

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHA BELAK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MIHA BELAK

**SPREMLJANJE NASTANKA RAZPADNIH PRODUKTOV
ZDRAVILNIH UČINKOVIN PRI ELEKTROKEMIČNEM
ČIŠČENJU ODPADNIH VOD**

**MONITORING THE OCCURRENCE OF DEGRADATION
PRODUCTS OF ACTIVE SUBSTANCES IN AN
ELECTROCHEMICAL WASTEWATER TREATMENT**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Katedri za biofarmacijo in farmakokinetiko, pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Zahvala

Ob koncu izdelave magistrske naloge bi se rad zahvalil vsem, ki so pripomogli k njenemu nastanku. Najprej bi se rad zahvalil svojemu mentorju, doc. dr. Juriju Trontlju, ki me je vedno usmeril na pravo pot. Hvala Jurij, za vso prijaznost in dosegljivost v času izdelave naloge. Hvala tudi vsem prijateljem, ki so mi polepšali čas in olajšali delo med študijem. In na koncu, hvala družini, ki vedno verjame vame.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Jurija Trontlja, mag. farm.

Ljubljana, 2015

Miha Belak

Predsednik komisije: prof. dr. Stanislav Gobec

Članica komisije: doc. dr. Pegi Ahlin Grabnar

VSEBINA

POVZETEK	IV
ABSTRACT	V
SEZNAM OKRAJŠAV	VI
UVOD	1
1.1 Zdravilne učinkovine v odpadnih vodah	1
1.1.1 Odstranjevanje zdravilnih učinkovin – čistilne naprave	2
1.1.2. Novejši postopki odstranjevanja kompleksnejših molekul	2
1.2. Izbor zdravilnih učinkovin in pregled literature – potencialni razgradni produkti.....	3
1.2.1. Karbamazepin.....	3
1.2.2. Amoksicilin	4
1.2.3. Atrazin in simazin	5
1.2.4. Ciprofloksacin	5
1.2.5. Diklofenak.....	6
1.2.6. Fluoksetin	7
1.2.7. Bisoprolol in metoprolol	8
1.2.8. Imatinib	8
1.2.9. Klofibrična kislina.....	9
1.2.10. Ibuprofen	10
2. NAMEN DELA	11
3. MATERIALI IN METODE	13
3.1. Materiali	13
3.1.1. Reagenti.....	13
3.1.2. Topila in mobilne faze.....	13
3.2. Aparature in laboratorijski inventar	13
3.3. Metode.....	14
3.3.1. Priprava raztopin	14
3.3.2. Analiza vzorcev.....	15
3.3.3. Obdelava rezultatov.....	16
3.4. Validacija metode.....	16

3.4.1. Linearnost.....	16
3.4.2. Ponovljivost.....	17
3.4.3. Stabilnost.....	17
3.4.4. Točnost.....	17
3.4.5 Selektivnost.....	18
4. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	19
4.1. Razgradni produkti in kinetika njihovega nastanka.....	19
4.1.1 Karbamazepin.....	19
4.1.2. Amoksicilin.....	22
4.1.3. Atrazin.....	24
4.1.4. Simazin.....	27
4.1.5. Ciprofloksacin.....	30
4.1.6. Diklofenak.....	32
4.1.7. Fluoksetin.....	33
4.1.8. Metoprolol.....	36
4.1.9. Bisoprolol.....	38
4.1.10. Imatinib.....	39
4.1.11 Klobfibrična kislina in ibuprofen.....	42
4.2. Validacija.....	45
4.2.1. Linearnost.....	45
4.2.2. Ponovljivost.....	45
4.2.3. Stabilnost raztopin - odzivi netretiranih vzorcev.....	50
4.3. Skupni komentar.....	51
4.3.1. Validacija metode.....	51
4.3.2. Razgradni produkti.....	51
4.3.3. Analiza brez standardov razgradnih produktov.....	52
4.3.4. Težave pri analizi.....	52
5. SKLEP.....	54
6. LITERATURA.....	55

POVZETEK

Vedno večja uporaba zdravilnih učinkovin v humani medicini in pesticidov v kmetijstvu je razlog, da je količina teh snovi v okolju čedalje večja. Poleg samih učinkovin pa se v okolju pojavljajo tudi njihovi metaboliti in razgradni produkti. Zaradi velike stabilnosti teh spojin lahko le-te predstavljajo vedno večjo grožnjo za vodne ekosisteme. Vse več raziskav je tako posvečeno iskanju možnosti in razvoju naprav za odstranjevanje teh spojin iz okolja. Slovensko podjetje Arhel razvija napravo, pri kateri elektrolizne celice razgrajujejo učinkovine s postopki elektrokemijske oksidacije. Cilj te naprave je razgradnja do čim manjših fragmentov, ki bi bili neškodljivi za okolje.

V našem delu smo se osredotočili na spojine, ki zaradi različnih dejavnikov (stabilnost, mehanizem delovanja, pogostost uporabe) predstavljajo večjo grožnjo za obremenitev okolja. Pripravili smo testne raztopine izbranih učinkovin in jih poslali na obdelavo z elektroliznimi celicami. Z literaturnim pregledom smo poiskali že detektirane razgradne produkte teh učinkovin, nato pa smo skušali razviti metode za semi-kvantitativno določanje morebitnih razgradnih produktov. Vse metode smo razvijali na kromatografu visoke ločljivosti sklopljenim z masnim detektorjem vrste trojni kvadrupol. Za vsako obdelano zdravilno učinkovino smo preverili tudi učinkovitost razgradnje z elektrolizno celico. Ugotovili smo, da se učinkovine razgradijo v različnem obsegu, pri polovici je bila dosežena popolna razgradnja. Za večino učinkovin smo detektirali vsaj enega, pa tudi do štiri različne razgradne produkte. Ugotovili smo, da pri pogojih razgradnje najpogosteje pride do hidroksilacije molekule, oz. razpada na kemično nestabilnih mestih.

Metode za določanje večine razpadnih produktov smo tudi validirali, težave pa smo imeli pri detekciji spojin, ki ionizirajo v negativnem načinu ionizacije (ibuprofen, klofibrinska kislina). Na osnovi rezultatov smo ugotovili, da tudi z metodo napredne oksidacije za večino testiranih učinkovin ne dobimo popolnoma majhnih fragmentov, ki bi bili neškodljivi za okolje. Z metodami, ki smo jih razvili za določanje razgradnih produktov učinkovin, pa bi lahko te detektirali tudi v realnih okoljskih vzorcih.

Ključne besede: Razgradni produkti, UHPLC-MS/MS, validacija metode, semi-kvantitativna analiza, BDDA

ABSTRACT

A growing use of active substances in human medicine and pesticides in agriculture leads to increased amount of these substances in the environment. In addition to the active ingredients also their metabolites and their degradation products appear in environment. Due to high stability of these compounds, they may pose a high threat to aquatic ecosystems. Consequently more and more research is dealing with the possibility for the removal of these compounds from the environment. Slovenian company Arhel is developing a device in which the electrolytic cells degrade the active ingredient with the processes of the electrochemical oxidation. The goal of this device is to degrade pharmaceuticals to small fragments, which would be harmless to the environment.

In this work we focused on compounds, which pose a considerable threat to the environment due to various factors (stability, mechanism of action, usage frequency). Test solutions of chosen compounds were prepared and sent to treatment with electrolytic cells. In literature review we found already detected degradation products of these compounds and then we tried to develop methods for semi-quantitative determination of potential degradation products. All methods were developed using an ultra high-resolution liquid chromatograph coupled with a mass detector type triple quadrupole. Also effectiveness of degradation with electrolytic cell for each treated test solution was tested. We found out that compounds degrade to different level, absolute degradation was reached in half of the cases. In most cases, at least one and up to four degradation products were detected.

Methods for the detection of the degradation products were also validated, for the majority of tested substances. We had some problems with the detection of compounds that ionize in negative ionization mode (ibuprofen, clofibric acid). In most cases, the degradation of active pharmaceutical ingredients did not reach a complete mineralization hence the absence of potentially still harmful fragments cannot be excluded. Methods developed for the determination of degradation products of pharmaceuticals, could be used for their detection in real environmental samples.

Key words: Degradation products, UHPLC-MS/MS, method validation, semi-quantitative analysis, BDDA

SEZNAM OKRAJŠAV

AUC - površina pod kromatografskim vrhom

BDDA - z borom dopirana diamantna anoda

E1, E2, E3, E4, E5, E6 - oznaka serij obdelave testnih raztopin

FDA - Food and drug administration, ameriška agencija za hrano in zdravila

iPr - izopropil

LC-MS/MS - tekočinska kromatografija skopljena z masnim detektorjem

m/z - razmerje med maso in nabojem; parameter pri masni spektrometriji

RSD - relativna standardna deviacija

RT - retencijski čas

SIM - snemanje enega iona=single ion monitoring

UHPLC-MS/MS - tekočinska kromatografija ultra visoke ločljivosti skopljena z masnim detektorjem vrste trojni kvadropul

ZZZS - zavod za zdravstveno zavarovanje Slovenije

UVOD

Zdravilne učinkovine so snovi, ki jih uporabljamo v humani ali veterinarski medicini z namenom, da bi se ponovno vzpostavile, izboljšale ali spremenile fiziološke funkcije ali da bi se določila diagnoza. Njihovo delovanje je posledica različnih farmakoloških odzivov, ki jih sprožijo v organizmu. Zaradi narave delovanja na posamezne tarče v organizmu gre po navadi za obstojne molekule. Zato se lahko v različnih aktivnih oblikah izločajo tudi v okolje, kamor pridejo zlasti preko odpadnih vod (2). V okolju pa se lahko pojavijo tudi zaradi nepravilnega odlaganja oz. izpustov ter uporabe v kmetijski industriji (fitofarmacevtiki). Tam lahko predstavljajo grožnjo za človeka in živali zlasti zaradi akutnih učinkov ob izpostavljenosti večji koncentraciji, vendar so ti primeri redki (3). V zadnjem času pa je vse več raziskav posvečenih raziskovanju učinka na ljudi in predvsem živali, ki so kronično izpostavljeni, sicer nizkim koncentracijam farmacevtikov v okolju. Pojem farmacevtik oz. pogosteje uporabljena množinska oblika »farmacevtiki« se v zadnjem času vse pogosteje uporablja v tuji literaturi (ang. *Pharmaceuticals*), v slovenskem prostoru pa ta izraz še ni bil definiran v nobenem strokovnem slovarju. Gre za vse spojine, nosilke farmakološkega učinka, ki so proizvedene za uporabo v zdravilih. Fitofarmacevtiki pa so analogno vse take spojine, proizvedene za uporabo na rastlinah in se delijo na pesticide ter zaščitne snovi za rastline (38). Za razliko od pojma »zdravilne učinkovine«, ki predstavljajo *de facto* enako materijo kot farmacevtiki, imajo slednji v okoljevarstvenem smislu negativno konotacijo, saj te spojine tam praviloma ničesar ne zdravijo, kvečjemu škodijo organizmom, ki jim niso bile namenjene. Veliko skrb pa predstavlja celo grožnja morebitnega vdora tovrstnih onesnažil v pitne vode (1,3). Raziskave so posvečene tudi raziskovanju morebitnih škodljivih učinkov na vodne živali, ki so tem snovem izpostavljene celo življenjsko obdobje. Znan je vpliv anksiolitikov, ki v koncentracijah prisotnih v odpadnih vodah, povzročijo spremembo vedenja in prehranjevalnih navad pri ribah (5).

1.1 Zdravilne učinkovine v odpadnih vodah

Pred obdelavo odpadnih vod v čistilnih napravah je koncentracija farmacevtikov v območju med 1 ng/L in 10² µg/L (1). Čistilne naprave v veliki meri še niso sposobne odstranjevanja večjih in kompleksnejših zdravilnih učinkovin. Razlog za to je morebiti zakonsko

neobvezujoče spremljanje teh snovi na iztokih (3). Učinkovitost odstranjevanja farmacevtikov je torej pričakovano slabša, saj so izmerjene koncentracije na izpustu čistilnih naprav še vedno v območju med 1 ng/L in 10 µg/L (4).

1.1.1 Odstranjevanje zdravilnih učinkovin – čistilne naprave

Čistilne naprave odstranjujejo predvsem enostavne oz. zmerno razgradljive ogljikove, dušikove in fosforjeve spojine (1). Čiščenje odpadnih vod v čistilnih napravah je po navadi sestavljeno iz procesov primarnega in sekundarnega čiščenja, včasih pa je prisotno še terciarno. Znotraj teh procesov se izvaja čiščenje na osnovi fizikalnih, kemijskih in bioloških postopkov (2). Najprej se izvedejo samo fizikalne metode ločbe, s čimer se znebimo anorganskih in velikih organskih delcev. Temu sledi sekundarna faza, kjer glavno čiščenje opravijo mikroorganizmi. Ti lahko razgradijo manjše organske molekule, razpadne produkte pa uporabijo kot vir hranil. Temu lahko sledi še ena faza čiščenja, kjer se zmanjša koncentracija nitratov, nitritov in fosfatov. To se doseže s postopki kloriranja, obarjanja in filtracije (2). Glavno pot za razgradnjo zdravilnih učinkovin torej predstavlja druga faza- čiščenje z mikroorganizmi, vendar je ta proces učinkovit le za enostavne organske spojine. Odstranitev oz. mineralizacija kompleksnejših spojin, kakršnih je večina zdravilnih učinkovin, pa je tudi v tem procesu majhna (2, 6).

1.1.2. Novejši postopki odstranjevanja kompleksnejših molekul

Odstranjevanje kompleksnejših organskih molekul je mogoče z uporabo naprednejših postopkov kemijske oksidacije. Razpad takšnih spojin poteče na osnovi tvorbe in hkratne uporabe hidroksilnih radikalov. Tvorbo le-teh pa omogočajo elektrolitske celice, ki vsebujejo različne elektrodne materiale. Hidroksilni radikali nastanejo zgolj s pomočjo električne energije, tvorijo pa se neposredno iz vode.

Slovensko podjetje, Arhel, proizvodnja in inženirng, d.o.o. razvija z borom dopirano diamantno elektrodo (BDDA). Prednost teh materialov v primerjavi z ostalimi je velika inertnost in trajnost, kar je še posebej pomembno za okoljske vzorce. Na ta način ni dodatne obremenitve za okolje, saj se v vodo ne sproščajo ioni kovin, ima pa tudi zelo dolgo

življenjsko dobo. Napravo je podjetje patentiralo, zato se na tem mestu ne bomo spuščali v večje podrobnosti, navajamo pa njihov patent (40).

1.2. Izbor zdravilnih učinkovin in pregled literature – potencialni razgradni produkti

Prisotnost farmacevtikov in njihovih razpadnih produktov v odpadnih vodah je odvisna od različnih dejavnikov. Pomembne so lastnosti samih učinkovin (predvsem stabilnost), pogostost predpisovanja in uporabe, in možnost morebitnih izpustov/izlivov v okolje (1, 36).

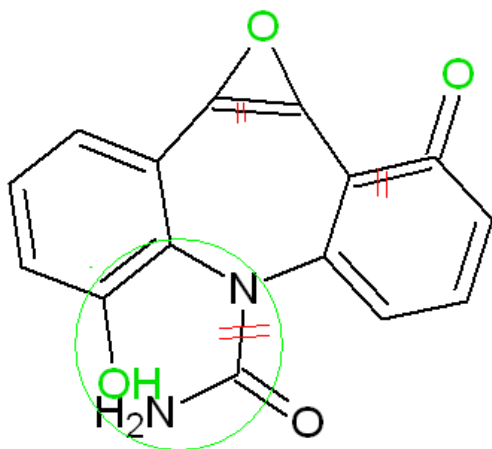
Izbor učinkovin za tretiranje smo naredili glede na različne kriterije: literaturni pregled že zaznanih spojin v odpadnih vodah, predstavniki različnih farmakoloških spojin, pogostost predpisovanja in njihove uporabe, dolgotrajnosti terapije, morebitni škodljiv vpliv na vodni ekosistem. V raziskavo smo zaradi pogoste uporabe pri poljedelstvu dodali tudi dva pesticida. Za izbrane učinkovine smo pripravili literaturni pregled mogočih razgradnih produktov pri pogojih pospešenega staranja. Iskali smo fragmente, ki jih lahko detektiramo s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masnim detektorjem in nastanejo kot posledica razgradnje učinkovin pri različnih procesih: pogoji napredne oksidacije, fotoliza, elektrokemična razgradnja, ozonizacija, kislá hidroliza, ipd.

V nadaljevanju so poleg kratke utemeljitve izbora posamezne učinkovine predstavljeni tudi že detektirani razgradni produkti, ki so nastali pri različnih procesih pospešenega staranja. Le-ti so predstavljeni tudi shematsko s strukturnimi formulami, kjer so poleg molekule učinkovine (črna barva) prikazana mesta razpada vezi (rdeča barva), oz. nastanka novih funkcionalnih skupin ali obročev (zelena barva).

1.2.1. Karbamazepin

Zaradi fizikalno-kemijskih lastnosti in kronične uporabe pri pacientih z epilepsijo je pogosto že bil najden v okoljskih vzorcih (6). Je namreč obstojna spojina, zato se slabo razgradi tudi z različnimi procesi čiščenja iz okolja. Škodljiv je tudi za vodne organizme, saj lahko povzroči razvojne motnje pri zarodkih rib (6,7). Že detektirani razgradni produkti (prikazani na sliki 1), ki so nastali pri oksidaciji aktivirani s persulfatom, so enkrat ali večkrat hidroksilirani

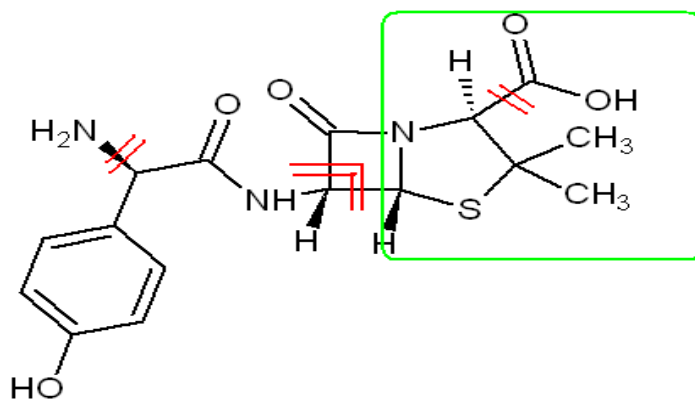
produkti. Možna je tudi dodatna ciklizacija, bodisi kot tvorba epoksida, bodisi tvorba novega obroča (8). Pri fotolizi pa pride do deamidacije in odcepa daljših fragmentov (9).



Slika 1: Karbamazepin in možni razgradni produkti

1.2.2. Amoksisicilin

Zelo pogosto predpisovan antibiotik v humani medicini in morebitna prisotnost le-tega v okolju lahko vpliva na razvoj rezistence na antibiotike. V procesu pospešenega staranja (fotorazgradnja, acidoliza) pride najprej do odprtja betalaktamskega obroča, nato pa še do odcepa posameznih funkcionalnih skupin (amino, karboksilna). Detektirani so bili tudi posamezni manjši fragmenti, ki so nastali z odcepom od osnovne molekule (10,11). Na sliki 2 so predstavljena mesta razgradnje amoksisicilina.

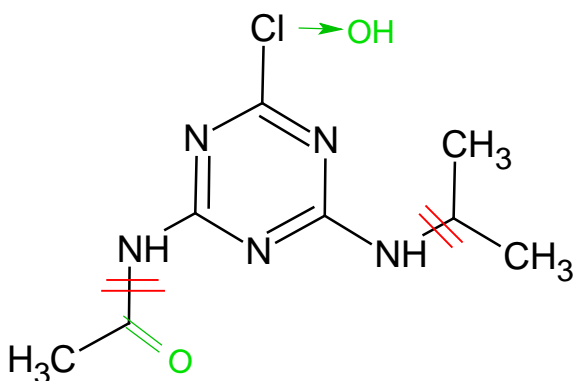


Slika 2: Amoksisicilin in mesta razgradnje

1.2.3. Atrazin in simazin

Zelo široka uporaba pesticidov v kmetijstvu in možnost neposrednega dostopa do podtalnice lahko predstavljata veliko okoljskih obremenitev in možnost onesnaženja pitne vode. Po indeksu toksičnosti, ki kaže vpliv na različne vodne organizme: ribe, alge in vodne bolhe, sta atrazin in simazin uvrščena v kategorijo srednjega tveganja (12). Atrazin je herbicid za zatiranje širokolistnih plevelov, ki se uporablja v kmetijstvu predvsem na koruznih poljih in za zelenice v parkih in golf igriščih. V veliki meri vstopa v podtalnico, naj bi povzročal prezgodnji porod, nepravilnosti pri razvoju otrok, morebiten vpliv kot estrogensko aktivna snov na dvoživke, zato ga je EU od 2004 prepovedala, a se še vedno pojavlja v našem okolju (39).

Učinkovini imata zelo podobno zgradbo, razlikujeta se le v substituentu na dušiku; pri atrazinu je na tem mestu izopropilna veriga, pri simazinu pa etilna. Pri razgradnji učinkovin s fotokatalizo pride najpogosteje do dealkilacije ene ali obeh alkilnih verig v spojini. Možna je tudi zamenjava klora s hidroksilno skupino (13,14) ali celo zamenjava amino- s hidroksilno skupino (15). Podrobnosti so prikazane na sliki 3.

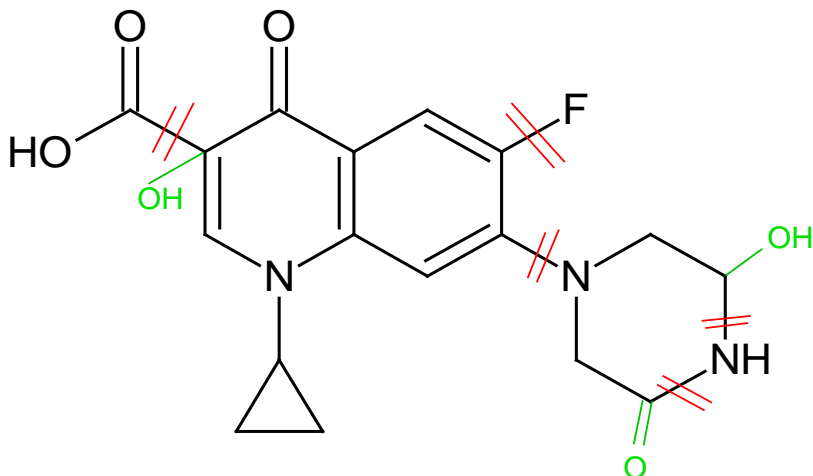


Slika 3: Atrazin in potencialni razgradni produkti

1.2.4. Ciprofloksacin

Še en predstavnik skupine antibiotikov, ki je za razliko od amoksicilina stabilnejši v vodnem okolju. Vse bolj razširjena rezistenca na antibiotike, ki postaja vse večji zdravstveni problem

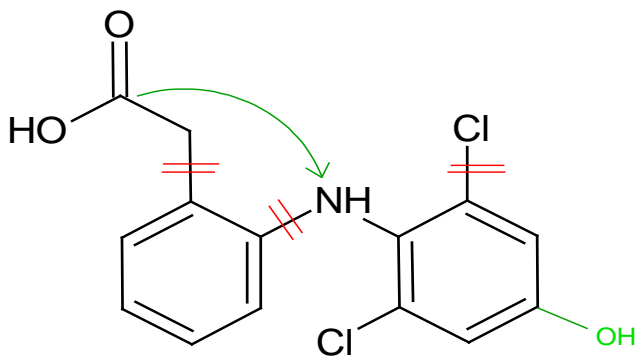
je eden izmed glavnih razlogov za določanje prisotnosti le-teh v okoljskih vzorcih (16,17). Pri pogojih oksidacije ciprofloksacina s kalijevim permanganatom pride do hidroksilacije na različnih mestih na piperazinskem obroču in tudi do popolne odstranitve le tega (18). V drugačnih pogojih oksidacije se lahko odcepi tudi karboksilna skupina, ki jo zamenja hidroksilna skupina (19). Spremembe učinkovine pri različnih pogojih so predstavljene na sliki 4.



Slika 4: Ciprofloksacin in mesta razgradnje

1.2.5. Diklofenak

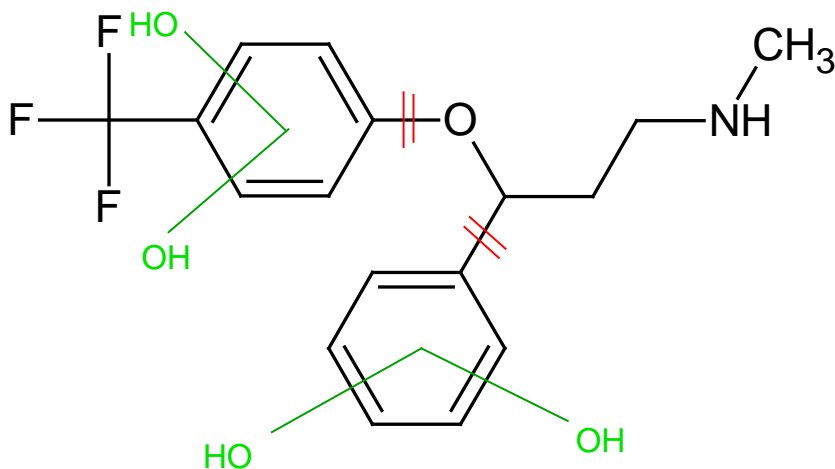
Po podatkih ZZZS je bil v letu 2012 na 13. mestu po pogostosti predpisovanja v Sloveniji. Izdanega je 1,1 tone same učinkovine. Dokazana je bila škodljivost za ujede, ki se prehranjujejo s tistimi živalmi, ki so uživale diklofenak, saj pri njih povzroči ledvično odpoved (36). Dokazan je bil tudi škodljiv vpliv na vodne organizme, saj se koncentrira v ledvicah in jetrih pri ribah (22). Pri pogojih fotoelektrokatalize in ozonizacije se najprej hidroksilira, nato pa se pri nekoliko ostrejših pogojih cepi na manjše fragmente z molekulsko maso manjšo od 100 (20,21). Mesta razgradnje so shematsko predstavljena na sliki 5.



Slika 5: Diklofenak in poti razgradnje

1.2.6. Fluoksetin

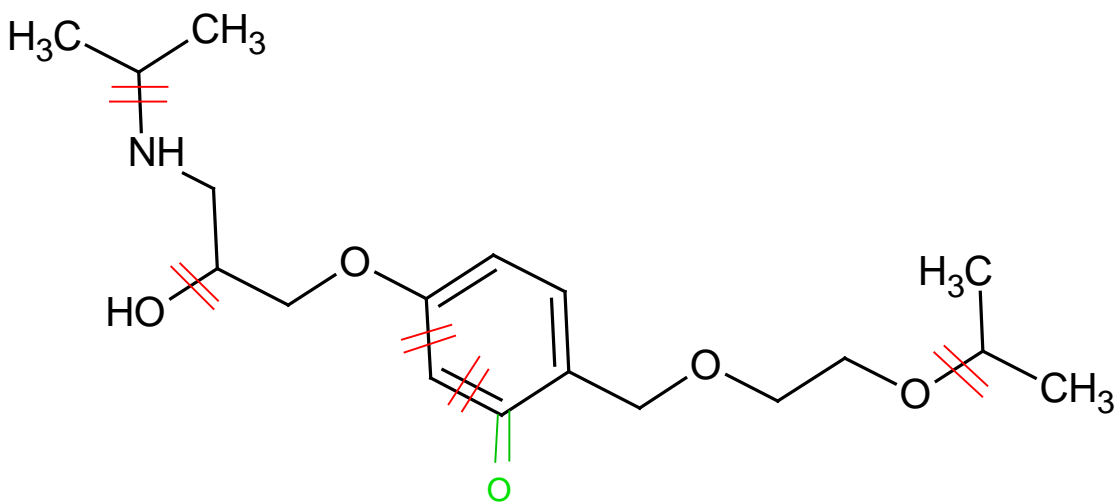
Antidepresiv, ki se v Sloveniji po podatkih ZZZS vse pogosteje predpisuje, zdravljenje z njim pa je razmeroma dolgotrajno. Pri kronični izpostavljenosti (v ekološko relevantnih koncentracijah) lahko pri zarodkih rib pride do motenj v razmnoževanju in razvoju, prav tako pa povzroči tudi endokrino disfunkcijo (24). Pri pogojih indirektna fotolize se najprej hidroksilira fenilni obroč. Po daljši izpostavljenosti stresnim pogojem pa pride najprej do še dodatne hidroksilacije na istem obroču (slika 6), kasneje pa se hidroksilira tudi drugi obroč (23).



Slika 6: Fluoksetin in produkti nastali s fotolizo

1.2.7. Bisoprolol in metoprolol

Učinkovini, ki ju uvrščamo v skupino beta blokatorjev, se predpisujeta pri različnih kardiovaskularnih zapletih. Narava teh bolezni zahteva kronično zdravljenje, zato se običajno predpisujeta za daljše časovno obdobje (26). Bisoprolol je bil v letu 2013 na 14. mestu po pogostosti predpisovanja vseh zdravil v Sloveniji. Pri pogojih oksidativnega stresa poteče bodisi dealkilacija oz. dehidroksialcija (27), pri ostrejših pogojih fotokatalize pa celo do odprtja benzenovega obroča in oksidacije na teh mestih (28). Struktura obeh učinkovin se razlikuje zgolj v substituentu na kisiku (bisoprolol-iPr, metoprolol-Me), zato ju zaradi enakega mehanizma delovanja predstavljamo skupaj. Shematsko so na sliki 7 predstavljena mesta razgradnje bisoprolola.

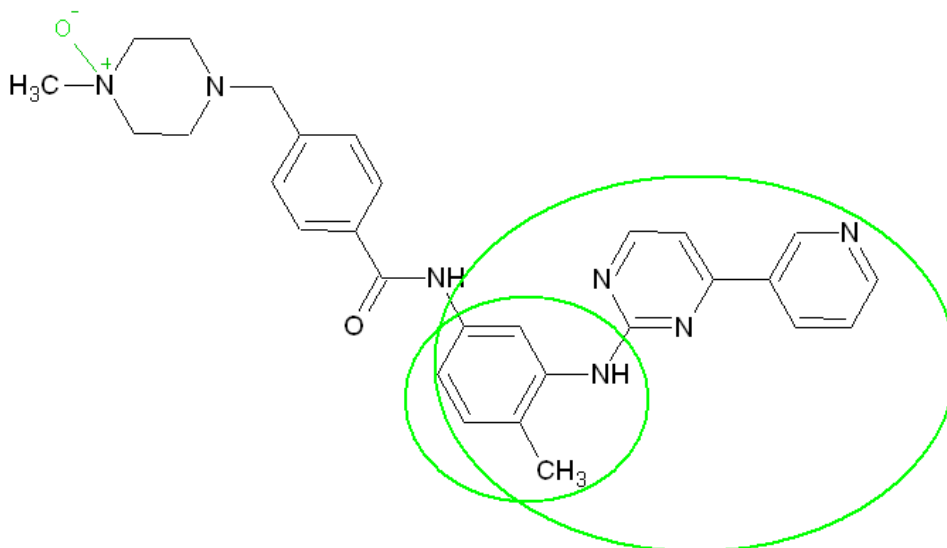


Slika 7: Bisoprolol- mesta razgradnje in oksidacije

1.2.8. Imatinib

Citostatik, ki se uporablja za zdravljenje nekaterih vrst levkemij (najpogosteje kronične mieloične) in GIT stromalnega tumorja. V raziskavo je vključen zaradi mehanizma delovanja, saj kot antitumorna učinkovina lahko zavira razmnoževanje nekaterih vrst celic, kar pa lahko predstavlja tudi nevarnost za okolje in organizme v njem. Raziskav, ki detektirajo razgradne produkte učinkovine je za enkrat še zelo malo. Kot najpogostejši produkt v procesu

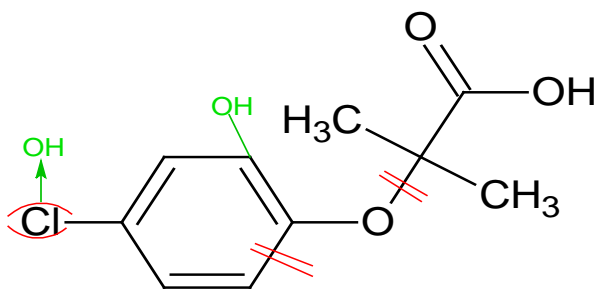
oksidativne razgradnje se pojavi N-oksidiran imatinib, nastanejo pa tudi krajši fragmenti, z odcepom različnih obročev iz molekule učinkovine (slika 8) (28).



Slika 8: Imatinib in mogoči razgradni produkti

1.2.9. Klofibrična kislina

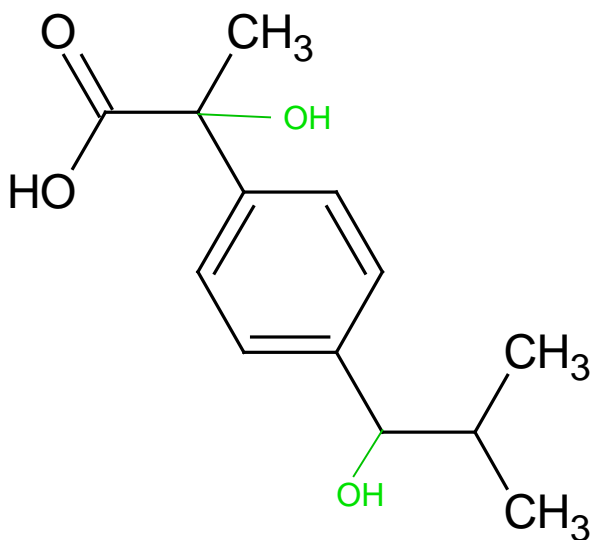
Gre za aktivni metabolit skupine hipolipemičnih zdravil- fibratov. V Sloveniji ima dovoljenje za promet učinkovina fenofibrat. Grožnja okolju je bila predstavljena z raziskavo, ki je pokazala da se klofibrična kislina ne razgradi v rastlinskih čistilnih napravah (29). Tudi v bioreaktorju, ki je bil razvit kot pilotna čistilna naprava, je po enem mesecu ostalo nerazgrajene kar 70% učinkovine (30). V procesu ozonizacije pride do odcepa alkilne verige, odprtja obroča in nastanka krajših substituiranih alkilnih verig (31). Mesta razgradnje in zamenjava funkcionalne skupine so prikazana na sliki 9.



Slika 9: Klofibrična kislina in njeni razpadni produkti

1.2.10. Ibuprofen

Zaradi čedalje večje uporabe ibuprofena kot analgetika je bila po podatkih ZZZS v letu 2013, poraba ibuprofena v Sloveniji predpisanega na zdravniški recept nekoliko večja od treh ton. Poleg tega je na voljo tudi kot OTC zdravilo, torej je zdravilo moč kupiti brez recepta. V raziskavi opravljeni v Veliki Britaniji so detektirali ibuprofen v več rekah in ugotovili škodljiv vpliv na razvoj ribjih zarodkov (32). Pri procesih fotokatalize in pospešene elektrokemične razgradnje pride najpogosteje do enkrat oz. dvakrat hidroksiliranih produktov (33). Mesti hidroksilacije sta predstavljena na sliki 10.



Slika 10: Ibuprofen in produkti fotolize

2. NAMEN DELA

Zaradi velike uporabe zdravilnih učinkovin pri ljudeh, živalih in rastlinah, je vse večja skrb posvečena vprašanju obremenitve okolja in vod s temi snovmi. Naloga se bo izvajala znotraj širšega evropskega Life + projekta, katerega namen je spremljati izpuste farmacevtskih onesnažil in razviti napravo za njihovo elektrokemijsko odstranjevanje.

Slovensko podjetje Arhel, proizvodnja in inženirng, d.o.o. razvija aparaturo za odstranjevanje organskih onesnažil v odpadnih vodah s postopkom elektrokemijske oksidacije (BDDA). V sodelovanju s podjetjem bomo določali koncentracije izbranih farmacevtikov v čistih in odpadnih vodah. S tem bomo omogočali spremljanje učinkovitosti čiščenja testnih vzorcev s to napravo pri različnih pogojih delovanja. Pri svojem delovanju bi BDDA načeloma lahko v idealnih pogojih popolnoma mineralizirala prisotne organske spojine. Takšno delovanje pa predvsem iz ekonomskih razlogov povezanih z veliko porabo električne energije ni smotrno. Zato je zelo pomembno, da ugotovimo, kateri so tisti pogoji, ki še zagotavljajo učinkovito odstranjevanje onesnažil in do kakšne mere, oziroma do kakšnih spojin se le-te razgradijo

Tudi razgradni produkti so lahko okoljsko problematični, saj se lahko morda še vedno vežejo na farmakološke receptorje ali pa postanejo zaradi vezave kisika nestabilni (npr. peroksidi, epoksidi) in s tem problematični zaradi potencialne reaktivnosti do bioloških makromolekul. S pregledom literature bomo poiskali potencialne razgradne produkte izbranih učinkovin, ki nastanejo kot posledica laboratorijske simulacije okoljske razgradnje pri pospešenem staranju (fotokemična, elektrokemična razgradnja).

Namen dela bo razviti analizne metode s tekočinsko kromatografijo sklopljeno z masno detekcijo za identifikacijo in spremljanje kinetike nastanka možnih razpadnih produktov izbranih farmacevtikov po obdelavi z BDDA. Analizirali bomo vzorce pri različnih pogojih obdelave (napetost na anodi in čas analize) in določili pogoje, v katerih dosežemo čim večji delež razgradnje razpadnih produktov. Poleg tega bomo spremljali tudi delež razpada vseh analiziranih učinkovin pri teh pogojih. Na ta način bomo lahko določili optimalne pogoje za odstranjevanje posameznega farmacevtika.

Rezultati meritev bodo pokazali ustreznost čiščenja odpadnih vod z BDDA. Metode, ki jih bomo razvili, pa bodo lahko služile za pregled vzorcev odpadnih in tudi pitnih vod, v katerih bomo lahko določili prisotnost morebitnih razgradnih produktov farmacevtikov.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Reagenti

Metanol – CH₃OH ChromasolV® (Sigma Aldrich, Steinheim Nemčija)

Acetonitril – CH₃N ChromasolV® (Sigma Aldrich Corporation, MO, Zda)

Mravljična kislina – CH₃COOH Suprapur® (Merck Kga, Nemčija)

Ultračista voda – Milli-Q voda, pridobljena z aparaturo Milli-Q advantage A10 Ultrapure Water Purification System, Millipore

Amonijev acetat MM 77,08g/mol, (Merck KgaA, Nemčija)

Pufrska raztopina pH 7,00 (pri T=20°C), (Merck KgaA, Nemčija)

3.1.2. Topila in mobilne faze

0,1% mravljična kislina v Milli-Q vodi: vodni del mobilne faze pri tekočinski kromatografiji

2,5 mM amonijev acetat (pH= 7,9): vodni del mobilne faze pri tekočinski kromatografiji za spojine, ki ionizirajo v negativnem načinu ionizacije

3.2. Aparature in laboratorijski inventar

Milli-Q advantage A10 Ultrapure Water Purification System (Millipore, Bedford, ZDA), FFA Ljubljana

UHPLC povezan z MS/MS: Agilent 1290 Infinity UHPLC, sklopljen s trojnim kvadropulnim masnim spektrometrom Agilent 6460, ESI vmesnik: JetStream, (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, ZDA)

Programska oprema Mass Hunter, (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, ZDA)

Mikrotitrna ploščica s pokrovom Agilent U96 500 µl (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, ZDA)

UHPLC kolona Supelco Titan C18 100X2,00mm, 1.9 μ m delci.

Pipete 2-20 μ l, 100-1000 μ l (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

Vortex (mešalnik) – Vibromix 10 (Tehtnica, Železniki, Slovenija)

Hladilnik z zmrzovalnikom (-20), (Gorenje, Velenje, Slovenija)

Mikrocentrifugirke (plastične epruvete), (Eppendorf Research, Hamburg, Nemčija)

pH-meter Mettler Toledo MP 220, (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica)

Elektroda Mettler Toledo InLab® Expert Pro (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica)

Tehtnica-analizna Mettler Toledo AG 245 (Mettler Toledo GmbH, Schwerzenbach, Švica)

Laboratorijski inventar: tehtič, žlička, nastavki za pipete, parafilm, magnetno mešalo, bučke

3.3. Metode

3.3.1. Priprava raztopin

3.3.1.1 Priprava raztopin zdravilnih učinkovin za analizo

Predhodno pripravljene raztopine standardov na fakulteti smo poslali na obdelavo v podjetje Arhel. Raztopine smo pripravili z raztopitvijo 5,0 mg substance v cca 5,0 mL metanola, nato pa smo prenesli v 5,0 L bučo in s pitno vodo dopolnili do oznake. Pripravljene raztopine so torej imele koncentracijo 1,0 mg/L (1ppm). V podjetju Arhel so raztopine obdelali z BDDA pri različnih napetostih, ki so bile označene z E1-E6. Obdelava vzorca je za vsako napetost potekala eno uro, vzorci pa so bili vzeti v časovnih intervalih 10 minut (od 0-60 min). Tako smo za vsak tretiran farmacevtik dobili po sedem vzorcev za 6 različnih napetosti.

3.3.1.2. Priprava raztopin za določanje linearnosti metode

Za določanje linearnosti metode za posameznem farmacevtik smo izbrali vzorec, kjer smo po analizi osnovnih vzorcev ugotovili najvišjo koncentracijo razpadnih produktov. Iz tega vzorca smo nato pripravili raztopine s šestimi različnimi koncentracijami osnovne raztopine. Naraščajoče volumne analiziranega vzorca (0,25,50,75,100,125 μ L) smo prenesli na

mikrotitrsko ploščico in jim dodali padajočo količino prečiščene vode (125,100,75,50,25,0 μL), tako da je bil skupni volumen vsake raztopine 125 μL . Tako smo dobili raztopine s teoretičnimi koncentracijami osnovne raztopine: 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8, 1,0 mg/L.

3.3.1.3. Priprava raztopin za določanje ponovljivosti metode

Najbolj koncentriran vzorec pri vsaki raztopini za določanje linearnosti, to je raztopina s koncentracijo 100% obdelanega vzorca, smo petkrat zapored injicirali v aparaturo na LC-MS/MS. Na ta način smo določili ponovljivost znotraj enega dne in jo podali kot RSD.

3.3.1.4 Izbor raztopin za določanje stabilnosti

Primerjali smo odzive netretiranih vzorcev, ki jih nismo poslali na obdelavo. Zato smo pripravili sveže raztopine za izbrane farmacevtike. Primerjali smo odziv s starejšimi vzorci iz podjetja, ki niso bili tretirani in z vzorcem E6t0. Ta vzorec ni bil tretiran z BDDA, bil pa je v stiku z elektrodo.

3.3.2 Analiza vzorcev

Analiza vzorcev je potekala na aparatu LC-MS/MS. Analite iz vzorca najprej ločimo na koloni s tekočinskim kromatografom ultra visoke zmogljivosti (UHPLC). Ta pa je sklopljen z masnim detektorjem, kjer sta povezana dva masna filtra. Na ta način lahko še dodatno fragmentiramo t.i. starševski ion (izbrani farmacevtik, oz. razgradni produkt). Po fragmentaciji starševskega iona lahko nato detektiramo t.i. hčerinske ione z znanim razmerjem masa : naboj (m/z).

Zaradi čim boljše ločbe strukturno podobnih analitov smo uporabili zelo zmogljivo kolono: Titan C18 100 \times 2,00mm z velikostjo delcev 1,8 μm . Za učinkovine, katerih razpadni produkti ionizirajo s pozitivnim nabojem smo uporabili mobilno fazo A: 0,1% HCOOH in mobilno fazo B 100% acetonitril. Spojine smo ločevali z linearnim gradientom od 5% B do 99 % B. Čas analize se je za posamezne farmacevtike nekoliko razlikoval.

Za učinkovini, ki ionizirata v z negativnim nabojem (tega pričakujemo tudi pri njihovih razpadnih produktih), smo pripravili drugačno mobilno fazo B: 2,5 mM amonijev acetat, s pH=7,9.

Zaradi večje preglednosti naloge za vsak analit posebej ne navajamo vseh parametrov LC-MS/MS (T kolone, V injiciranja, čas analize, pretok, parametri ionskega izvora).

3.3.3 Obdelava rezultatov

Posneli smo kromatograme ter za vsak kromatografski vrh tudi posneli masne spektre za vse vzorce pri dveh različnih pogojih – E3 in E6. Nato smo glede na identificirane mase razgradnih produktov iz posnetih spektrov postavili SIM (single ion monitoring) metodo in z njo posneli kromatograme vzorcev v vseh časovnih točkah in obeh testiranih pogojih (E3 in E6). Pri snemanju spektrov z LC-MS/MS smo za vsak analiziran farmacevtik, nastavili literaturno znana razmerja m/z za vse potencialne razpadne produkte. Želeli smo detektirati tudi morebitne še neidentificirane razpadne produkte, za kar smo nastavili široko območje vrednosti m/z . Za vse jasno identificirane kromatografske vrhove smo nato s pomočjo programske opreme Mass Hunter površine pod krivuljo (AUC) pretvorili v odzive. Z uporabo programa MS Excel smo grafično predstavili povezavo med pogoji obdelave in koncentracijo analita vzorca. Tako smo za analizirane pogoje (E3 in E6) predstavili kinetiko razpada učinkovine in nastanka razgradnih produktov.

3.4. Validacija metode

Metod nismo validirali v vseh aspektih, kot to npr. določajo smernice ICH, temveč smo opredelili le tiste parametre, ki so bili ključni za prikaz oz. potrditev kvalitete rezultatov. To so točnost, ponovljivost, selektivnost, območje linearnosti in stabilnost.

3.4.1. Linearnost

Linearnost je sposobnost analiznega postopka, da prikaže odzive, ki so neposredno oz. z matematično pretvorbo premo sorazmerni količini (koncentraciji) analita v vzorcu. Določimo jo z regresijsko premico, ki prikazuje povezavo med koncentracijo in odzivi. Odnos predstavimo z matematičnim zapisom $y = k \cdot x + n$. Količina (koncentracija) analita iz vzorca torej vpliva na odziv le-tega, ki je v našem primeru izražen kot površina kromatografskega vrha.

Za določanje območja linearnosti smo za vsak analit pripravili šest vzorcev z različnimi koncentracijami. Linearnost smo določili s programom MS Excel, za kar smo uporabili funkcijo linearna regresija.

3.4.2. Ponovljivost

Ponovljivost nam pokaže stopnjo ujemanja posameznih rezultatov pri seriji analiz homogenega vzorca. Serijo analiz izvajamo pod enakimi pogoji dela (isti laboratorij, operater,...), v čim krajšem časovnem okviru. Ker ponovljivost kaže na natančnost metode, jo izražamo s standardno deviacijo oziroma relativno standardno deviacijo (RSD) za posamezno serijo meritev. Po priporočilih FDA jo izvajamo na vsaj petih ponovitvah. Za bioanalizne metode velja, da odstopanje, izraženo z RSD, ne sme presegati 15%, razen na spodnji meji določitve, kjer lahko ta vrednost znaša 20% (35). Za določanje ponovljivosti metode smo petkrat zaporedoma injicirali vsak posamezen vzorec, v katerem smo pričakovali najvišjo koncentracijo posameznega analita. Za izračun vrednosti RSD smo uporabili enačbo 1, kjer σ predstavlja standardni odklon, \bar{y} pa aritmetično sredino rezultatov.

$$\text{Enačba 1: } \text{RSD} = \sigma * 100 / \bar{y}$$

3.4.3. Stabilnost

Za določanje stabilnosti smo primerjali odzive sveže pripravljenih, netretiranih vzorcev. Na ta način smo želeli izvedeti, če v dlje pripravljeni raztopini že pride do morebitnega razpada učinkovine na razpadne produkte tudi brez tretiranja z BDDA. Tako smo primerjali sveže pripravljene raztopine, ki niso bile poslana na obdelavo z obdelanimi vzorci. Prav tako smo zaradi možne onečiščenosti elektroliznih celic s predhodno obdelanimi vzorci, v analizo vključili tudi vzorce odvzete ob času 0 min pri pogojih E6. V vseh teh vzorcih smo iskali morebitne razpadne produkte, ki bi nastali že s samim razpadom učinkovine v raztopini brez tretiranja z BDDA.

3.4.4. Točnost

Točnost metode nam pove, kako se rezultati pridobljeni z metodo ujemajo z dejansko vrednostjo. Točnost analizne metode je bila že predhodno potrjena, vendar le za osnovne

spojine (ti rezultati niso vključeni v tem delu). Točnosti nismo mogli določiti za razgradne produkte, ker njihovih analitskih standardov nismo imeli na voljo. Zato je metoda zanje samo semi-kvantitativna, ker njihovih koncentracij nismo mogli določiti, temveč le njihovo relativno primerjavo (upadanje in naraščanje s časom obdelave glede na izhodiščno vrednost). Ustreznost tega pa smo potrdili s testom linearnosti odzivov.

3.4.5 Selektivnost

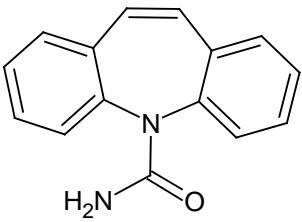
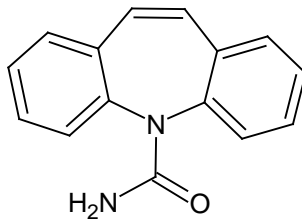
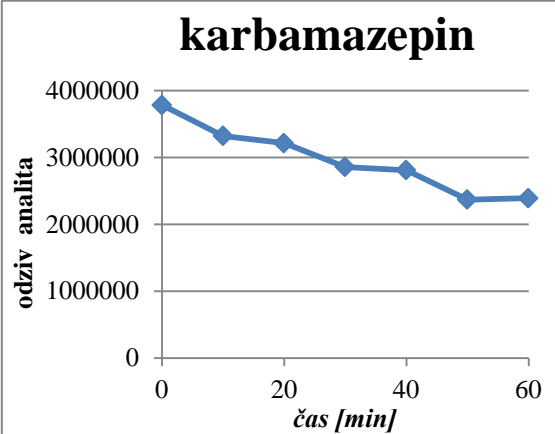
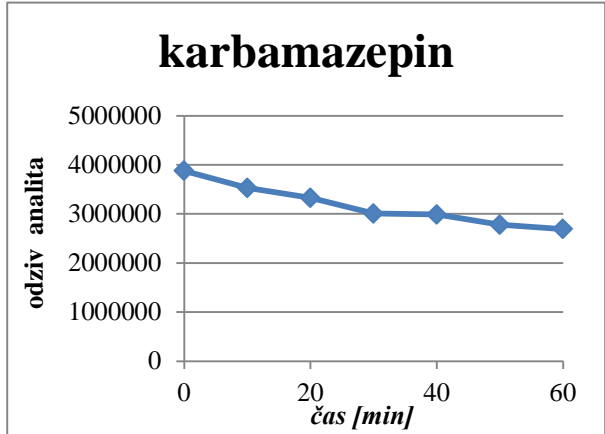
Sposobnost metode, da pravilno določi koncentracijo preiskovane snovi v vzorcu ob prisotnosti ostalih snovi, imenujemo selektivnost. Na določitev preiskovane lastnosti (v našem primeru koncentracije snovi) lahko vplivajo tudi druge spojine v vzorcu, morebitne nečistoče, druge primesi. Pri razvoju naše metode je bila selektivnost dosežena tako na kromatografski strani prek retencijskih časov (uporabili smo visoko učinkovito UHPLC kolono), kot tudi na samem detektorju, ki je spremljal le izbrane mase oz. razmerja m/z .

4. REZULTATI IN RAZPRAVA

4.1. Razgradni produkti in kinetika njihovega nastanka

Za vsako analizirano učinkovino je grafično podano razmerje med odzivom (ta je premo sorazmeren s koncentracijo učinkovine) in časom obdelave pri pogojih E3 in E6. Izbrali smo torej vzorce, ki so bili obdelani pri najvišji napetosti (E6), kjer pričakujemo največji upad učinkovine in posledično največ razgradnih produktov. Za primerjavo smo izbrali tudi nekoliko nižjo napetost (E3), a še vedno dovolj visoko, da že pričakujemo razgradne produkte. Za vsako analizirano učinkovino sta najprej predstavljeni (slike 11 do 22) kinetiki upadov učinkovine pri različnih pogojih. Kasneje so podane tudi karakteristike in struktura detektiranih razgradnih produktov in kinetika njihovega nastanka.

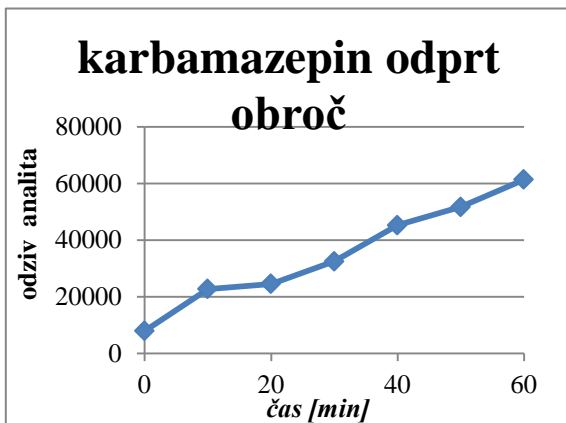
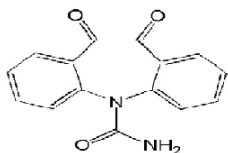
4.1.1 Karbamazepin

Pogoji E6	Pogoji E3
Karbamazepin - Upad učinkovine RT: 2,9 min Struktura: <div style="text-align: center;">  </div>	Karbamazepin - Upad učinkovine RT 3,0 min Struktura: <div style="text-align: center;">  </div>
<div style="text-align: center;">  </div>	<div style="text-align: center;">  </div>

Karbamazepin- odprt obroč

Karakteristike: m/z : 269,1+ RT:2,0 min

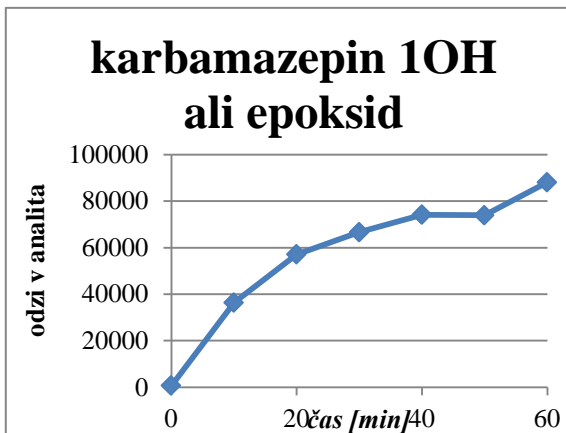
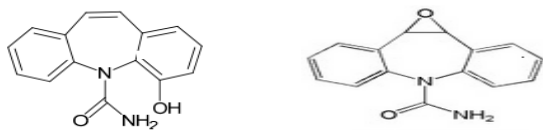
Struktura produkta:



Karbamazepin- hidroksilacija ali epoksid

Karakteristike: m/z : 253+ RT: 2,5 min

Struktura produkta:



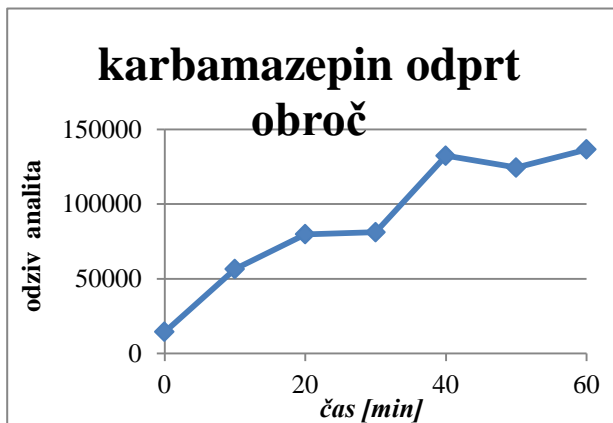
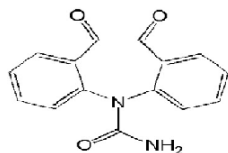
Karbamazepin- dodatni cikel

Karakteristike: m/z : 251+; RT: 2,5 min

Karbamazepin- odprt obroč

Karakteristike: m/z : 269,1+ RT:2,2 min

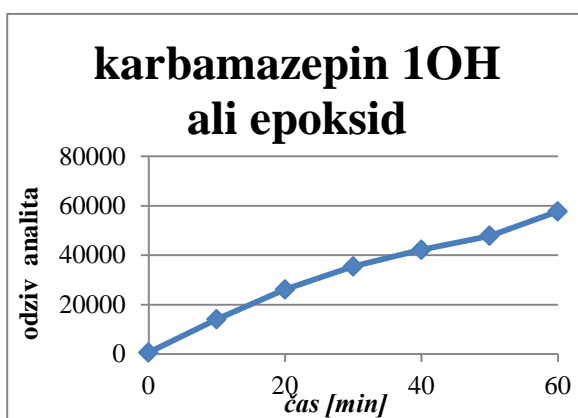
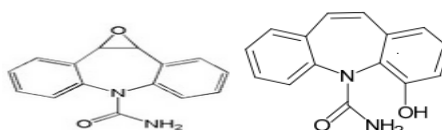
Struktura produkta:



Karbamazepin- hidroksilacija ali epoksid

Karakteristike: m/z : 253+ RT: 2,6 min

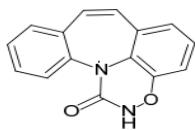
Struktura produkta:



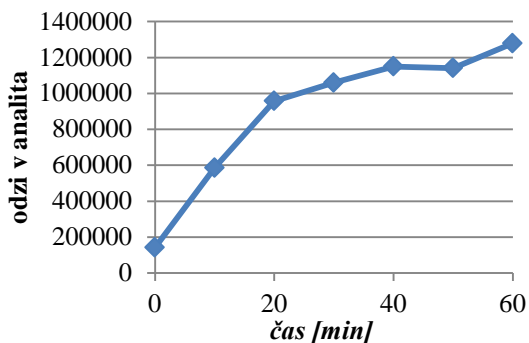
Karbamazepin- dodatni cikel

Karakteristike: m/z : 251+; RT: 2,6 min

Struktura produkta:



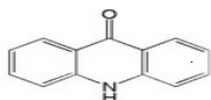
karbamazepin dodatni cikel



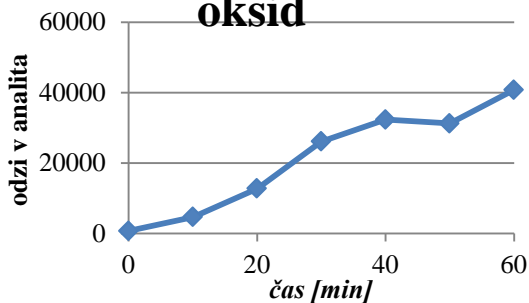
Karbamazepin- dekarboksamid in oksid

Karakteristike: m/z : 196,1+ RT: 2,8 min

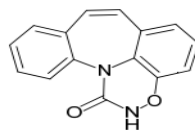
Struktura produkta:



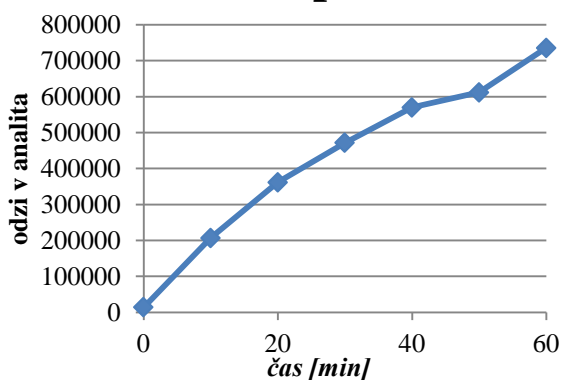
karbamazepin dekarboksamid in oksid



Struktura produkta:



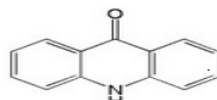
karbamazepin cikel



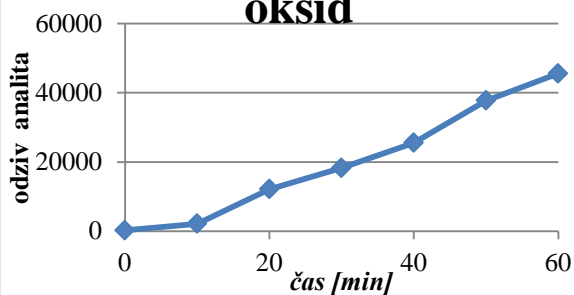
Karbamazepin- dekarboksamid in oksid

Karakteristike: m/z : 196,1 + RT:2,9 min

Struktura produkta



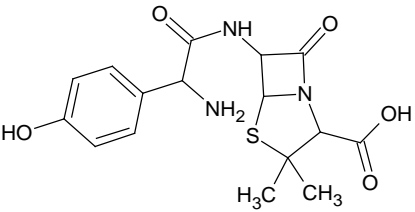
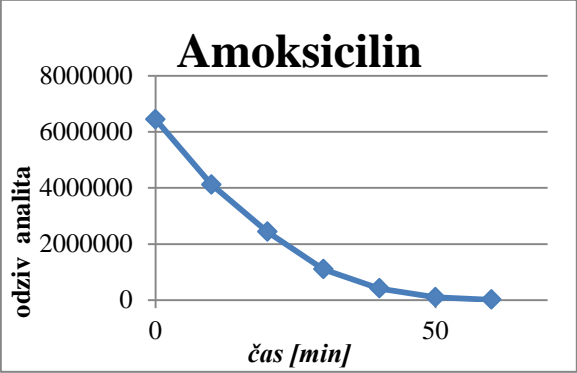
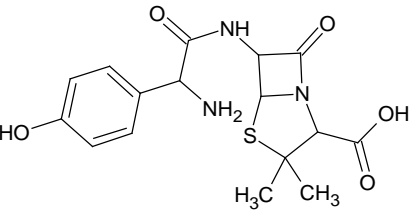
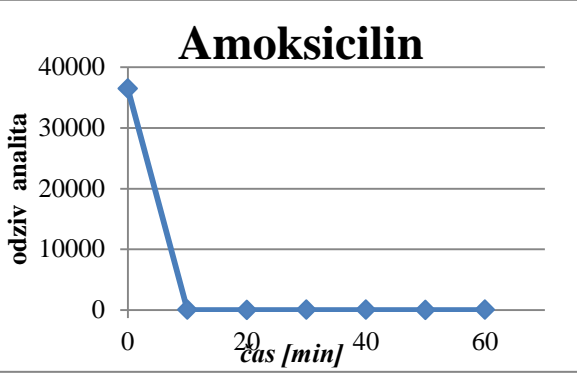
karbamazepin dekarboksamid in oksid

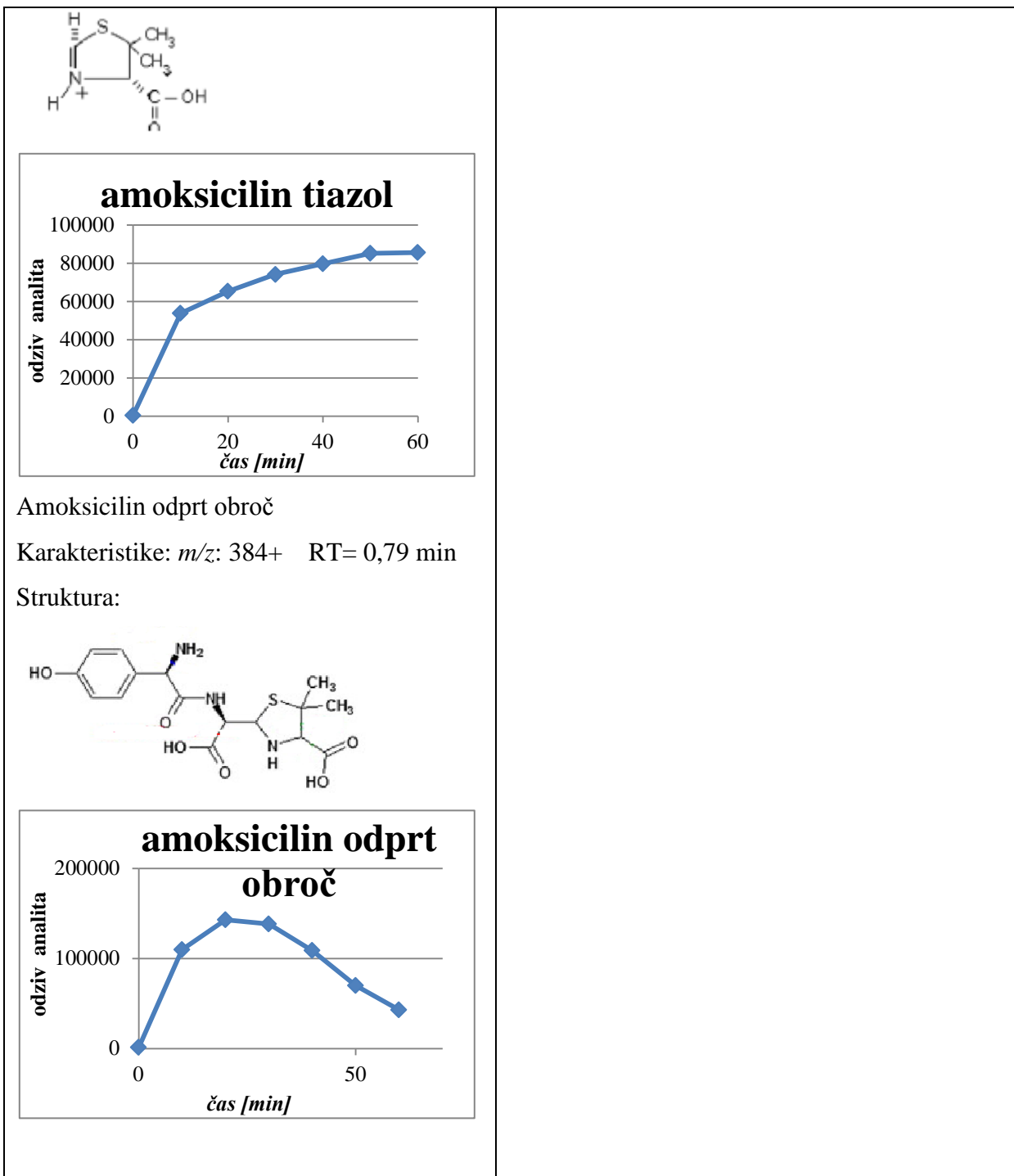


Slika 11: Karbamazepin: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Karbamazepin se pri obeh pogojih obdelave le deloma razgradi (cca. 1/3 učinkovine), vendar smo uspeli identificirati štiri potencialne razgradne produkte. Vsi se pojavijo tako pri milejših kot ostrejših pogojih. Glavno mesto razgradnje molekule je dušikov atom, ki se oksidira, lahko pa pride tudi do odprtja obroča. Še en razpadni produkt pa je nastanek dodatnega obroča (ciklizacija), ki nastane po reakciji dveh reaktivnih centrov v molekuli (amid + hidroksid). Pri ostrejših pogojih je bolj verjeten nastanek produkta z dodatnim ciklom v molekuli, pri milejših pa nastane več produkta, kjer pride do odprtja obroča. Pri četrtem razgradnem produktu (dekarboksamidacija in oksidacija) je odziv zelo nizek, zato s parametri linearnosti ne moremo potrditi validacije metode tudi za ta produkt, vendar vidimo jasno naraščanje koncentracije s časom.

4.1.2. Amoksicilin

Pogoji E6	Pogoji E3
<p>Amoksicilin - Upad učinkovine RT; 1,4 min Struktura:</p>   <p>Amoksicilin tiazolski obroč Karakteristike: $m/z=160+$, RT= 3,92 min Struktura produkta:</p>	<p>Amoksicilin - Upad učinkovine RT: 1,5 min Struktura:</p>   <p>Razgradnih produktov ne zaznamo.</p>

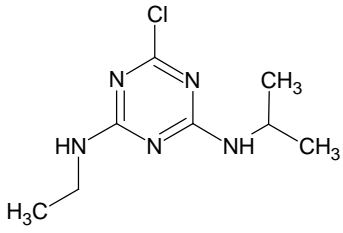
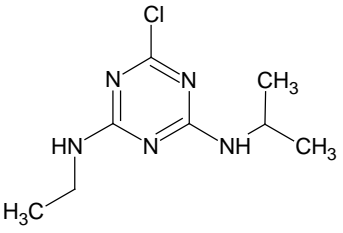


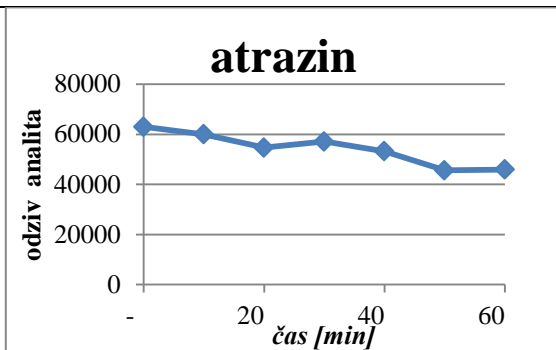
Slika 12: Amoksicilin: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Učinkovina v kratkem času popolnoma razpade pri obeh pogojih, pri blažjih pogojih (E3) je popoln razpad dosežen že po prvih 10 minutah obdelave vzorca. Pri milejših pogojih smo v vseh časovnih točkah različnih od nič detektirali popolno odsotnost učinkovine in razgradnih

produktov, kar je verjetno posledica nestabilnosti same učinkovine. To kaže tudi na možnost zelo učinkovite razgradnje te spojine z elektrokemijskim čiščenjem, saj pri teh pogojih nismo detektirali nobenih razpadnih produktov. V vzorcih, ki so bili pripravljene že dlje časa (1 teden v hladilniku pri 4°C), poteče v veliki meri razgradnja tudi brez obdelave z BDDA, kar kaže na sorazmerno slabo stabilnost vodnih raztopin amoksicilina. Zato smo pripravili svež vzorec učinkovine in ga poslali na obdelavo pri pogojih E6 in vzorce ponovno posneli. Po analizi meritev dobimo dva potencialna razgradna produkta, pri katerih gre za časovno odvisnost spreminjanja koncentracije. Z gotovostjo lahko potrdimo nastanek tiazolskega fragmenta, ki se odcepi od celotne molekule amoksicilina. Pri drugem identificiranem vrhu (odprtje obroča) pa s parametri validacije metode ne moremo potrditi selektivnosti metode. Zato je glede na kratek retencijski čas mogoče, da gre za nečistočo v vzorcu, ki se na koloni izloči skupaj s fronto topila. Razlog za malo detektiranih razgradnih produktov je hiter razpad amoksicilina, kjer se zaradi kemične nestabilnosti najprej odpre obroč, sledi pa nadaljnja cepitev do manjših fragmentov.

4.1.3. Atrazin

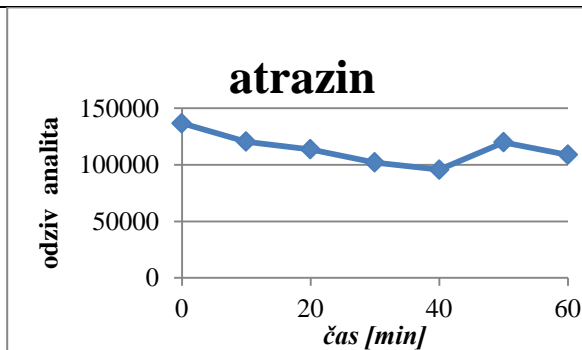
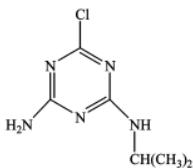
Pogoji E6	Pogoji E3
Atrazin - Upad učinkovine RT: 3,6 min Struktura: 	Atrazin - Upad učinkovine RT: 3,7 min Struktura: 



Atrazin odcep etila

Karakteristike: m/z : 188+ RT 3,1

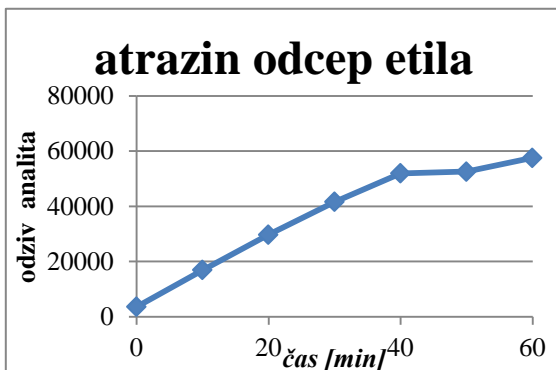
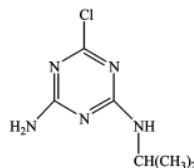
Struktura produkta:



Atrazin odcep etila

Karakteristike: m/z : 188 + RT 3,3

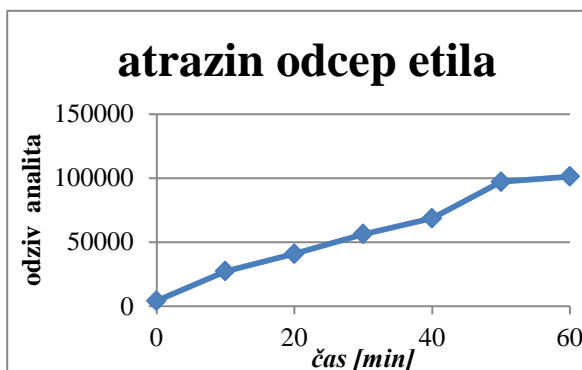
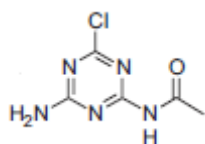
Struktura produkta:



Atrazin oksidacija etila in dealkilacija iPr

Karakteristike: m/z : 188+ RT: 1,7 min

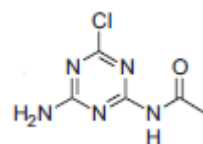
Struktura produkta:

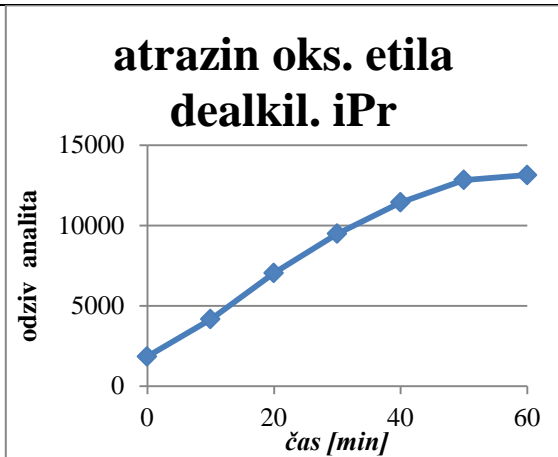


Atrazin oksidacija etila in dealkilacija iPr

Karakteristike: m/z : 188+ RT: 1,8 min

Struktura produkta:

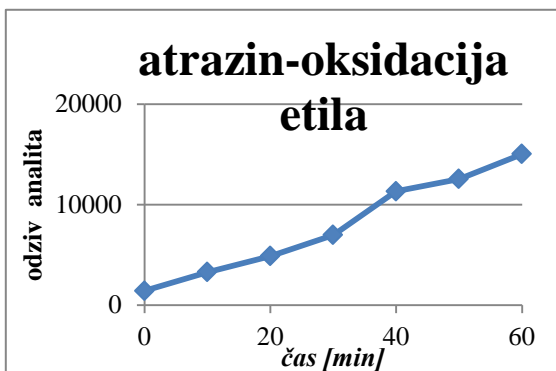
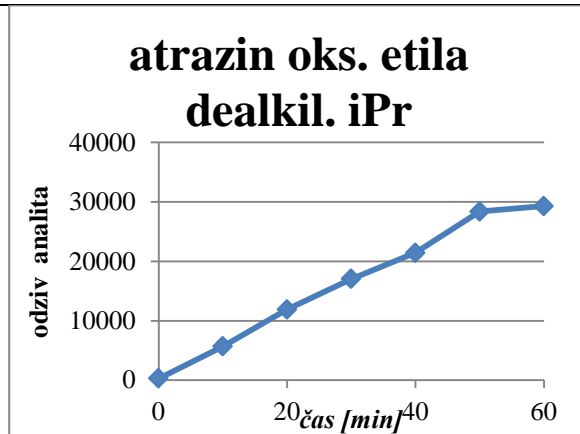
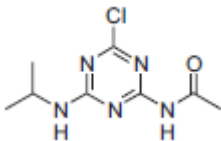




Atrazin oksidacija etila

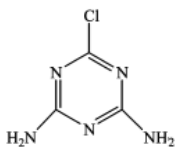
Karakteristike: m/z : 230+ RT: 3,23 min

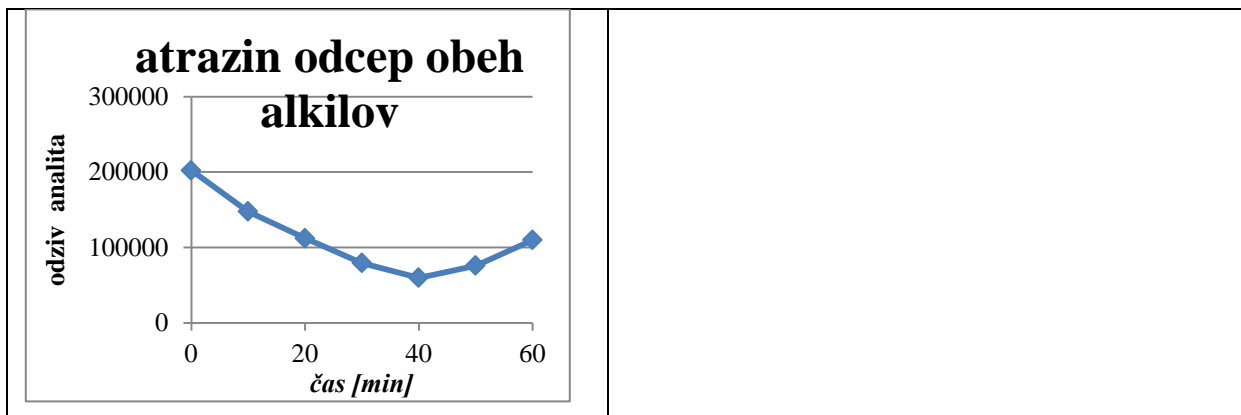
Struktura produkta:



Atrazin odcep obeh alkilov

Karakteristike: m/z :146+ RT:0,8 min

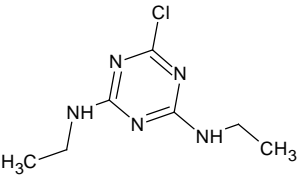
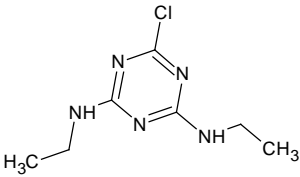


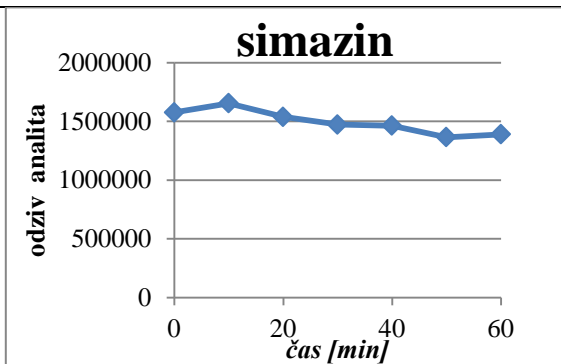


Slika 13: Atrazin: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Učinkovina le delno razpade, kar kaže na njeno veliko stabilnost. Vendar je pri ostrejših pogojih delež razgrajene učinkovine večji, kar je tudi glavni razlog, da smo pri teh pogojih detektirali več razgradnih produktov. Razpad se začne z dealkilacijo stranskih verig. Vidimo, da pride najprej do odcepa etilne verige, šele kasneje se odcepi tudi izopropilna. Vzrok temu je verjetno večja sterična oviranost na mestu kjer se nahaja iPr veriga. Lahko pa poteče najprej oksidacija na etilni verigi, v tem primeru pa se odcepi izopropilna veriga.

4.1.4. Simazin

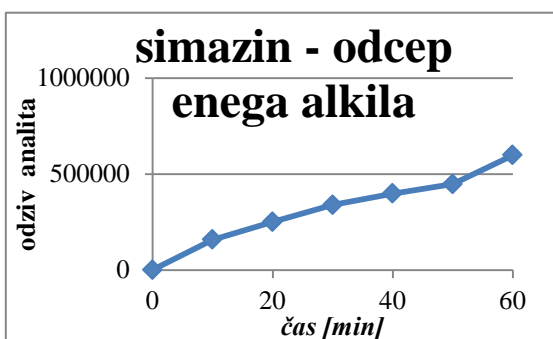
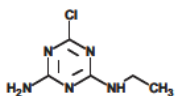
Pogoji E6	Pogoji E3
Simazin - Upad učinkovine RT: 3,3 min Struktura: 	Simazin - Upad učinkovine RT: 3,4 min Struktura: 



Simazin- odcep enega alkila

Karakteristike: m/z : 174+; RT: 2,8 min

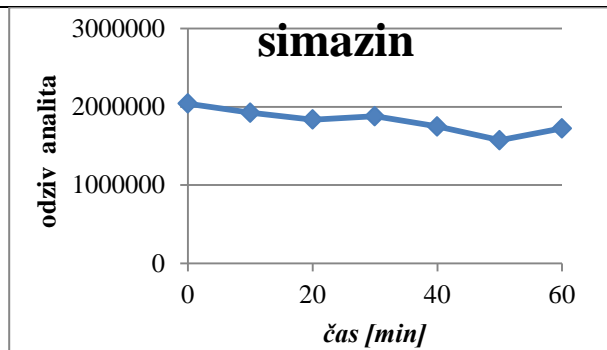
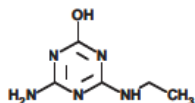
Struktura produkta:



Simazin- odcep enega alkila in zam. Cl

Karakteristike: m/z : 156+; RT: 2,4 min

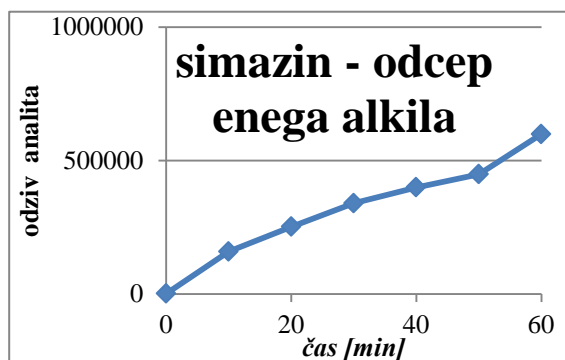
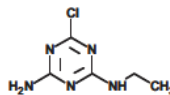
Struktura produkta:

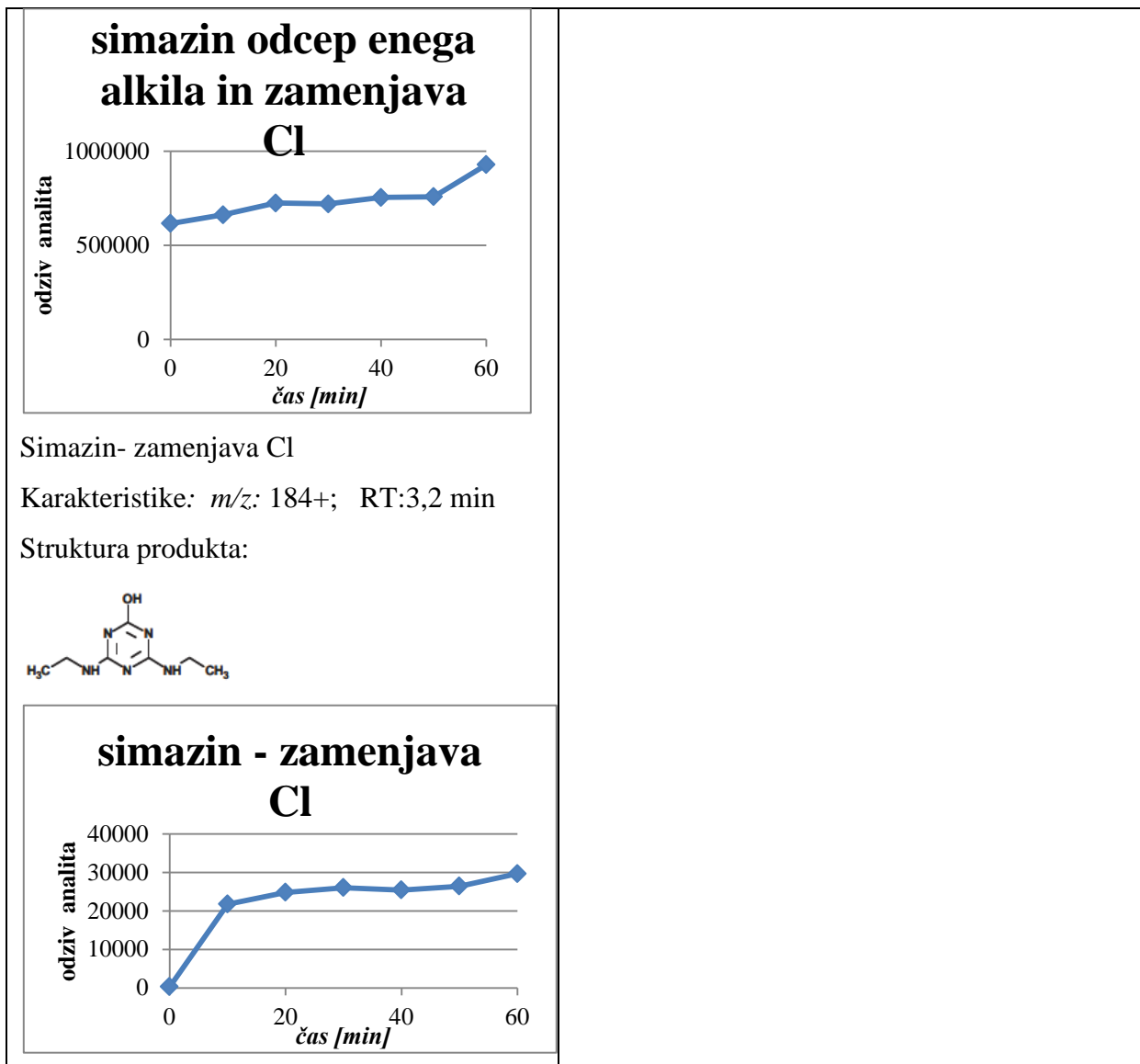


Simazin- odcep enega alkila

Karakteristike: m/z : 174+; RT: 2,8 min

Struktura produkta

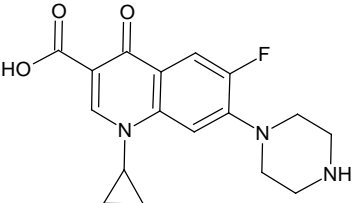
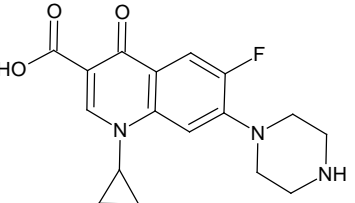
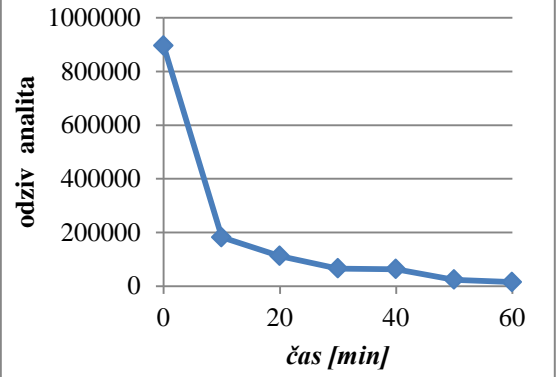
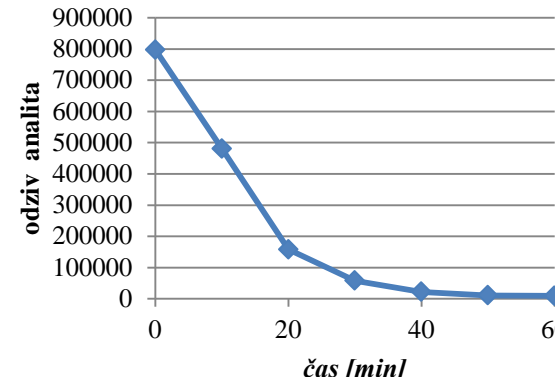
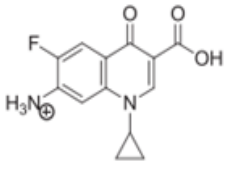
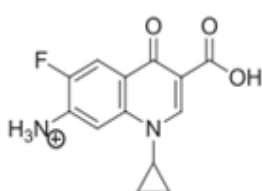


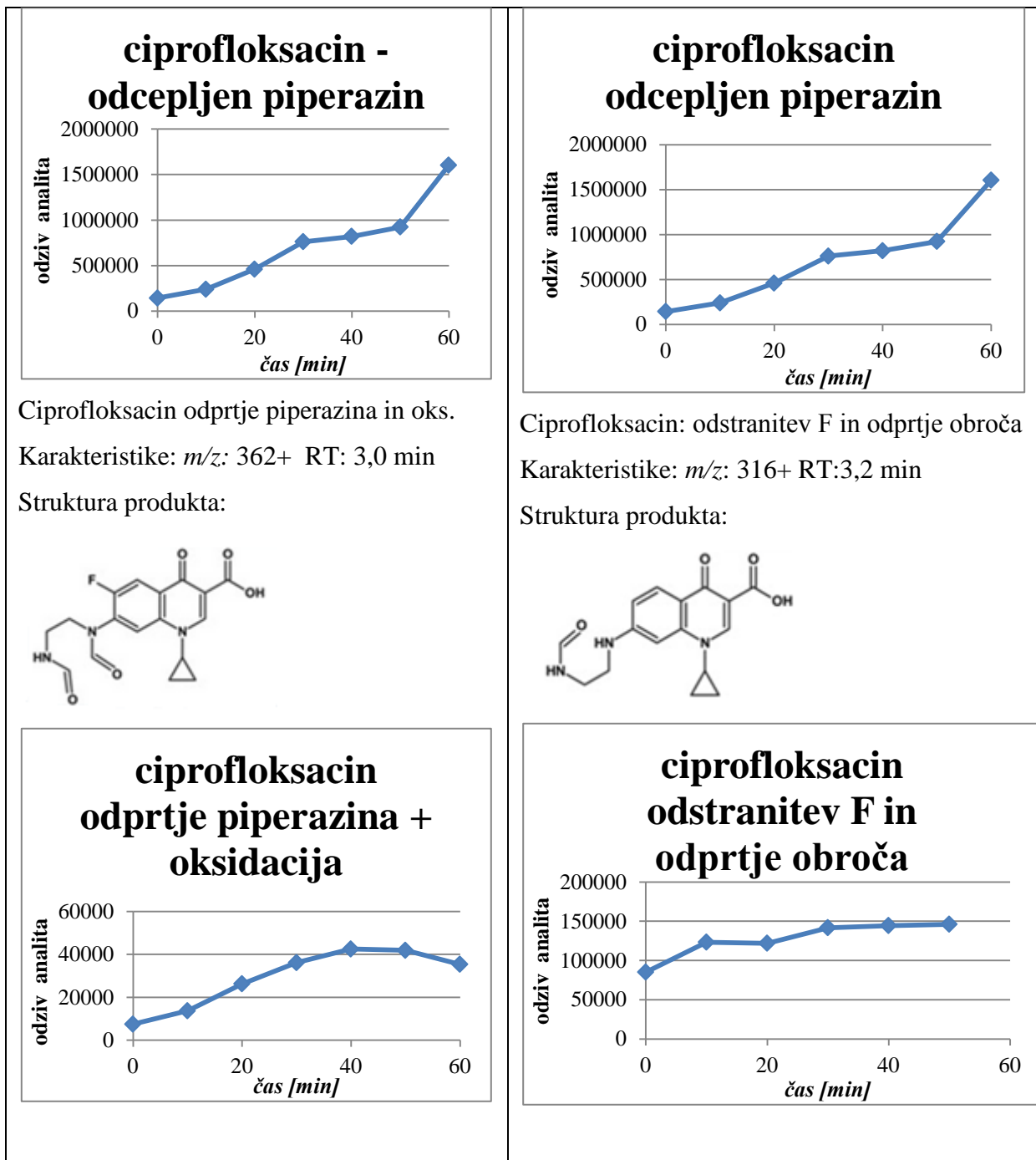


Slika 14: Simazin: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Podobno kot atrazin je tudi simazin stabilna molekula kar se kaže v nizkem deležu razpada pri obdelavi z različnimi pogoji. Kljub temu lahko detektiramo nekaj potencialnih razgradnih produktov. Spet se pojavi le en enak produkt pri obeh pogojih: simazin z odcepom ene alkilne verige, kar kaže na podoben začetek razgradnje kot pri atrazinu. Pri tem pesticidu nismo detektirali fragmenta z odcepljenima obema alkilnima verigama, smo pa ugotovili, da pri ostrejših pogojih obdelave poleg dealkilacije pride tudi do nukleofilne substitucije. Zamenja se namreč klor s hidroksilno skupino.

4.1.5. Ciprofloksacin

Pogoji E6	Pogoji E3																																
<p>Ciprofloksacin - Upad učinkovine</p> <p>RT: 2,9 min</p> <p>Struktura:</p> 	<p>Ciprofloksacin - Upad učinkovine</p> <p>RT: 3,0 min</p> <p>Struktura:</p> 																																
<p style="text-align: center;">ciprofloksacin</p>  <table border="1"> <caption>Data for Ciprofloxacin Response (E6)</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>900000</td></tr> <tr><td>10</td><td>180000</td></tr> <tr><td>20</td><td>100000</td></tr> <tr><td>30</td><td>80000</td></tr> <tr><td>40</td><td>70000</td></tr> <tr><td>50</td><td>60000</td></tr> <tr><td>60</td><td>50000</td></tr> </tbody> </table>	čas [min]	odziv analita	0	900000	10	180000	20	100000	30	80000	40	70000	50	60000	60	50000	<p style="text-align: center;">ciprofloksacin</p>  <table border="1"> <caption>Data for Ciprofloxacin Response (E3)</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>800000</td></tr> <tr><td>10</td><td>480000</td></tr> <tr><td>20</td><td>150000</td></tr> <tr><td>30</td><td>80000</td></tr> <tr><td>40</td><td>50000</td></tr> <tr><td>50</td><td>40000</td></tr> <tr><td>60</td><td>30000</td></tr> </tbody> </table>	čas [min]	odziv analita	0	800000	10	480000	20	150000	30	80000	40	50000	50	40000	60	30000
čas [min]	odziv analita																																
0	900000																																
10	180000																																
20	100000																																
30	80000																																
40	70000																																
50	60000																																
60	50000																																
čas [min]	odziv analita																																
0	800000																																
10	480000																																
20	150000																																
30	80000																																
40	50000																																
50	40000																																
60	30000																																
<p>Ciprofloksacin odstranitev piperazina</p> <p>Karakteristike: m/z: 263+, RT: 2,7 min</p> <p>Struktura produkta:</p> 	<p>Ciprofloksacin- odstranitev piperazina</p> <p>m/z: 263+, RT: 2,8 min</p> <p>Struktura produkta:</p> 																																

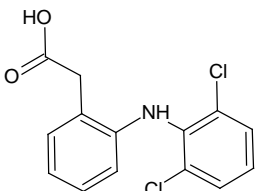
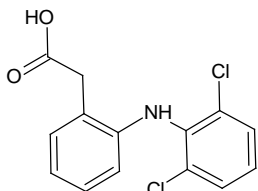
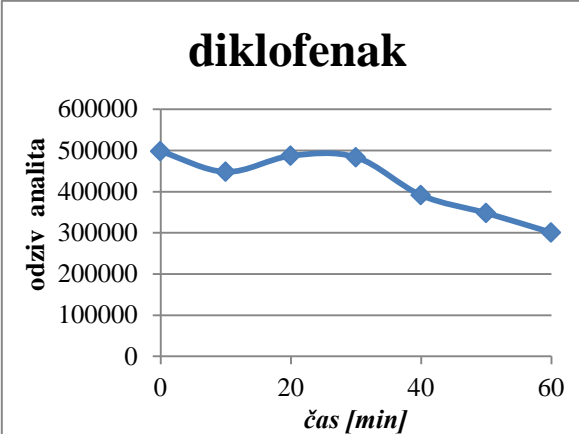
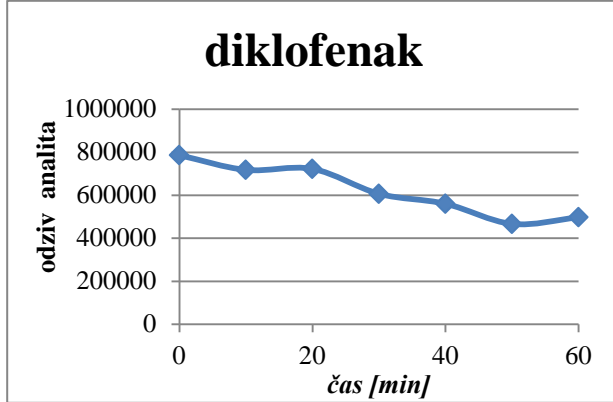
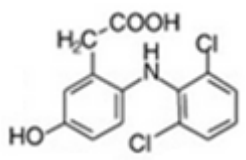


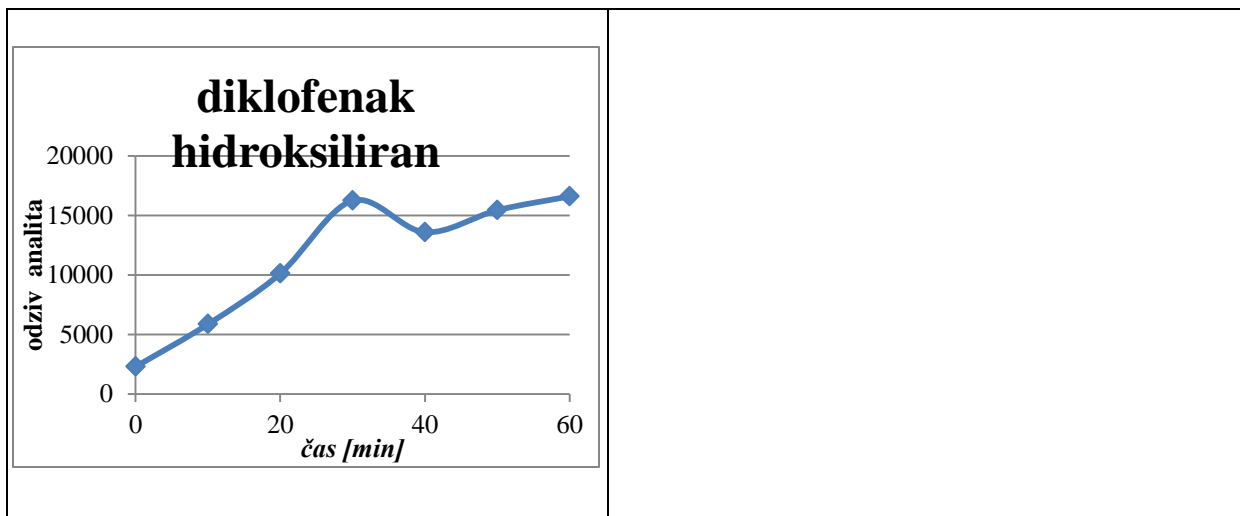
Slika 15: Ciprofloksacin: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Razpad učinkovine je v končni časovni točki popoln. Čas za dosego popolnega razpada je pričakovano nekoliko daljši pri milejših pogojih (40-50 min). Zaznali smo 3 potencialne razgradne produkte, pri čemer pa se le eden pojavi tako pri milejših kot pri ostrejših pogojih obdelave. Gre za spojino, ki nastane z odcepitvijo piperazinskega obroča od celotne

učinkovine. Lahko pa pride tudi samo do odprtja piperazinskega obroča, kjer nato poteče še oksidacija. Fragment z razmerjem m/z 316+ glede na molekulsko maso ustreza molekuli z odprtim piperazinskim obročem, kjer poteče oksidacija, odcepi pa se tudi fluor. Strukturna formula tega razpadnega produkta ni nujno takšna, saj obstaja več različnih možnih struktur s to vrednostjo m/z (19).

4.1.6. Diklofenak

Pogoji E6	Pogoji E3																																
<p>Diklofenak - razpad učinkovine</p> <p>RT: 3,8 min</p> <p>Struktura:</p> 	<p>Diklofenak - razpad učinkovine</p> <p>RT: 4,0 min</p> <p>Struktura:</p> 																																
<p style="text-align: center;">diklofenak</p>  <table border="1"> <caption>Data for Diclofenak E6 graph</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>500000</td></tr> <tr><td>10</td><td>450000</td></tr> <tr><td>20</td><td>480000</td></tr> <tr><td>30</td><td>480000</td></tr> <tr><td>40</td><td>380000</td></tr> <tr><td>50</td><td>350000</td></tr> <tr><td>60</td><td>300000</td></tr> </tbody> </table>	čas [min]	odziv analita	0	500000	10	450000	20	480000	30	480000	40	380000	50	350000	60	300000	<p style="text-align: center;">diklofenak</p>  <table border="1"> <caption>Data for Diclofenak E3 graph</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>780000</td></tr> <tr><td>10</td><td>700000</td></tr> <tr><td>20</td><td>720000</td></tr> <tr><td>30</td><td>600000</td></tr> <tr><td>40</td><td>550000</td></tr> <tr><td>50</td><td>450000</td></tr> <tr><td>60</td><td>480000</td></tr> </tbody> </table>	čas [min]	odziv analita	0	780000	10	700000	20	720000	30	600000	40	550000	50	450000	60	480000
čas [min]	odziv analita																																
0	500000																																
10	450000																																
20	480000																																
30	480000																																
40	380000																																
50	350000																																
60	300000																																
čas [min]	odziv analita																																
0	780000																																
10	700000																																
20	720000																																
30	600000																																
40	550000																																
50	450000																																
60	480000																																
<p>Diklofenak hidroksiliran</p> <p>Karakteristike: m/z: 312,0+, RT: 3,5 min</p> <p>Struktura produkta:</p> 	<p>Ni razpadnih produktov</p>																																

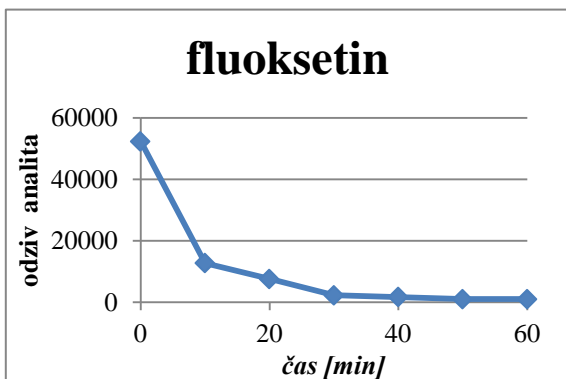


Slika 16: Diklofenak: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnega produkta

Tudi pri ostrejših pogojih razpade manj kot polovica vse učinkovine. Sklepamo, da je tudi to vzrok za šibkejšo zaznavo razgradnih produktov; pri milejših pogojih jih sploh nismo zaznali. Pri pogojih E6 pa smo zaznali le en razpadni produkt – hidroksiliran diklofenak. Odziv le-tega je bil zelo nizek, tako da nismo uspeli prikazati linearnosti odziva metode za ta produkt (preglednica I). Odsotnost razgradnih produktov, ki bi jih lahko detektirali z LC-MS/MS, lahko razloži študija, kjer z ozonizacijo dosežemo fragmentacijo diklofenaka do manjših organskih spojin, ki jih ne moremo selektivno dokazati z našo metodo (21). Tako lahko sklepamo, da se je del učinkovine, ki je razpadel, razgradil v povsem majhne organske fragmente.

4.1.7. Fluoksetin

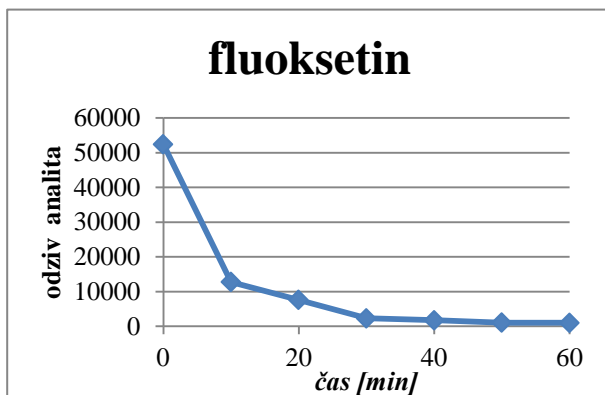
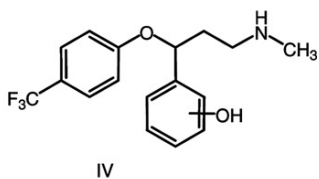
Pogoji E6	Pogoji E3
Fluoksetin – Upad učinkovine	Fluoksetin - Upad učinkovine
RT: 3,2 min	RT 3,4 min
Struktura:	Struktura:



Fluoksetin 1-OH

Karakteristike: $m/z=326+$; RT: 3,8 min

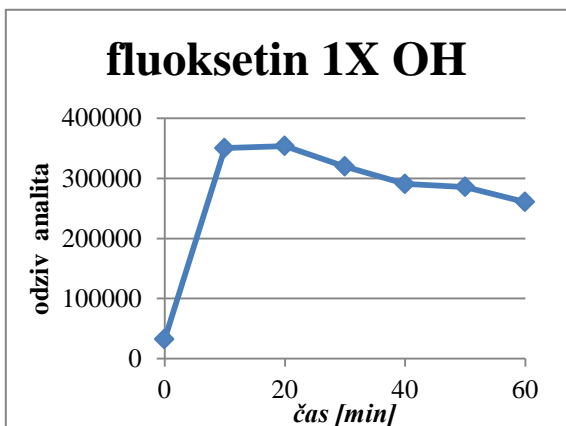
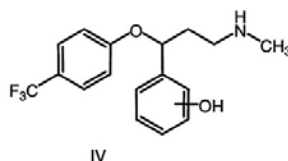
Struktura produkta:



Fluoksetin 1-OH

Karakteristike: m/z : 326+; RT: 3,8 min

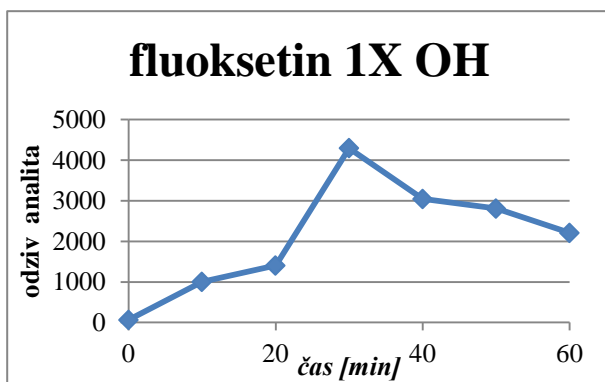
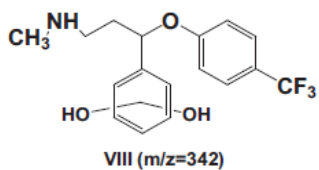
Struktura produkta

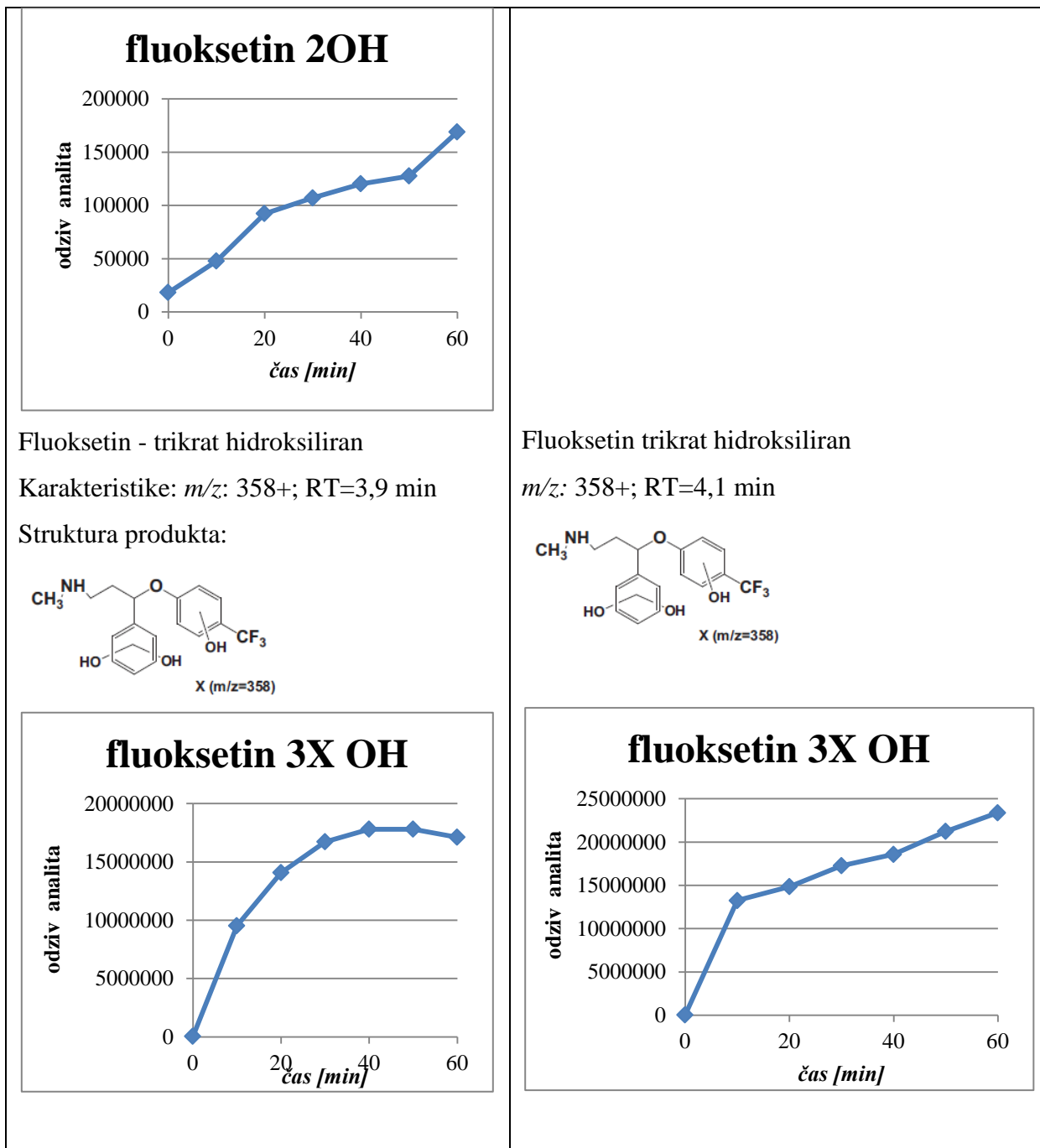


Fluoksetin 2-OH

Karakteristike: m/z : 342+; RT=3,6 min

Struktura produkta:



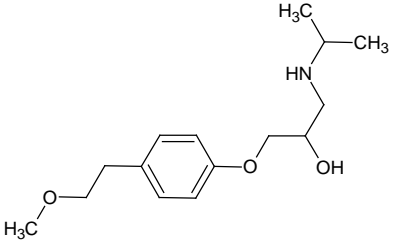
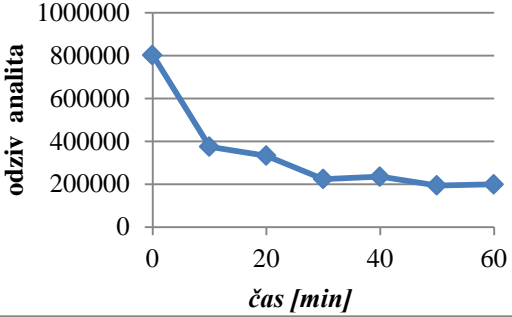
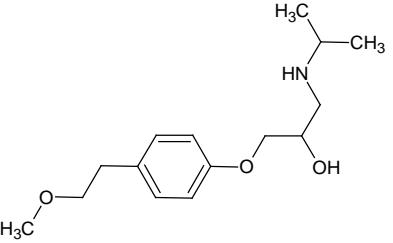
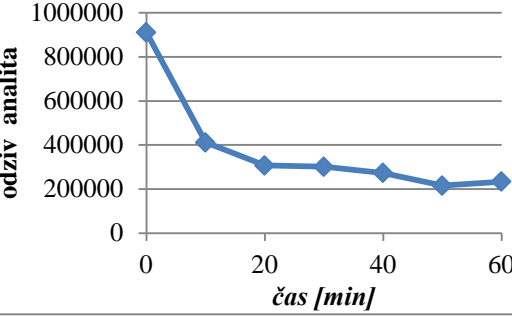


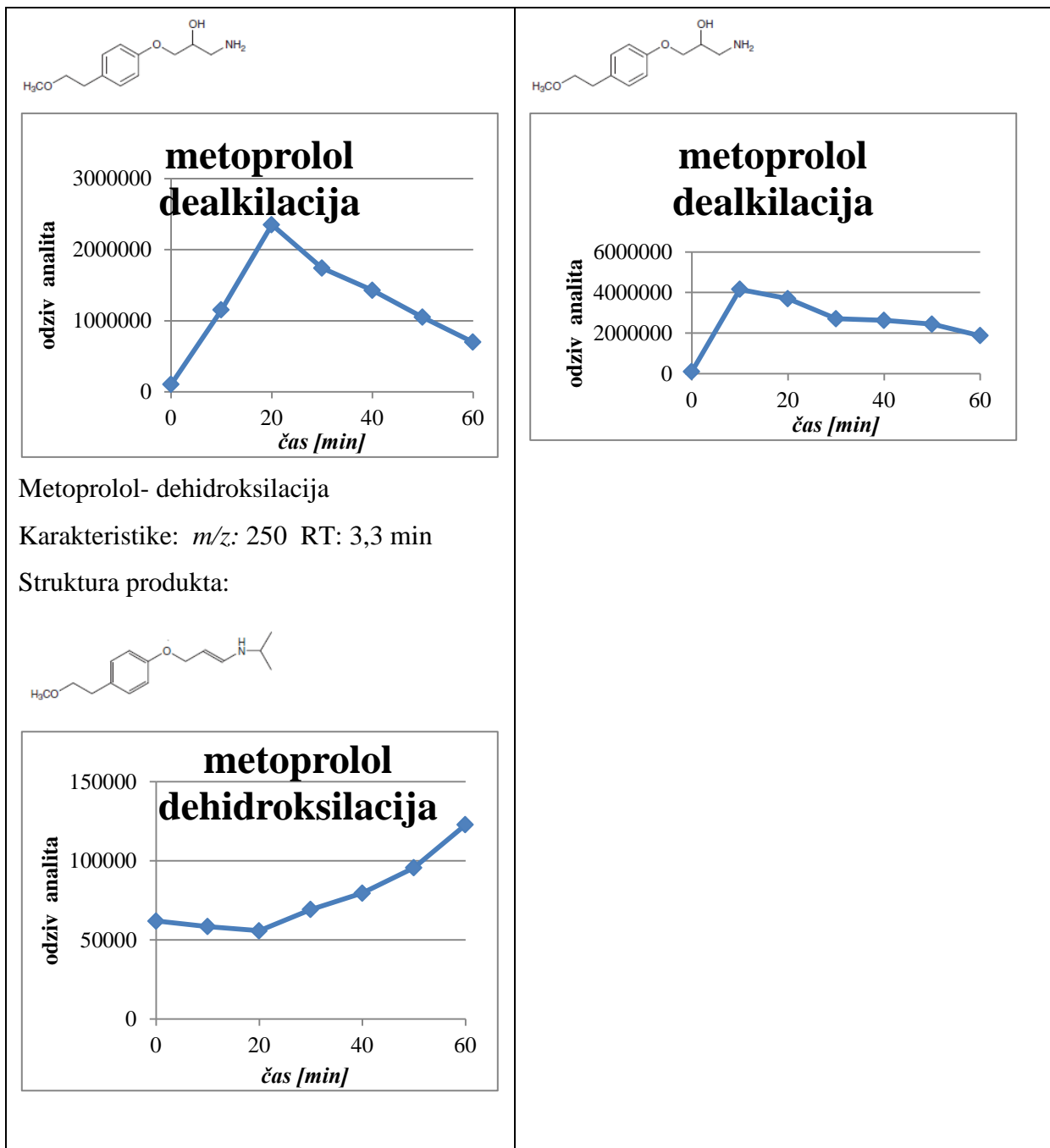
Slika 17: Fluoksetin: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Učinkovina popolnoma razpade, pri čemer je razpad dosežen že po 30 min pri ostrejših pogojih in po 40 min pri pogojih E3. Glavni produkt, ki nastane pri obdelavi fluoksetina je trikrat hidroksiliran produkt, ki ga tudi zaznamo pri obeh pogojih. Zelo velik odziv (cca. 150 krat večji, kot pri samem fluoksetinu) je posledica intenzivnejše ionizacije spojine, ki jo lahko

na masnem detektorju lažje detektiramo. Pri milejših pogojih (E3) zaznamo predvsem trikrat hidroksiliran fluoksetin. Pri ostrejših pogojih pa zaznamo v večji meri tudi mono- in dihidroksiliran fluoksetin. Zanimiva je kinetika nastanka mono in trikrat hidroksiliranega produkta, kjer vidimo, da njuna koncentracija najprej zraste, nato pa začne upadati. Razlog za to so najverjetneje nadaljnje oksidacijske pretvorbe, čigar produktov pa nismo uspeli ne zaznati ne identificirati. Za monohidroksiliran produkt nismo uspeli dokazati linearnosti za našo metodo, tako da lahko gre zaradi podobnega RT zgolj za lažno pozitiven signal, ki pripada osnovni učinkovini – fluoksetinu.

4.1.8. Metoprolol

Pogoji E6	Pogoji E3																																
<p>Metoprolol - Upad učinkovine</p> <p>RT: 2,0 min</p> <p>Struktura:</p>  <div data-bbox="228 1234 797 1644"> <p style="text-align: center;">metoprolol</p>  <table border="1"> <caption>Data for Metoprolol signal decrease (E6)</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>800000</td></tr> <tr><td>10</td><td>350000</td></tr> <tr><td>20</td><td>300000</td></tr> <tr><td>30</td><td>220000</td></tr> <tr><td>40</td><td>230000</td></tr> <tr><td>50</td><td>180000</td></tr> <tr><td>60</td><td>180000</td></tr> </tbody> </table> </div> <p>Metoprolol- dealkilacija</p> <p>Karakteristike: m/z: 226+ RT: 1,8 min</p> <p>Struktura produkta:</p>	čas [min]	odziv analita	0	800000	10	350000	20	300000	30	220000	40	230000	50	180000	60	180000	<p>Metoprolol - Upad učinkovine</p> <p>RT: 2,0 min</p> <p>Struktura:</p>  <div data-bbox="829 1234 1398 1644"> <p style="text-align: center;">metoprolol</p>  <table border="1"> <caption>Data for Metoprolol signal decrease (E3)</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>900000</td></tr> <tr><td>10</td><td>400000</td></tr> <tr><td>20</td><td>300000</td></tr> <tr><td>30</td><td>300000</td></tr> <tr><td>40</td><td>280000</td></tr> <tr><td>50</td><td>200000</td></tr> <tr><td>60</td><td>220000</td></tr> </tbody> </table> </div> <p>Metoprolol- dealkilacija</p> <p>Karakteristike: m/z: 226+ RT: 1,8 min</p> <p>Struktura produkta:</p>	čas [min]	odziv analita	0	900000	10	400000	20	300000	30	300000	40	280000	50	200000	60	220000
čas [min]	odziv analita																																
0	800000																																
10	350000																																
20	300000																																
30	220000																																
40	230000																																
50	180000																																
60	180000																																
čas [min]	odziv analita																																
0	900000																																
10	400000																																
20	300000																																
30	300000																																
40	280000																																
50	200000																																
60	220000																																



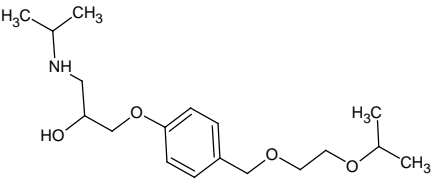
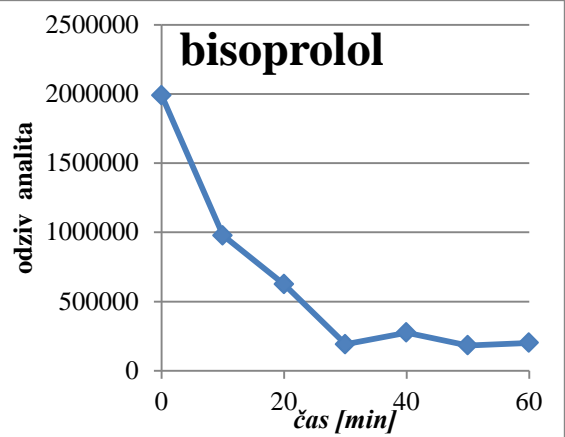
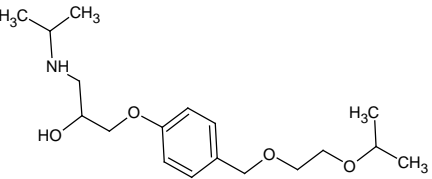
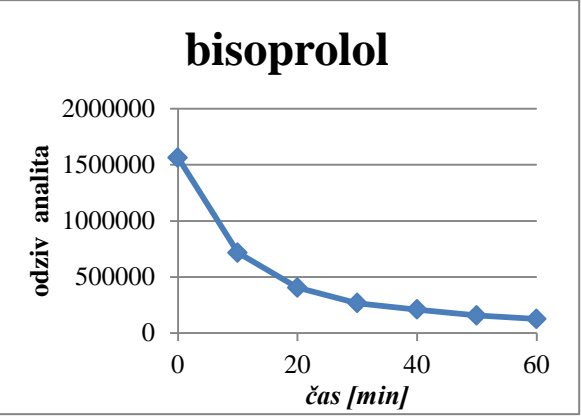
Slika 18: Metoprolol: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

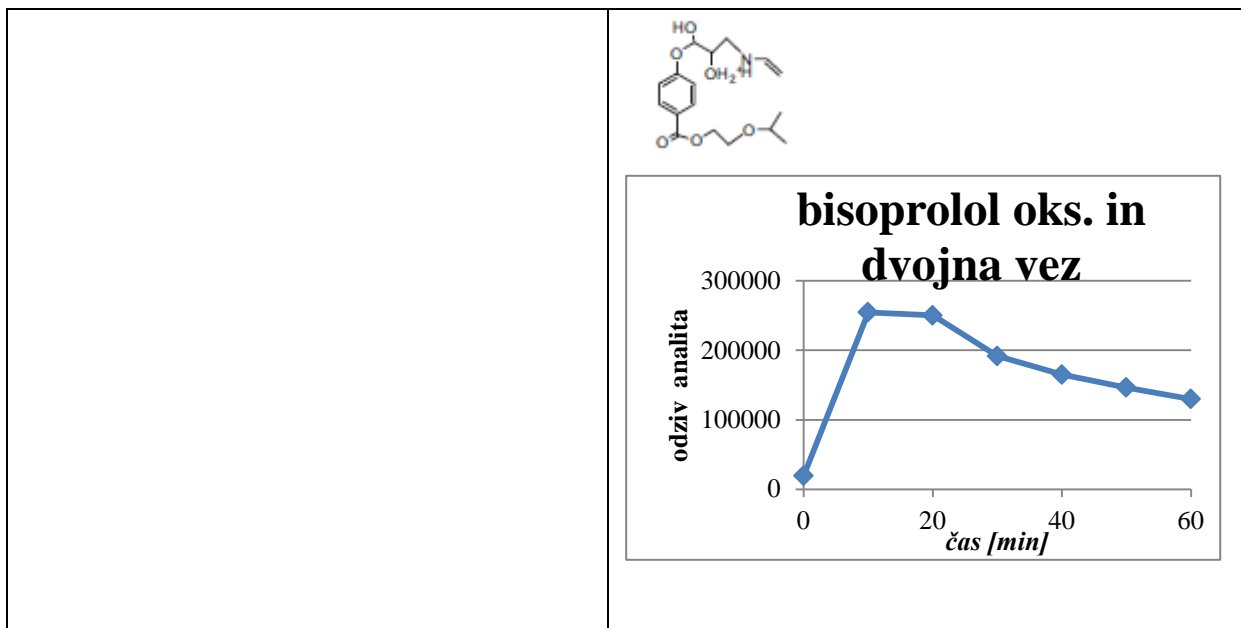
Razgradnja metoprolola poteče le do cca. 25% začetne vrednosti učinkovine in to ne glede na napetost (pogoji E3 ali E6). Zaznamo samo dva potencialna razgradna produkta - dealkiliran in dehidroksiliran metoprolol. Kinetika nastanka pri različnih pogojih kaže, da razpadni produkt (dealkilacija iPr verige na dušiku) doseže vrh pri cca 10-20 min, nato pa začne koncentracija tega produkta upadati. Pri validaciji metode smo dobili za ta produkt nekoliko

slabšo linearnost, vendar ker opazimo jasen trend nastanka produkta ter ustrezno daljši retencijski čas glede na osnovno molekulo metoprolola (kar se torej sklada s povečanjem lipofilnosti), lahko vseeno z veliko verjetnostjo sklepamo, da gre za predpostavljeni produkt. Zaradi relativno slabe učinkovitosti čiščenja smo še enkrat poslali vzorce na obdelavo, kjer so vzorce obdelali pod ostrejšimi pogoji.

Posledica tega je verjetno fragmentacija metoprolola na manjše delce, ki jih z našo metodo ne detektiramo. To razloži tudi kinetiko za edini razgradni produkt, ki smo ga dokazali, saj se tudi ta po določenem času verjetno razgradi na še manjše delce.

4.1.9. Bisoprolol

Pogoji E6	Pogoji E3
<p>Bisoprolol - Upad učinkovine</p> <p>RT: 2,6 min</p> <p>Struktura:</p>  	<p>Bisoprolol - Upad učinkovine</p> <p>RT: 2,6 min</p> <p>Struktura:</p>   <p>Bisoprolol-oksidacija in dvojna vez</p> <p>Karakteristike: m/z: 340+ RT: 2,7 min</p> <p>Struktura produkta:</p>

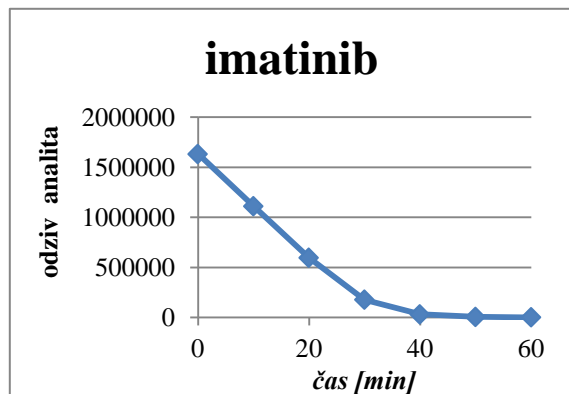
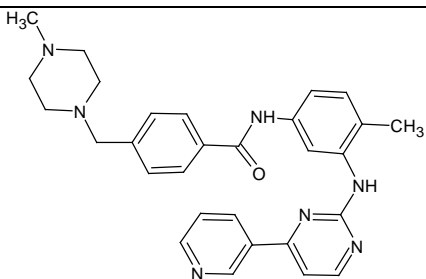


Slika 19: Bisoprolol: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnega produkta

Učinkovina skoraj popolnoma razpade pri obdelavi z BDDA. Pričakujemo podobno pot razgradnje učinkovine kot pri metoprololu, vendar tu dealkiliranega razpadnega produkta nismo zaznali. Detektirali smo le večkrat oksidirani fragment, ki pa bi zaradi svoje kompleksnosti lahko imel tudi drugačno strukturno formulo. Tudi pri tej učinkovini smo analizirali vzorce, ki so bili tretirani po modifikaciji metode (podobno kot za metoprolol), zato je odsotnost razgradnih produktov verjetno posledica njihove razgradnje do zelo majhnih fragmentov. Ker ti niso ionizirali, jih z našo metodo nismo mogli zaznati.

4.1.10. Imatinib

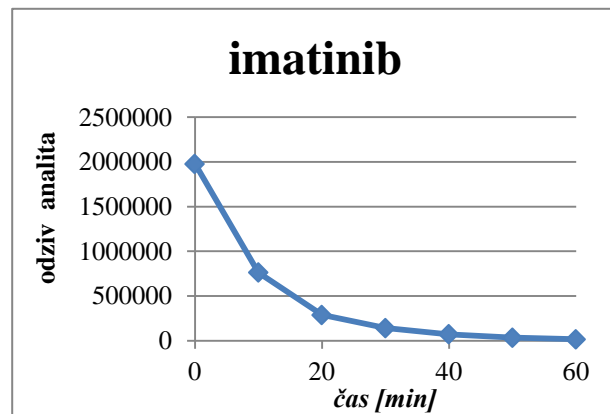
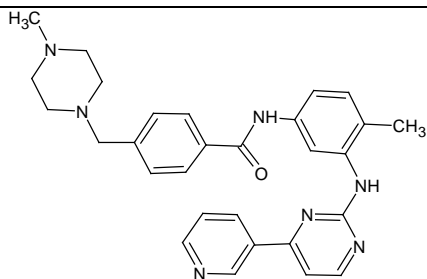
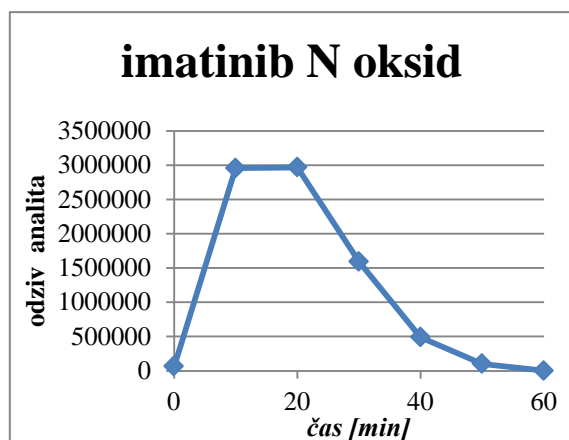
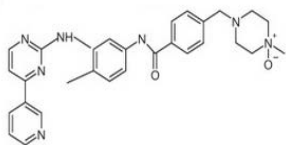
Pogoji E6	Pogoji E3
Imatinib - Upad učinkovine	Imatinib - Upad učinkovine
RT: 2,3 min	RT: 2,3 min
Struktura:	Struktura:



Imatinib N-oksoid

Karakteristike: m/z : 510+; RT:2,4 min

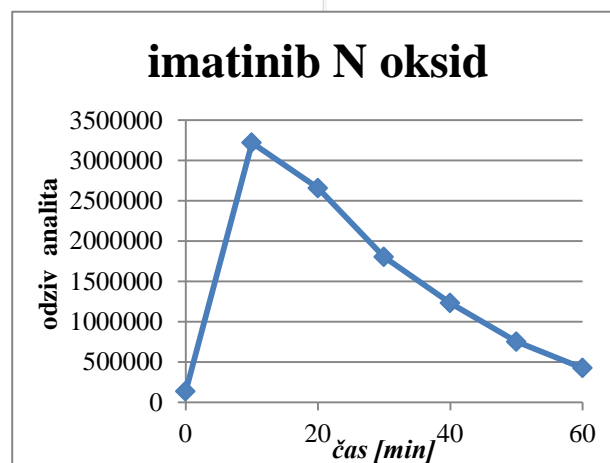
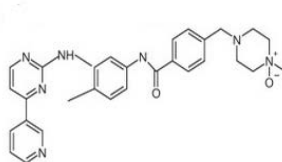
Struktura produkta:



Imatinib N-oksoid

Karakteristike: m/z : 510+; RT:2,4 min

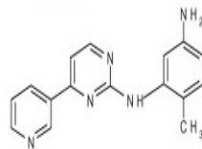
Struktura produkta:



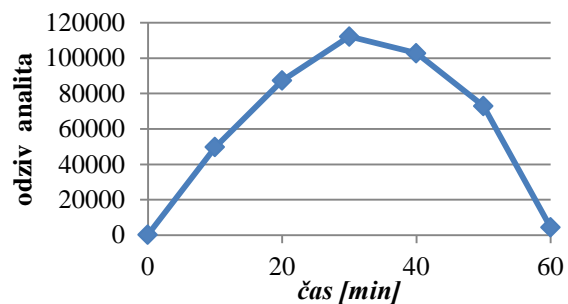
Imatinib- odcep dveh obročev

Karakteristike: m/z : 278+ RT:2,9 min

Struktura produkta:



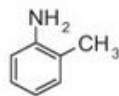
imatinib odcep dveh obročev



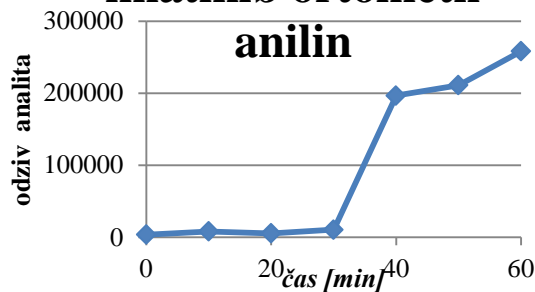
Imatinib- ortometilanilin:

Karakteristike: m/z : 108+ RT:3,7 min

Struktura produkta:



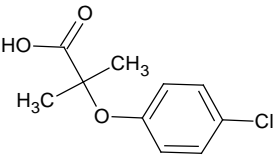
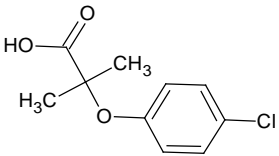
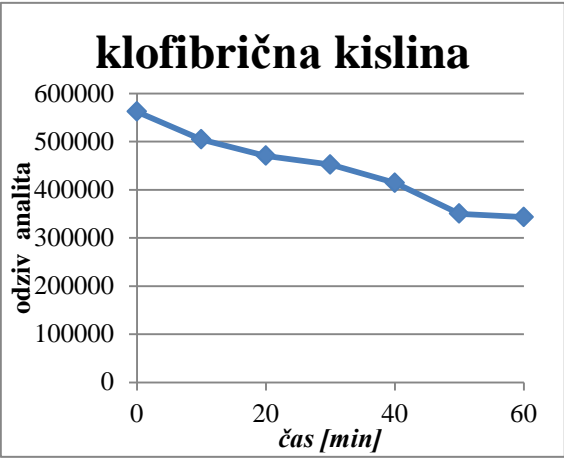
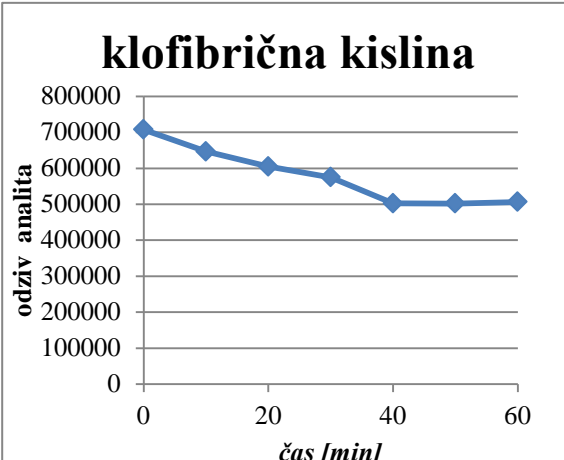
imatinib ortometil anilin

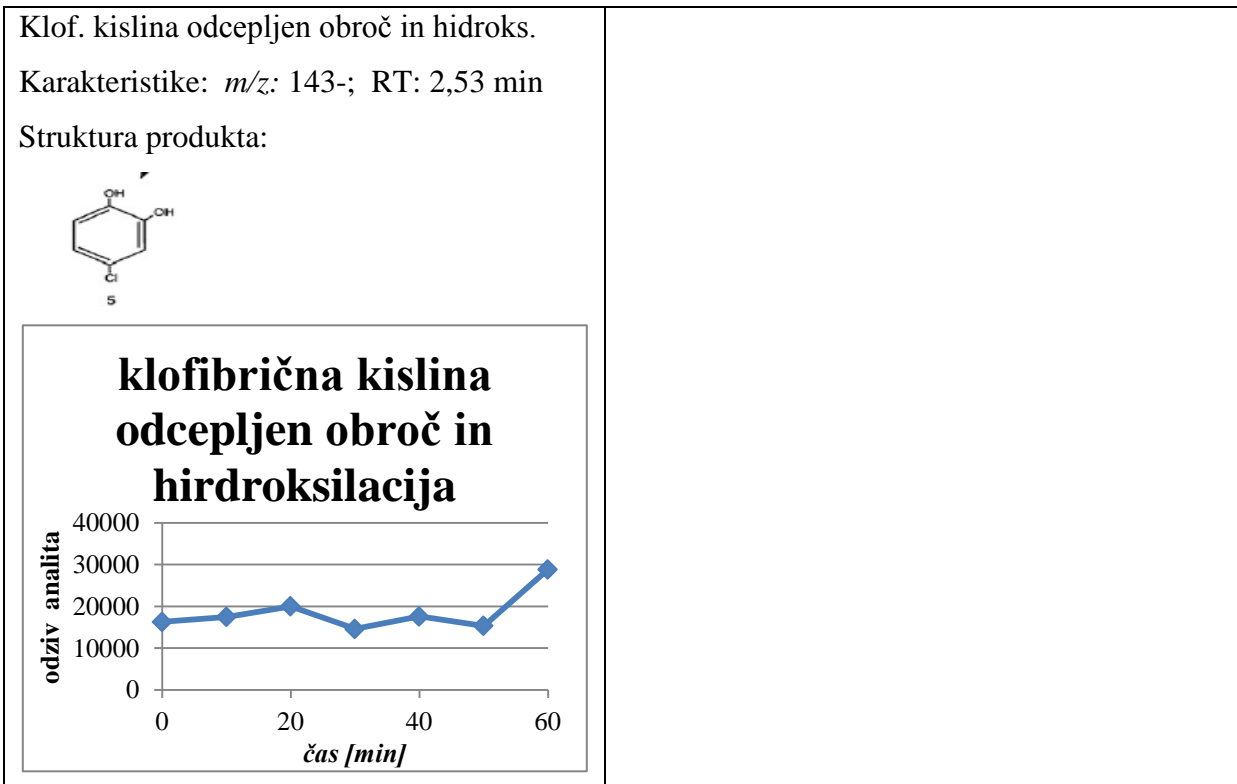


Slika 20: Imatinib: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnih produktov

Razpad učinkovine je popoln, dosežen v 40 min (E6) oz. 50 min (E3). Našli smo 3 predvidene potencialne razgradne produkte: imatinib N-oksidi, imatinib z odcepljenima piperazinskim in benzenskim obročem ter orto-metilnilin. Pri ostrejših pogojih smo zaznali le prvega, ostalih dveh pa ne. Že kinetika nastanka tega produkta (oksidacija na dušiku) kaže, da sam razpadni produkt med procesom čiščenja razpade na druge fragmente, saj njegova koncentracija najprej strmo naraste, potem pa počasi upade. Pri milejših pogojih zaznamo še nastanek in razpad fragmenta imatiniba z odcepljenima obročema, prav tako pa je viden nastanek manjšega fragmenta – ortometilanilina. Tudi s spremljanjem razpadnega produkta, kjer se od molekule imatiniba odcepita dva obroča, vidimo, da se v samem procesu čiščenja razgradi najprej do manjših fragmentov.

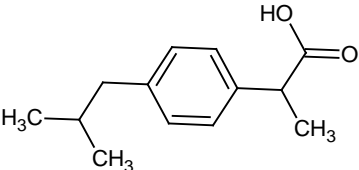
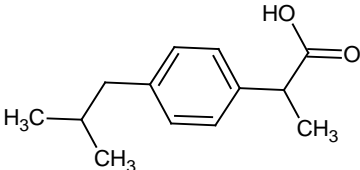
4.1.11 Klofibrična kislina in ibuprofen

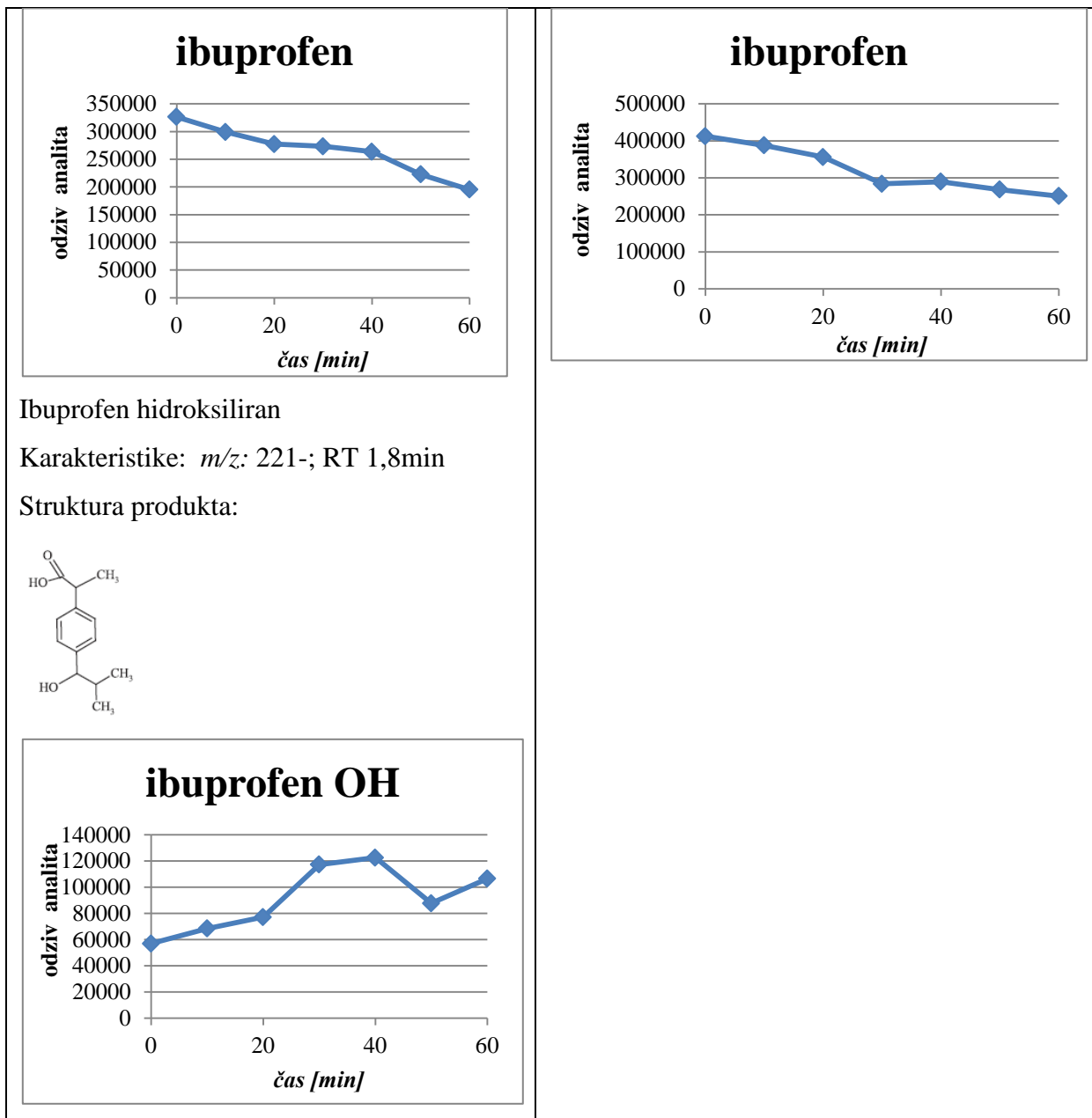
Pogoji E6	Pogoji E3																																
Klofibrična kislina- Upad učinkovine RT: 2,3 min Struktura: 	Klofibrična kislina - Upad učinkovine RT: 2,3 min Struktura: 																																
 <p>klofibrična kislina</p> <table border="1"> <caption>Data for Klofibrična kislina (E6)</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>550000</td></tr> <tr><td>10</td><td>500000</td></tr> <tr><td>20</td><td>470000</td></tr> <tr><td>30</td><td>450000</td></tr> <tr><td>40</td><td>420000</td></tr> <tr><td>50</td><td>350000</td></tr> <tr><td>60</td><td>340000</td></tr> </tbody> </table>	čas [min]	odziv analita	0	550000	10	500000	20	470000	30	450000	40	420000	50	350000	60	340000	 <p>klofibrična kislina</p> <table border="1"> <caption>Data for Klofibrična kislina (E3)</caption> <thead> <tr> <th>čas [min]</th> <th>odziv analita</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>0</td><td>700000</td></tr> <tr><td>10</td><td>650000</td></tr> <tr><td>20</td><td>600000</td></tr> <tr><td>30</td><td>580000</td></tr> <tr><td>40</td><td>500000</td></tr> <tr><td>50</td><td>500000</td></tr> <tr><td>60</td><td>500000</td></tr> </tbody> </table>	čas [min]	odziv analita	0	700000	10	650000	20	600000	30	580000	40	500000	50	500000	60	500000
čas [min]	odziv analita																																
0	550000																																
10	500000																																
20	470000																																
30	450000																																
40	420000																																
50	350000																																
60	340000																																
čas [min]	odziv analita																																
0	700000																																
10	650000																																
20	600000																																
30	580000																																
40	500000																																
50	500000																																
60	500000																																



Slika 21: Klofibrična kislina: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnega produkta

Ibuprofen

Pogoji E6	Pogoji E3
Ibuprofen - Upad učinkovine RT: 3,0 min Struktura:	Ibuprofen - Upad učinkovine RT: 3,1 min Struktura:
	



Slika 22: Ibuprofen: upad učinkovine in kinetika nastanka razgradnega produkta

Učinkovini v manj kot polovičnem obsegu zapadeta razgradnji, tudi pri ostrejših pogojih. Gre za substanci, ki ionizirata z negativnim nabojem, po pregledu literature pa smo ugotovili, da tudi potencialni razpadni produkti ionizirajo z negativnim nabojem. Zaradi tega smo za ti 2 učinkovini spremenili mobilno fazo B. Kljub temu, smo le pri najostrejših pogojih za vsako učinkovino zaznali le po en potencialni razpadni produkt, vendar oba z nizkim odzivom. Pri vzorcih analiziranih za validacijo metode nismo uspeli detektirati nobenega izmed teh

produktov, zato ne moremo z gotovostjo trditi, da sta detektirana kromatografska vrhova razgradna produkta. Možnih razlogov za tako malo razpadnih produktov je več: slaba razpadnost učinkovine, nizki odzivi morebitnih razpadnih produktov, glavni pa je zagotovo negativna ionizacija razpadnih produktov, ki je skoraj vedno povezana z nižjimi odzivi v primerjavi s snovmi, ki ionizirajo v pozitivnem načinu.

4.2. Validacija

4.2.1. Linearnost

Linearnost metode smo določali z merjenjem odziva ustrezno redčenih vzorcev, ki so bili izpostavljeni obdelavi z BDDA. Z določanjem linearnosti smo predvsem želeli potrditi, da je metoda ustrezna za kvantitativno spremljanje kinetike nastanka razgradnih produktov in upada izhodnih spojin. Hkrati pa smo s tem tudi želeli potrditi, da odzivi niso bili šum iz ozadja bazne linije gradienta, temveč, da izvirajo iz vzorca različnih znanih koncentracij posameznih vzorcev. Odziv analita je predstavljala površina kromatografskih vrhov. Odzive smo analizirali s programom MS Excel, z uporabo funkcij slope, intercept, pearson. Za vsak analizirani vzorec smo določili regresijsko premico, kjer smo iskali linearno povezanost med naraščajočo koncentracijo analita v vzorcu in odzivom.

4.2.2. Ponovljivost

Za določanje ponovljivosti metode smo prav tako uporabili program MS Excel in uporabili funkcije: average (povprečje), stdev, (standardna deviacija) iz česar smo lahko določili tudi vrednost RSD. Ta vrednost je razmerje med standardno deviacijo in povprečjem posameznih meritev. Ker jo podajamo v odstotkih, dobljeno razmerje še pomnožimo s 100%. Poleg odzivov smo določili tudi ponovljivost retencijskih časov.

V preglednici I so podani parametri validacij.

Preglednica I: Parametri linearnosti in ponovljivosti metode za učinkovine in njihove razgradne produkte. Poleg imena vsake učinkovine je označen tudi vzorec, ki smo ga uporabili za validacijo metode.

Analizirani vzorec Razgradni produkti spojine	Enačba reg. premice Pearsonov koeficient (R^2)	Ponovljivost odziva RSD
Karbamazepin, E5; t60 Karbamazepin odprt obroč	$y = 77164x - 1369,5$ $R^2 = 0,9977$	STDEV:1639,35 RSD: 2,14
Karbamazepin – cikel	$y = 866583x - 31593$ $R^2 = 0,9997$	STDEV: 7041.23 RSD:0,85
Karbamazepin- hirosiliran oz. epoksid	$y = 66031x - 1163,2$ $R^2 = 0,9998$	STDEV: 549,16 RSD: 0,85
Karbamazepin – dekarboksamid in oksid	$y = 15414x + 10383$ $R^2 = 0,8748$	STDEV: 1857,04 RSD: 7,01
Amoksicilin; E5, t40 Amoksicilin tiazol	$y = 101417x + 7945,9$ $R^2 = 0,9707$	STDEV: 1835,36 RSD: 1,75
Atrazin; E4, t60 Atrazin- odcep etila	$y = 48274x - 1039,9$ $R^2 = 0,9992$	STDEV:2420,91 RSD: 4,80
Atrazin- oks. etila, dealkilacija iPr	$y = 14152x + 742,78$ $R^2 = 0,9872$	STDEV: 1682,39 RSD: 9,85
Atrazin- oks. etila	$y = 474955x - 14703$ $R^2 = 0,9993$	STDEV: 19983,68 RSD:4,09
Atrazin- odcep obeh alkilov	$y = 154815x - 13801$ $R^2 = 0,9957$	STDEV:5657,53 RSD:3,90

Ciprofloksacin; E5, t50		
Ciprofloksacin- dekarboksilacija, zamenjava F	$y = 264674x - 24198$ R² = 0,9869	STDEV: 2897,21 RSD:1,16
Ciprofloksacin- odprtje piperazina in oksidacija	$y = 47362x + 4052,9$ R² = 0,9937	STDEV:545,18 RSD: 1,10
Ciprofloksacin- odstranitev F, odprtje obroča	$y = 20563x - 2640,2$ R² = 0,9757	STDEV:1407,65 RSD: 7,93
Diklofenak; E5, t60		
Fluoksetin; E5, t60		
Fluoksetin- enkrat hidroksiliran	$y = 971,09x + 127,32$ R² = 0,9032	STDEV:104,71 RSD: 9,73
Fluoksetin- dvakrat hidroksiliran	$y = 127706x - 13326$ R² = 0,9933	STDEV:2689,02 RSD:2,21
Fluoksetin- trikrat hidroksiliran	$y = 2E+07x - 164725$ R² = 0,9978	STDEV:319079,14 RSD: 1,67
Metoprolol; E3, t60 (nov)		
Metoprolol- dealkilacija	$y = 17865x - 695,19$ R² = 0,9421	STDEV:1307,68 RSD:7,13
Metoprolol- dehidroksilacija	$y = 6833x + 7942,7$ R² = 0,7685	STDEV: 680,39 RSD: 4,21
Simazin; E5, t60		
Simazin- odcep enega alkila	$y = 122103x - 7374,7$ R² = 0,9962	STDEV:839,44 RSD:1,23
Simazin- odcep enega alkila in zamenjava Cl	$y = 41352x + 921,56$ R² = 0,9895	STDEV:40,15 RSD:1,38
Simazin- zamenjava Cl	$y = 5431,6x - 159,53$ R² = 0,9896	STDEV: 1388,89 RSD:5,23
Imatinib; E3, t60		
Imatinib- N-oksid	$y = 487776x - 52049$ R² = 0,9967	STDEV:12436,67 RSD:2,89

Imatinib- odcep dveh obročev	$y = 25280x - 1036,6$ R² = 0,9985	STDEV:1223,22 RSD:4,70
Imatinib- ortometil anilin	$y = 307417x + 43267$ R² = 0,9914	STDEV:6220,86 RSD:1,76
Bisoprolol; E3, t60 (nov)		
Bisoprolol- oks. in dvojna vez	$y = 16862x + 679,36$ R² = 0,9917	STDEV: 1321,41 RSD: 8,07
Ibuprofen; E4, t60		
Klofibrična kislina; E5, t60		

Parametre ponovljivosti metode smo določili tudi prek retencijskih časov za analizirane razgradne produkte. S tem smo želeli še dodatno potrditi selektivnost metode, saj na ta način lahko bolj zanesljivo trdimo, da gre pri identificiranih vrhovih res za razgradne produkte učinkovin in ne za morebitne nečistoče oz. druge spojine v vzorcu. Vse RSD vrednosti (preglednica II) za razgradne produkte so nižje od 0,5%, zato lahko z veliko gotovostjo sklepamo, da vrhovi s temi RT res pripadajo razgradnim produktom spojin.

Preglednica II: Za določanje ponovljivosti metode smo izračunali tudi ponovljivost retencijskih časov za vsak detektiran razgradni produkt. V preglednici so ob imenu razgradnega produkta podani povprečni retencijski čas (izračunan iz petih meritev), ter standardna deviacija in RSD.

Razgradni produkti spojine	RT [min]	Ponovljivost odziva RSD [%]
Karbamazepin odprt obroč	2,03	STDEV: 0,002 RSD: 0,11
Karbamazepin – cikel	2,44	STDEV: 0,002 RSD:0,08
Karbamazepin- hirosiliran oz. epoksid	2,58	STDEV: 0,00 RSD: 0,00
Karbamazepin – dekarboksamid in oksid	2,85	STDEV: 0,00 RSD: 0,00

Amoksicilin tiazol	3,92	STDEV: 0,002 RSD: 0,05
Atrazin- odcep etila	3,14	STDEV:0,00 RSD: 0,00
Atrazin- oks. etila, dealkilacija iPr	1,73	STDEV: 0,004 RSD: 0,23
Atrazin- oks. etila	3,26	STDEV: 0,004 RSD:0,11
Atrazin- odcep obeh alkilov	0,85	STDEV:0,003 RSD:0,38
Ciprofloksacin- dekarboksilacija, zamenjava F	3,12	STDEV: 0,002 RSD:0,06
Ciprofloksacin- odprtje piperazina in oksidacija	3,05	STDEV:0,002 RSD: 0,07
Ciprofloksacin- odstranitev F, odprtje obroča	3,12	STDEV:0,002 RSD: 0,06
Diklofenak;	/	/
Fluoksetin- enkrat hidroksiliran	3,71	STDEV:0,004 RSD: 0,11
Fluoksetin- dvakrat hidroksiliran	3,63	STDEV:0,002 RSD:0,06
Fluoksetin- trikrat hidroksiliran	3,92	STDEV:0,00 RSD: 0,00
Metropolol- dealkilacija	1,78	STDEV:0,004 RSD:0,21
Metoprolol- dehidroksilacija	3,41	STDEV: 0,002 RSD: 0,07

Simazin- odcep enega alkila	2,79	STDEV:0,015 RSD:0,54
Simazin- odcep enega alkila in zamenjava Cl	2,36	STDEV:0,002 RSD:0,16
Simazin- zamenjava Cl	3,19	STDEV: 0,003 RSD:0,14
Imatinib- N-oksid	2,28	STDEV:0,002 RSD:0,09
Imatinib- odcep dveh obročev	2,90	STDEV:0,002 RSD:0,06
Imatinib- ortometil anilin	3,51	STDEV:0,002 RSD:0,05
Bisoprolol- oks. in dvojna vez	2,65	STDEV: 0,009 RSD: 0,42

4.2.3. Stabilnost raztopin - odzivi netretiranih vzorcev

Odzivi sveže pripravljenih raztopin, ki niso bili poslani na analizo, so zelo podobni z odzivi starejših raztopin. Pri večini analiziranih spojin sploh ne zaznamo signifikantnih razlik, do teh pride le pri treh analiziranih učinkovinah. Amoksicilin v dlje pripravljenem vzorcu že delno razpade, zato je koncentracija v sveže pripravljenem vzorcu največja. To velja tudi za imatinib, kjer pa v starejših vzorcih zaznamo tudi dva razpadna produkta: imatinib brez dveh obročev in N-oksidiran imatinib. Pri simazinu je odziv fitofarmaceutika v vseh vzorcih podoben, lahko pa zaznamo tudi en razpadni produkt: simazin z odcepljenim etilom.

Pri vzorcih odvzetih ob času 0 min pri napetosti E6, ki so bili v stiku z BDDA nismo zaznali nobenih drugih razpadnih produktov. S tem lahko ovržemo sum, da je kateri izmed identificiranih vrhov posledica nečistoč ali navzkrižne kontaminacije iz same elektrolitske celice.

4.3. Skupni komentar

4.3.1. Validacija metode

Metodo smo validirali za določanje vsaj enega razpadnega produkta pri večini učinkovin (razen diklofenaka) in njihovih razgradnih produktih, ki ionizirajo v pozitivnem načinu ionizacije. Pri nekaterih učinkovinah smo zaznali različne razgradne produkte pri različnih pogojih obdelave (fluoksetin, atrazin). Ker smo parametre za validacijo metode določali zgolj pri enem vzorcu za vsako obdelano učinkovino, je lahko tudi to razlog, da metoda ni validirana za vsak identificirani razgradni produkt. Pri parametru linearnosti (R^2) za monohidroksiliran fluoksetin smo dobili nižjo vrednost kot pri ostalih razgradnih produktih. Ta vrednost bi bila gotovo višja, če bi bila prisotna ta spojina v višji koncentraciji, kjer je tudi odziv in signal višji. Vendar smo le-tega določali v vzorcu, kjer je bila učinkovina tretirana pod ostrejšimi pogoji, omenjen razpadni produkt pa je pri teh pogojih nastal zgolj v manjši količini.

4.3.2. Razgradni produkti

Zelo pogost produkt vzorcev obdelanih z BDDA je hidroksiliran farmacevtik. Hidroksilacija lahko poteče tudi na več mestih. Pogosto pa pride do razpada učinkovine na kemijsko nestabilnih mestih. Tako so razpadni produkti posledica dealkilacije, razpada na mestu funkcionalnih skupin (amid, karboksilna kislina, halogeni element). To so tudi pričakovani razpadni produkti, nismo pa našli nobenega do sedaj še nedetektiranega razpadnega produkta. Te smo iskali z metodo snemanja celotnega spektra (ang. Full Scan), ki išče spojine v široko nastavljenem območju m/z , npr. 10-600, a v teh meritvah nismo detektirali nobenih kromatografskih vrhov z nepredvidenimi vrednostmi m/z .

Metodi za spojini z negativno ionizacijo (klofibrična kislina in ibuprofen) nista izkazovali dovolj velike občutljivosti, zato bi ju za nadaljnje raziskovanje njunih razgradnih produktov bilo smotno še dodatno optimizirati. Morda je zaradi manjše uporabe fibratov kot učinkovin za zniževanje holesterola, primerneje namesto klofibrične kisline spremljati drug hipolipemik, npr. katerega od statinov.

4.3.3. Analiza brez standardov razgradnih produktov

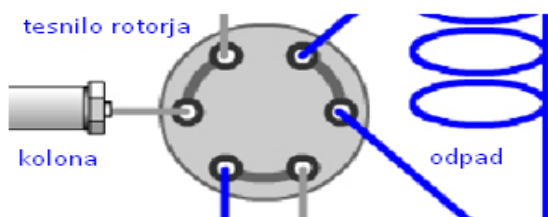
Identifikacija razgradnih produktov je torej slonela na že objavljenih študijah, kjer so pri pogojih pospešenega staranja identificirali razgradne produkte spojin. Za nedvoumno potrditev vseh predlaganih struktur detektiranih razgradnih produktov in njihovo kvantifikacijo bi tako potrebovali še analitske standarde vseh teh spojin. Na ta način bi lahko izvedli tudi vse parametre validacije metode.

Za dokončno potrditev bilo treba odkrite razgradne produkte izolirati, npr. z ekstrakcijo na trdnem nosilcu, in jih verjetno kromatografsko ločiti od izhodne spojine. Nato bi jih lahko strukturno analizirali z ustreznimi analitskimi tehnikami (jedrska magnetna spektroskopija).

Izračun masne bilance (farmaceutik+/-razpadni produkti) za posamezen analit pokaže, da je razmerje lahko močno v prid razpadnih produktov. Vidimo torej, da so odzivi nekaterih razgradnih produktov mnogo večji od odziva same (tudi nerazgrajene) učinkovine. To kaže, da ne moremo sklepati na koncentracijsko povezavo med odzivi različnih analitov. Z drugimi besedami, ne moremo uporabiti umeritvene krivulje izhodne spojine za izračun koncentracij razgradnega produkta.

4.3.4. Težave pri analizi

Retencijski časi se za večino enakih analitov pri pogojih E3 malenkostno razlikujejo od tistih pri pogojih E6, saj so za cca 0,1 min daljši. Razlog za takšno odstopanje je manjša tehnična težava na aparatu, ki je bila kasneje odpravljena. Minimalno oz. neopazno je namreč puščalo tesnilo rotorja na heksagonalnem ventilu avtomatskega vzorčevalnika (t.i. 'rotor seal' prikazan na sliki 23), zaradi česar se je nekoliko znižal pretok in pritisk na koloni in posledično so bili časi za potovanje spojin do detektorja nekoliko daljši.



Slika 23: Rotor Seal in njegova vloga.

Ko je bilo to tesnilo na aparatu zamenjano, so se nekoliko spremenili retencijski časi. Zaradi tega, ker smo vzorce deloma že pred tem porabili in zaradi časovne stiske zaradi zasedenosti inštrumenta, si nismo mogli privoščiti ponovne analize vseh vzorcev po menjavi tesnila.

Količina vzorca za posamezne pogoje obdelave z BDDA je bila dokaj nizka (cca. 100 µL). To je predstavljajo težave zlasti pri analizi učinkovin, kjer smo morali opraviti veliko meritev za optimizacijo metode, saj smo za validacijo metode potrebovali nekoliko večje količine vzorcev. To je tudi eden izmed razlogov, da pri spojinah ki ionizirajo z negativnim nabojem, v procesu validacije nismo detektirali razpadnih produktov, saj smo za to uporabili drug vzorec kot pri sami identifikaciji.

Pri določanju linearnosti je prišlo pri simazinu pri določeni koncentraciji (0,80 mg/L) do očitno prevelikih odzivov. Rezultat je posledica onečiščenosti vzorca, zato smo pri izračunu koeficientov vrednosti odzivov pri tej koncentraciji namenoma izpustili.

5. SKLEP

Z metodo tekočinske kromatografije sklopljene z masno detekcijo smo uspeli identificirati veliko razpadnih produktov učinkovin, ki so nastali po obdelavi vzorcev z BDDA. Metode smo z izbranimi parametri validirali za večino identificiranih spojin in s tem potrdili njihovo ustreznost za semi kvantitativno spremljanje kinetike nastanka in grobo identifikacijo nastalih razpadnih produktov. Za njihovo pravo kvantifikacijo in potrditev pravilnosti identifikacije pa bi potrebovali še analitske standarde vseh teh spojin, kar pa je zaradi težke dosegljivosti in cene presegalo namen našega dela. Ugotovili smo, da farmacevtiki tudi po obdelavi z BDDA ne mineralizirajo do povsem majhnih organskih molekul, za katere bi lahko trdili, da so povsem neškodljive za okolje. Videli smo tudi, da koncentracija skoraj polovice analiziranih spojin pri izbranih pogojih razgradnje v 60 min povsem upade (amoksicilin, ciprofloksacin, fluoksetin, bisoprolol, imatinib). Pri ostalih je dosežen različen delež razgradnje med 30 in 75% (metorpolol, karbamazepin, atrazin, simazin, diklofenak, klofibrična kislina, ibuprofen).

Pri bolj kompleksnih molekulah smo praviloma zaznali več razpadnih produktov, kar kaže, da bi se nadaljnje raziskave lahko usmerile na to področje. Za dve učinkovini (metoprolol in bisoprolol) je bilo po optimizaciji pogojev odstranjevanja doseženo izboljšanje v smislu manjše zaznave večjih razgradnih produktov in verjetno večje mineralizacije.

Razvite metode lahko služijo za iskanje morebitnih razpadnih produktov izbranih zdravilnih učinkovin v odpadnih vodah. Metodi za spojini z negativno ionizacijo nista dovolj optimizirani, zato bi ju morali še dodatno optimizirati.

6. LITERATURA

1. Verlicchi P, Al Aukidy M, Zambello E. Occurrence of pharmaceutical compounds in urban wastewater: Removal, mass load and environmental risk after a secondary treatment- A review, *Science of the Total Environment* 2012; 429: 123–55
2. George Tchobanoglous, Franklin Louis Burton, H. David Stensel, *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* 4th edition, McGraw-Hill Education, Boston, 2003: 516-52
3. Fent K., Weston A., Caminada D., *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*, *Aquatic Toxicology* 2006; 76: 122–59
4. Fent K., *Effects of pharmaceutics on aquatic organisms* 3rd edition, Springer, Berlin, 2008: 175-203
5. Brodin T., Fick J, Jonsson M, Klaminder J., Dilute concentrations of a psychiatric drug alter behavior of fish from natural populations, *Science* 2013; 339: 814-5
6. Juwarkar A. A., Singh K., Mudhoo A., A comprehensive overview of elements in bioremediation, *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 2010, 9: 215-30
7. Cleuvers, M. , *Aquatic ecotoxicity of pharmaceuticals including the assessment of combination effects*, *Toxicology Letters* 2003; 142: 185-94
8. Lacey, C., S. Basha, A. Morrissey, and J. M. Tobin , *Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland: Environmental Monitoring and Assessment* 2012; 184: 1049-62
9. Deng J, Shao Y. Gao N., Deng Y., Zhou S., Hu X., Thermally activated persulfate (TAP) oxidation of antiepileptic drug carbamazepine in water, *Chemical Engineering Journal* 2013; 228: 765–71
10. Keen S., Baik S., Linden K., Aga D., Love N., Enhanced Biodegradation of Carbamazepine after UV/H₂O₂ Advanced Oxidation, *Environmental Science Technology* 2012; 46: 6222–27
11. Xiaoming Li, Tingting Shen, Dongbo Wang, Xiu Yue, Xian Liu, Qi Yang, Jianbin Cao, Wei Zheng, Guangming Zeng, Photodegradation of amoxicillin by catalyzed Fe³⁺/H₂O₂ process, *Journal of Environmental Sciences* 2012, 24(2): 269–75

12. Igal Gozlan, Adi Rotstein, Dror Avisar, Amoxicillin-degradation products formed under controlled environmental conditions: Identification and determination in the aquatic environment, *Chemosphere* 2013, 9: 985–92
13. Kock-Schulmeyer, M., M. Villagrasa, M. Lopez de Alda, R. Cespedes-Sanchez, F. Ventura, and D. Barcelo, 2013, Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact, *Science of the Total Environment* 2013; 458: 466-76
14. M.J. López-Muñoz, J. Aguado Alonso, A. Revilla, Photocatalytic removal of s-triazines: Evaluation of operational parameters, *Catalysis Today* 2012; 161: 153-62.
15. Núria Borràs, Ramon Oliver, Conchita Arias, Enric Brillas, Degradation of Atrazine by Electrochemical Advanced Oxidation Processes Using a Boron-Doped Diamond Anode, *The Journal of Physical Chemistry A* 2010; 114 (24): 6613–21
16. Balci B, Oturan N, Cherrier R, Oturan MA, Degradation of atrazine in aqueous medium by electrocatalytically generated hydroxyl radicals. A kinetic and mechanistic study, *Water research* 2009; 43(7): 1924-34
17. Halling-Sørensen, B., S. Nors Nielsen, P. F. Lanzky, F. Ingerslev, H. C. Holten Lützhøft, and S. E. Jørgensen, Occurrence, fate and effects of pharmaceutical substances in the environment- A review, *Chemosphere* 1998, 36: 357-93
18. Hirsch, R., T. Ternes, K. Haberer, and K.-L. Kratz, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of The Total Environment* 1999; 225: 109-18
19. Hubicka U., Zmudzki P., Zuromska-Witek B., Zajdel P., Pawlowski M., Krzek J., Separation and characterization of ciprofloxacin, difloxacin, lomefloxacin, norfloxacin, and ofloxacin oxidation products under potassium permanganate treatment in acidic medium by UPLC-MS/MS, *Talanta* 2013; 109: 91–100
20. An T., Yang H., Li G., Song W., Cooper W.J., Nie X., Kinetics and mechanism of advanced oxidation processes (AOPs) in degradation of ciprofloxacin in water, *Applied Catalysis B: Environmental* 2010; 94: 288–94
21. Hu X, Yang J., Zhang j., Magnetic loading of TiO₂/SiO₂/Fe₃O₄ nanoparticles on electrode surface for photoelectrocatalytic degradation of diclofenac, *Journal of Hazardous Materials* 2011; 196: 220– 27

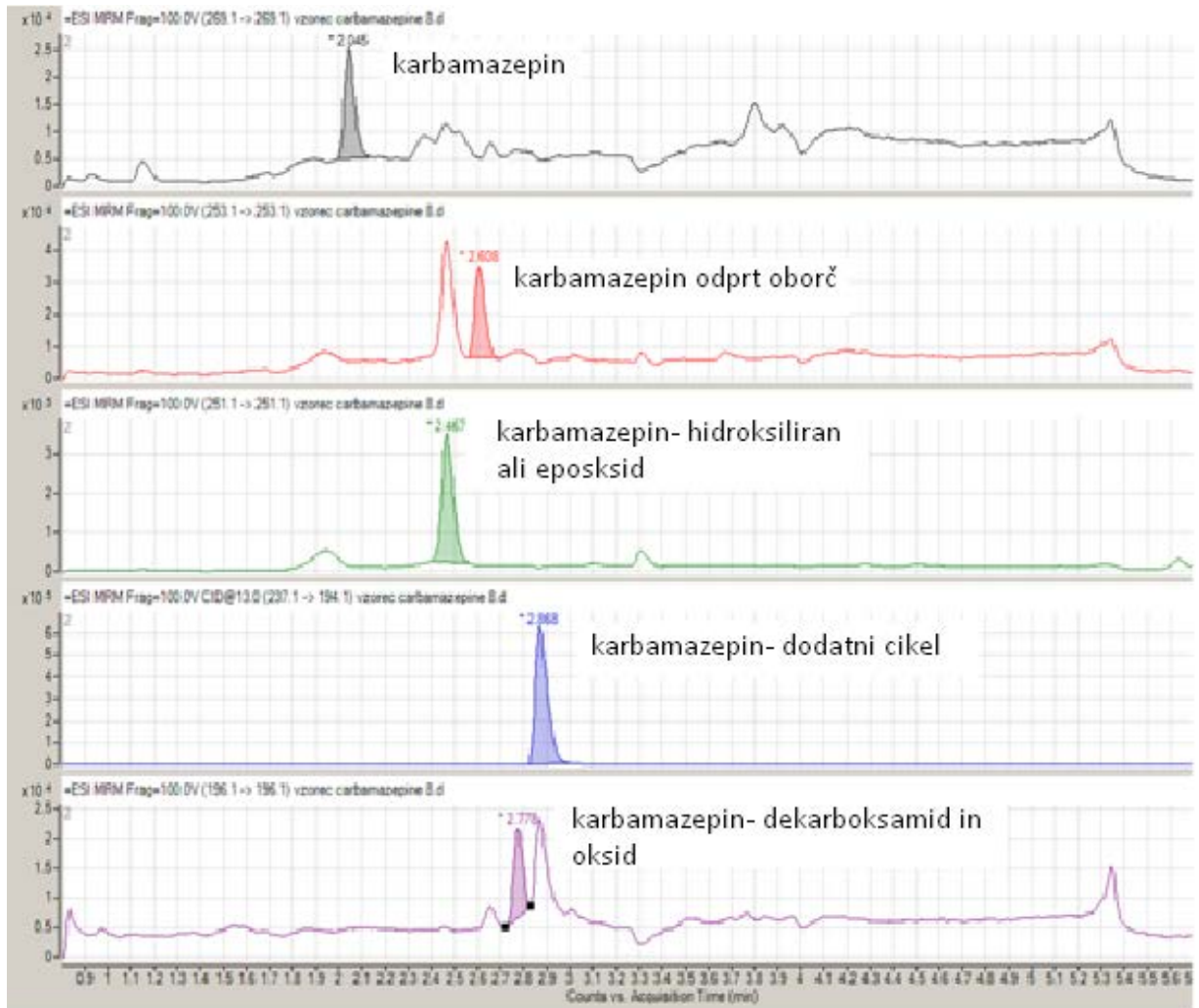
22. Coelho A.D. , Sans C., Agüera A, Gómez M:J:, Esplugas S., Dezotti M., Effects of ozone pre-treatment on diclofenac: Intermediates, biodegradability and toxicity assessment, *Science of the Total Environment* 2009; 407: 3572–78
23. Schwaiger, J., H. Ferling, U. Mallow, H. Wintermayr, and R. D. Negele, Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac. Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout, *Aquatic Toxicology* 2004; 68: 141-50
24. Méndez-Arriaga F, Otsu T, Oyama T, Gimenez J, Esplugas S, Hidaka H, Serpone N, of the antidepressant drug Fluoxetine (Prozac) in aqueous media by hybrid catalytic/ozonation processes, *Water Research* 2011; 45(9): 2782-94
25. Brooks, B. W., C. M. Foran, S. M. Richards, J. Weston, P. K. Turner, J. K. Stanley, K. R. Solomon, M. Slattery, and T. W. La Point, Aquatic ecotoxicology of fluoxetine, *Toxicology Letters* 2003; 142: 169-183
26. Gu Q, Dillon CF, and B. VL., Prescription Drug Use Continues to Increase:U.S. Prescription Drug Data for 2007–2008, *NCHS data brief* 2010; 42:1-8
27. Borkar M. R., Raju B., Srinivas R., Patel P., Kumar Shetty S., Identification and characterization of stressed degradation products of metoprolol using LC-Q-TOF-ESI-MS/MS and MS_n experiments, *Biomedical Chromatography* 2012; 26: 720–36
28. V. Romero, N. De la Cruz, Renato F. Dantas, P. Marco, J. Giménez, S. Esplugas Photocatalytic treatment of metoprolol and propranolol, *Catalysis today* 2011; 161: 115-20
29. A. Nageswaria, K.V.S.R. Krishna Reddy, K. Mukkanti, Stability-indicating UPLC method for determination of Imatinib Mesylate and their degradation products in active pharmaceutical ingredient and pharmaceutical dosage forms, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 2012; 66: 109– 15
30. Matamoros, V., J. Puigagut, J. García, and J. M. Bayona, Behavior of selected priority organic pollutants in horizontal subsurface flow constructed wetlands; A preliminary screening, *Chemosphere* 2007; 69: 1374-80
31. Kosjek, T., E. Heath, and B. Kompore, Removal of pharmaceutical residues in a pilot wastewater treatment plant, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2007; 387: 1379-87

32. Rosal R.,Gonzalo S.M., Boltes K., , Letón P.,Vaquero J.J., García-Calvo E., Identification of intermediates and assessment of ecotoxicity in the oxidation products generated during the ozonation of clofibric acid, *Journal of Hazardous Materials* 2009; 172: 1061–68
33. B.A. Boxall, V.D.J. Keller, J.O. Straub, S.C. Monteiro, R. Fussell, R.J. Williams, Exploiting monitoring data in environmental exposure modelling and risk assessment of pharmaceuticals, *Environment International* 2014; 73: 176-85
34. Ling Feng, Eric D. van Hullebusch , Manuel A. Rodrigo, Giovanni Esposito, Mehmet A. Oturan, Removal of residual anti-inflammatory and analgesic pharmaceuticals from aqueous systems by electrochemical advanced oxidation processes. A review, *Chemical Engineering Journal* 2013; 228: 944–64
35. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation, 2011, US Department of Health and Human Services, FDA, Rockville
36. Water for health, 2010, WHO Guidelines for Drinking-water Quality, 2010; dostop na http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/info_sheet_pharmaceuticals/en/, 15.05.2015
37. Lindqvist, N., T. Tuhkanen, and L. Kronberg , Occurrence of acidic pharmaceuticals in raw and treated sewages and in receiving waters, *Water Research* 2005; 39: 2219-28
38. <http://ec.europa.eu/food/plant/pesticides/eu-pesticides-database/public/?event=homepage&language=EN>; dostop 30.09.2015
39. Grmek-Košnik I., Ambrož B., Blaznik U.,Otorepec P., Pesticidi v pitni vodi, *Zdravniški vestnik* 2006, 75: 537-48
40. Leštan Domen, Lakovič Gorazd, Gerl Marko, Finžgar Neža, Pitnik z varno vodo za pitje, Urad RS za intelektualno lastnino, številka patenta: 24019, datum patetna: 30.09.2013

7. PRILOGA

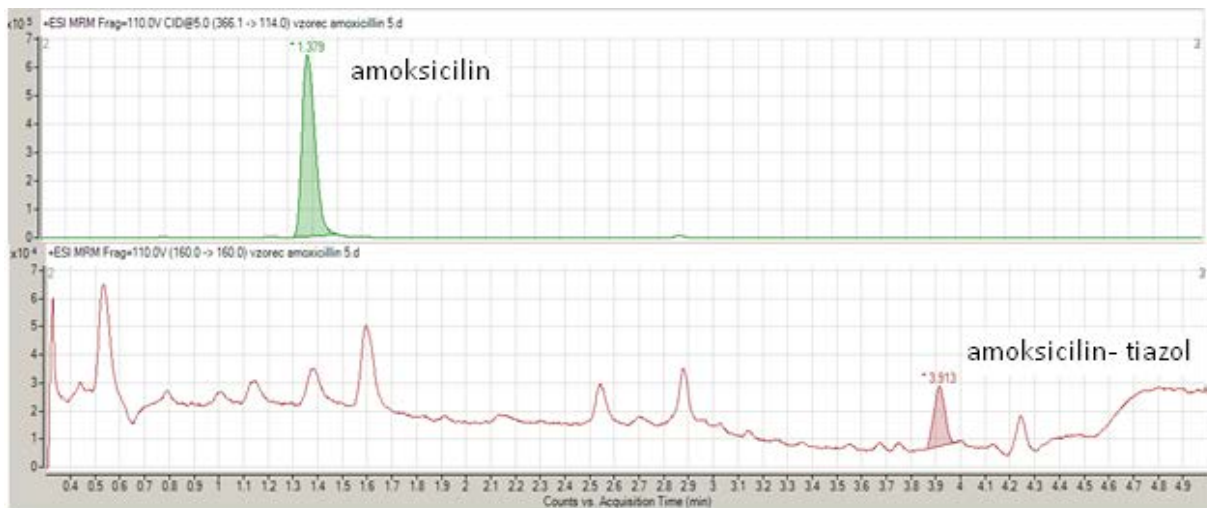
Kromatogrami analiziranih farmacevtikov in detektiranih razgradnih produktov

Karbamazepin



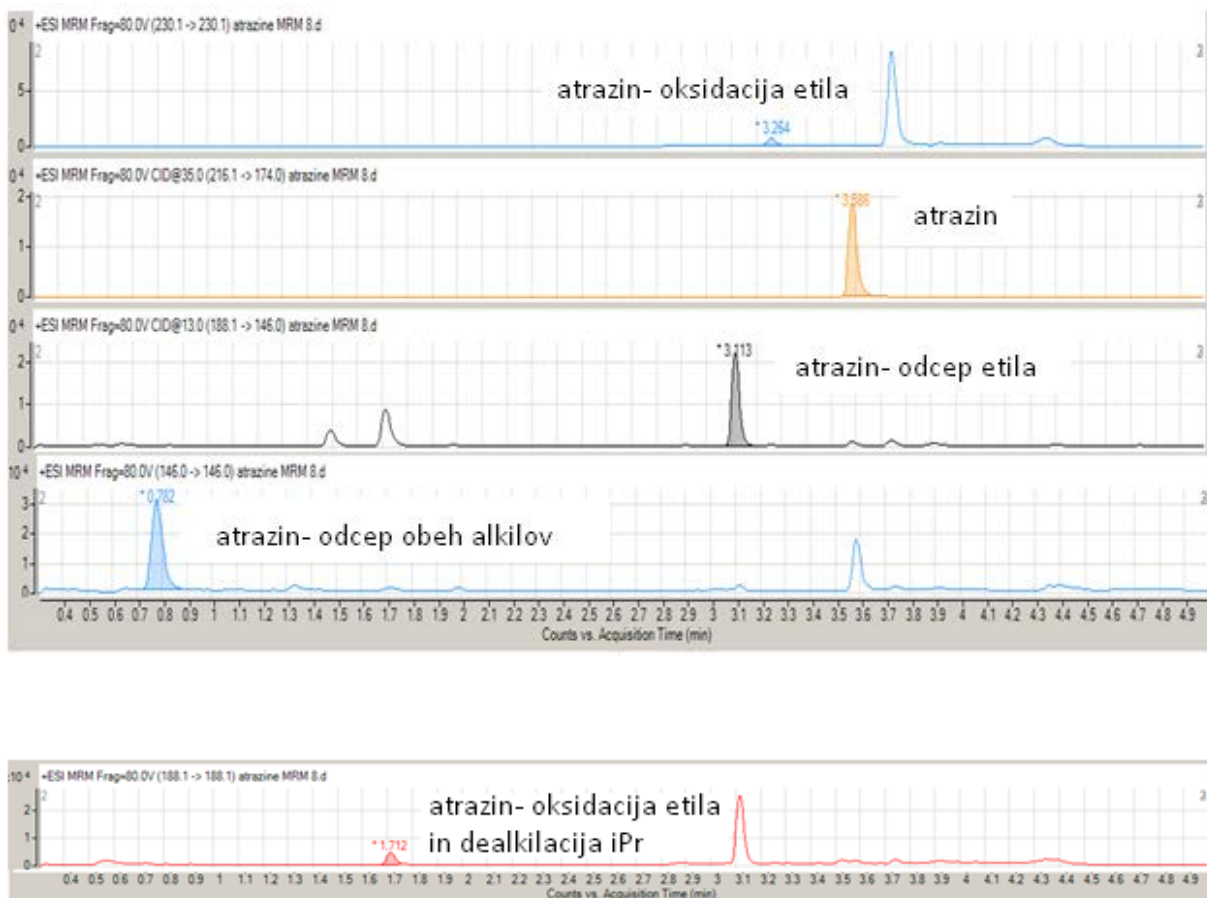
Slika 1: Kromatogram karbamazepina in njegovih produktov.

Amoksicilin



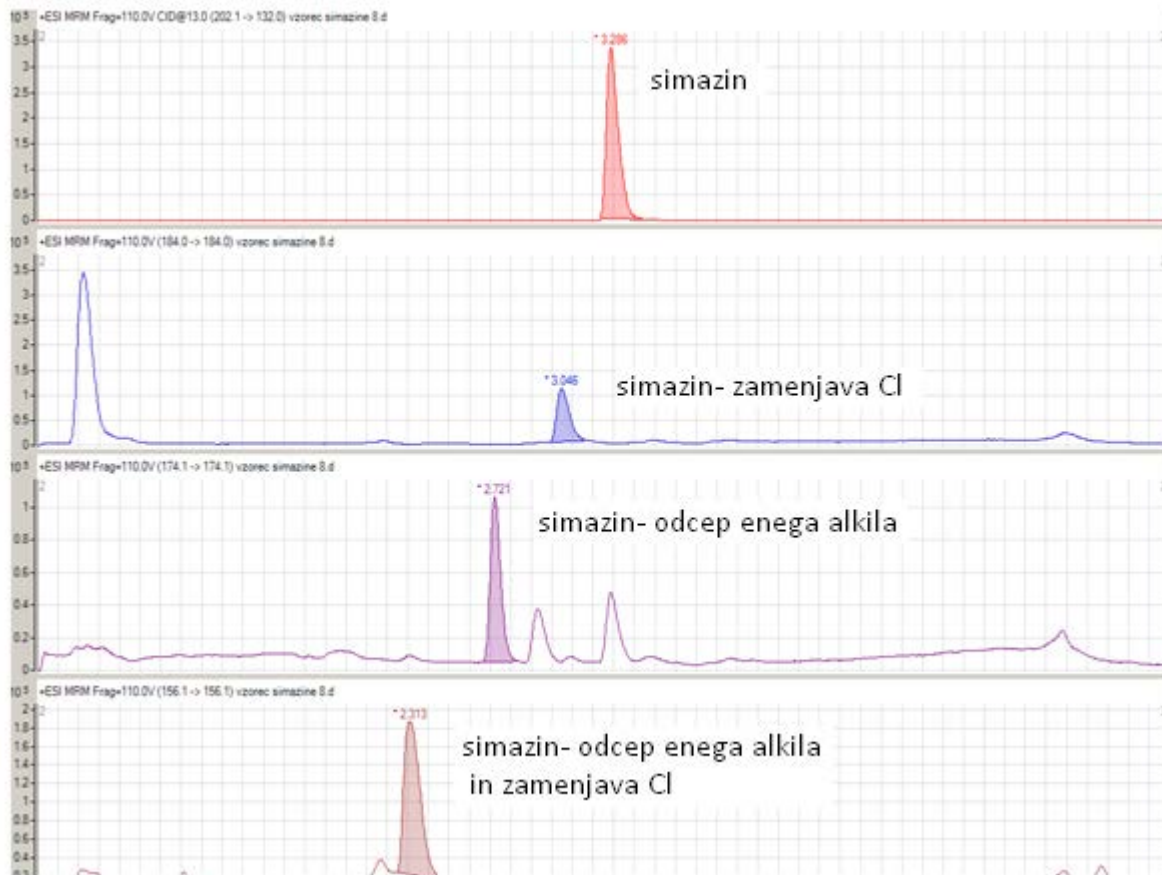
Slika 2: Kromatogram amoksicilina in njegovega razpadnega produkta

Atrazin



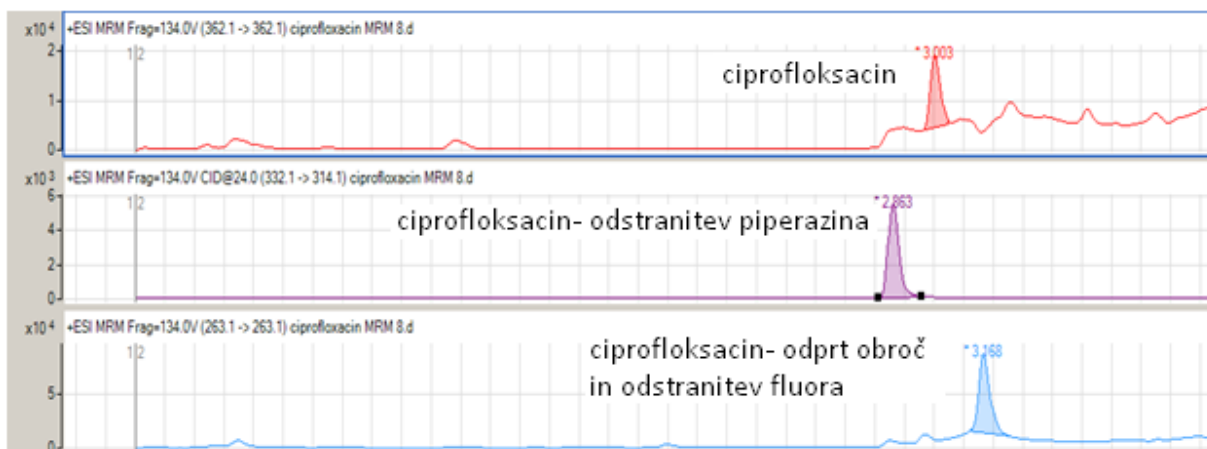
Sliki 3 in 3a: Kromatogram atrazina in njegovih razpadnih produktov

Simazin



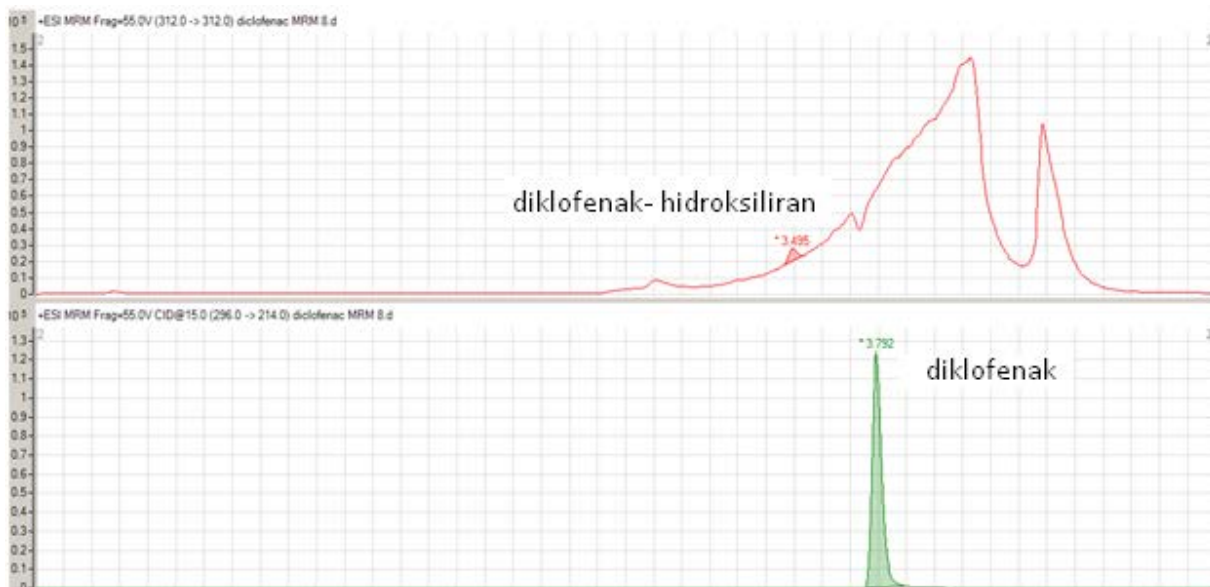
Slika 4: Kromatogram simazina in razgradnih produktov

Ciprofloksacin



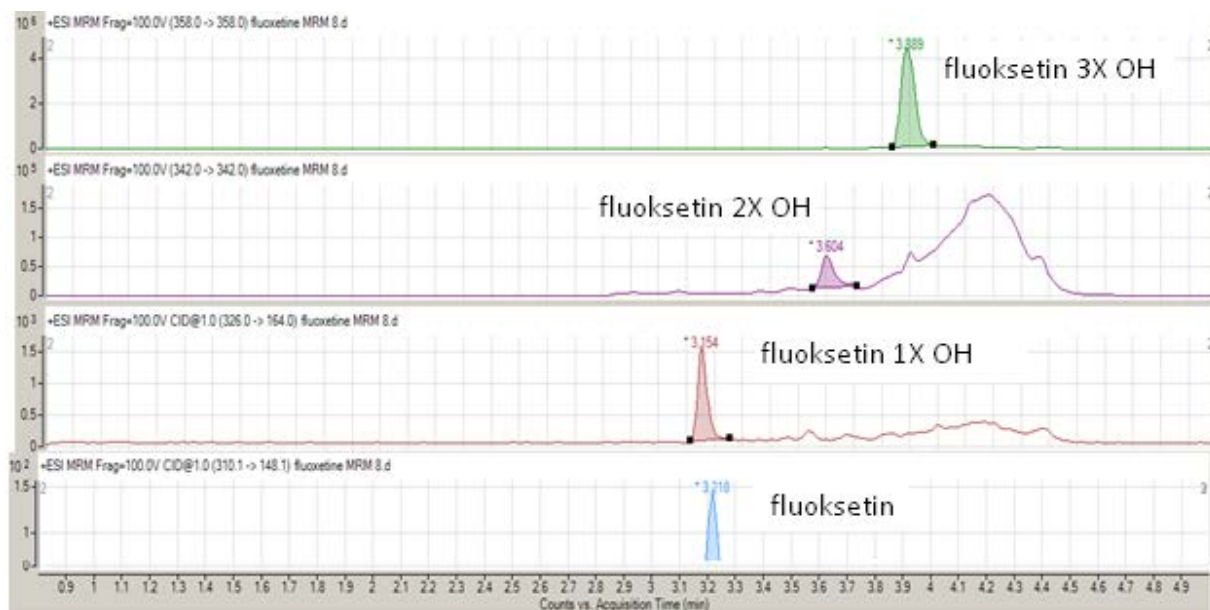
Slika 5: Kromatogram ciprofloksacina in razpadnih produktov

Diklofenak



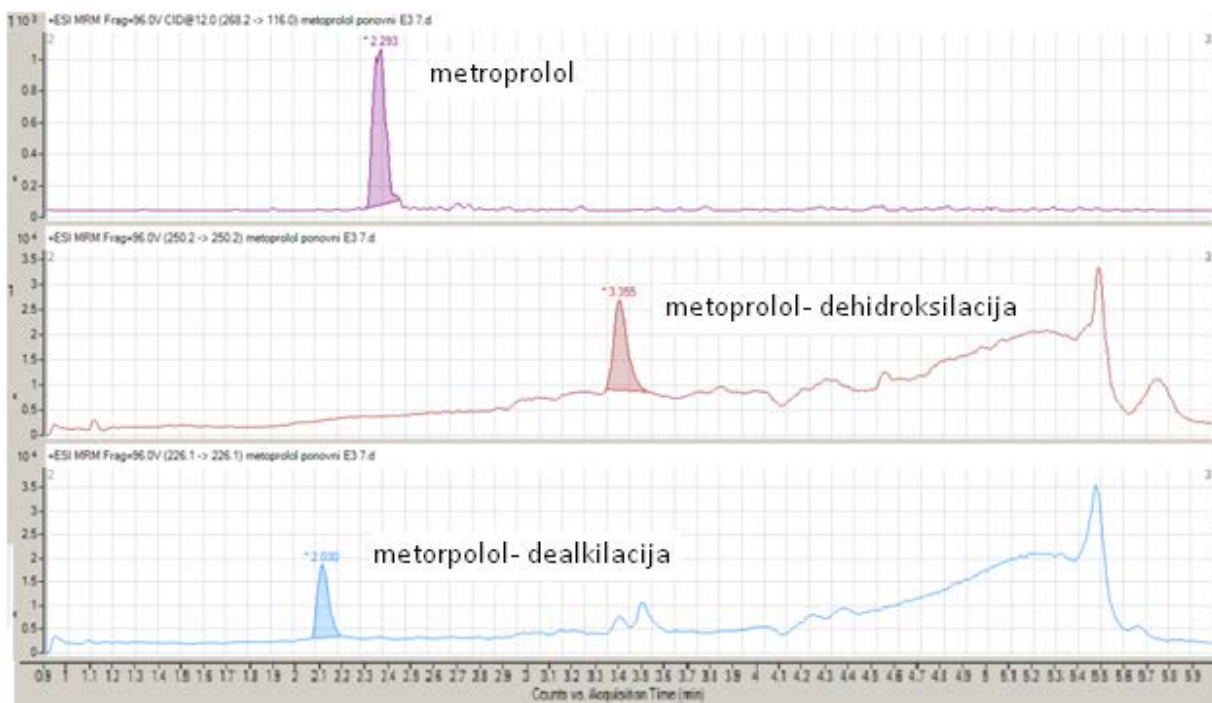
Slika 6 Kromatograma diklofenaka in razpadnega produkta

Fluoksetin



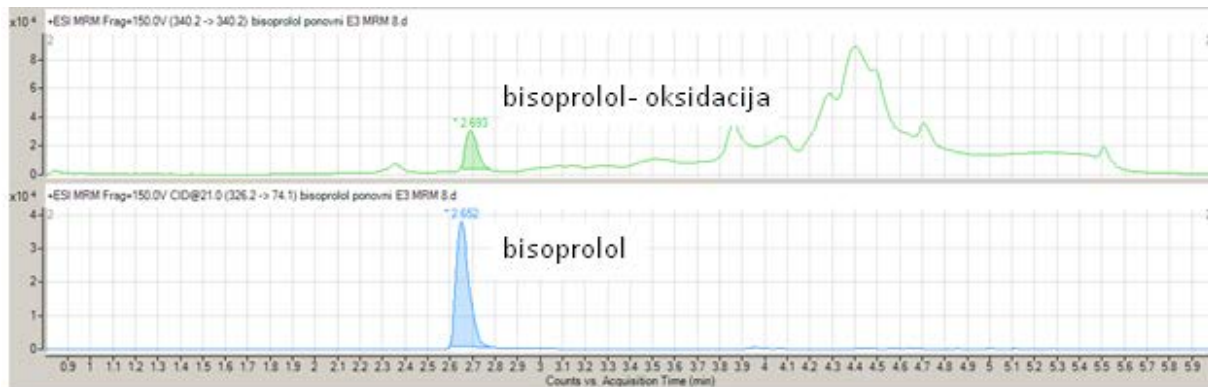
Slika 7: Kromatogram fluoksetina in razpadnih produktov

Metoprolol



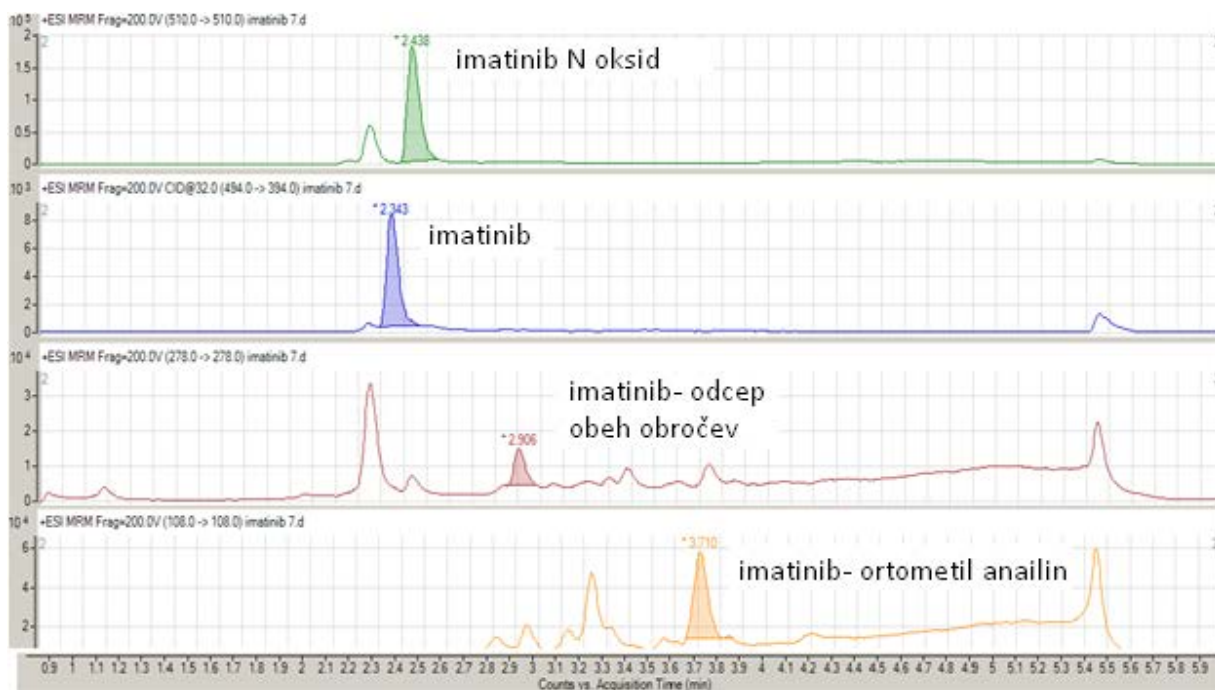
Slika 8: Kromatogram metoprolola in razpadnih produktov

Bisoprolol



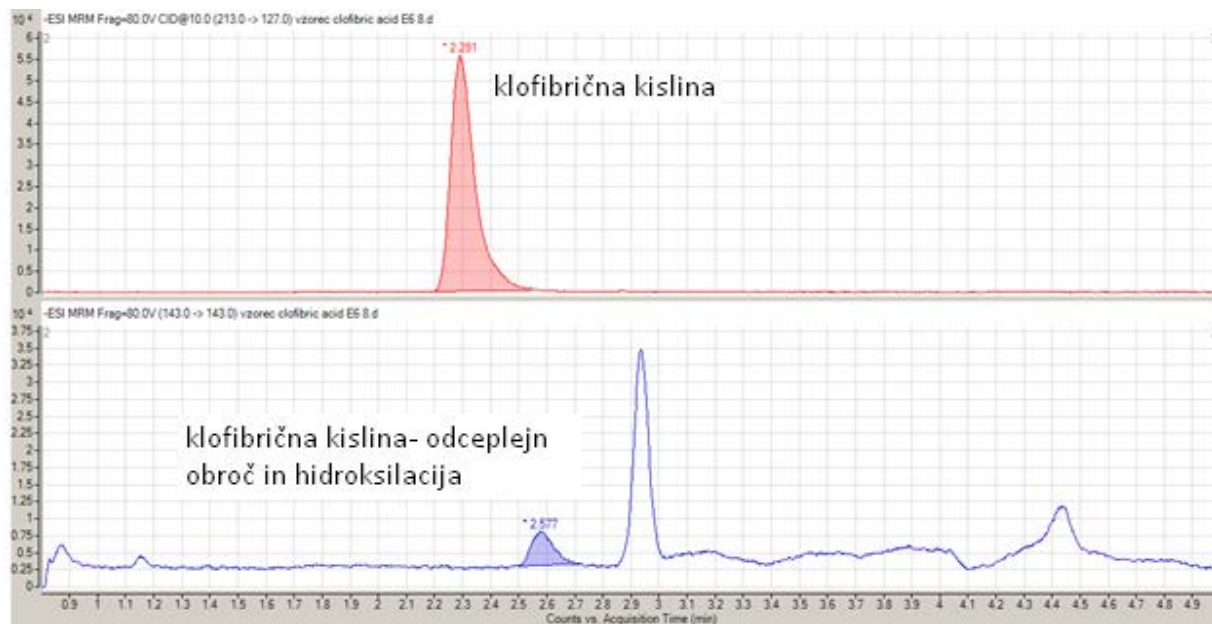
Slika 9 Kromatogram bisoprolola in njegovega razpadnega produkta

Imatinib



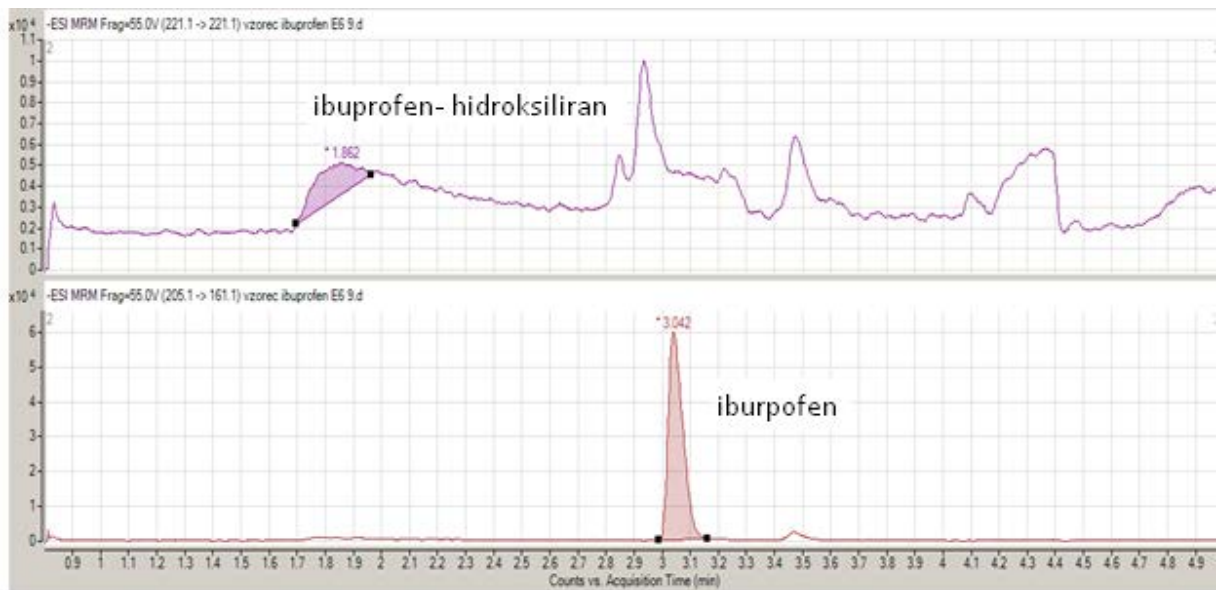
Slika 10: Kromatogram imatiniba in razpadnih produktov

Klofibrična kislina



Slika 11: Kromatogram klofibrične kisline in razpadnega produkta

Ibuprofen



Slika 12: Kromatogram ibuprofena in razpadnega produkta