK
TRAM	81,9 ± 12,0	0,13 ± 0	0,13 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,14 ± 0,01
O-DM-TRAM	52,4 ± 7,9	<GK	0,01 ± 0	0,08 ± 0	0,01 ± 0,01
N-DM-TRAM	14,0 ± 2,2	0,09 ± 0	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,10 ± 0
SMX	15,9 ± 5,0	<GK	<GK	<GK	<GK
N-Ac-SMX	5,3 ± 1,1	<GK	<GK	<GK	<GK
ZOLP	1,6 ± 0,9	<GK	<GK	<GK	<GK
2OH-ZOLP	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
1OH-ZOLP	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
ZOLP-COOH	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
AZI	76,5 ± 12,0	0,08 ± 0,02	0,35 ± 0,07	0,46 ± 0,02	0,52 ± 0,13
N-DM-AZI	3,3 ± 0,7	<GK	<GK	<GK	<GK
N'-DM-AZI	10,2 ± 2,2	<GK	<GK	<GK	<GK
DC-AZI	19,4 ± 4,4	<GK	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,02 ± 0
LOR	1,0 ± 0,2	<GK	<GK	<GK	<GK
DLOR	2,6 ± 1,3	0,05 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,14 ± 0,01
5OH-DLOR	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
6OH-DLOR	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
CARB	22,7 ± 2,2	0,07 ± 0,01	0,07 ± 0,01	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0
CARB-EP	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
CLA	13,9 ± 2,8	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0
DC-CLA	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
MTHD	5,3 ± 0,7	0,01 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0
EDDP	12,4 ± 1,4	0,02 ± 0	0,02 ± 0	0,04 ± 0	0,05 ± 0
EMDP	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
RAM	3,6 ± 1,3	<GK	<GK	<GK	<GK
OXA	49,9 ± 7,5	0,21 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,25 ± 0,02	0,27 ± 0,02
VER	2,6 ± 0,8	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0
norVER	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
O-DM-VER	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
VER D617	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
SER	3,0 ± 1,1	0,17 ± 0,01	0,22 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,20 ± 0,04
norSER	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
SER-KET	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
DIA	2,4 ± 0,6	0,04 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,07 ± 0,01
norDIA	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
TEM	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
WAR	3,7 ± 2,1	<GK	<GK	<GK	<GK
WAR-OH	NO	<GK	<GK	<GK	<GK
VAL	168,7 ± 26,6	<GK	<GK	<GK	<GK
ATOR	6,8 ± 1,7	<GK	<GK	<GK	<GK
COT	15,8 ± 2,7	<GK	<GK	<GK	<GK
LIS	5,2 ± 1,4	<GK	<GK	<GK	<GK
MDMA	4,4 ± 0,7	<GK	<GK	<GK	<GK

Tablica XVI. nastavak

FAS	$\gamma(\text{medij}) / \text{ng L}^{-1}$ ($n = 34$)	$\omega(\text{zebrice}) / \mu\text{g kg}^{-1}$ ($n = 2$)			
		1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
SPY	10,1 ± 3,4	<GK	<GK	<GK	<GK
CIP	21,3 ± 4,0	<GK	<GK	<GK	<GK
OXCARB	10,1 ± 5,3	<GK	<GK	<GK	<GK
TOR	2,0 ± 0,3	<GK	<GK	<GK	<GK
ESC	3,0 ± 0,5	0,02 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0	0,03 ± 0
QUE	1,8 ± 0,3	0,01 ± 0	0,02 ± 0	0,01 ± 0	0,03 ± 0
AML	4,1 ± 1,2	<GK	<GK	<GK	<GK
ERY-H2O	2,1 ± 0,3	<GK	<GK	<GK	<GK
TERB	0,4 ± 0,2	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0	0,01 ± 0

GK, granica kvantifikacije; NO, nije određeno

Tablica XVII. Biokoncentracijski faktori (BCF i BCF_{uk}) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrica modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije 1 µg L⁻¹. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	BCF				BCF _{uk}			
	1. dan	13. dan	14. dan	28. dan	1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
COD	0,9	0,9	0,9	0,7	1,1	1,3	1,4	1,4
CAFF	0,5	0,8	0,8	0,8	-	-	-	-
NOR	0,0	0,8	1,0	1,3	-	-	-	-
BE	0,2	0,7	0,6	0,5	-	-	-	-
TRAM	1,3	1,5	1,4	1,6	1,8	2,0	2,0	2,4
SMX	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1
ZOLP	1,0	1,1	1,4	1,2	1,1	1,2	1,6	1,3
AZI	0,2	2,1	2,2	2,7	0,2	3,1	3,1	3,7
DLOR	3,3	15,1	18,3	28,0	3,3	16,6	19,8	29,5
CARB	0,7	1,3	1,2	0,7	0,7	1,4	1,2	0,7
CLA	0,2	0,3	0,2	0,3	0,2	0,4	0,3	0,4
EDDP	0,2	0,3	0,3	0,4	0,2	0,3	0,4	0,5
RAM	0,0	0,0	0,0	0,0	-	-	-	-
OXA	2,0	2,7	3,3	3,1	-	-	-	-
VER	0,4	0,8	0,9	1,0	2,0	3,2	4,4	5,8
SER	11,8	44,1	46,7	75,1	12,1	44,6	47,3	76,0
DIA	8,9	21,6	23,2	24,5	8,9	24,2	25,7	26,9
WAR	0,5	1,0	1,0	1,4	0,5	1,0	1,1	1,5
VAL	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-
ATOR	0,0	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-

BCF_{uk}, bioakumulacijski faktor dobiven iz sumarne koncentracije roditeljskog spoja i svih metabolita

Tablica XVIII. Biokoncentracijski faktori (BCF i BCF_{uk}) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrića modelnoj smjesi odabranih farmaceutskih spojeva, nominalne koncentracije 1 µg L⁻¹, uz dva akutna izlaganja nominalnoj koncentraciji 100 µg L⁻¹, 1. i 14. dan izlaganja u trajanju od 24 h. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	BCF				BCF _{uk}			
	1. dan	13. dan	14. dan	28. dan	1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
COD	0,8	1,1	0,5	1,5	1,8	2,7	1,6	3,0
CAFF	0,8	0,8	0,9	0,8	-	-	-	-
NOR	0,2	1,0	0,2	1,1	-	-	-	-
BE	0,1	0,8	0,2	0,7	-	-	-	-
TRAM	1,2	1,6	0,9	1,6	1,7	2,2	1,4	2,3
SMX	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,2	0,1	0,2
ZOLP	1,1	1,9	0,9	1,9	1,3	2,3	1,0	2,3
AZI	0,4	3,8	0,8	4,6	0,6	6,1	1,1	7,3
DLOR	3,5	30,1	4,8	49,3	3,8	31,8	5,1	50,9
CARB	2,1	1,4	0,9	1,0	2,2	1,4	1,0	1,0
CLA	0,2	0,4	0,3	0,7	0,3	0,4	0,3	0,8
EDDP	0,1	0,6	0,2	0,7	0,2	0,7	0,3	0,8
RAM	0,0	0,1	0,0	0,2	-	-	-	-
OXA	1,5	3,7	1,5	5,3	-	-	-	-
VER	1,1	1,3	1,4	1,4	4,2	6,3	3,7	6,8
SER	38,1	43,6	123,6	69,2	38,6	44,3	124,9	70,1
DIA	21,7	22,2	23,7	20,0	22,2	24,2	24,0	22,1
WAR	0,5	1,3	0,5	1,2	0,5	1,4	0,5	1,4
VAL	0,1	0,2	0,1	0,2	-	-	-	-
ATOR	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-	-	-

BCF_{uk}, bioakumulacijski faktor dobiven iz sumarne koncentracije roditeljskog spoja i svih metabolita

Tablica XIX. Biokoncentracijski faktori (BCF i BCF_{uk}) određeni u pokusu kroničnog izlaganja zebrica razrijeđenoj pročišćenoj otpadnoj vodi. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	BCF				BCF _{uk}			
	1. dan	13. dan	14. dan	28. dan	1. dan	13. dan	14. dan	28. dan
CAFF	-	1,1	1,1	1,3	-	-	-	-
TRAM	1,6	1,6	1,5	1,7	2,7	2,6	2,6	3,2
N-DM-TRAM	6,1	4,7	5,2	7,3	-	-	-	-
AZI	1,0	4,5	5,8	6,7	1,0	4,6	6,2	7,0
DC-AZI	-	0,9	0,9	1,0	-	-	-	-
DLOR	18,1	36,7	39,0	50,7	18,1	36,7	38,6	50,5
CARB	3,2	3,2	3,7	1,7	3,2	3,2	3,7	1,7
CLA	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6
MTHD	2,6	5,3	5,9	5,3	7,4	10,3	14,0	14,8
EDDP	1,8	1,9	3,1	3,7	3,2	4,4	6,0	6,4
OXA	4,2	5,0	5,0	5,5	-	-	-	-
VER	1,7	1,3	2,1	1,3	1,7	1,4	2,1	1,4
SER	54,9	72,1	69,1	66,7	54,9	72,1	69,0	66,9
DIA	16,4	21,9	19,2	29,4	16,5	21,9	19,2	29,4
ESC	6,5	9,0	10,0	9,7	-	-	-	-
QUE	6,0	8,9	6,9	19,2	-	-	-	-
TERB	21,7	20,0	20,0	28,3	-	-	-	-

BCF_{uk}, bioakumulacijski faktor dobiven iz sumarne koncentracije roditeljskog spoja i svih metabolita

Tablica XX. Ekotoksikološka procjena onečišćenja rijeke Save farmaceutskim spojevima na temelju maksimalne koncentracije izmjerene u uzorcima vode rijeke Save i PNEC vrijednosti.

Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	PNEC(voda) ^a / $\mu\text{g L}^{-1}$	$\bar{c}_{\text{max}}(\text{voda})$ / ng L^{-1}	RQ _{max} (voda)
AZI	0,019	3789,59	199,452
DC-AZI	1,53	1672,76	1,093
N'-DM-AZI	0,19	83,65	0,440
N-DM-AZI	0,19	137,81	0,725
CLA	0,12	138,00	1,150
ERY-H2O	0,057	12,39	0,217
CIP	0,089	83,49	0,938
NOR	0,16	82,13	0,513
SMX	0,6	294,74	0,491
N-Ac-SMX	2,38	64,60	0,027
SPY	0,46	181,77	0,395
AML	0,23	41,87	0,182
ATOR	8,5	51,19	0,006
VAL	560	1939,41	0,003
WAR	1,2	11,07	0,009
VER	2,53	6,02	0,002
COD	7,19	79,78	0,011
MTHD	0,59	44,43	0,075
EDDP	0,085	114,47	1,347
TRAM	8,65	692,00	0,080
O-DM-TRAM	10,1	1054,66	0,104
N-DM-TRAM	11	188,13	0,017
CARB	2	253,11	0,127
OXCARB	2,95	330,81	0,112
DIA	0,29	11,83	0,041
OXA	0,37	913,81	2,470
ESC	2,68	40,66	0,015
SER	0,0094	11,30	1,202
QUE	10	19,14	0,002
ZOLP	0,18	2,92	0,016
COC	2,46	64,18	0,026
BE	2,32	380,72	0,164
MDMA	30,1	20,36	0,001
CAFF	1,2	19 948,67	16,624
COT	10	1106,56	0,111
LOR	5,3	9,20	0,002
DLOR	36	110,22	0,003
TERB	0,053	1,50	0,028
TOR	1670	58 873,64	0,035

^avrijednosti preuzete iz baze NORMAN²⁰⁹; PNEC, predviđena koncentracija bez učinka; \bar{c}_{max} , maksimalna koncentracija farmaceutskih spojeva izmjerena u uzorcima vode rijeke Save; RQ, kvocijent rizika

Tablica XXI. Ekotoksikološka procjena onečišćenja rijeke Save farmaceutskim spojevima na temelju maksimalnih masenih udjela određenih u mišiću riba i odgovarajućih (a) PNEC vrijednosti za ribe prema podacima iz baze NORMAN i (b) PNEC vrijednosti korigiranih za bioakumulacijske faktore određene u ovom radu. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	PNEC(riba) ^a / $\mu\text{g kg}^{-1}$	PNEC(riba, kor) ^b / $\mu\text{g kg}^{-1}$	$\omega_{\text{max}}(\text{riba})$ / $\mu\text{g kg}^{-1}$	RQ _{max} (riba) (a)	RQ _{max} (riba, kor) (b)
AZI	0,12	0,09	27,74	231,167	316,126
DC-AZI	9,7	1,37	2,24	0,231	1,631
N'-DM-AZI	1,2	2,82	1,81	1,505	0,640
N-DM-AZI	1,2	3,89	1,58	1,320	0,407
CLA	0,47	0,09	0,29	0,615	3,062
ERY-H2O	0,23	0,23	0,20	0,865	0,857
CIP	0,62	0,41	0,90	1,452	2,222
NOR	0,43	0,83	3,68	8,558	4,451
SMX	5,95	0,05	0,05	0,008	0,872
N-Ac-SMX	5,42	0,87	0,03	0,005	0,031
SPY	1,15	0,12	0,08	0,069	0,641
AML	2,51	3,03	1,67	0,665	0,551
ATOR	649	1,74	0,01	0,000	0,007
VAL	1064	114,72	0,46	0,000	0,004
WAR	26,3	1,03	0,01	0,000	0,006
VER	504	3,24	0,01	0,000	0,002
COD	453	6,95	0,20	0,000	0,029
MTHD	125	0,46	0,07	0,001	0,157
EDDP	125	0,01	0,02	0,000	2,383
TRAM	515	2,79	0,58	0,001	0,209
O-DM-TRAM	175	0,18	0,06	0,000	0,331
N-DM-TRAM	124	5,58	0,18	0,001	0,032
CARB	19,8	0,88	0,19	0,010	0,215
OXCARB	56,6	0,22	0,04	0,001	0,185
DIA	14,2	2,27	0,14	0,010	0,062
OXA	19,9	0,16	0,76	0,038	4,722
ESC	275	2,15	0,07	0,000	0,034
SER	1,32	0,85	1,47	1,112	1,725
QUE	102	15,73	2,77	0,027	0,176
ZOLP	3,48	0,31	0,01	0,001	0,016
COC	17,2	2,45	0,27	0,016	0,112
BE	2,32	1,09	0,21	0,089	0,190
MDMA	318	12,18	0,03	0,000	0,002
CAFF	1,92	0,82	12,09	6,299	14,789
COT	27,6	4,78	0,92	0,033	0,192
LOR	404	189,81	0,25	0,001	0,001
DLOR	4420	313,39	2,11	0,000	0,007
TERB	3,74	2,43	0,07	0,020	0,030
TOR	3348	180,29	0,14	0,000	0,001

^apreuzeto iz baze podataka NORMAN²⁰⁹; ^bvrijednost dobivena umnoškom PNEC(voda) iz baze podataka NORMAN²⁰⁹ i prosječne vrijednosti bioakumulacijskih faktora za mišić na lokaciji Hrušćica (Tablica 24); PNEC, predviđena koncentracija bez učinka; ω_{max} , maksimalna koncentracija farmaceutskih spojeva izmjerena u uzorcima mišića riba izlovljenih iz rijeke Save; RQ, kvocijent rizika

Tablica XXII. Rangiranje istraživanih farmaceutskih spojeva u rijeci Savi prema toksičnosti, upotrebom ToxPi rangiranja na temelju njihovih koncentracija u vodi na odsječku Save od Otoka Samoborskog do Oborova. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	ToxPi vrijednost*	Rang
AZI	4,466	1
CAFF	4,059	2
SER	3,911	3
OXA	3,801	4
EDDP	3,794	5
CLA	3,758	6
N-DM-AZI	3,745	7
DC-AZI	3,643	8
SMX	3,585	9
ERY-H2O	3,579	10
SPY	3,573	11
AML	3,556	12
BE	3,442	13
N'-DM-AZI	3,393	14
CARB	3,367	15
MTHD	3,354	16
O-DM-TRAM	3,337	17
COT	3,332	18
OXCARB	3,329	19
DIA	3,313	20
LIS	3,256	21
TRAM	3,247	22
ZOLP	3,222	23
RAM	3,217	24
COC	3,214	25
NOR	3,184	26
N-Ac-SMX	3,173	27
ESC	3,144	28
TERB	3,140	29
WAR	3,118	30
N-DM-TRAM	3,048	31
COD	3,023	32
TOR	2,999	33
ATOR	2,940	34
MOR	2,933	35
VER	2,868	36
LOR	2,841	37
DLOR	2,831	38
CIP	2,787	39
QUE	2,783	40
VAL	2,725	41
MDMA	2,607	42
ERY	2,302	43

*određeno prema Reifu i suradnicima²¹¹

Tablica XXIII. Rangiranje istraživanih farmaceutskih spojeva u rijeci Savi prema toksičnosti, upotrebom ToxPi rangiranja na temelju njihovih masenih udjela u mišiću ribe na odsječku Save od Otoka Samoborskog do Oborova. Puni nazivi spojeva nalaze se u tablici 1.

FAS	Tox-Pi vrijednost*	Rang
AZI	5,000	1
CAFF	4,280	2
SER	3,861	3
NOR	3,687	4
CLA	3,600	5
N⁷-DM-AZI	3,527	6
N-DM-AZI	3,416	7
AML	3,328	8
DC-AZI	3,260	9
BE	3,219	10
QUE	3,182	11
COT	3,133	12
ERY-H₂O	3,128	13
CIP	2,929	14
SPY	2,889	15
OXA	2,790	16
COC	2,742	17
TRAM	2,512	18
N-DM-TRAM	2,504	19
TERB	2,472	20
DIA	2,464	21
SMX	2,416	22
DLOR	2,401	23
CARB	2,350	24
ESC	2,028	25
O-DM-TRAM	2,021	26
MTHD	2,015	27
LOR	1,996	28
EDDP	1,830	29
VAL	1,758	30
N-Ac-SMX	1,746	31
WAR	1,616	32
TOR	1,575	33
COD	1,566	34
OXCARB	1,428	35
ZOLP	1,357	36
MDMA	1,237	37
ATOR	1,104	38
VER	1,030	39

*određeno prema Reifu i suradnicima²¹¹

§ 9. ŽIVOTOPIS

Klaudija Ivanković Koprivić rođena je 6. svibnja 1994. godine u Kiseljaku, u Bosni i Hercegovini. Petu gimnaziju u Zagrebu završila je 2013. godine. Preddiplomski sveučilišni studij Kemije i inženjerstva materijala na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje 2015. godine, a diplomski sveučilišni studij Primijenjene organske kemije na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije završava 2020. godine. Za vrijeme studija sudjeluje u izvedbi praktikuma organske, fizikalne i analitičke kemije kao demonstrator te volontira u Zavodu za fizičku kemiju na Institutu Ruđer Bošković pod mentorstvom dr. sc. Marka Rožmana, a 2020. godine, sklopu Erasmus+ studijskog boravka, volontira u istraživačkom timu Dr. Jørgena Kjensa na Interdisciplinary Nanoscience Center u Aarhusu (Danska). Za vrijeme studiranja, dobitnica je Rektorove nagrade za individualni znanstveni rad i Dekanove nagrade *cum laude* za izvrsnost u studiranju, a bila je i stipendistica Grada Zagreba na temelju izvrsnosti.

Krajem 2020. godine zapošljava se u Laboratoriju za analitiku i biogeokemiju organskih spojeva Zavoda za istraživanje mora i okoliša na Institutu Ruđer Bošković (IRB) u Zagrebu na HRZZ projektu „Istraživanje farmaceutskog ekspozoma slatkovodnih organizama - procjena rizika i prioritizacija“ pod vodstvom i mentorstvom dr. sc. Senke Terzić te paralelno upisuje doktorski studij analitičke kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu (PMF SuZ). Za vrijeme dokorskog studija sudjeluje u izvođenju nastave kolegija Instrumentalne analitičke metode u istraživanju okoliša (Geološki odsjek, PMF SuZ) i Instrumentalne metode analize kakvoće okoliša (Biološki odsjek, PMF SuZ). U sklopu stručnog usavršavanja, sudjelovala je na radionicama statističke analize i obrade podataka (IRB, Zagreb), pisanja nacionalnih i EU projekata (IRB, Zagreb), 1st Workshop on Mass Spectrometry in Life Sciences (PMF SuZ), Publishing Workshop and Writers' Lab (SETAC, Kopenhagen, Danska) te mnogobrojnim radionicama mekih vještina. Do sada je objavila pet znanstvenih radova u Q1 časopisima, od kojih je na tri rada prvi autor. Za vrijeme dokorskog studija, na konferencijskim skupovima je sudjelovala s ukupno 11 usmenih i posterskih priopćenja. Višestruka je dobitnica godišnje nagrade Instituta Ruđer Bošković za znanstvene radove objavljene u bazi *Web of Science Core Collection* s faktorom utjecaja unutar prvih 10 % u predmetnoj kategoriji, za 2021., 2023. i 2024. godinu. Obnašala je dužnost predstavnice asistenata Zavoda za istraživanje

mora i okoliša u Vijeću asistenata IRB-a tijekom 2023. i 2024. godine. Aktivna je članica Nezavisnog sindikata znanosti i visokog obrazovanja.

Za vrijeme doktorskog studija ima jedan prekid u radu zbog trudnoće u periodu od travnja 2024. do kolovoza 2025. godine.

Paralelno s radom u znanosti, godinama se aktivno bavi pčelarstvom s obitelji i pčelarskim temama kroz aktivnost u Udruzi pčelara zaprešićkog kraja „Ban Josip Jelačić“, trenutačno u ulozi dopredsjednice udruge. Također, osnovala je vlastito obiteljsko pčelarstvo Apis Aurum te završila edukaciju i osposobljavanje za apiterapeuta i fitoaromaterapeuta.

Područja od interesa su joj biomonitoring, ekstrakcijske tehnike aktivnih tvari iz biljnih/životinjskih materijala, farmakologija s naglaskom na metabolizam farmaceutski aktivnih spojeva te farmakognozija i kemija prirodnih organskih spojeva.

Znanstveni radovi u časopisima:

1. Terzic, Senka; Ivankovic, Klaudija; Jambrosic, Karlo; Kurtovic, Bozidar; Ahel, Marijan. Bioaccumulation and tissue distribution of pharmaceuticals and their transformation products in fish along the pollution gradients of a wastewater-impacted river // *Science of the total environment*, 956 (2024), 177339, 14. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.177339
2. Ivankovic, Klaudija; Krizman-Matasic, Ivona; Dragojevic, Jelena; Mihaljevic, Ivan; Smital, Tvrtko; Ahel, Marijan; Terzic, Senka. Uptake/depuration kinetics, bioaccumulation potential and metabolic transformation of a complex pharmaceutical mixture in zebrafish (*Danio rerio*) // *Journal of hazardous materials*, 470 (2024), 134144, 12. doi: 10.1016/j.jhazmat.2024.134144
3. Ivankovic, Klaudija; Jambrosic, Karlo; Mikac, Iva; Kapetanovic, Damir; Ahel, Marijan; Terzic, Senka. Multiclass determination of drug residues in water and fish for bioaccumulation potential assessment // *Talanta*, 264 (2023), 124762, 11. doi: 10.1016/j.talanta.2023.124762
4. Dabić, Dario; Hanževački, Marko; Škorić, Irena; Žegura, Bojana; Ivanković, Klaudija; Biošić, Martina; Tolić, Kristina; Babić, Sandra. Photodegradation, toxicity and density functional theory study of pharmaceutical metoclopramide and its photoproducts // *Science of the total environment*, 807 (2022), 150694, 10. doi: 10.1016/j.scitotenv.2021.150694

5. Ivanković, Klaudija; Kern, Matej; Rožman, Marko. Modelling of the adsorption of pharmaceutically active compounds on carbon-based nanomaterials // Journal of hazardous materials, 414 (2021), 125554, 12. doi: 10.1016/j.jhazmat.2021.125554

Priopćenja na znanstvenim skupovima:

1. Ivanković Koprivić, Klaudija; Krizman-Matasić, Ivona; Dragojević, Jelena; Mihaljević, Ivan; Smital, Tvrtko; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Uptake/depuration kinetics and bioaccumulation potential of complex pharmaceutical mixtures in zebrafish (*Danio rerio*): impact of physicochemical properties and metabolic transformation // 10th Faculty of Science PhD Student Symposium: Book of Abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2026.
2. Ivanković Koprivić, Klaudija; Jambrošić, Karlo; Kapetanović, Damir; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Occurrence and distribution of pharmaceutically active compounds (phacs) in water and fish from the Sava river, Croatia // 10th International Conference WATER FOR ALL, Book of Abstracts. Osijek: Faculty of Food Technology Osijek, 2024. str. 25.
3. Ivanković, Klaudija; Jambrošić, Karlo; Mikac, Iva; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Razvoj multirezidualnih analitičkih metoda za procjenu farmaceutskog ekspozoma slatkovodnih organizama // 1. Skup mladih znanstvenika ZIMO-a, Zagreb, Hrvatska, 2023.
4. Ivanković Koprivić, Klaudija; Dragojević, Jelena; Mihaljević, Ivan; Smital, Tvrtko; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Kinetika akumulacije i eliminacije smjese farmaceutski aktivnih spojeva u modelnom organizmu *Danio rerio* // 4. Znanstvena škola o okolišu "Nekonvencionalni pristupi konvencionalnim izazovima", Zagreb, Hrvatska, 2023.
5. Ivanković, Klaudija; Jambrošić, Karlo; Mikac, Iva; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Development of an optimized sample preparation procedure for the determination of trace levels of pharmaceuticals in fish // 7th Faculty of Science PhD Student Symposium : Book of Abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2023. str. 46–46.
6. Ivanković, Klaudija; Dragojević, Jelena; Mihaljević, Ivan; Smital, Tvrtko; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Kinetics of uptake and elimination of complex drug mixture in zebrafish (*Danio rerio*) // Abstract book of SETAC Europe 33rd Annual Meeting

- “Dana-driven environmental decision-making”. Dublin: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 2023. str. 274–274.
7. Ivanković, Klaudija; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Development of multirezidual LC-MS/MS method for the assessment of trace levels of pharmaceuticals in aquatic environment // 6. simpozij studenata doktorskih studija PMF-a: knjiga sažetaka. Zagreb: Prirodoslovno–matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 102–103.
 8. Ivanković, Klaudija; Kostanjevečki, Petra; Ahel, Marijan; Terzić, Senka. Method development for the assessment of bioaccumulation potential of pharmaceuticals in fish // SETAC Europe 32nd Annual Meeting : Abstract book. Kopenhagen: Society of Environmental Toxicology and Chemistry (SETAC), 2022. str. 510–510.
 9. Kern, Matej; Ivanković, Klaudija; Škulj, Sanja; Rožman, Marko. Modeling the adsorption of emerging contaminants on carbon nanomaterials // Book of abstracts of Nowelties’ Final Conference "New Materials and Inventive Waste Water Treatment Technologies. Harnessing resources effectively through innovation". Zagreb: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, 2022. str. 54–57.
 10. Kern, Matej; Ivanković, Klaudija; Rožman, Marko. Modelling of the adsorption of pharmaceutically active compounds on carbon-based nanomaterials // Simpozij studenata doktorskih studija PMF-a : knjiga sažetaka = PhD student symposium 2021 : book of abstracts. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 2021. str. 334–334.
 11. Ivanković, Klaudija. Farmaceutski ekspozom slatkovodnih organizama - prisutnost i utjecaj farmaceutika na vodene organizme // Znanstvena škola - Sveobuhvatni pristup istraživanju antropogenih pritisaka na okoliš, Zagreb, Hrvatska, 2021.