

Masteroppgave i farmasi

**Utviklingen av en metode for
påvisning av selektive
serotonin reopptakshemmere
i sjøvannsprøver med stort volum**

av
Kristian L. Forsberg
Mai 2009



UNIS

The University Centre in Svalbard

Avdeling for legemiddelkjemi, Institutt for farmasi

Det medisinske fakultet

Universitetet i Tromsø

Veiledere:

Terje Vasskog, UiT

Einar Jensen, UiT

Roland Kallenborn, UNIS/NILU

Forord

Arbeidet som presenteres i denne oppgaven har blitt utført ved avdeling for legemiddelkjemi, Universitetet i Tromsø og ved avdeling for arktisk teknologi, Universitetet på Svalbard i perioden oktober 2008 til mai 2009. Arbeidet har blitt finansiert med støtte fra Svalbards Miljøvernfond og Sparebanken Nord-Norges gavefond.

Arbeidet med oppgaven har vært spennende og lærerikt, morsomt og til tider svært så frustrerende. Jeg har fått lov til å fordype meg i væskechromatografien og massespektrometriens verden – og ikke minst fått muligheten til å oppleve en vinter på Svalbard i all sin storslagenhet; oppleve mørketid, blåtid og at lyset kommer tilbake til Longyearbyen, Ny-Ålesund, Barentsburg og Pyramiden...

Gjennom mitt arbeid har jeg hatt muligheten til å få arbeide med mange svært dyktige mennesker - og mange fortjener en stor takk for den hjelpen jeg har fått!

Aller først vil jeg rette en stor takk til mine veiledere dr. Terje Vasskog, professor Einar Jensen og professor Roland Kallenborn.

Terje har tatt oppgaven som hovedveileder svært seriøst og har evnet å inspirere selv når ting har sett som mørkest ut. Takk for at du alltid har hatt anledning til å diskutere både faglige og mindre faglige temaer, for hyggelig selskap på ski- og skuterturer og konferanser og for at du har hatt tro på meg og mine evner.

Takk Einar og Roland - for innspill, inspirasjon, oppmuntring og all tilrettelegging både i Tromsø og Longyearbyen.

Så vil jeg få takke PhD-student Monika Trümper ved UNIS for all hjelp og selskap i sene ettermiddagstimer på laben og over pizzaen på puben. Takk for lånet av jerrykanne og slede!

En stor takk til deg Bente, "my partner in crime" for selskap, samtaler, middagsmat og hjelp – jeg har vel ikke vært så ille å dele bad med på brakka?

Takk til logistikkavdelinga ved UNIS, og spesielt John Inge og Kåre for hjelp med prøveinnsamling på Adventfjorden i både stummende mørke og 50 effektive kalde grader.

Så til alle gode naboer i Nybyen: Takk for laget! Det har vært hyggelig å lære dere å kjenne – håper vi sees igjen.

Til slutt vil jeg få lov til å rette en stor takk til venner og familie.

Til min kjære bestemor som dessverre gikk bort under avslutningen av oppgaven - takk for alle minner, omsorg og støtte.

Til mine foreldre for høstturer til Tromsø med hjemmelaga syltetøy i bagasjerommet, all støtte ”opp gjennom” og i løpet av studietida. Takk.

Og til sist (men ikke minst) min kjære samboer og forlovede June som passa på leiligheta og venta tålmodig under Svalbardoppholdet og i de sene kveldstimer som gikk med til labarbeid og skriving. *Du e' no best læll!*

Kristian L. Forsberg

Mai 2009

Sammendrag

Til påvisning av selektive serotonin reopptakshemmere (SSRI) i sjøvann har det tidligere blitt benyttet ulike teknikker; væske-væske mikroekstraksjon (LPME) og tradisjonell fast faseekstraksjon (SPE). Disse metodene har vært begrenset av henholdsvis prøvevolum og tidkrevende ekstraksjon. Det har derfor vært et mål å utvikle en SPE-metode som er rask og effektiv, og som samtidig ved hjelp av store prøvevolum kan senke deteksjons- og kvantifikasjonsgrensene. Polymersorbentene XAD 2 og XAD 7HP har i et tradisjonelt SPE-oppsett blitt benyttet til å ekstrahere sjøvannsprøver med volum på 10 l. Prøvene ble analysert ved hjelp av UPLC-MS/MS. Innledende tester viste at XAD 7HP ga bedre gjenvinning enn XAD 2 og at begge sorbentene hadde gode fysiske egenskaper som tillot hurtig ekstraksjon av store prøvevolum. Ved oppskalering av sorbentmengde og prøvevolum kunne imidlertid ikke gode kromatografieresultater oppnås, og det ble konkludert med at dette mest trolig ble forårsaket av forurensninger fra sorbenten. Innenfor gitte tidsrammer har det derfor ikke vært mulig å utvikle en fungerende metode, og videre utvikling vil være nødvendig. Forutsatt utvikling av en effektiv metode for rensing av sorbentmaterialet vil metoden kunne være brukbar for både sure, nøytrale og basiske forbindelser fra sjøvann.

Innhold

Forord	3
Sammendrag	4
Innhold	5
Forkortelser	6
Liste over figurer	8
Liste over tabeller	10
1. Introduksjon	11
1.2 Oppgavens hensikt	11
2. Legemidler i miljøet	12
2.1 Legemidler i miljøet – et nytt fenomen?	12
2.2 Legemidler i Nord-Europeiske og arktiske strøk	13
2.3 Legemiddelbruk i Norge i dag	14
2.3.1 Demografiske forhold og legemidler på Svalbard	15
2.4 Selektive serotoninreopptakshemmere	16
2.5 SSRI'er i et økotoksikologisk perspektiv	17
3. Ekstraksjon-, separasjon- og deteksjonsteknikk	21
3.1 Fast fase-ekstraksjon; SPE	21
3.2 High Performance Liquid Chromatography; HPLC	22
3.3 Elektrospray ionisering; ESI	23
3.4 Massespektrometri; MS	24
4. Materialer og metode	27
4.1 Kjemikalier	27
4.2 Materialer	28
4.3 Metodeutvikling	29
4.3.1 Valg av sorbent	29
4.3.2 Væskrokromatografi og massespektrometri	31
4.3.3 Prøveopparbeidelse og ekstraksjon	32
4.3.4 Steder for prøvetaking	64
5. Resultater og diskusjon	67
5.1 Metodeutviklingen	67
5.2 Prøver fra Ny-Ålesund og Adventfjorden	71
6. Konklusjon	78
Referanser	79
Appendiks	81
Appendiks 1: MS-paramtere	81
Appendiks 2: Kromatogrammer fra full scan etter Na ⁺ -addukter	82

Forkortelser

5-HT	5-Hydroksytryptamin; serotonin
5-HT _{1A}	5-Hydroksytryptamin 1A reseptortype
5-HT _{1B}	5-Hydroksytryptamin 1B reseptortype
AC	Alternating current; Vekselstrøm
AIP	Apotekenes innkjøpspris
ATC	Anatomisk terapeutisk kjemisk klassifisering
AUP	Apotekenes utsalgspris
CE	Collision energy
CV	Cone voltage; Spenning på kon
DC	Direct current; Likestrøm
DDD	Definert døgndose
EI	Electro ionization; Elektroionisering
ESI	Electrospray ionization; Elektrosprayionisering
GMP	Good Manufacturing Practice
HPLC	High performance liquid chromatography; Væskekromatografi
IS	Intern standard
KISP	Kiel in situ pump
LC ₅₀	Lethal concentration 50%
LOEC	Lowest observable effects concentration
LOD	Limit of detection; Deteksjonsgrense
LOQ	Limit of quantification; Kvantifikasjonsgrense
LPME	Liquid phase micro extraction; Væske-væske mikroekstraksjon
LYB	Longyearbyen, Svalbard
MeOH	Metanol
MeCN	Acetonitril
MRM	Multiple reaction monitoring
MS	Massespektrometri
<i>m/z</i>	Mass-to-charge ratio; Masse over ladning-ratio.
NaOH	Natriumhydroksid
NOEC	No observable effect concentration
PAH	Polynukleære aromatiske hydrokarboner
PE	Polyetylen

POP	Persistent organic pollutants
PTFE	Polytetrafluoroetylen; Teflon
SPE	Solid phase extraction; Fast fase-ekstraksjon
SSRI	Selektive serotonin reopptakshemmere (reuptake inhibitors)
TCA	Tricyclic antidepressants; Trisykliske antidepressiva
UNIS	University Centre in Svalbard; Universitetet på Svalbard
UV	Ultrafiolett spektroskopi
QQQ	Trippelkvadrupol massespektrometri

Liste over figurer

Figur 1 - Transportveier for legemidler til miljøet (Inspirert av Vasskog 2008)	12
Figur 2 - Salg av SSRI'er i Norge omregnet til DDD/1000 innbyggere/dag i perioden 2004 - 2008. Verdi for DDD oppgitt i tegnforklaring [9].	15
Figur 3 - Forenklet skisse av serotonerg transmisjon i synapse og SSRI'ers virkested.	17
Figur 4 - Oppsett for SPE-ekstraksjon (Inspirert av Vasskog 2008)	21
Figur 5 - Forenklet skisse av elektroprayoniseringskilde (Inspirert av Vasskog 2008)	23
Figur 6 – ESI-kilde på Waters Quattro Premier XE massespektrometer	24
Figur 7 – Skjematisk tegning av trippelkvadrupol (QqQ) med motsatte par i ulik farge.	25
Figur 8 – Skjematisk tegning av ESI ionekilde og MS/MS deteksjon med trippelkvadrupol (Inspirert av Vasskog 2008)	26
Figur 9 - Struktur, molekylvekt og pKa-verdi for kjemiske standarder. * angir posisjoner for isotopmerking.	28
Figur 10 - XAD7HP, kjemisk struktur. R-gruppen er ikke oppgitt av produsent [33].	30
Figur 11 – Kromatogram av standardløsning med konsentrasjon på 50 ng/ml.	33
Figur 12 – Trinn 1, 0,5 g XAD2. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	34
Figur 13 - Trinn 1, 0,5 g XAD7. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	35
Figur 14 - Analyse av prøver etter metode i Trinn 2. Basisk prøve, 0,5 g XAD2. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	36
Figur 15 – Trinn 2, kolonne har blitt vasket med vann før eluering. Basisk prøve, 0,5 g XAD2. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	37
Figur 16 – Trinn 2, kolonne har blitt vasket med vann før eluering. Basisk prøve, 0,5 g XAD7. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	38
Figur 17 – Trinn 3, mengde sorbent (XAD2) økt til 2,5 g. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	39
Figur 18 - Trinn 3, mengde sorbent (XAD7) økt til 2,5 g. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	40
Figur 19 – Trinn 4, forsøk med ammoniakk som base. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.	41
Figur 20 - Samme prøve som i Figur 18 (Trinn 3, 2,5 g XAD7), men analysert ved hjelp av UPLC og Quattro Premier XE-detektor. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l. Merk responsforskjellen mellom de to LC-MS/MS-oppsettene.	43
Figur 21 – Trinn 5, prøve med stort volum ekstrahert med 2 g XAD7. Ferskvannsprøve på 9 l tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/9L.	44
Figur 22 - Samme prøve som i Figur 21 (Trinn 5), men analysert med MRM-metode uten tidsvinduer. NB: Rekkefølgen på de ulike kanalene er endret.	45
Figur 23 – Trinn 5, prøve med stort volum ekstrahert med 2 g XAD7. Sjøvannsprøve på 9 l (hvorav 7 L ble ekstrahert) tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/9L. NB: Rekkefølgen på de ulike kanalene er endret.	46
Figur 24 - Trinn 6, oppskalering av mengde sorbent (XAD7) til 4,5 g. Sjøvannsprøve på 10 l tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende sluttkonsentrasjon på 50 ng/10L. Elueringsfraksjon 1 av 3.	49
Figur 25 – Trinn 7, introduksjon av MeCN-faseskille ved frysing. Prøve opparbeidet etter metode i Trinn 7 og ekstrahert med 4,5 g XAD7. Sjøvannsprøve på 10 l tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende sluttkonsentrasjon på 50 ng/10L.	50

Figur 26 – Trinn 7, samme prøve som i Figur 25 etter tilsetning av 2 dråper maursyre og introduksjon av sentrifugering. Prøven ble sentrifugert ved 4500 rpm i 5 min og supernatant analysert.	51
Figur 27 – Eksempel på dårlig kromatografi for parallell av prøve vist i Figur 26 (Trinn 7 med maursyretilsetning og sentrifugering).	52
Figur 28 - Samme prøve som i Figur 27 (Trinn 7 med maursyretilsetning og sentrifugering) etter om lag 4 timers henstand. Merk bedringen av kromatografiresultatene.	53
Figur 29 - Trinn 8, introduksjon av sur mobilfase. Samme prøve som i Figur 27 og Figur 28. Toppform og retensjonstid er vesentlig forbedret.	54
Figur 30 – Trinn 9, introduksjon av 60 ml kolonne og 25 g sorbent (XAD7). 10 l sjøvann uten base ekstrahert. Prøvene ble tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende sluttkonsentrasjon på 50 ng/10 l.	57
Figur 31 - SPE-oppsett med 60 ml kolonner på vakuumanifold. Prøver på 10 l PE-kanner i bakgrunnen.	61
Figur 32 - Trinn 16, forsøk med ytterligere vask av sorbent før ekstraksjon. 10 l sjøvannsprøve tilsatt forbindelser tilsvarende sluttkonsentrasjon på 100 ng/10 l.	62
Figur 33 - Trinn 16. Samme prøve som i Figur 32, men med MeCN faseskilleseparasjon og påfølgende basisk væske-væske-ekstraksjon (Trinn 16 metode).	63
Figur 34 - Pumpe for prøvetaking. Håndpumpe (membrantype) med kapasitet på 0,5 l/slag og 10 m 1" vinylslange med lengdemerking. Slangen er påmontert blylodd.	64
Figur 35 - Prøvetaking på sjøis på Adventfjorden, 25/03-2009	65
Figur 36 - Prøvetaking på sjøis ved Ny-Ålesund, 11/03-2009	65
Figur 37 - Oversiktskart over Midt-Spitsbergen (Kart: Direktoratet for naturforvaltning)	66
Figur 38 - Lokalteter for prøveinnsamling i Longyearbyen. (Blå stiplet linje viser eksisterende avløpsvannledning.) X: Utslipp for avløpsvann, 60 meter under overflaten. 1: Prøveinnsamling 25/3-09 (Kart: Direktoratet for naturforvaltning)	66
Figur 39 - Lokalteter for prøveinnsamling i Ny-Ålesund. X: Utslipp for avløpsvann fra marinlab. Y: Utslipp for avløpsvann fra Ny-Ålesund. 1: Prøveinnsamling 11/03-09 (Kart: Direktoratet for naturforvaltning)	66
Figur 40 - Prøve fra Ny-Ålesund, 11/03-2009 (parallell 1). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.	72
Figur 41 - Prøve fra Ny-Ålesund, 11/03-2009 (parallell 2). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.	73
Figur 42 - Prøve fra Ny-Ålesund, 11/03-2009 (parallell 3). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.	74
Figur 43 - Prøve fra Adventfjorden, 23/03-2009 (parallell 1). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.	75
Figur 44 - Prøve fra Adventfjorden, 23/03-2009 (parallell 2). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.	76
Figur 45 - Prøve fra Adventfjorden, 23/03-2009 (parallell 3). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.	77
Figur 46 – Full scan av citalopram: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	82
Figur 47 - Full scan av citalopram d6: Mulig tegn til Na ⁺ -addukter ved ~36,4 minutter.	83
Figur 48 - Full scan av desmetylcitalopram: Mulig tegn til Na ⁺ -addukter ved ~24,1 minutter.	84
Figur 49 - Full scan av didesmetylcitalopram: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter. Merk sammenfallende m/z for didesmetylcitalopram og fluvoksamin (Figur 53).	85
Figur 50 - Full scan av fluoksetin: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	86
Figur 51 - Full scan av fluoksetin d5: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	87
Figur 52 - Full scan av norfluoksetin: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	88

Figur 53 - Full scan av fluvoksamin: Mulig tegn til Na ⁺ -addukter ved ~20,4 minutter. Merk sammenfallende <i>m/z</i> for fluvoksamin og didesmetylcitalopram (Figur 49).	89
Figur 54 - Full scan av paroksetin: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	90
Figur 55 - Full scan av paroksetin d4: Mulig tegn til Na ⁺ -addukter ved ~24,1 minutter.	91
Figur 56 - Full scan av sertralin: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	92
Figur 57 - Full scan av sertralin d3: ingen tydelige tegn til Na ⁺ -addukter.	93

Liste over tabeller

Tabell 1 - Antall brukere av SSRI'er (N06A B) i Norge i alle aldre. [12]	15
Tabell 2 - Salg av legemidler i ATC-gruppe N06A B ved Spitsbergen apotek i perioden 01/09-2008 til 01/03-2009 [16].	16
Tabell 3 - Elueringsgradient på Nano Acquity ultraperformance LC (sur mobilfase).	31
Tabell 4 - Monoisotopisk masse, molekyl- og produktion, samt cone voltage (CV) og collision energy (CE) for forbindelsene	32
Tabell 5 - Mengde base (5M NaOH-løsning) tilsatt i hvert trinn i Trinn 10 . *Første måling utført etter en natts henstand.	55
Tabell 6 - Mengde av de ulike IS'er som tilsettes prøver i endelig metode	56
Tabell 7 - Endelig metode oppsummert.	60
Tabell 8 - Lokalteter og tidspunkt for prøveinnsamling	64

1. Introduksjon

Legemidler er i følge legemiddelovens §2 definert som: *”Med legemidler forstås i denne lov stoffer, droger og preparater som er bestemt til eller utgis for å brukes til å forebygge, lege eller lindre sykdom, sykdomssymptomer eller smerter, påvirke fysiologiske funksjoner hos mennesker eller dyr, eller til ved innvortes eller utvortes bruk å påvise sykdom”* [1]. De er utviklet for å kunne ha en virkning hos høyerestående organismer, og kan således påvirke for eksempel marint liv ved lave konsentrasjoner.

Legemidler som gis i behandlingsøyemed til mennesker og dyr ender i stor grad opp i havet enten som opprinnelig virkestoff eller som metabolitter, ofte med virkning lik virkestoffets. Det er derfor viktig å kartlegge hvilke legemidler som slippes ut, hvor mye som slippes ut og hvilke effekter det kan ha på miljøet.

1.2 Oppgavens hensikt

Oppgavens hensikt er å utvikle en metode for å ekstrahere og kvantifisere serotonin reopptakshemmere (SSRI) fra sjøvannsprøver med store volum. Væske-væske mikroekstraksjon (LPME) og fast-fase ekstraksjon (SPE) har tidligere blitt brukt for å påvise SSRI'ers tilstedeværelse i miljøet [2, 3], men mens LPME har vært begrenset av små prøvevolum, har ekstraksjon ved hjelp av tradisjonelle SPE-sorbenter vært en svært tidkrevende prosess. Ved bruk av polymersorbenter i et tradisjonelt SPE-oppsett er målet å kunne utvikle en metode som raskt og effektivt kan ekstrahere sjøvannsprøver med store volum, samt senke deteksjonsgrensen (LOD) ytterligere sammenlignet med LPME.

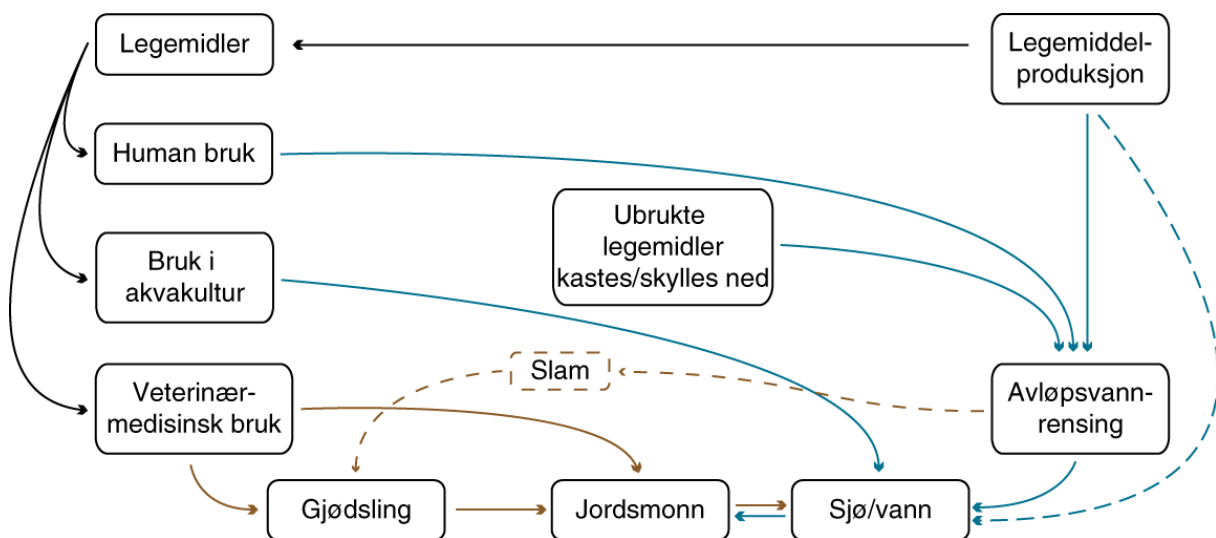
Sammenlignet med tempererte strøk, vil man i arktiske strøk ha en situasjon hvor fotolytisk og mikrobiell nedbrytning av legemidler kan være begrenset av lave temperaturer og mørketid. Derfor er metodeutvikling og prøveinnsamling hovedsaklig utført i Longyearbyen (LYB) og Ny-Ålesund på Svalbard.

2. Legemidler i miljøet

2.1 Legemidler i miljøet – et nytt fenomen?

Legemidler i miljøet som forskningsområde fikk først fokus på 1970-tallet da Tabak et al. fant hormoner i avløpsvann. Sett bort fra noen få undersøkelser i løpet av 1980-tallet var det liten interesse for problematikken, og det var først på midten av 1990-tallet at problemet skulle få nytt fokus [4]. I dag er legemidler i miljøet blitt gjenstand for allmenn bekymring og det forskes i utstrakt grad for å kunne si noe om hvilken effekt dette har på miljøet.

Figur 1 viser ulike transportveier for legemidler fra bruk til miljø. Ved behandling av mennesker og dyr vil legemidler skilles ut – enten i form av ikke metabolisert virkestoff, eller i form av mer eller mindre aktive eller toksiske metabolitter. Disse transporteres så via avløp til rensesanlegg og deretter til miljø i form av rensert vann og slam som deponeres eller benyttes til gjødsling. I veterinærmedisinsk sammenheng kan legemidler ende opp i miljøet via gjødsling eller ekskrementer, og i fiskeoppdrett har man tradisjonelt brukt legemidler som fortilsetning. Undersøkelser viser også at så mye som en tredjedel av legemidler solgt i Tyskland finner veien til miljøet fordi de ubrukt blir skylt ned, eller kastet i husholdningsavfall [4]. I de senere år har produksjon av legemidler og virkestoff vist seg å være en utslippskilde. Krav til ”Good Manufacturing Practice” (GMP) gjør at utslipp av legemidler er lave i Europa og Nord-Amerika, men undersøkelser i senere tid har vist at man i utløp fra produksjonsanlegg i enkelte asiatiske land kan finne virkestoff i konsentrasjoner tilsvarende flere mg/L [5].



Figur 1 - Transportveier for legemidler til miljøet (Inspirert av Vasskog 2008)

I akvakulturen har vaksiner gjort at man i senere år har kunnet redusere en del av legemiddelforbruket, men for mennesker og dyr vil det være vanskeligere å redusere utslippene. Rensing av avløpsvann kan være en løsning, men her må man også skille mellom ulike rensemetoder og deres evne til å fjerne legemidler. Mest utbredt er rensenanlegg med filtrering, eventuelt i kombinasjon med biologisk nedbrytning. Disse anleggenes evne til å fjerne legemiddelrester er begrenset og man er derfor avhengig av ytterligere trinn bestående av for eksempel flokkulering, ozonbehandling eller avansert oksidasjon for å oppnå gode resultater med hensyn på legemidler. Rensing er derfor kostbart og lar seg vanskelig gjennomføre i land med spredt bosetningsmønster. I Norge er man nord for Trondheim bare pålagt å filtrere avløpsvann [6], og i Tromsø finner man følgelig bare rensenanlegg med filtrasjon. I Longyearbyen blir avløpsvann sluppet ut i Adventfjorden uten noen form for rensing.

En annen foreslått vei å gå er introduksjonen av såkalt ”green pharmacy”, det vil si legemidler utviklet for å ha minst mulig økotoksikologisk påvirkning [5]. Sverige er et foregangsland i så måte, og har gjort informasjon om legemidlers miljøpåvirkning tilgjengelig for allmennheten [7]. Hvorvidt dette faktisk vil påvirke forskrivers og pasients valg av legemiddelbehandling, og således være et insentiv for produsenter til å produsere ”miljøvennlige legemidler” er usikkert.

Utslipp av legemidler i miljøet vil kanskje på lang sikt også påvirke oss mennesker. Det er påvist legemidler i grunn- og drikkevann, og i en fremtid hvor etterspørselen etter rent vann utvilsomt vil øke, kan dette utgjøre en stor risiko for menneskers helse [8].

2.2 Legemidler i Nord-Europeiske og arktiske strøk

Man vet at ”Persistent organic pollutants” (POP) og polynukleære aromatiske hydrokarboner (PAH) sin levetid i miljøet er avhengig av de omgivende miljøforhold som temperatur, strålingsforhold, mikrobiologiske forhold og geologi. Det er vist at forurensende kjemiske substanser kan ha en forlenget levetid ved lavere temperatur i omgivelsene lik de man har i nordlige miljøer. Denne antagelsen kan også brukes for legemidler, og i de senere år har man sett et økende fokus på i hvilken grad legemidler og andre forurensende kjemikalier kan akkumulere i nordområdene – og hvilke konsekvenser dette kan ha for miljøet.

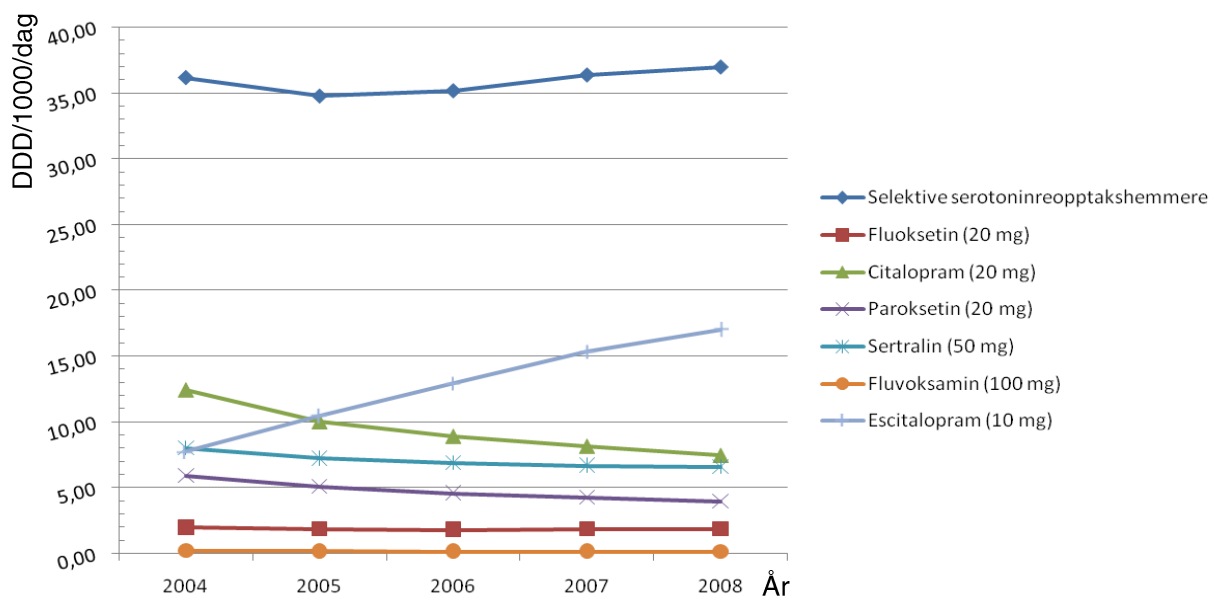
Flere særegne demografiske-, miljø- og klimaforhold gjør at man kan forvente både akkumulasjon og forlenget levetid for kjemiske substanser i nordområdene:

- Lave temperaturer; både årlig gjennomsnitt og maksimumstemperatur om sommeren er lavere enn i mer tempererte områder, og dette vil kunne ha innvirkning på både mikrobiologiske og kjemiske nedbrytningsprosesser.
- Sesongvariasjonene i lys; Lange perioder med mørketid samt endret intensitet og spektrum av strålingen vil kunne ha innvirkning på fotokjemisk nedbrytning. Mørketiden i Tromsø varer fra 25. november til 19. januar, men perioden uten UV-lys tilstrekkelig for nedbrytning strekker seg fra oktober til mars. Dette fører til en markert reduksjon i nedbrytningen av kjemiske substanser [9].
- De demografiske forholdene er annerledes i Skandinavia og de nordlige områdene i forhold til det man finner i sentrale Europa, med mange små, spredte bebyggelser og få større byer og sentre. Kostnadene med avansert rensing av avløpsvann er så store at det ikke er kostnadmessig gjennomførbart for små samfunn. Mangelen på moderne avløpsrensing vil man anta resulterer i betydelige utslipp av legemidler til miljøet [9].

2.3 Legemiddelbruk i Norge i dag

Salg av legemidler fra grossist til sykehus, apotek og dagligvare beløp seg i 2008 til 11,5 milliarder kroner (Apotekenes innkjøpspris; AIP) i Norge. Dette tilsvarer i utsalgspris fra apotek (Apotekenes utsalgspris; AUP) en omsetning på 17,6 milliarder kroner, eller om lag 3700 kroner pr innbygger [10]. Disse tallene forteller imidlertid kun om salg, og ikke bruk. En oversikt over legemiddelbruken på verdensbasis eksisterer ikke, og bruken varierer fra land til land, avhengig av tilgang, kjøpekraft i befolkningen og gjeldende behandlingsprinsipper [11]. I 2008 var samlet salg av antidepressiva i Norge 55,2 DDD/1000 innbyggere/døgn (daglig definert døgndose; DDD). Av dette utgjorde gruppen SSRI'er 36,97 DDD/1000 innbyggere/døgn. Salget av escitalopram (Cipralox®), S-enantiomeren av citalopram, utgjorde 31% av totalforbuket av antidepressiva i 2008 målt i doser. Grunnlaget for disse tallene er imidlertid basert på salg fra grossist til apotek og sykehus, og alle legemidler som blir solgt blir ikke nødvendigvis brukt [10].

DDD er definert som den antatt gjennomsnittlige døgndose brukt ved preparatets hovedindikasjon hos voksne. Døgndosen fastsettes med bakgrunn i bruken internasjonalt, selv om terapianbefalinger kan variere fra land til land og fra indikasjon til indikasjon. Definert døgndose bør derfor betraktes som en teknisk verdi [10].



Figur 2 - Salg av SSRI'er i Norge omregnet til DDD/1000 innbyggere/dag i perioden 2004 - 2008. Verdi for DDD oppgitt i tegnforklaring [9].

Tabell 1 - Antall brukere av SSRI'er (N06A B) i Norge i alle aldre. [12]

År	Brukere/1000 innbyggere		
	Begge Kjønn	Kvinne	Mann
2004	37,74	50,34	24,93
2005	36,27	48,23	24,13
2006	36,31	48,25	24,21
2007	37,13	49,51	24,62
2008	37,05	49,28	24,75

2.3.1 Demografiske forhold og legemidler på Svalbard

Å få en fullgod oversikt over antall personer som til enhver tid befinner seg på Svalbard er vanskelig. Ved utgangen av 2008 var folketallet på Svalbard 2510 personer. Av disse var 2077 personer registrert i befolkningsregisteret for Svalbard. Innbyggertallet i Longyearbyen (LYB) var 2025 personer, i Ny-Ålesund 36 personer, og om lag 430 personer i den russiske bosetningen i Barentsburg. I tillegg kommer om lag 220 personer som har sitt virke i Sveagruba og som pendler til LYB eller fastlandet [13]. I tillegg til dette kommer studenter, forskere og turister. I 2007 kom det 31 000 turister til LYB, i tillegg til 33 000 turister som besøkte øygruppa med 30 oversjøiske cruiseskip [14].

LYB er ikke tilrettelagt som et livsløpssamfunn, og Helse- og Sosiallovgivningen er ikke gjort gjeldende på Svalbard. Det betyr at de bosattes respektive hjemkommune på fastlandet er

ansvarlig for ytelser innenfor sosial- og helsesektoren og ved behov for pleie- og omsorgstjenester [15]. Som pensjonist eller kronisk syk med behov for behandling kan man ikke bo på Svalbard. Dette fører naturlig nok til skjevheter i befolkningsgrunnet som vanskeliggjør en eventuell ekstrapolering av legemiddelbruksmønstre fra fastlandet til Svalbard. Enkelte vil også kanskje hevde at LYB er et ”autoselektivt samfunn”, hvor man vil finne en mindre andel syke individer enn i en normalpopulasjon.

Frem til høsten 2008 var det ikke apotek i LYB. Legemiddelbehovet ble dekket av apotek i Tromsø gjennom et legemiddelutvalg lik de vi finner på fastlands-Norge. Dette har gjort det vanskelig å fremskaffe statistikk over salg og bruk av legemidler i LYB [2].

Tabell 2 viser salgsstatistikken fra Spitsbergen apotek for SSRI'er i apotekets første driftshalvår [16]. Dette gir imidlertid ikke en fullgod oversikt over bruken av SSRI'er da pendlende innbyggere kan få sine legemidler fra apotek på fastlandet, og turister, studenter og forskere bringer med legemidler. Det er altså vanskelig å fastslå hvor stort forbruket som kan forventes å nå sjø via avløp faktisk er. Det er også funnet forskjeller i typer av SSRI'er, og mengder funnet i og utenfor turistsesong [2].

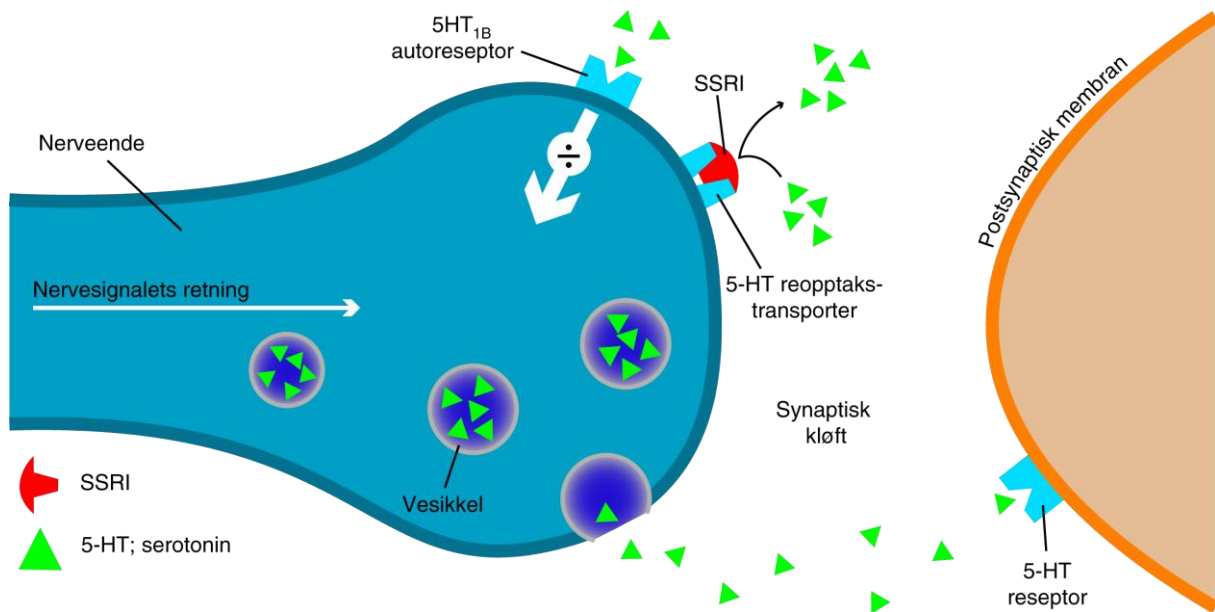
Tabell 2 - Salg av legemidler i ATC-gruppe N06A B ved Spitsbergen apotek i perioden 01/09-2008 til 01/03-2009 [16].

ATC	ATC nivå navn (DDD verdi)	DDD solgt
N06A B04	Citalopram (20 mg)	100
N06A B08	Fluvoksamin (100 mg)	270
N06B B10	Escitalopram (10 mg)	882

2.4 Selektive serotoninreopptakshemmere

Selektive serotoninreopptakshemmere omtales ofte som andregenerasjons, nyere, antidepressiva. Sammen med trisykliske antidepressiva (TCA) og ”atypiske antidepressiva” utgjør SSRI de legemidlene man har til rådighet ved behandling av depresjoner [17, 18]. Sammenlignet med TCA er SSRI'er som navnet antyder selektive for reopptak av serotonin, mens TCA har en mer uselektiv hemming av opptak av monoaminer, i tillegg til å ha hemmende effekt på muskarine-, α -adrenerge- og histaminerge reseptorer. Dette antas å være årsaken til at SSRI'er har en mildere bivirkningsprofil, mindre interaksjonspotensiale og er forbundet med mindre toksisitet ved overdosering [19]. Dette gjør at SSRI'er i stor grad er foretrukket ved behandling av depresjoner, og blir brukt i 2 av 3 tilfeller [17]. Det finnes i dag 6 ulike SSRI på det norske markedet: Citalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin,

zsertralin og escitalopram (S-enantiomer av citalopram), og har indikasjon ikke bare ved depresjoner, men også ved ulike angst- og tvangslidelser, spiseforstyrrelser og personlighetsforstyrrelser [17].



Figur 3 - Forenklet skisse av serotonerg transmisjon i synapse og SSRI'ers virkested.

Den biokjemiske teorien bak depresjon er monoaminteorien, som fremsetter at depresjon kommer som et resultat av mangel på monoaminer (og serotonin spesielt) i transmisjonen av impulser i sentralnervesystemet [19]. Som man kan se i Figur 3, blokkerer SSRI'er reopptak av serotonin fra den synaptiske kløften og øker derfor mengden serotonin som kan interagere med serotonin-reseptorer i postsynaptisk membran. Hemming av reopptak serotonin vil initsielt også hemme frisetting av serotonin fra presynaptisk nerveende via serotonin autoreseptorer, men disse reseptorene vil ved kronisk behandling desensitiviseres og frisettingen vil normaliseres [18]. Det er likevel flere svakheter ved monoaminteorien, og verken depresjonens patofysiologi eller antidepressivas virkningsmekanisme er fullt ut forstått [18, 19].

2.5 SSRI'er i et økotoksikologisk perspektiv

Denne oppgaven har ikke som mål å være uttømmende i forhold til den litteratur som omhandler SSRI'er i et økotoksikologisk perspektiv. Det vil likevel bli brukt litt tid på å gjennomgå noe av det som har vært publisert de siste årene, da SSRI'er og i særstilling fluoksetin har vært gjenstand for en god del oppmerksomhet. I 2003 kunne Perreault et al. vise at leppefisk (*Thalassoma bifasciatum* – bluehead wrasse) behandlet med fluoksetin viste

mindre aggressiv adferd enn kontroller som ikke fikk fluoksetin. Hannfisk som ble behandlet med intraperitoneale fluoksetin-injeksjoner tilsvarende 6 µg/g kroppsvekt over 2 uker fremviste færre aggressive forfølgelser av introduserte inntrengere enn kontroller injisert med saltvann. Fisk som fikk slik kronisk behandling fremviste også et lavere aktivitetsnivå enn sine kontroller. Perreault et al. viste i en tilsvarende feltstudie at hannfisker som fikk engangsinjeksjon med fluoksetin tilsvarende 10 µg/g kroppsvekt før de ble introdusert for en inntrenger, fremviste en signifikant lavere tendens til å starte aggressive forfølgelser enn kontrollfisk injisert med saltvann [20].

I 2008 viste Beulig og Fowler i et aktivt, toveis, shuttle-boksoppsett at gullfisk (art ikke spesifisert) som fikk kronisk behandling med fluoksetin, fremviste en signifikant lavere evne til å unngå elektriske støt enn fisk behandlet med en 5-HT_{1A} reseptor antagonist. Fisk som fikk kronisk behandling med fluoksetin viste imidlertid bare en noe lavere, ikke signifikant, evne til å unngå støt enn kontrollfisk som fikk verken fluoksetin eller 5-HT_{1A} reseptor antagonist [21].

Samme år publiserte Gaworecki og Klaine resultatene av et forsøk hvor de utsatte hybrid abbor (*Morone saxatilis* x *M. chrysops*) for ikke-dødelige doser fluoksetin over 6 dager. Ut i fra kunnskapen om at endrede serotonin-nivåer kan påvirke en rekke atferdmønstre, ville de undersøke hvordan økt serotonin-nivå påvirket evnen til å jakte byttedyr. Abboren ble utsatt for fluoksetin-holdig vann på henholdsvis 0,0 µg/L, 23,2±6,6, 51,4±10,9 og 100,9±18,6 µg/L i 6 dager, fulgt av 6 dagers recoveryperiode i rent vann. Serotonin-nivå og abbores evne til å jakte byttedyr ble målt hver tredje dag. Abbor utsatt for fluoksetin-holdig vann viste en redusert evne til å jakte byttedyr, og graden av reduksjon korrelerte både med konsentrasjon i vann og tiden fisken var utsatt for fluoksetin. I løpet av recoveryperioden på 6 dager hadde ikke serotonin-nivået normalisert seg i forhold til kontrollene [22].

I 2009 undersøkte Winder et al. akutt mortalitet og ikke-dødelige fysiologiske effekter hos ørekyte (*Cyprinodon variegatus*) i fluoksetin-holdig sjøvann. I sjøvann med konsentrasjoner av fluoksetin tilsvarende det som man i litteraturen har funnet rapportert, kunne man ikke påvise signifikant økt mortalitet. LC₅₀ for fluoksetin i løpet av 96 timer ble bestemt til å være >2.000 mg/L. "Lowest observable effects concentration"; LOEC i løpet av 96 timer ble bestemt til å være 2.000 mg/L, mens "no observable effects concentration"; NOEC ble funnet å være 1,250 mg/L (96 timer). Det ble også studert hvilken innvirkning ikke-dødelige doser av fluoksetin hadde på ørekyten i løpet av 72 timer. Det ble funnet signifikante endringer i

forholdene mellom neurotransmitorer ved konsentrasjoner om lag en størrelsesorden større enn de som i litteraturen er rapportert funnet [23].

I 1998 oppdaget Fong at fluvoksamin, fluoksetin og paroksetin kunne stimulere gyting hos sebramusling. Paroksetin ble funnet å være det legemidlet som stimulerte gyting i minst grad (0,33 mg/L for hanner, ingen signifikant endring hos hunner), mens fluvoksamin ble funnet å være mest potent med 0,03 µg/L hos hanner og 3,18 µg/L for hunner [24].

I 2007 undersøkte Johnson et al. i hvilken grad fluoksetin, fluvoksamin og sertraline er toksisk for alger og fytoplankton. I forsøk hvor inhibering av vekst ble undersøkt over 96 timer, ble sertraline funnet å være den mest toksiske med en inhiberende konsentrasjon på 4,6 µg/L, fulgt av fluoksetin og fluvoksamin med henholdsvis 31,3 µg/L og 1662 µg/L [25].

Henry et al. undersøkte i 2004 akutt og kronisk toksisitet av 5 SSRI'er (citalopram, fluoksetin, fluvoksamin, paroksetin og sertralin) på vannloppe (*Ceriodaphnia dubia*). Akutt toksisitet ble funnet ved å bestemme LC₅₀ over 48 timer, og kronisk test ble utført over 8 dager for å bestemme NOEC og LOEC med reproduksjon som endepunkt. LC₅₀ over 48 timer var i størrelsesorden 0,12 til 3,90 mg/L med sertralin som mest toksisk, fulgt av fluoksetin, paroksetin, fluvoksamin og citalopram som minst toksisk. SSRI'ene påvirket reproduksjonen hos vannloppene i negativ grad, og for sertralin ble LOEC funnet å være 0,045 mg/L og NOEC 0,009 mg/L [26].

Det er altså funnet bevis for at SSRI'er kan ha skadelig innvirkning på marine miljøet, men først og fremst i høyere konsentrasjoner enn det man per i dag har klart å påvise i miljøet. Man har i dag begrenset eller ingen kunnskap om hvilke effekter de konsentrasjoner som er påvist vil ha på marine organismer over måneder og år.

I 2002 fant Kolbin et al. fluoksetin med en estimert mediankonsentrasjon på 0.012 µg/L i amerikanske elver [27]. Vasskog et al. undersøkte i 2006 i hvilken grad ulike SSRI'er var tilstede i innløp og utløp fra tre renseanlegg og en pumpestasjon for avløpsvann i Tromsø. I prøver hentet fra Sjølund pumpestasjon som betjener avløpsvann fra psykiatrisk avdeling, Åsgård, Universitetssykehuset i Nord-Norge (UNN), ble det for henholdsvis sertralin, fluoksetin, paroksetin, citalopram og fluvoksamin funnet konsentrasjoner på 16,3 ng/l, 2,3, 0,7, 32,7 og 0,8 ng/l. I utløp fra de tre rensestasjonene ble det funnet konsentrasjoner i området mellom 0,9-2,0 ng/l, nq-1,3, 0,5-1,6, 9,2-382 og nq-0,8 ng/l for de respektive SSRI'er (nq; detekterbar, men ikke kvantifiserbar). Konsentrasjonene funnet i innløp er høyere enn i utløp, noe som kan tilskrives adsorpsjon til partikler, biodegradering eller annen form nedbrytning i filtreringsprosessen [3]. I 2008 analyserte Vasskog et al. sjøvannsprøver fra

Tromsø og LYB for SSRI'er. I sjøvannsprøvene fra Tromsø ble citalopram og paroksetin funnet, men ikke i kvantifiserbare mengder. I prøvene fra LYB fant man paroksetin (0,6-1,4 ng/l), fluvoksamin (0,5-0,8 ng/l) og sertralin (ikke kvantifiserbar) [2].

Renseanlegg for avløpsvann er normalt ikke konstruert for å fjerne legemidler, og det rensede vannet kontrolleres først og fremst for å kvantifisere fjerning av nitrogen, fosfat, patogener, partikler og metallioner. Det er store forskjeller i hvordan avløpsvann renses før utslipp i elver og sjø. Mange rensesanlegg har bare to trinn; mekanisk filtrering og biologisk nedbrytning. Det eksisterer imidlertid også rensesanlegg som benytter tre eller flere rensetrinn; ultrafiltrasjon, flokkulering, ozonbehandling, avansert oksidasjon eller osmose, men disse forekommer sjeldnere på grunn av kostnadene forbundet med dem [28]. I lavt utviklede land må man gå ut fra at avløpsvann i stor grad slippes ut urensset – dette er av kostnadmessige hensyn også tilfellet i bosetningene på Svalbard.

Zorita et al. fant i 2009 at et rensesanlegg med 3-trinns rensesprosess (filtrering, mikrobiologisk nedbrytning og flokkulering) i Kristianstad i Sør-Sverige var i stand til å fjerne mer enn 90% av fluoksetin målt i innløp, og mer enn 99% av metabolitten norfluoksetin [28].

Selv om en substans tilsynelatende er eliminert, kan man ikke uten videre slutte at den har vært gjenstand for biologisk eller fotokjemisk nedbrytning. En viktig prosess for eliminasjon av legemidler er adsorpsjon til partikler. Partikkeladsorpsjon kan også ha betydning for spredning og biotilgjengelighet av legemidler i miljøet (partikkelbundet transport) og deres eliminasjon i rensesanlegg for avløpsvann [29].

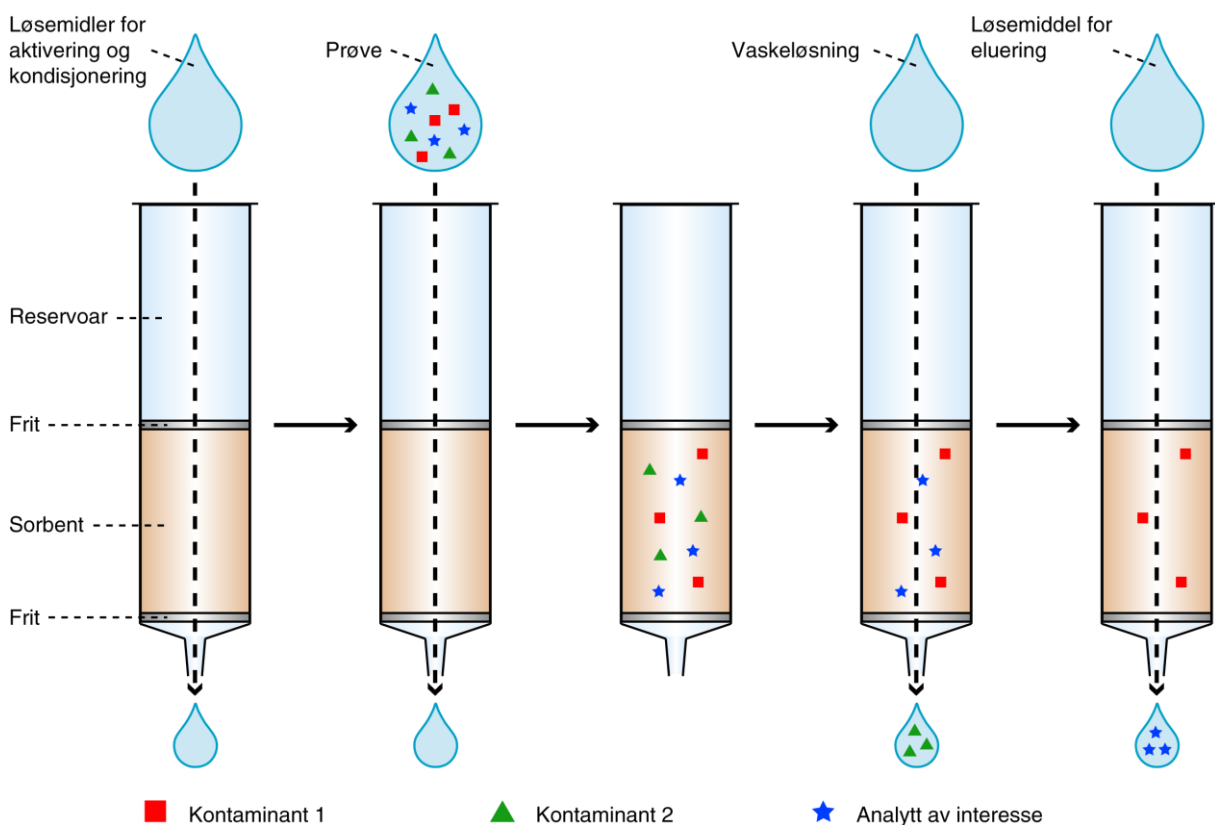
Tidligere har en måte å kvitte seg med kloakkslam fra rensesanlegg vært å dumpe slammet til sjøs. I 1998 innførte EU forbud mot denne praksisen, og man har siden da sett større bruk av kloakkslam til blant annet gjødsling i jordbruk. Det er derfor også økt interesse for hvorvidt partikkeladsorberte legemidler kan tas opp i planter. Redshaw et al. viste i 2008 at blomkål dyrket i vekstmedium tilsatt fluoksetin kunne ta opp legemidlet [30]. Dette reiser spørsmål om hvorvidt man kan forvente at legemidler kan bli transportert i næringskjeder.

3. Ekstraksjon-, separasjon- og deteksjonsteknikk

3.1 Fast fase-ekstraksjon; SPE

Fast fase-ekstraksjon (Solid Phase Extraction) kan benyttes som teknikk for å isolere, rens og konsentrere stoffer fra væsker. Forutsatt at den faste fasen (sorbent) har funksjonelle grupper som kan interagere med analytten, kan denne fordele seg mellom sorbent og væske. Styrken på de interagerende kreftene mellom analytt og sorbent i forhold til interaksjonen mellom analytt og prøveløsning vil bestemme i hvor stor grad analytten vil kunne gjenvinnes fra løsningen. Ved svak interaksjon mellom analytt og sorbent vil man kunne oppleve at analytten av interesse ikke holdes tilbake, men bryter gjennom sorbenten.

Ved hjelp av ulike sorbentmaterialer vil man i stor grad kunne isolere en hvilken som helst organisk substans fra ulike vannprøver, og SPE har i de senere år blitt benyttet i utstrakt grad i kartleggingen av legemidler i miljøet.



Figur 4 - Oppsett for SPE-ekstraksjon (Inspirert av Vasskog 2008)

For ekstraksjon av miljøprøver benyttes det i hovedsak fire ulike typer sorbenter:

- Revers fase-sorbenter
- Ionebytter-sorbenter
- Polymer-sorbenter
- ”Mixed-mode”-sorbenter

Polymer-baserte sorbenter er ofte foretrukket i ekstraksjonen av legemidler fra miljøprøver. Dette er fordi de er mer robuste overfor ekstreme pH-verdier sammenlignet med C₁₈-silica, samt at de ikke deaktiveres av vannprøver med stort volum. Det er av de samme årsaker benyttet polymer-sorbent i denne oppgaven. Polymer-sorbenter har kapasitet for både lipofile og hydrofile interaksjoner, men ved ekstraksjon av organiske molekyler fra vandige matrikser, vil hydrofile bindingssteder i stor grad være okkupert av vann. Ved slik bruk vil retensjonsmekanismene kunne forklares med hovedsakelig van der Waals-krefter lik de man ser ved bruk av revers fase C₁₈-kolonner [8, 31].

3.2 High Performance Liquid Chromatography; HPLC

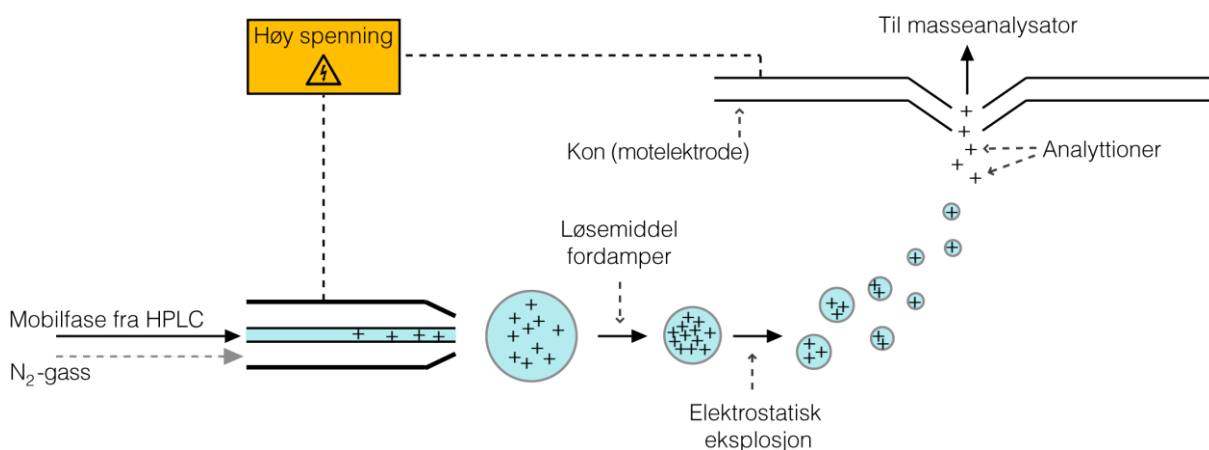
Separasjonsteknikken væskechromatografi, eller high performance liquid chromatography; HPLC bygger på det samme prinsippet som SPE: distribusjonen av analytter mellom fast stasjonær- og flytende mobilfase. Retensjon og separasjon skjer ved å pumpe prøven, ved hjelp av mobilfase, gjennom en kolonne pakket med stasjonærfase. Dess sterkere affinitet analyttene i prøven har til stasjonærfasen, dess lengre retensjonstid vil analytten ha. Distribusjonen av analytter mellom mobil- og stasjonærfase er avhengig av analyttens struktur og mobil- og stasjonærfasens sammensetning. Dersom prøven inneholder flere analytter vil man altså kunne separere disse ved utnytte forskjell i analyttenes kjemiske egenskaper og dermed affinitet til stasjonærfasen i samspill med endring i mobilfasens sammensetning.

I denne oppgaven benyttes ultra performance liquid chromatography; UPLC som separasjonsteknikk. UPLC er lansert som en videreutvikling av HPLC med kolonner hvor pakkematerialets partikler er mindre – i likhet med kolonnens indre diameter. Dette resulterer i et høyere mottrykk, noe UPLC-pumpene er utviklet for å kunne håndtere. I enkelte tilfeller kan UPLC gi signaltopper som er bare noen få sekunder vide, noe som tidligere bare gasschromatografi har vært i stand til [8, 31].

3.3 Elektrospray ionisering; ESI

Elektrosprayionisasjon; ESI er en ofte brukt ioniseringsteknikk i kombinasjon med HPLC, særlig på sure eller basiske forbindelser. I motsetning til elektroionisering; EI, foregår ioniseringen i ESI i atmosfærisk trykk, og ESI er en ”myk” ioniseringsteknikk, det vil si at fragmentering skjer i liten grad. Når man likevel ser fragmentering ved bruk av ESI, skjer dette normalt ved høy ”cone voltage” (CV). Ved slike betingelser har ionene høy energi som i kollisjoner med molekyler i lufta ved atmosfærisk trykk gir fragmentering. Fragmenteringsmønsteret er i stor grad likt det man vil se i kollisjonscellen i massespektrometre, men den relative fordelingen av produksjoner kan være ulik. Fragmenteringsmønsteret domineres også hovedsakelig av fragmentering ved heteroatomer som nitrogen og oksygen i motsetning til bryting av karbon-karbon-bindinger som man kan observere ved bruk av EI.

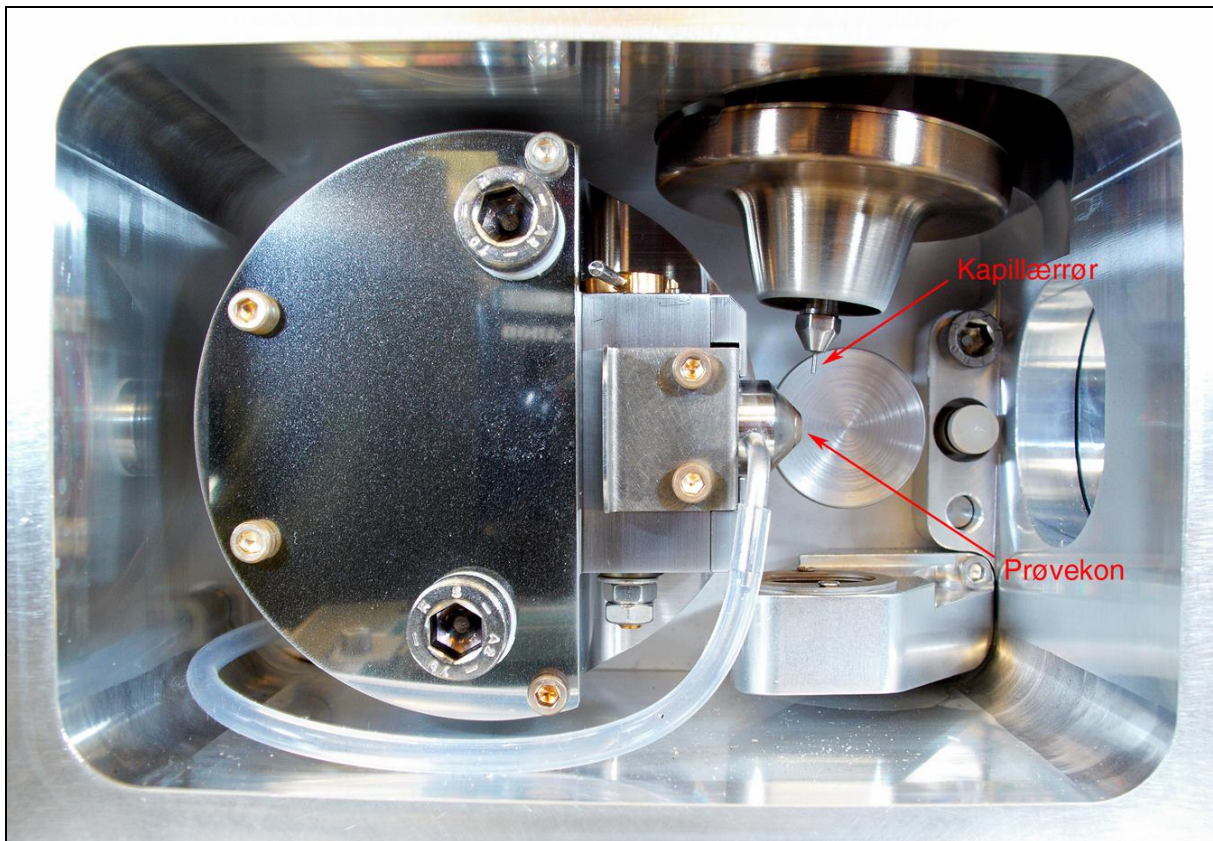
ESI-prinsippet går ut på å presse mobilfase med analytter gjennom et tynt kapillærrør påsatt høy elektrisk spenning (2-6 kV). Denne spenningen i kombinasjon med forstøvergass (ofte N₂) som tilføres ved enden av kapillærrøret forstøver mobilfasevæsken og analyttene blir fordelt i en aerosolfase. Disse små mobilfasedråpene fordamper så, og molekylionene i gassfase føres inn i masseanalysatoren ved hjelp av elektrisk spenning.



Figur 5 - Forenklet skisse av elektrosprayioniseringskilde (Inspirert av Vasskog 2008)

Avhengig av spenningen som tilføres kapillæret, vil man kunne danne enten positive eller negative ioner. Dersom spenningen er positiv, vil positive ioner dannes. Dersom en protondonor (vann, organisk syre eller lignende) er tilstede sammen med analyttene, vil man ofte se et protonert molekylion; $[M+H]^+$. Avhengig av prøvematriks' sammensetning vil andre ioneprodukter også kunne dannes, og ionisering med Na⁺ og K⁺ kan forekomme.

Behovet for å separere de ulike forbindelsene i en prøve når man bruker massespektrometer (MS) som detektor er ikke alltid tilstede da detektoren vil kunne separere de. Man kan likevel oppleve at enkelte forbindelser som er tilstede i prøvematriks påvirker ioniseringen, og reduserer eller øker ioniseringen av de analyttene man ønsker å undersøke. Dette vil påvirke kvantifiseringen av analyttene, og det er derfor viktig at man undersøker i hvilken grad ionsuppresjon eller –forsterkning skjer ved bruk av ESI-MS [8, 31-33].



Figur 6 – ESI-kilde på Waters Quattro Premier XE massespektrometer

3.4 Massespektrometri; MS

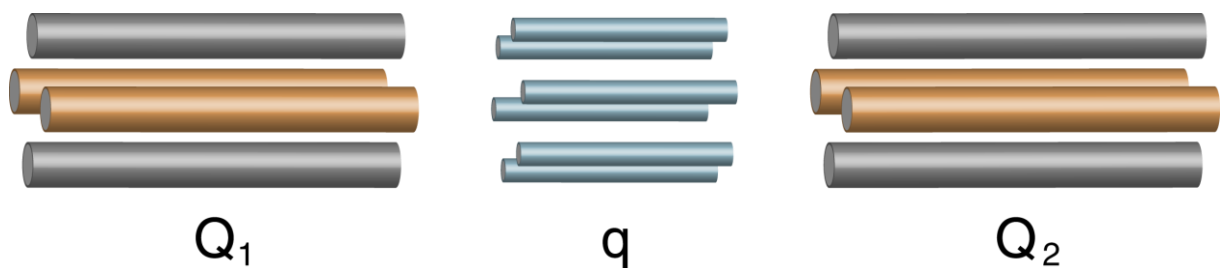
Massespektrometri er en deteksjonsteknikk som går ut på å ionisere kjemiske forbindelser for å generere ladete molekyler og molekylfragmenter som kan separeres ut fra deres masse over ladnings-ratio (m/z)

MS har sammen med ultrafiolett spektroskopi (UV) vært de foretrukne deteksjonsteknikkene ved analyser av legemidler. MS er sammenlignet med UV en mer kostbar og utfordrende metode å jobbe med, men gir til gjengjeld bedre kvantifikasjons- og deteksjonsgrenser. MS-detektoren har også muligheten for å kunne brukes som både en generell og selektiv detektor.

Muligheten for å kunne analysere analytter med en såkalt MS/MS-konfigurasjon, med to masseseparatorer koblet etter hverandre, er noe av det som gjør MS attraktiv og som gjør MS i stand til å gi god selektivitet og sensitivitet.

Trippelkvadrupol massespektrometri utføres som navnet antyder med en trippelkvadrupol (QqQ). QqQ består som regel av to kvadrupoler (masseseparatorer) adskilt av en heksapol eller oktapol (kollisjonscelle) – og navnet er derfor noe misvisende.

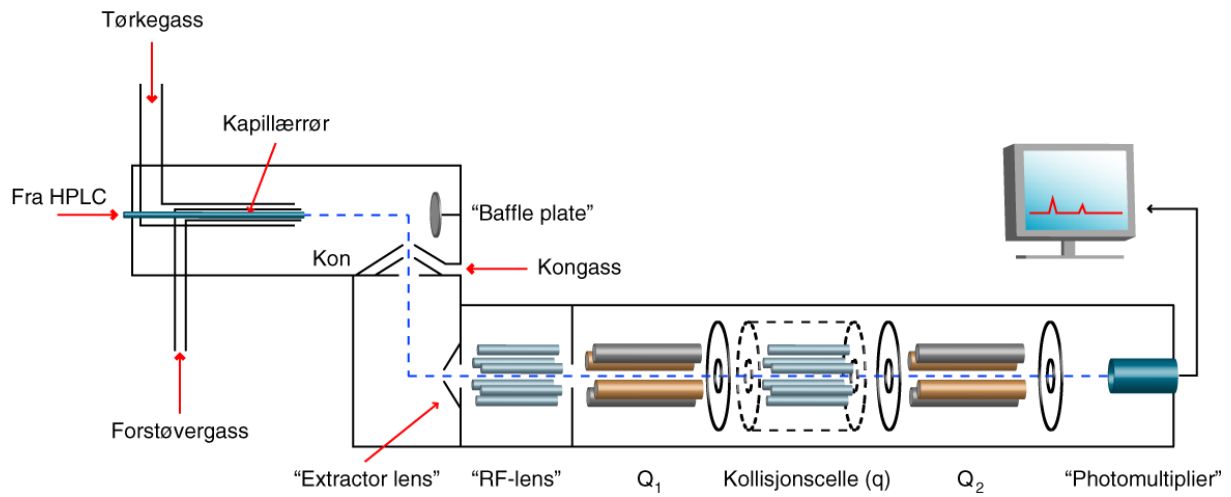
Kvadrupolen består i sin tur av fire parallelle metallstaver hvor to og to motsatte par kobles sammen med elektrisk spenning.



Figur 7 – Skjematisk tegning av trippelkvadrupol (QqQ) med motsatte par i ulik farge.

Mellom parene setter man en kombinasjon av vekselstrøm (AC) og likestrøm (DC), og ved bestemte AC- og DC-spenninger kan så ioner med bestemt m/z -ratio passere gjennom kvadrupolen. I Figur 7 ser man de to masseseparatorene Q_1 og Q_2 samt kollisjonscellen q . Kollisjonscellens oppgave er ikke å separere ioner, men danne fragmenter av ionene som har passert Q_1 for videre separasjon i Q_2 . Dette gjøres ved å sette AC-spenning på stavene i kollisjonscellen (q) og lede en inert kollisjonsgass gjennom cellen. I kollisjon med kollisjonsgassen danner ionene fragmenter som kan separeres i Q_2 . Graden av fragmenteringen er imidlertid avhengig av kollisjonsgassens energi og trykk.

Når trippelkvadrupolen brukes som en spesifikk detektor, vil en kombinasjon av bestemte AC- og DC-spenninger la bare ioner med spesifikk m/z passere Q_1/Q_2 . Flere ioner kan analyseres stegvis innenfor et gitt tidsvindu, men blir antallet ulike ioner for mange vil detektoren bruke for kort tid på hvert ion, og antall punkter over toppsignalet bli for få. Siden man separerer ioner basert på ionets masse har man mulighet til å benytte isotop-merkede ($^2\text{H}/^{13}\text{C}$) forbindelser som interne standarder (IS) [8, 31-33].



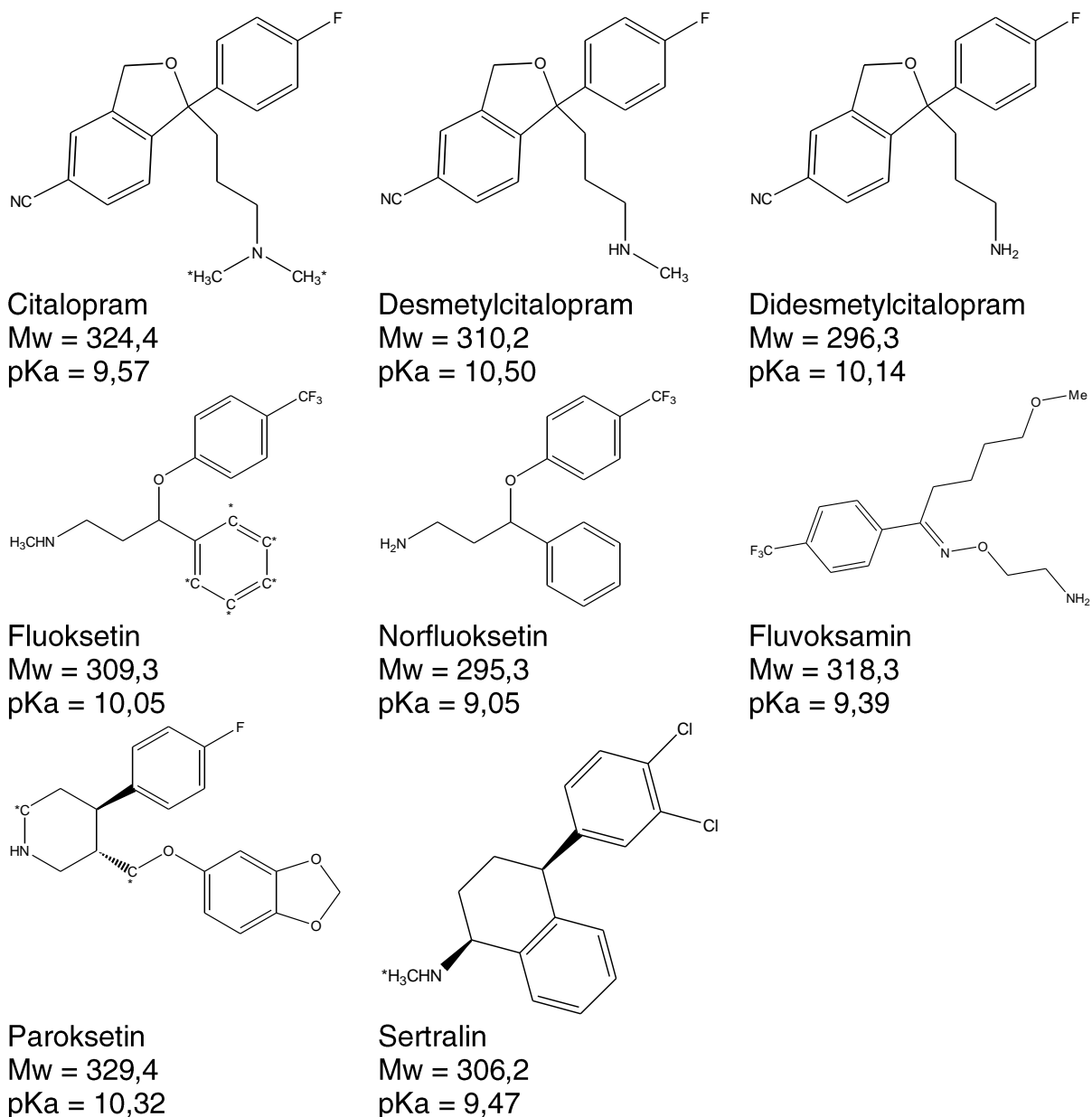
Figur 8 – Skjematisk tegning av ESI ionekilde og MS/MS deteksjon med trippelkvadrupol (Inspirert av Vasskog 2008)

4. Materialer og metode

4.1 Kjemikalier

De selektive serotoninreopptakshemmerne citalopram (*1-[3-(dimethylamino)propyl]-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofurancarbonitrile*), fluoksetin (*((±)-N-methyl-γ-[4(trifluoromethyl)phenoxy]benzenepropanamine)*), fluvoksamin (*5-methoxy-1-[4-(trifluoromethyl)phenyl]-1-pentanone-O-(2-aminoethyl)oxime*), paroksetin (*trans(-)-3-[(1,3-benzodioxol-5-yloxy)methyl]benzenepropanamine*) og sertralin (*((1S-cis)-4-(3,4-dichlorophenyl)-1,2,3,4-tetrahydro-N-methyl-1-naphtylamine*) ble kjøpt fra Toronto Research Chemicals (TRC, Toronto, ON, Canada). Metabolittene og de interne standardene (IS) desmetylcitalopram (*1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-1-[3-(methylamino)propyl]-5-isobenzofurancarbonitrile*), di-desmetylcitalopram (*1-(3-aminopropyl)-1-(4-fluorophenyl)-1,3-dihydro-5-isobenzofuran-carbonitrile*), norfluoksetin (*γ-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]benzenepropanamine*) og citalopram-d6, fluoksetin-d5, paroksetin-d4 og sertralin-d3 ble også kjøpt fra TRC. I Figur 9 er SSRI'ene og metabolittenes struktur, molekylvekt og pKa-verdier vist.

Løsemidler brukt i ekstraksjon var acetonitril HPLC- og GC-kvalitet (LiChroSolv® og SupraSolv®) fra Merck (Darmstadt, Tyskland) og metanol HPLC og GC-kvalitet (LiChroSolv® og SupraSolv®) fra Merck. Natriumhydroksid pellets pro analyse, maursyre (98-100%) pro analyse og ammoniakkløsning (32%) extra pure ble også kjøpt fra Merck. N-Pentan ble kjøpt fra VWR (Briare, Frankrike). Til HPLC-mobilfaser ble acetonitril HPLC-kvalitet, maursyre (98-100%) pro analyse og vann fra Milli-Q rensesystem fra Millipore (Bedford, MA, USA) benyttet. Øvrig vann hvor annet ikke er angitt er også produsert ved hjelp av Milli-Q rensesystem. Sjøvann til utvikling av metoden ble i Tromsø hentet ved ulike lokaliteter rundt Tromsøya, og ved UNIS var sjøvann tilgjengelig på laboratoriene. Dette sjøvannet hentes i samme rørsystem som kraftverket i Longyearbyen benytter til kjølevann, og leveres til UNIS via rørsystem.



Figur 9 - Struktur, molekylvekt og pKa-verdi for kjemiske standarder. * angir posisjoner for isotopmerking.

4.2 Materialer

Til SPE-ekstraksjon ble utstyr fra Supelco benyttet: 6 ml SPE-kolonner av glass med teflon (PTFE) frits (20 μm porøsitet), 60 ml SPE-kolonner av polyetylen (PE) med PE frits (20 μm porøsitet), Visiprep™ large volume samplers for 60 ml SPE-kolonner og Visiprep™ SPE vakuumpumpe manifold med 12 porter. Glassfiberfilter, type 696, 110mm, 1,2 μm partikkelretensjon ble kjøpt fra VWR (Leuven, Nederland). I tillegg til vanlig vannstrålevakuumpumpe har ulike elektriske vakuumpumper blitt benyttet i filtreringen av

prøvene, deriblant KNF Laboport (Sigma) og Vacuubrand RD 8 (Vacuubrand, Wertheim, Tyskland) vakuumpumper.

Til prøveinnsamling ble håndrevet membranpumpe (0,5 L/slag) og 10 m 1" vinylslange kjøpt fra Biltema (Helsingborg, Sverige), og transportbeholdere i form av 10 l PE-kanner fra Polimoon (nå oppkjøpt av Promens, Kopavogur, Island).

Prøvene har av ulike årsaker blitt analysert ved hjelp av to ulike LC-MS/MS-oppsett: Waters 2695 separation module HPLC (Waters, Milford, MA, USA) koblet til Quattro-LC massespektrometer fra Micromass (Manchester, England) (benevnes heretter som "Quattro LC"), og Nano Acquity ultraperformance LC koblet med Quattro Premier XE massespektrometer, begge fra Waters (benevnes heretter som "Nano UPLC"). Separasjon ble på Nano UPLC utført ved hjelp av en Waters Acquity UPLC BEH C₁₈-kolonne (1,0x150 mm, 1,7 µm partikkelstørrelse). På Quattro-LC ble en Waters Xbridge C₁₈-kolonne benyttet (150x2,1 mm).

4.3 Metodeutvikling

Dette kapitlet vil omhandle metoden; hvor prøvene har blitt innhentet, hvilke sorbenter som ble valgt og hvorfor - og hvilke steg som har blitt utført for å utvikle metoden så langt det har vært mulig innenfor det begrensede tidsrom som har stått til disposisjon.

4.3.1 Valg av sorbent

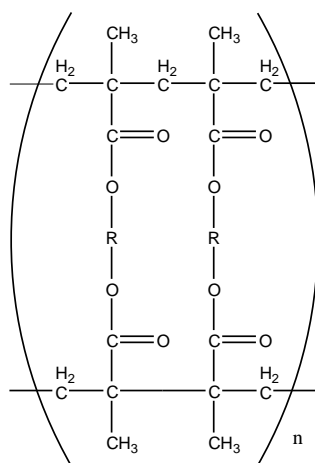
Da arbeidet med denne oppgaven startet ble det planlagt å benytte en "Kiel in situ pump" (KISP) til prøveinnsamling. KISP muliggjør prøveinnsamling og ekstraksjon av prøven i ett og samme trinn ved at man senker en Pumpe koblet til fast fase-kolonner i vannet på stede for prøveinnsamling. Fordelen med en slik løsning er at man enkelt kan ekstrahere store volumer sjøvann (opp til flere tusen liter), og at man slipper de logistiske utfordringene og problemene med kontaminasjon i forbindelse med lagring og transport av store prøvevolum. KISP er i stand til å pumpe fra 1 til 200 L/time ned til 6000 meters dyp, noe som setter krav til sorbentens bestandighet ved både høy gjennomstrømming og høyt trykk [34].

Amberlite XAD2 og XAD7HP fra Rohm & Haas Company (Philadelphia, PA, USA) er sorbentmaterialer som fyller disse kriteriene. Begge XAD-sorbentene består av uløselige polymerperler (gjennomsnittlig størrelse på om lag 0,7 mm) som har både en kontinuerlig polymer- og porefase. Dette gir sorbentene høyt overflateareal, og sammen med de alifatiske egenskapene er de godt egnet til å adsorbere ikke polare forbindelser fra polare, vandige medier [35-37].

KISP'ens vekt er 70 kilo, og man er derfor avhengig av båt med vinsj for å kunne bruke den. Vinteren 2009 frøs Adventfjorden, og man kunne derfor ikke benytte båt. Det ble også erfart at KISP'en fryser ved lave temperaturer. KISP'en som er tilgjengelig ved UNIS kunne derfor ikke benyttes. Det ble likevel bestemt at man skulle gå videre med XAD-sorbentene da deres fysiske egenskaper ville kunne tillate hurtigere ekstraksjon sammenlignet med for eksempel revers fase C₁₈-silica-sorbenter i et tradisjonelt SPE-oppsett.

Sorbentene Amberlite XAD7HP (20-60 mesh wet), ble kjøpt fra Sigma (St. Louis, MO, USA) og Amberlite XAD2 fra Supelco (Bellefonte, PA, USA) fikk vi for testing fra Universitetet på Svalbard (UNIS) ved Roland Kallenborn.

Sorbenten som til slutt ble benyttet i metoden var XAD7HP. Denne viste i innledende tester å gi bedre gjenvinning av legemidlene enn XAD2.



Figur 10 - XAD7HP, kjemisk struktur. R-gruppen er ikke oppgitt av produsent [35].

XAD7HP (heretter XAD7) er en ikke-ionisk alifatisk akrylpolymer. Polymerperlene har en gjennomsnittlig størrelse på 0,56-0,71 mm. Overflateareal er $\geq 380 \text{ m}^2/\text{g}$ og porøsitet $\geq 0,5 \text{ ml}$ væske per ml sorbent. Sorbenten blir solgt vannvætet og konservert med natriumklorid (NaCl) og natriumkarbonat (Na₂CO₃). Disse saltene må fjernes før bruk [35].

4.3.2 Væskekromatografi og massespektrometri

Prøvene har som nevnt i **4.2 Materialer** blitt analysert ved hjelp av to ulike HPLC-MS/MS-oppsett. Fokuset har likevel vært å utvikle en metode for UPLC-MS/MS, og da i vårt tilfelle på Nano Acquity ultraperformance LC koblet med Quattro Premier XE massespektrometer (begge Waters). Separasjon ble utført ved hjelp av en Waters Acquity UPLC BEH C₁₈-kolonne (1,0x150 mm, 1,7 µm partikkelstørrelse).

Tabell 3 - Elueringsgradient på Nano Acquity ultraperformance LC (sur mobilfase).

Tid (minutter)	Væskestrøm (µL/min)	% vann	% acetonitril
0.00	50	60	40
1.00	50	60	40
7.00	50	55	45
12.00	50	50	50

Tabell 3 viser gradienten som til slutt ble benyttet ved analyse. Mobilfasen ble gjort sur ved å tilsette 0,1 % maursyre til både vann og acetonitril. Det ble i tillegg benyttet gradienter hvor man fra 12 til 60 minutter økte andelen acetonitril til 100 % i et forsøk på å eluere kolonnen fullstendig med hensyn på alle analytter og kontaminasjoner. Prøvene fra Ny-Ålesund og Adventfjorden (Figur 40 – 45) ble analysert med elueringsgradient over 60 minutter.

Deteksjon ble utført ved hjelp av Quattro Premier XE massespektrometer. For kvantifisering og identifikasjon ble MS/MS i multiple reaction mode (MRM) benyttet. Protonert molekylion $[M+H]^+$ ble benyttet som utgangsign og produktionet med kraftigst signal ble benyttet som kvantifiseringsion. ESI ble benyttet i positiv modus. Sprøyteinjeksjoner av forbindelser løst i 50:50 MeCN:vann + 0,1 % maursyre ble benyttet for å bestemme og optimisere verdier for molekylion, datterion, ”cone voltage” (CV) og ”collision energy” (CE). Disse verdiene er angitt i Tabell 4. Nitrogengass (99,99%, AGA, Oslo) ble benyttet som forstøver-, kon- og tørkegass, mens argongass (99,99%, AGA) ble benyttet som kollisjonsgass.

Tabell 4 - Monoisotopisk masse, molekyl- og produktion, samt cone voltage (CV) og collision energy (CE) for forbindelsene

Forbindelse	Monoisotopisk masse	[M+H] ⁺ (m/z)	Datterion (m/z)	CV (V)	CE (eV)
Citalopram	324,16	325,34	108,93	42	27
Citalopram D6	330,20	331,11	108,81	41	27
Desmethylcitalopram	310,15	311,24	108,93	37	21
Didesmethylcitalopram	296,13	297,24	108,93	29	19
Fluoxetine	309,13	310,24	44,12	20	15
Fluoxetine D5	314,16	315,23	43,97	20	12
Norfluoxetine	295,12	296,16	133,91	16	7
Fluvoxamine	318,16	319,26	71,07	26	17
Paroxetine	329,14	330,27	192,25	38	22
Paroxetine D4	333,17	334,31	74,02	40	29
Sertraline	305,07	306,24	275,12	19	12
Sertraline D3	308,09	309,20	274,80	17	12

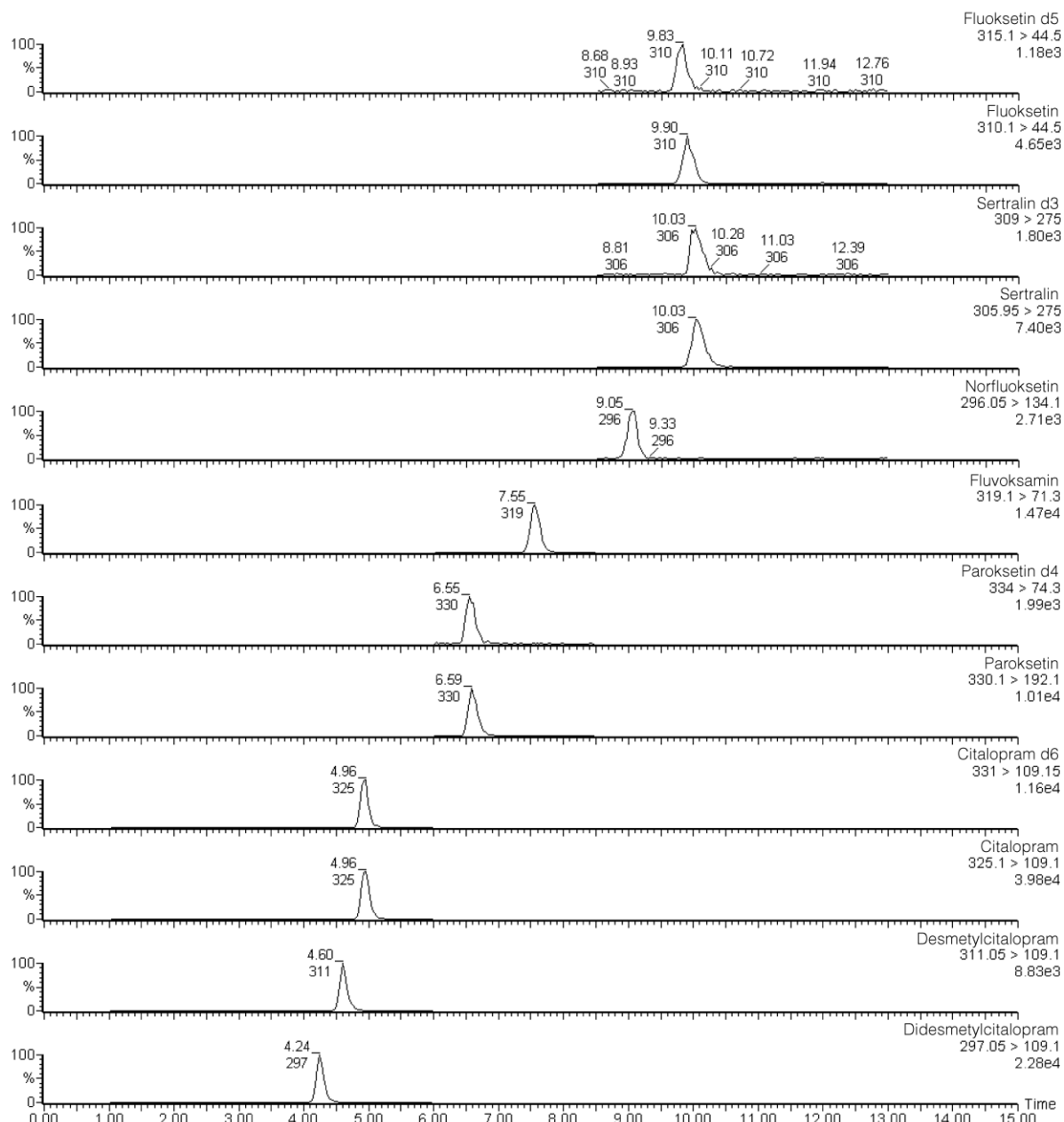
Ytterligere parametre for massespektrometeret er gitt i appendiks 1. Figur 11 illustrerer retensjonstider for standarder uten ekstraksjon.

4.3.3 Prøveopparbeidelse og ekstraksjon

I denne delen vil metodeutviklingsprosessen brytes ned i hovedtrinn. Kromatogrammer er tatt med for å illustrere resultatet av de ulike trinnene. De ulike trinnene, deres resultater og mulige årsaker blir diskutert i del 5.

Lagringsløsninger for SSRI'er, metabolitter og interne standarder med konsentrasjoner tilsvarende 100 eller 200 µg/ml ble laget ut fra veid tørrstoff som ble løst i metanol (MeOH) av HPLC-kvalitet. Disse ble så lagret ved -18° C. Arbeidsløsninger ble tillaget fra lagringsløsningene ved å fortynne ytterligere med MeOH av HPLC-kvalitet *eller* MeOH:vann 50:50 (v/v) + 0,1% maursyre.

5 M natriumhydroksidløsning ble tillaget ved å løse 200 g natriumhydroksid (NaOH) i 1 L vann.



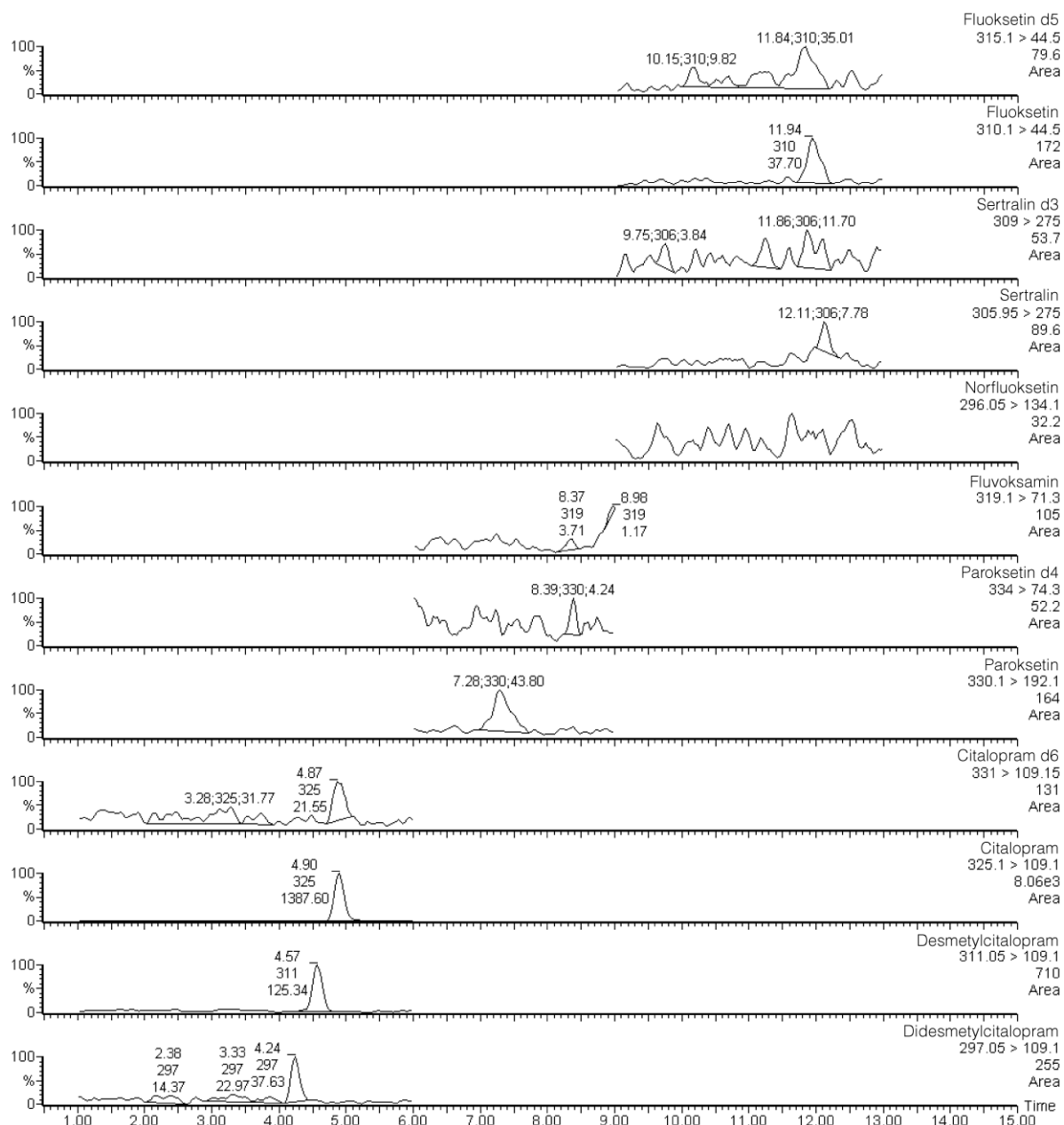
Figur 11 – Kromatogram av standardløsning med konsentrasjon på 50 ng/ml.

Trinn 1: Småskala test av sorbenter: XAD2 og XAD7, 0,5 g.

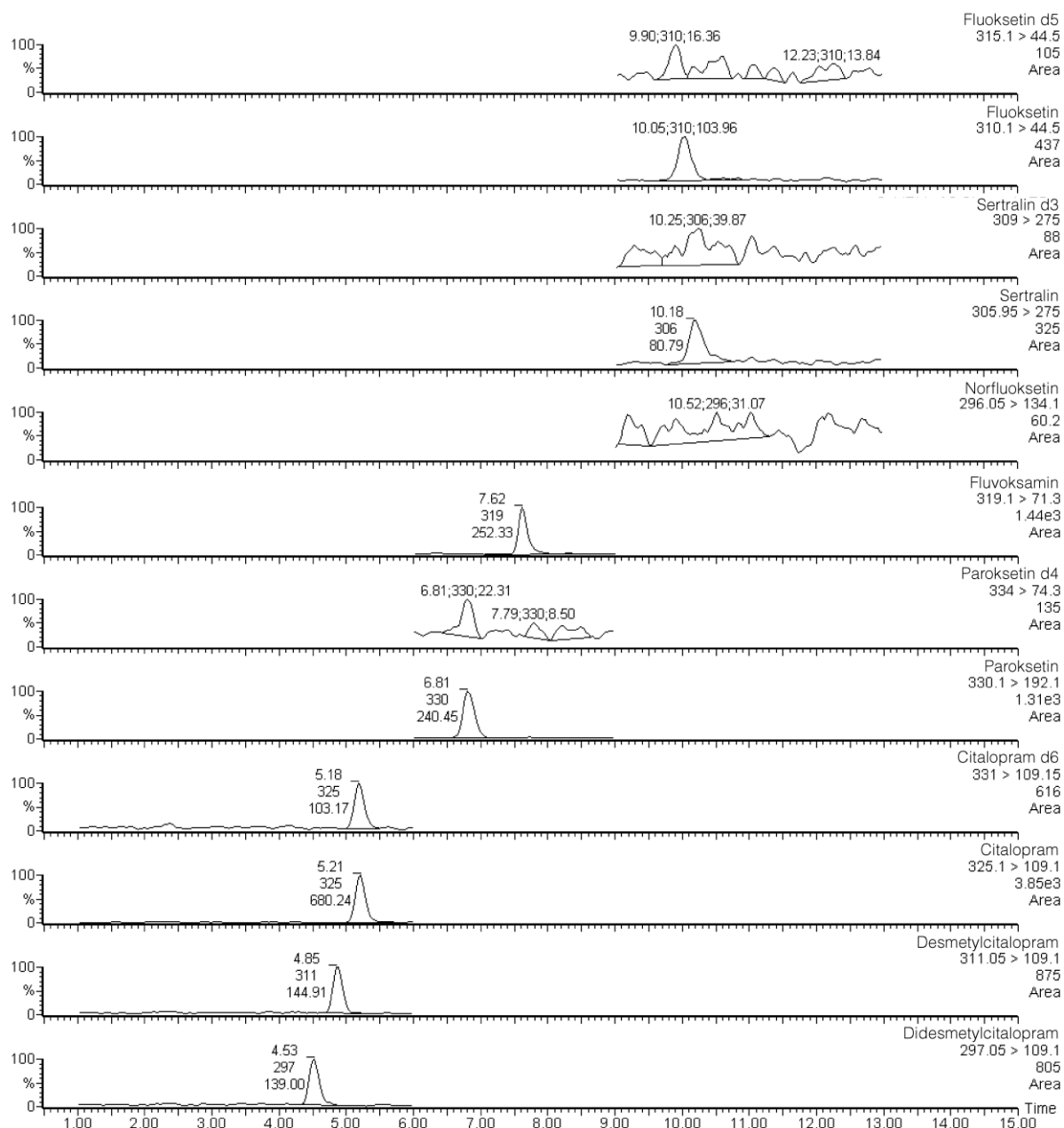
0,5 g sorbent ble overført til SPE-kolonne (6 ml, glass) med PTFE-frit over og under sorbent. 3 paralleller av hver sorbent ble tillaget. Kolonnene ble vasket med 10 ml MeOH før ekstraksjon av prøver. Prøver á 1 l vann (drikkevann fra kran) ble tilsatt 1 ml miks av interne standarder (IS-miks heretter) med konsentrasjon på 50 ng/ml og 1 ml (50 ng/ml) miks av SSRI'er samt deres metabolitter (SSRI-miks heretter) til en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l. Kolonnene ble tørket og eluert med 10 ml MeOH. Eluatene ble dampet ned i

varmeblokk (50°C) under nitrogengass (N₂) til et volum på om lag 200 µl og overført til HPLC-vialer. 200 µl vann ble tilsatt prøvene før injeksjon på HPLC.

Prøvene ble analysert ved hjelp av Quattro-LC. Prøvene ga signaler på enkelte stoffer (Se Figur 12 og Figur 13).



Figur 12 – Trinn 1, 0,5 g XAD2. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.

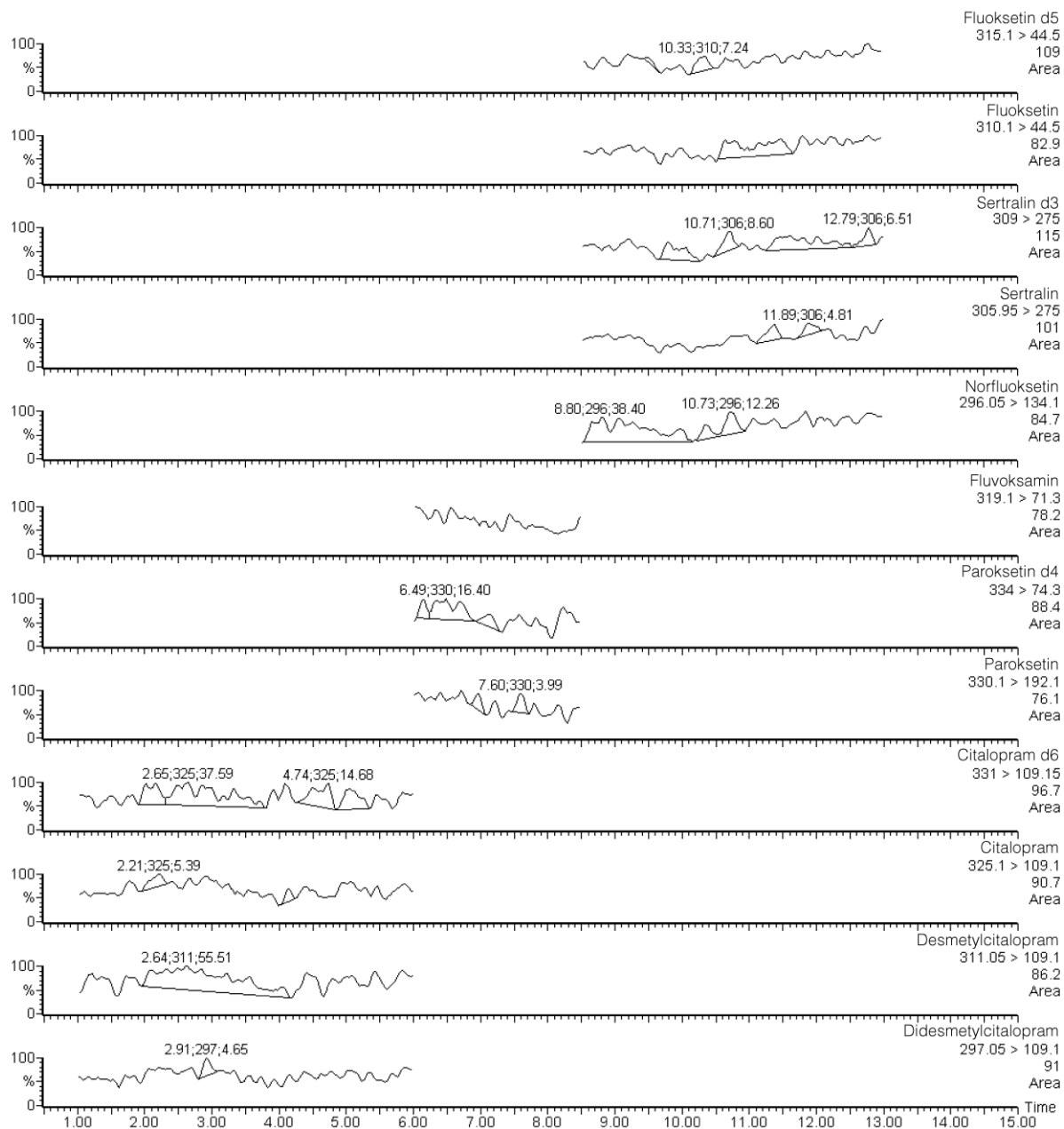


Figur 13 - Trinn 1, 0,5 g XAD7. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.

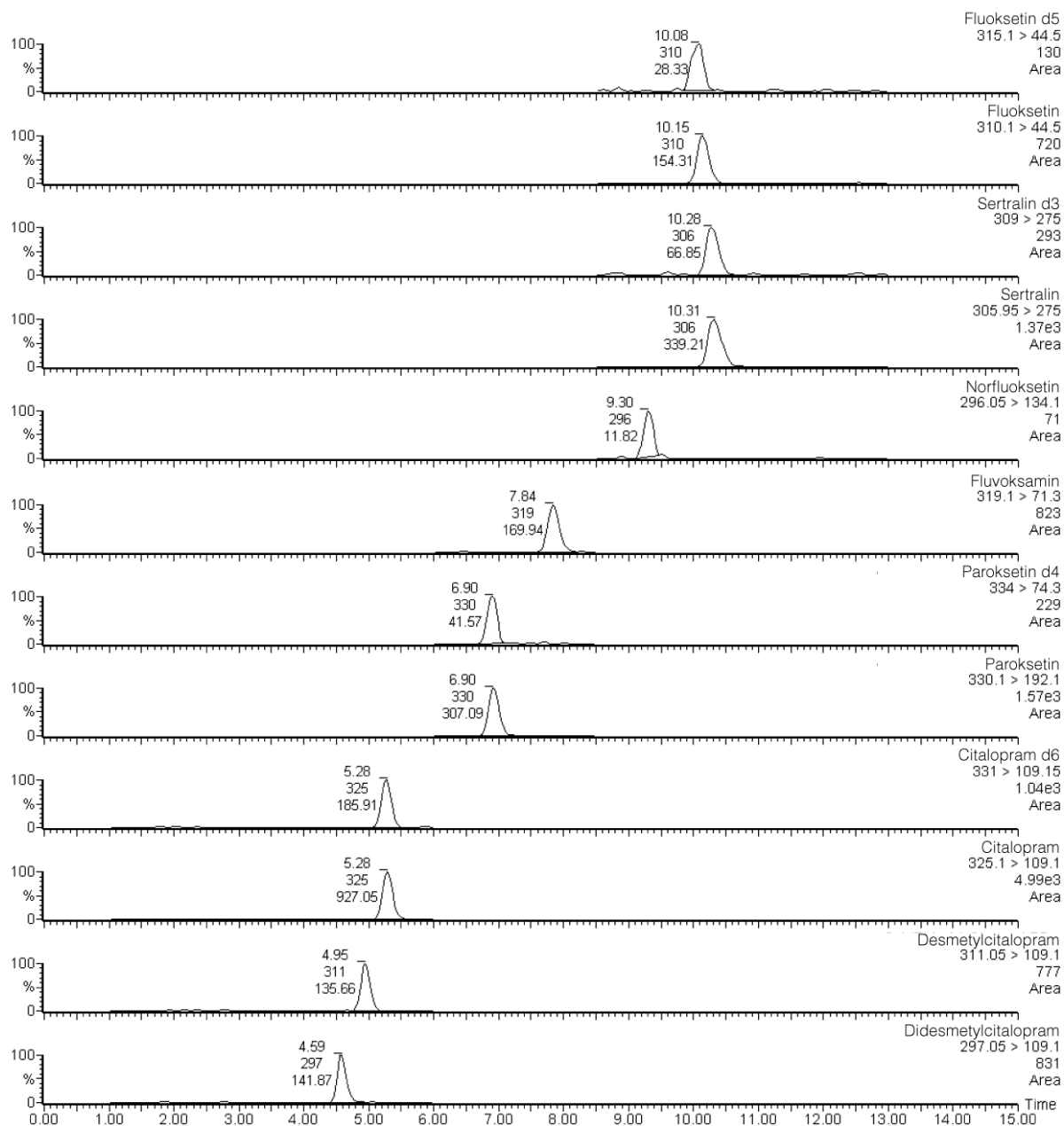
Trinn 2: Småskala test av sorbenter: XAD2 og XAD7, 0,5 g og basisk prøve.

Samme metode som i Trinn 1 ble benyttet, men prøven ble gjort basisk ved å tilsette 10 ml 5M NaOH-løsning før ekstraksjon. Ved å gjøre prøvene basiske, opp mot pH 12, vil man oppnå at en større andel av analyttene tilstede i prøven vil ha en nøytral ladning. Dette vil favorisere interaksjoner med sorbenten og dette vil kunne gi bedre gjenvinning av analyttene fra prøven.

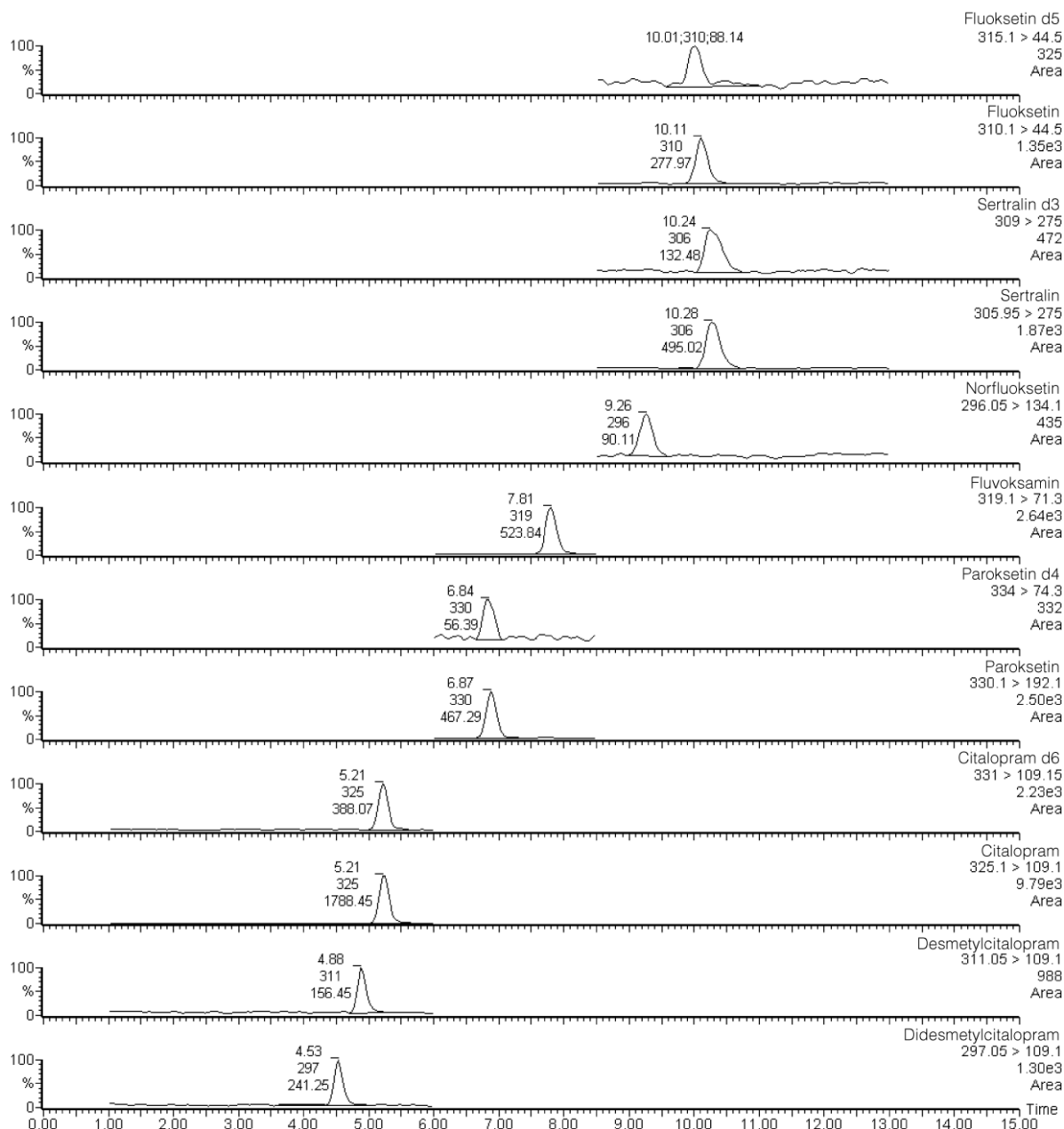
Ved analyse på Quattro-LC fant man ingen signaler (Figur 14), og Na⁺-addukter ble vurdert som mulig årsak. Deretter ble samme metode forsøkt med vask av kolonnene; kolonnene ble vasket med 10 ml vann før ekstraksjon med MeOH i den hensikt å fjerne salter. Ved analyse fant man nå lave signaler (Figur 15 og Figur 16), og det ble besluttet å øke mengden sorbent.



Figur 14 - Analyse av prøver etter metode i Trinn 2. Basisk prøve, 0,5 g XAD2. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.



Figur 15 – Trinn 2, kolonne har blitt vasket med vann før eluering. Basisk prøve, 0,5 g XAD2. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.



Figur 16 – Trinn 2, kolonne har blitt vasket med vann før eluering. Basisk prøve, 0,5 g XAD7. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.

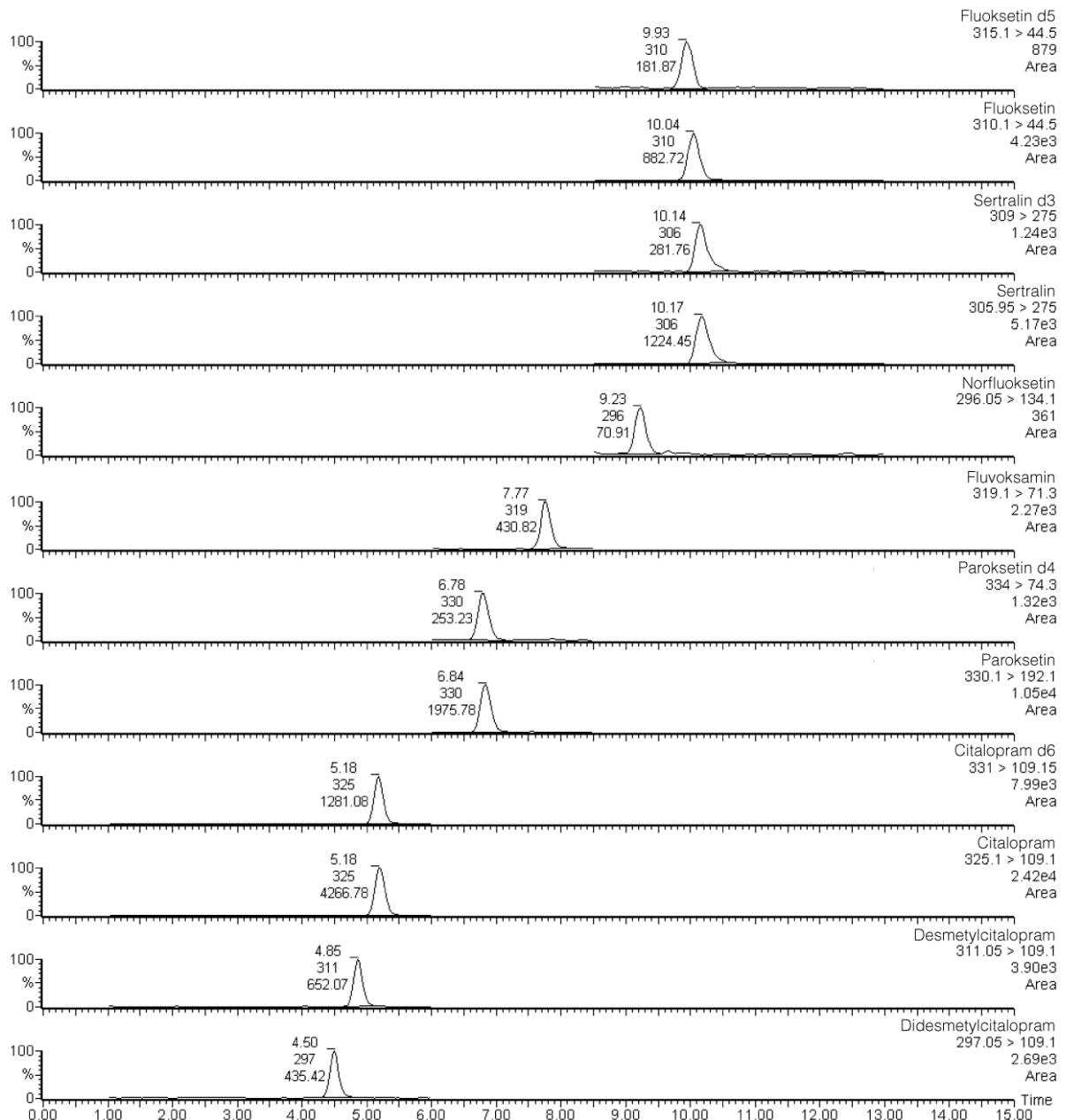
Trinn 3: Oppskallering av sorbentmengde: XAD2 og XAD7, 2,5 g og basisk prøve.

3 paralleller av hver sorbent ble tillaget som i Trinn 1, men mengden økt fra 0,5 g til 2,5 g. Kolonnene ble vasket med 25 ml MeOH og kondisjonert med 25 ml vann før ekstraksjon. Prøver á 1 l ble tilsatt SSRI- og IS-miks til en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l og gjort basiske med 10 ml 5M NaOH-løsning.

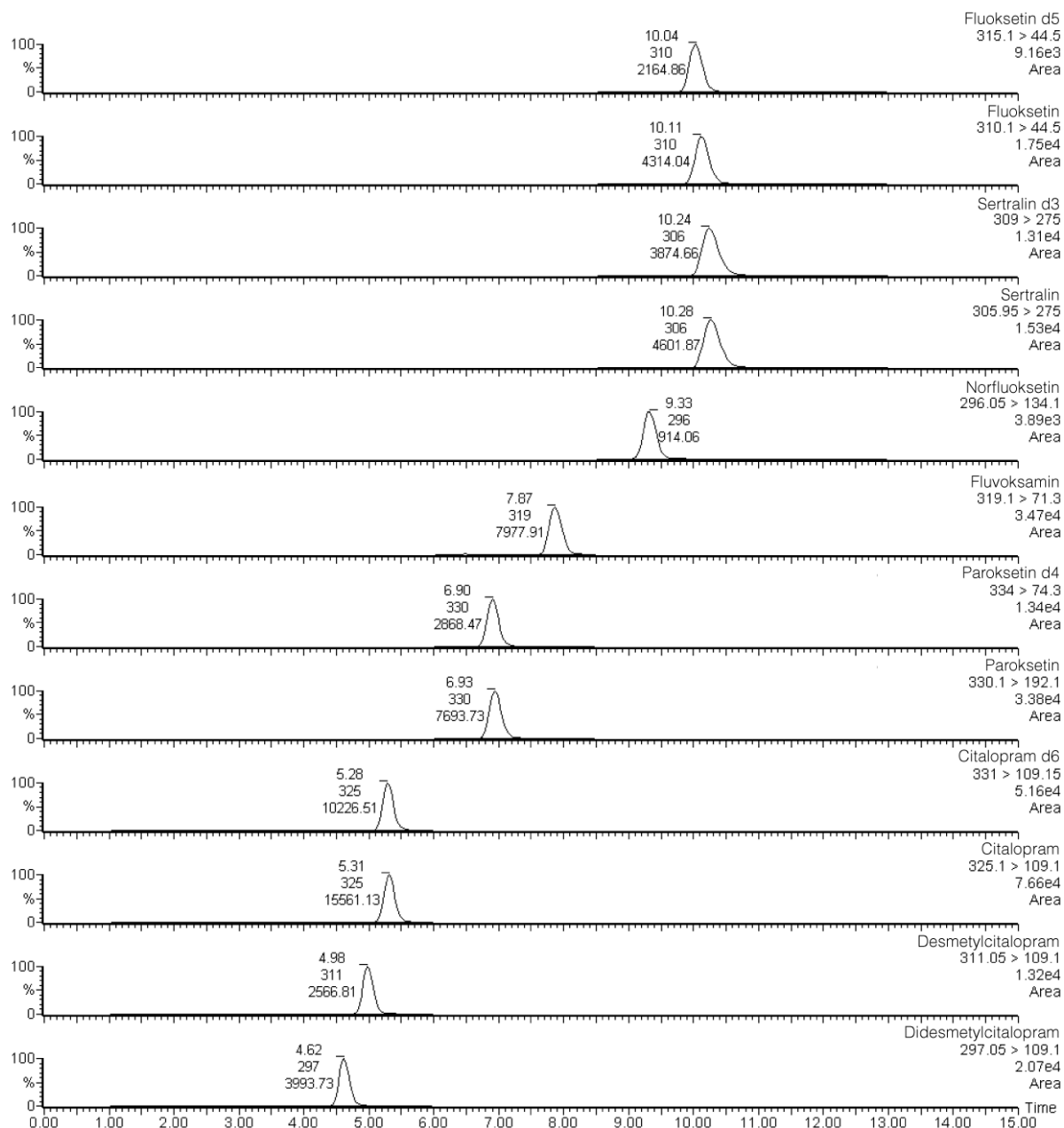
Prøvene ble så ekstrahert med en gjennomstrømning på om lag 10 ml/min og kolonnene deretter vasket med 50 ml vann før de ble eluert med 15 ml MeOH. Eluatene ble dampet ned

(50°C, N₂-gass) til et volum på om lag 200 µl overført til HPLC-vialer hvor 200 µl vann ble tilsatt.

Ved analyse fant man at XAD7 så ut til å gi noe bedre gjenvinning enn XAD2 (Figur 17 og Figur 18), og det ble derfor bestemt å gå videre med XAD7 som eneste sorbent.



Figur 17 – Trinn 3, mengde sorbent (XAD2) økt til 2,5 g. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.

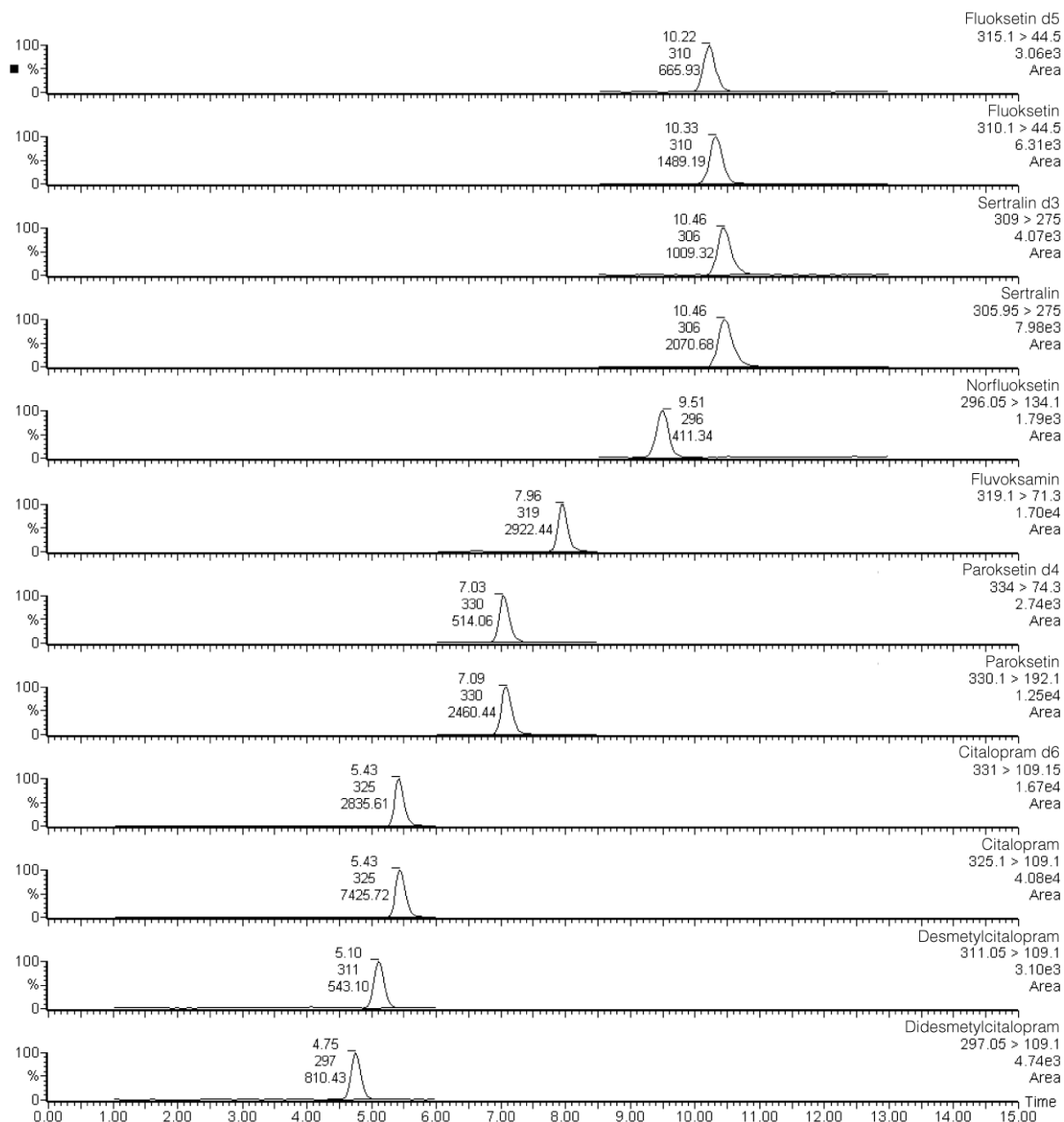


Figur 18 - Trinn 3, mengde sorbent (XAD7) økt til 2,5 g. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.

Trinn 4: Vil ammoniakk være bedre egnet enn NaOH for å gjøre prøver basisk?

Ammoniakk ble testet for å finne ut om man ville få bedre gjenvinning og kromatografi. Metoden fra Trinn 3 ble benyttet med 2 paralleller med 2,5 g XAD7. I stedet for NaOH-løsning ble prøvenes pH justert til ~ pH 12 med 35 ml ammoniakkløsning (32%) per 1 l vann.

Sammenlignet med prøver fra Trinn 3 så ammoniakk ut til å gi noe lavere signal enn NaOH (Figur 19). Det ble derfor besluttet å gå videre med NaOH for å gjøre prøver basiske.



Figur 19 – Trinn 4, forsøk med ammoniakk som base. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l.

Trinn 5: Prøver med stort volum, samt saltvannsprøver.

2 paralleller med om lag 9 l vann (fra Milli-Q) hver ble tilsatt 1 ml SSRI-miks (50 ng/ml) og 1 ml IS-miks (50 ng/ml) til en sluttkonsentrasjon på 50 ng/9L og deretter 100 ml 5M NaOH-løsning. Prøvene ble ristet mellom hver tilsetning. Prøvene ble ekstrahert gjennom 2 g XAD7 som hadde blitt vasket med 25 ml vann og kondisjonert med 25 ml MeOH. Etter ekstraksjon ble kolonnene vasket med 25 ml vann og deretter eluert med 15 ml MeOH. Eluatene ble så dampet ned under N₂-strøm til et volum på om lag 200 µl og overført til HPLC-vialer. Prøvene ble tilsatt 200µl vann.

2 paralleller med 9 l saltvann ble tilsatt samme mengde SSRI-miks og IS-miks som ferskvannsprøvene, og deretter tilsatt 100 ml 5M NaOH-løsning.

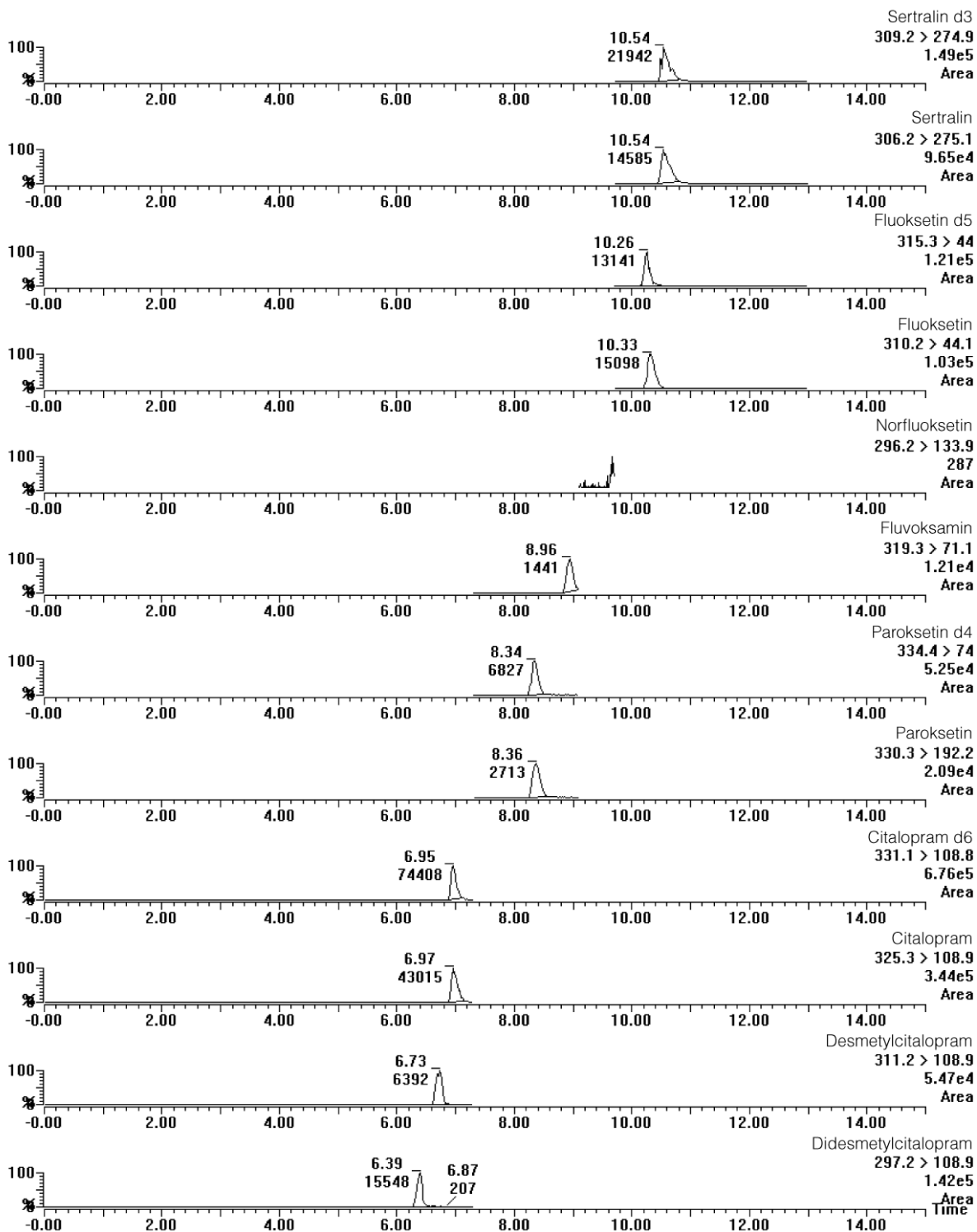
Ved tilsetning av base til saltvann vil man observere en betydelig utfelling av tungtløselige salter. Dersom disse ikke filtreres bort vil de tette SPE-kolonnene og gjøre ekstraksjon umulig.

Saltet ble derfor filtrert bort ved hjelp av glassfiberfilter med 1,2 µm partikkelretensjon (VWR 696), büchnertrakt, vakuumbolbe og vannstrålevakuum. Filteret ble byttet hver gang salt stoppet gjennomstrømmingen (anslagsvis et 20-talls filtre per prøve).

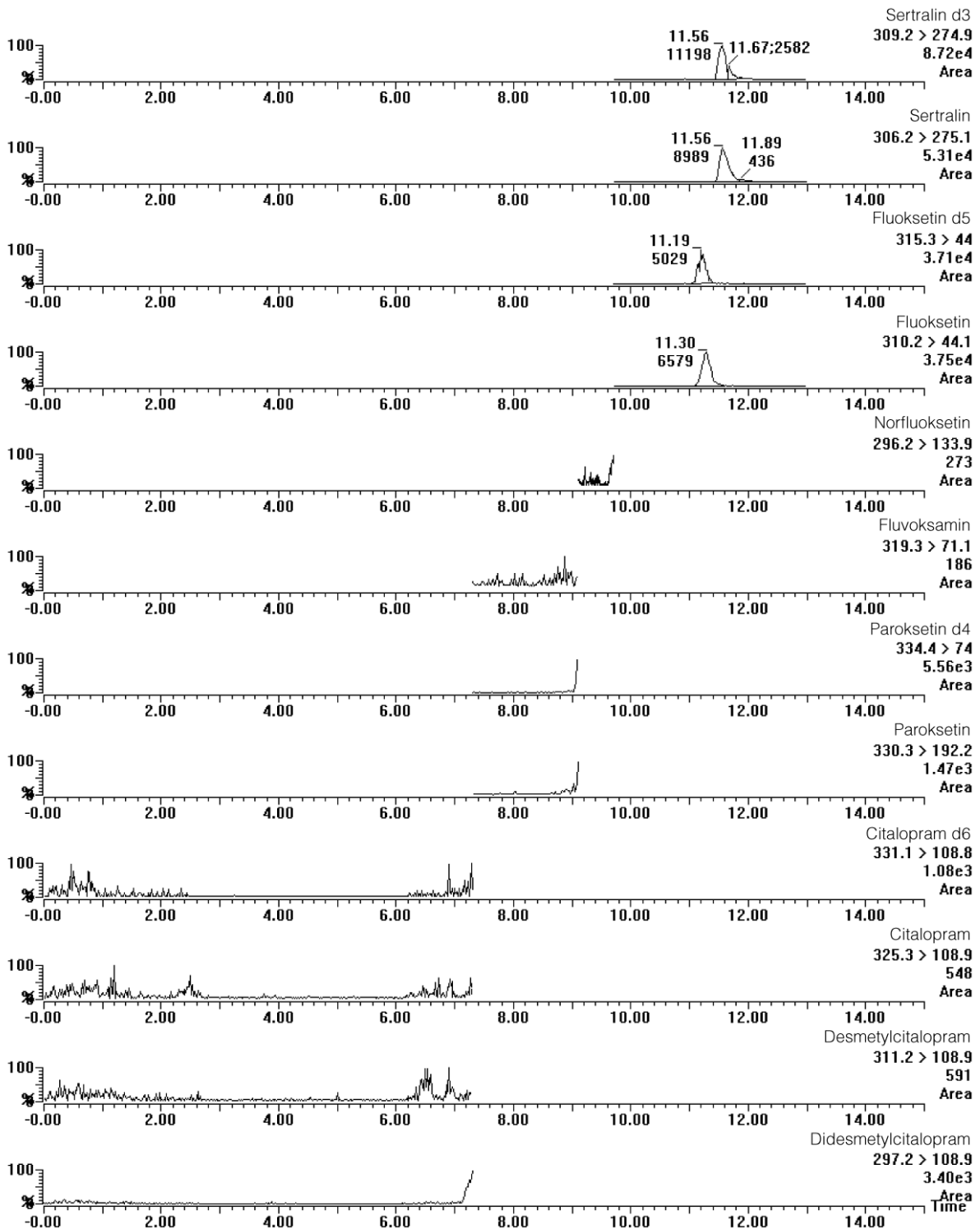
Ekstraksjon og reduksjon av prøvevolum ble gjennomført på samme måte som for ferskvannsprøvene, men av 9 l prøvevolum ble bare 7 l ekstrahert fordi salt stoppet gjennomstrømmingen i SPE-kolonna. Én filtrering ble vurdert som ikke tilstrekkelig, og dobbel filtrering ble derfor benyttet videre.

Heretter ble Nano UPLC benyttet som eneste LC-MS/MS-oppsett. I ferskvannsprøvene fant man signaler, men retensjonstiden var kraftig forskjøvet sammenlignet med ikke ekstraherte standarder (Figur 21 og Figur 22). Saltvannsprøvene ga ingen sikre resultater (Figur 23).

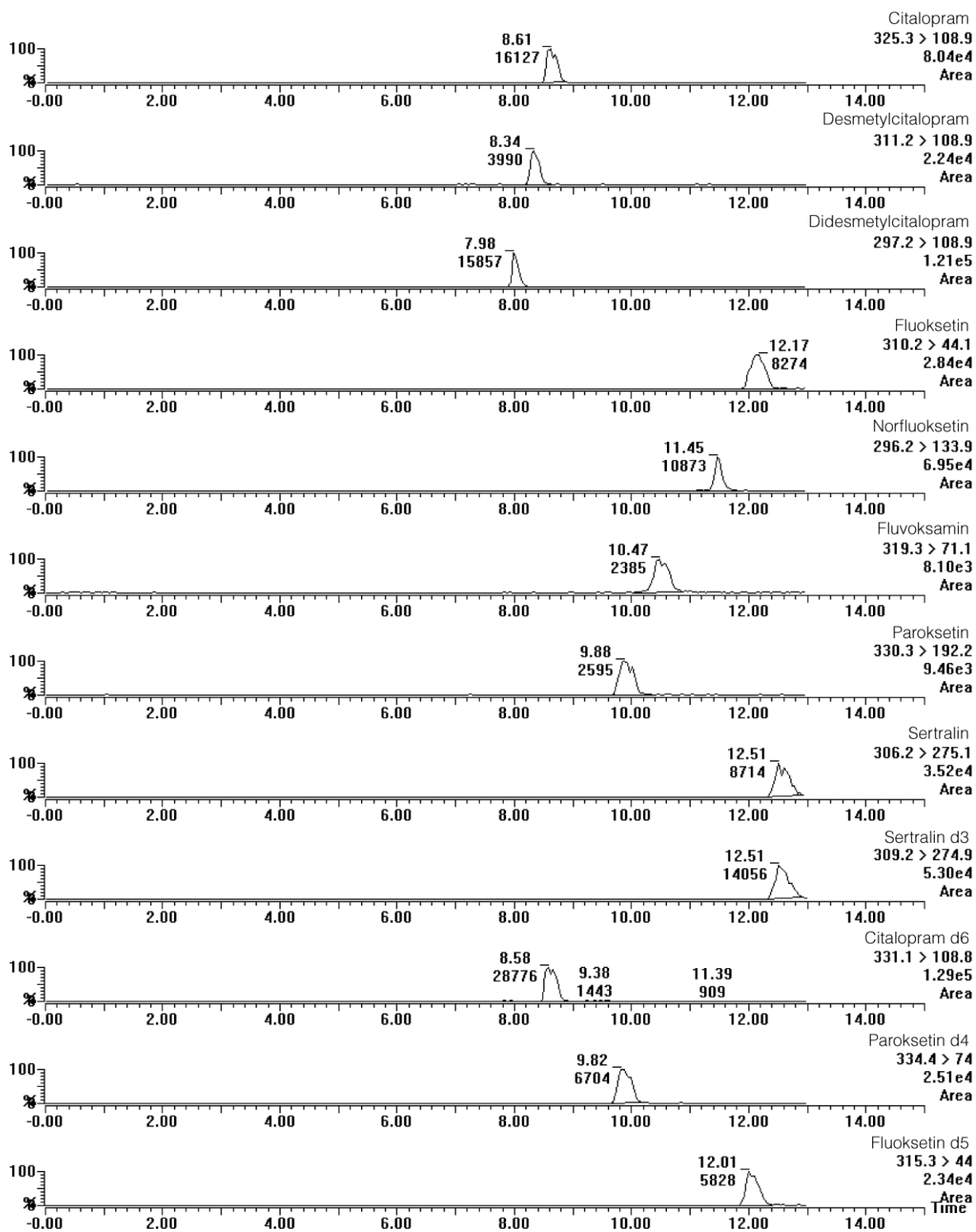
Heretter ble saltvann benyttet til alle prøver.



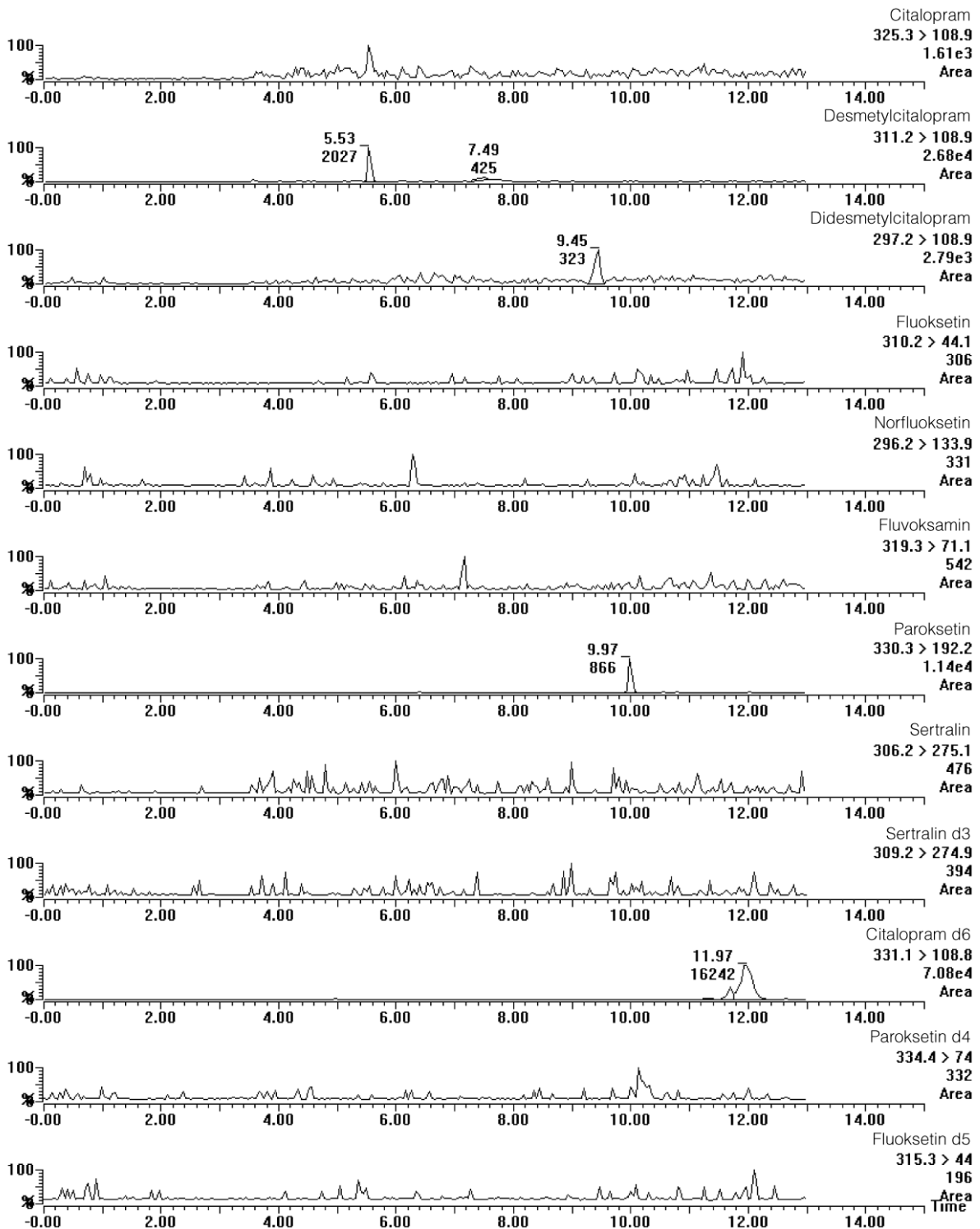
Figur 20 - Samme prøve som i Figur 18 (Trinn 3, 2,5 g XAD7), men analysert ved hjelp av UPLC og Quattro Premier XE-detektor. Alle forbindelser tilsatt i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/l. Merk responsforskjellen mellom de to LC-MS/MS-oppsettene.



Figur 21 – Trinn 5, prøve med stort volum ekstrahert med 2 g XAD7. Ferskvannsprøve på 9 l tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/9L.



Figur 22 - Samme prøve som i Figur 21 (Trinn 5), men analysert med MRM-metode uten tidsvinduer.
NB: Rekkefølgen på de ulike kanalene er endret.



Figur 23 – Trinn 5, prøve med stort volum ekstrahert med 2 g XAD7. Sjøvannsprøve på 9 l (hvorav 7 L ble ekstrahert) tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende en sluttkonsentrasjon på 50 ng/9L. NB: Rekkefølgen på de ulike kanalene er endret.

Trinn 6: Oppskalering til 4,5 g sorbent med 10 l sjøvannsprøver, dobbel filtrering og eluering med MeCN.

10 l PE-dunker (Polimoon) ble benyttet som prøvebeholdere. Prøvene ble som tidligere tilsatt SSRI'er og IS'er til en sluttkonsentrasjon på 50 ng/10 l, samt 100 ml 5M NaOH-løsning. Når utfelt salt hadde sedimentert ble prøvene filtrert og overført til tom dunk. Deretter ble en andre filtrering utført og prøvene tilbakeført i opprinnelige (vasket) prøvebeholdere. Det ble også forsøkt å filtrere prøver som fikk stå en natt for utfelling og sedimentasjon. I dette trinnet ble elektrisk vakuumpumpe tatt i bruk, noe som forkortet tiden som gikk med til filtrering betraktelig. Henstand over natt gjorde også filtreringsarbeidet vesentlig enklere, og man hadde ingen problemer med utfelling mellom første og andre filtrering.

6 ml glasskolonner ble så pakket med 4,5 g XAD7 og vasket med 50 ml MeOH og kondisjonert med 50 ml vann. Prøvene ble ekstrahert med gjennomstrømning på om lag 130 ml/min og kolonnene ble deretter skylt med 500 ml vann (10-20 ml/min) og tørket ved å trekke luft gjennom i 5 minutter.

I dette trinnet ble MeCN tatt i bruk som elueringsvæske fordi MeCN muliggjør "utfrysing" av saltholdig vannfase (se Trinn 7 for nærmere beskrivelse). Prøvene ble så eluert i tre fraksjoner á 15 ml MeCN for å bestemme hvor stor mengde elueringsvæske som var nødvendig for å eluere analyttene fra sorbenten.

Da prøvevolumet ble redusert på varmeblokk under N₂-strøm fikk man etter hvert saltutfelling. I et forsøk på å fjerne dette saltet fra prøven ble prøven dampet til tørrhet og reagensrøret vasket med 1 ml n-pentan i den hensikt å ekstrahere forbindelsene fra saltet da Vasskog et al. har vist at n-pentan egner seg til dette formålet [3].

Pentan-fasen ble så ble overført til HPLC-vial og dampet til tørrhet. HPLC-vialene ble så tilsatt 200 µl MeCN:vann 70:30 og prøvene analysert.

Fraksjon 1 ga noen signaler, men kromatografien var dårlig og mye tydet på at retensjonstiden var kraftig forskjøvet (Figur 24). Fraksjon 2 og 3 inneholdt svært små mengder stoff.

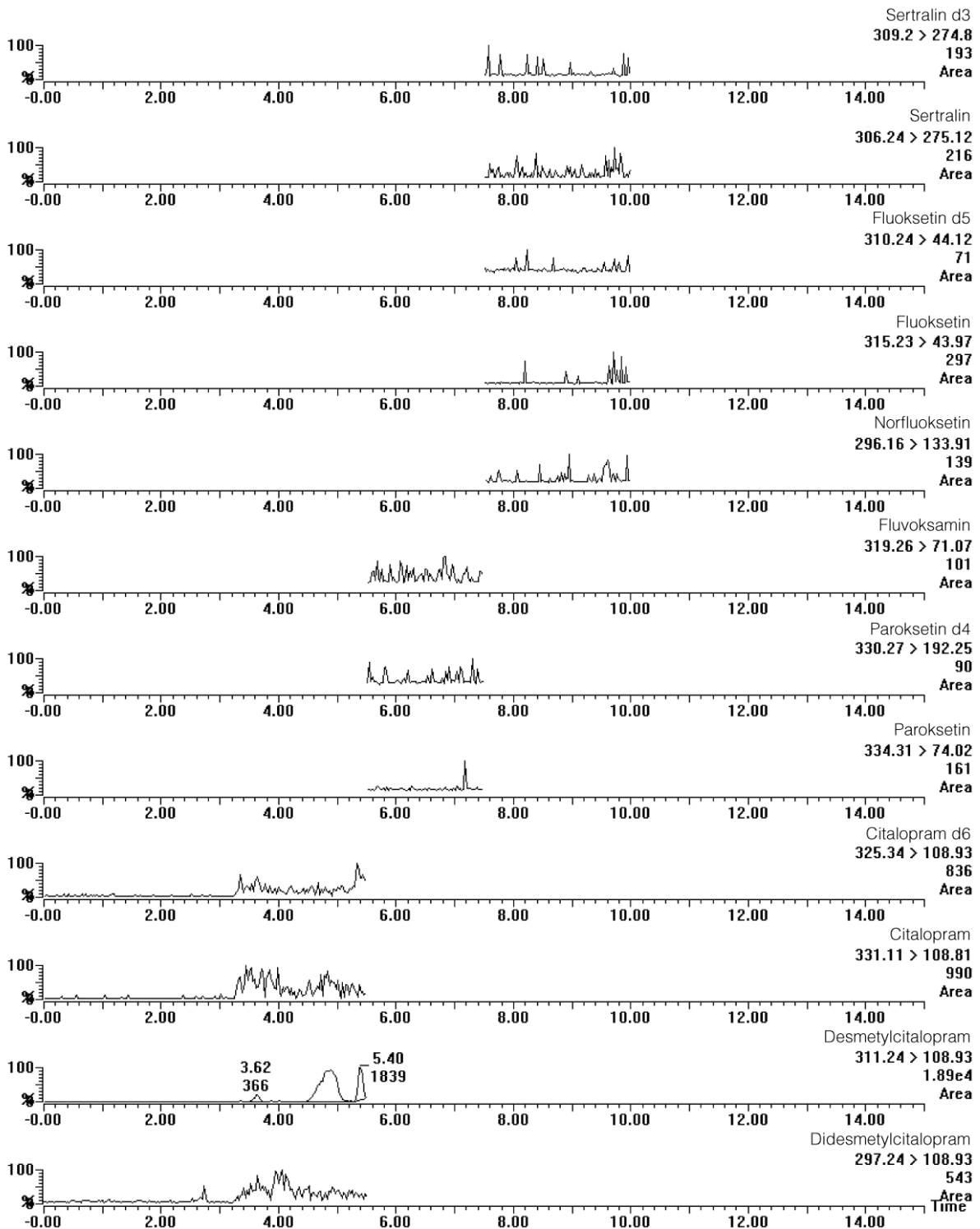
Trinn 7: Introduksjon av avsaltningsteknikk og sentrifugering.

I et forsøk på å fjerne salt fra den eluerte prøven ble det i dette trinnet tatt i bruk en metode basert på arbeid av Gu et al. [38, 39]. Metoden går ut på at man ved å fryse en blanding av MeCN og vann vil indusere et faseskille. Nedre fase vil da kunne bestå av opptil 65 % (v/v) vann og 35% MeCN. I vår metode vil da den øvre, organiske fasen inneholde størsteparten av analyttene.

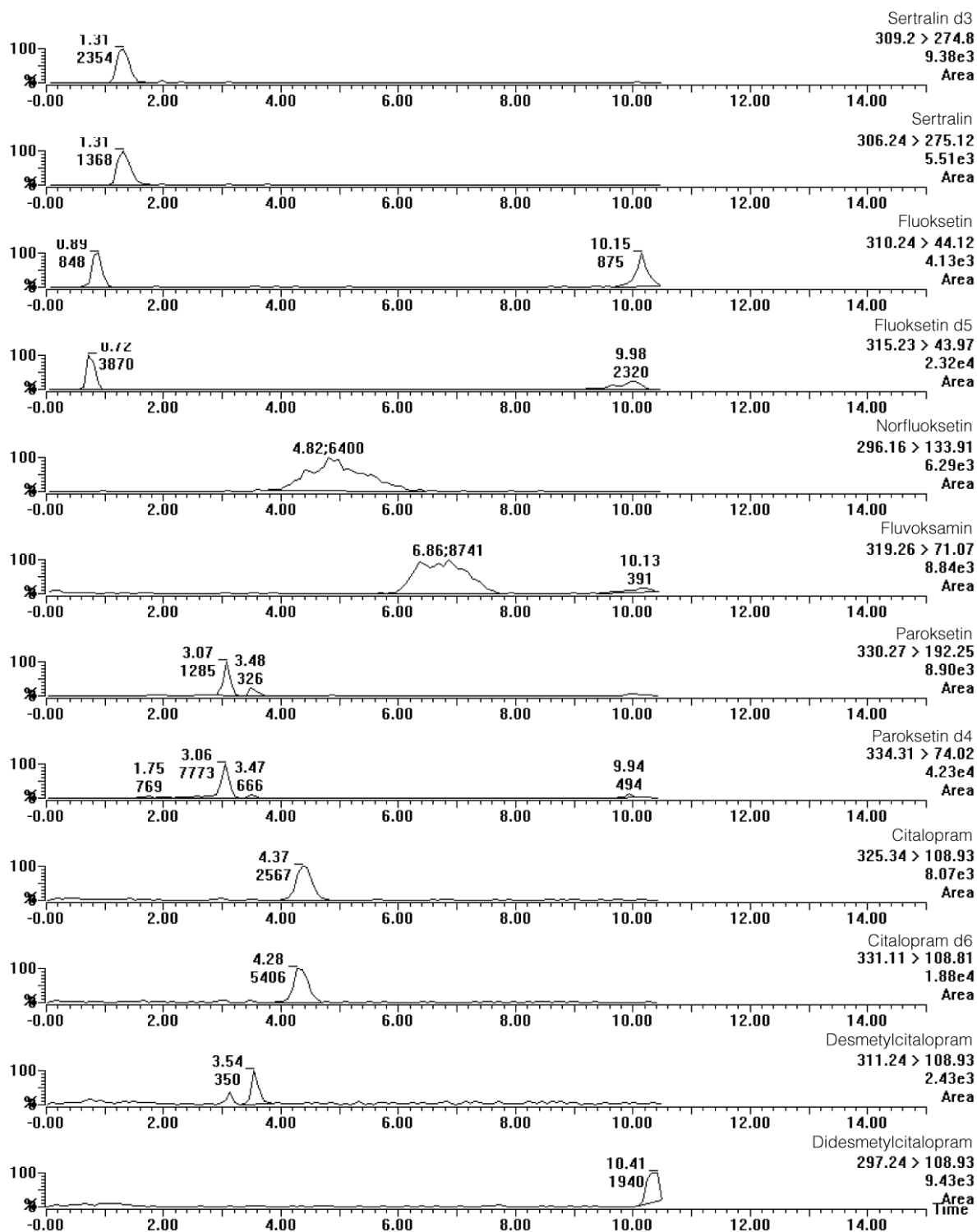
Prøveopparbeidelsen for dette trinnet var lik den i Trinn 6, men kolonnene ble bare eluert én gang med 15 ml MeCN. Eluatene ble deretter satt i fryser (-18° C) over natt.

Påfølgende dag ble et tydelig faseskille observert, og vannfasene hadde frosset. Øvre MeCN-fase ble så tatt videre, dampet ned under N₂-strøm og overført til HPLC-vial. Prøvene ble så dampet til tørrhet og reoppløst i 200 µl 70:30 MeCN:vann. Det ble da observert en blakking av prøven.

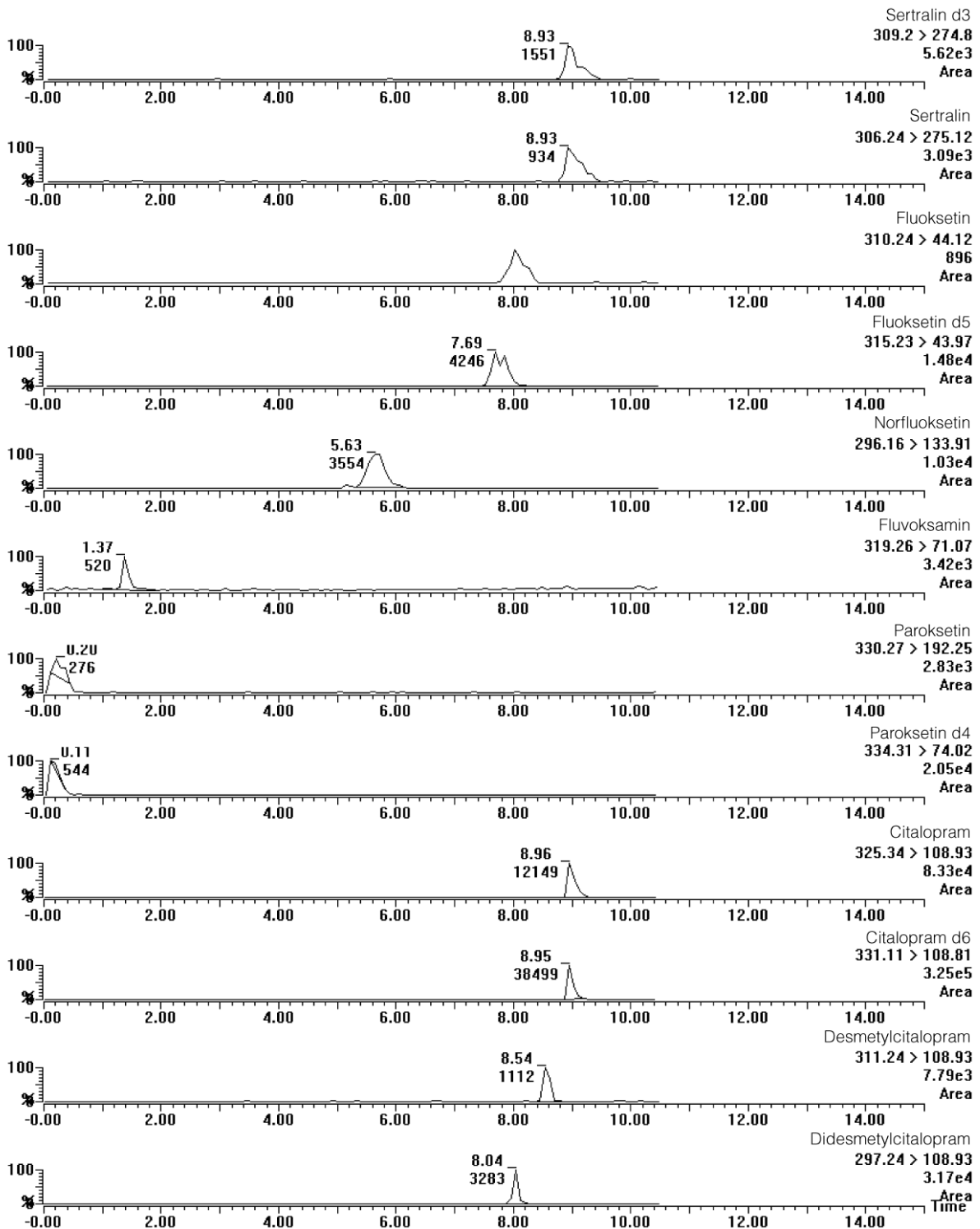
Ved analyse fikk man signaler fra alle stoffene (Figur 25), men kromatografien var ikke tilfredsstillende. 2 dråper maursyre ble forsøksvis tilsatt uten at dette hadde noen effekt på kromatografien. Prøven ble derfor ført tilbake til reagensrør og sentrifugert ved 4500 rpm i 5 minutter. Etter sentrifugeringen inneholdt reagensrørene en blank prøve med hvitt bunnfall. Prøven ble så forsiktig tatt ut og analysert på nytt. Dette resulterte i bedre kromatografi, men retensjonstidene var til dels kraftig forskjøvet (Figur 26).



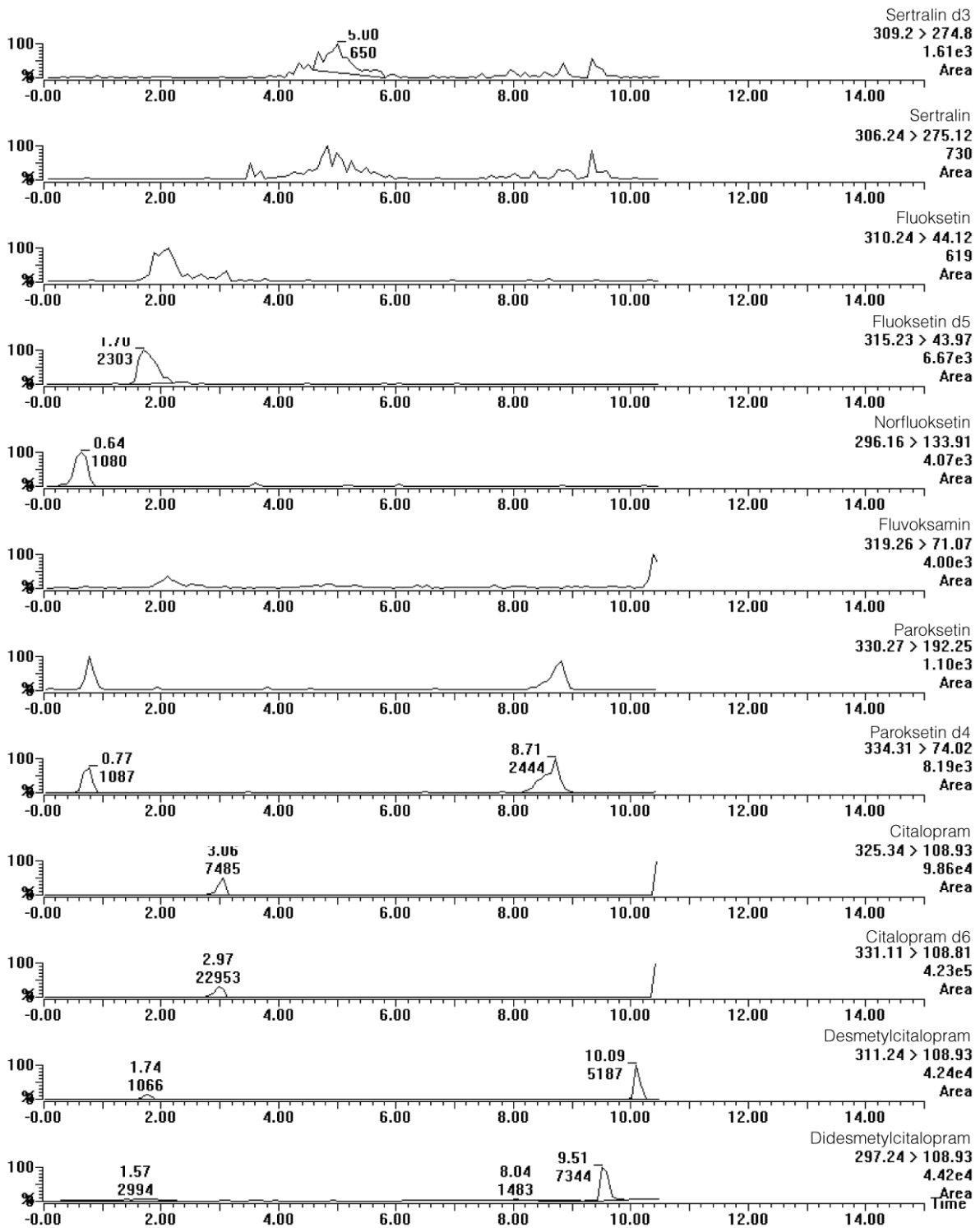
Figur 24 - Trinn 6, oppskalering av mengde sorbent (XAD7) til 4,5 g. Sjøvannsprøve på 10 l tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende sluttkonsentrasjon på 50 ng/10L. Elueringsfraksjon 1 av 3.



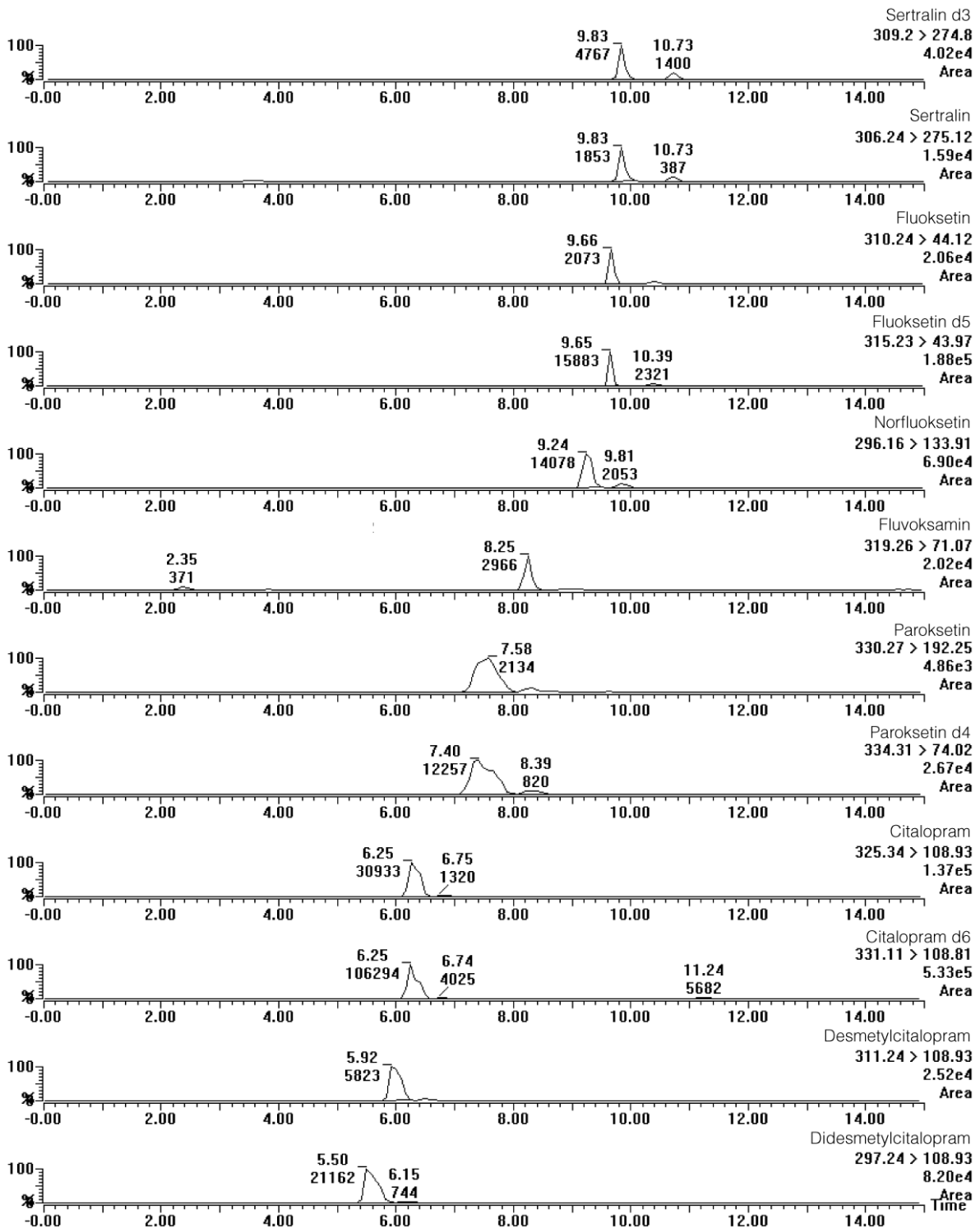
Figur 25 – Trinn 7, introduksjon av MeCN-faseskille ved frysing. Prøve opparbeidet etter metode i Trinn 7 og ekstrahert med 4,5 g XAD7. Sjøvannsprøve på 10 l tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende sluttkonsentrasjon på 50 ng/10L.



Figur 26 – Trinn 7, samme prøve som i Figur 25 etter tilsetning av 2 dråper maursyre og introduksjon av sentrifugering. Prøven ble sentrifugert ved 4500 rpm i 5 min og supernatant analysert.



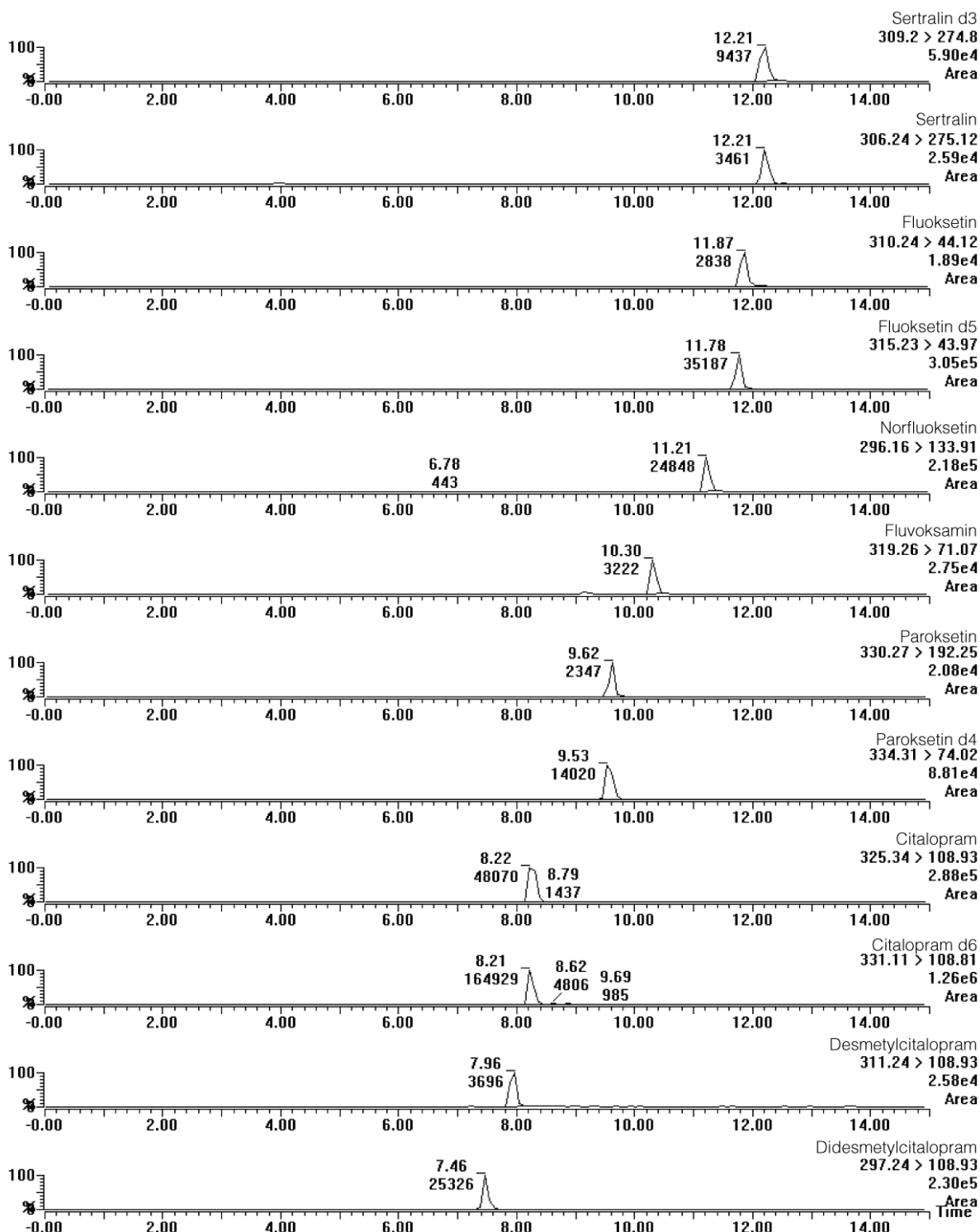
Figur 27 – Eksempel på dårlig kromatografi for parallell av prøve vist i Figur 26 (Trinn 7 med maursyretilsetning og sentrifugering).



Figur 28 - Samme prøve som i Figur 27 (Trinn 7 med maursyretilsetting og sentrifugering) etter om lag 4 timers henstand. Merk bedringen av kromatografiresultatene.

Trinn 8: Introduksjon av sur mobilfase

I dette trinnet ble prøver fra Trinn 7 analysert med 0,1 % (v/v) maursyre tilsatt mobilfasen. Dette ga en vesentlig forbedret kromatografi (Figur 29).



Figur 29 - Trinn 8, introduksjon av sur mobilfase. Samme prøve som i Figur 27 og Figur 28. Toppform og retensjonstid er vesentlig forbedret.

Trinn 9: Introduksjon av 25 g sorbent og prøve uten tilsatt base.

I dette trinnet ble mengden sorbent oppskalert til den endelige mengden vi ønsket å jobbe med. Større mengder sorbent ville øke gjenvinningen og redusere risikoen for gjennombrudd av analytt i sorbenten. Oppskalering kunne potensielt gjøre metoden egnet for større volum enn 10 l. Det ble også undersøkt om økt sorbentmengde kunne gi tilfredsstillende gjenvinning fra prøver med nøytral pH.

60 ml PE-kolonner ble pakket med 25 g XAD7 og PE-fritter ble benyttet. Kolonnene ble vasket med 50 ml MeOH og kondisjonert med 50 ml vann. 10 l sjøvann ble tilsatt 50 ng SSRI og IS og deretter ekstrahert med gjennomstrømming på om lag 130 ml/min. Kolonnene ble så vasket med 1 l vann, og deretter eluert med 15 ml MeCN.

Prøven ble så satt i fryser over natt for å indusere faseskille. Påfølgende dag kunne man ikke observere faseskille lik det man så i Trinn 7, men hele prøven hadde frosset. Dette ble tolket som at prøven ikke inneholdt tilstrekkelig salt til å indusere faseskille, og hele prøven ble derfor dampet ned under N₂-strøm og analysert.

Analyser ga imidlertid ingen resultat (Figur 30).

Trinn 10: Undersøkelser av mengde base tilsatt og pH etter utfelling.

Det var ønskelig å undersøke i hvilken grad utfelling av salter ved tilsetning av base påvirket pH i prøvene. Dette ble gjort ved å tilsette 100 ml 5M NaOH-løsning til 10 l vann og la prøven stå over natt for å la utfelling skje. Deretter ble base tilsatt prøven i porsjoner og pH ble målt etter hver tilsetning ved hjelp av pH-meter.

Tabell 5 - Mengde base (5M NaOH-løsning) tilsatt i hvert trinn i Trinn 10 . *Første måling utført etter en natts henstand.

Tilsetning nr.	Mengde base tilsatt (ml)	Total mengde base tilsatt (ml)	pH målt
1	100	100	*9,5
2	50	150	10,3
3	50	200	10,5
4	100	300	12,1

Trinn 11: Bestemmelse av mengde IS som skal tilsettes, og filtrering av prøve med 150 ml base.

Siden de ulike interne standardene ga ulik respons ved analyse, ble det bestemt å tilsette de ulike IS'ene i ulike mengdeforhold for å kunne få omtrent lik respons. Mengde IS som skulle tilsettes ble bestemt ut fra forholdet mellom de ulike IS'ers respons. Det ble laget separate arbeidsløsninger av hver IS med konsentrasjon på 100 ng/ml. Heretter ble alle prøver tilsatt følgende mengder IS:

Tabell 6 - Mengde av de ulike IS'er som tilsettes prøver i endelig metode

Intern standard	Mengde (ng)	Mengde arbeidsløsning tilsatt (µL)
Citalopram d6	10	100
Fluoksetin d5	25	250
Paroksetin d4	25	250
Sertralin d3	50	500

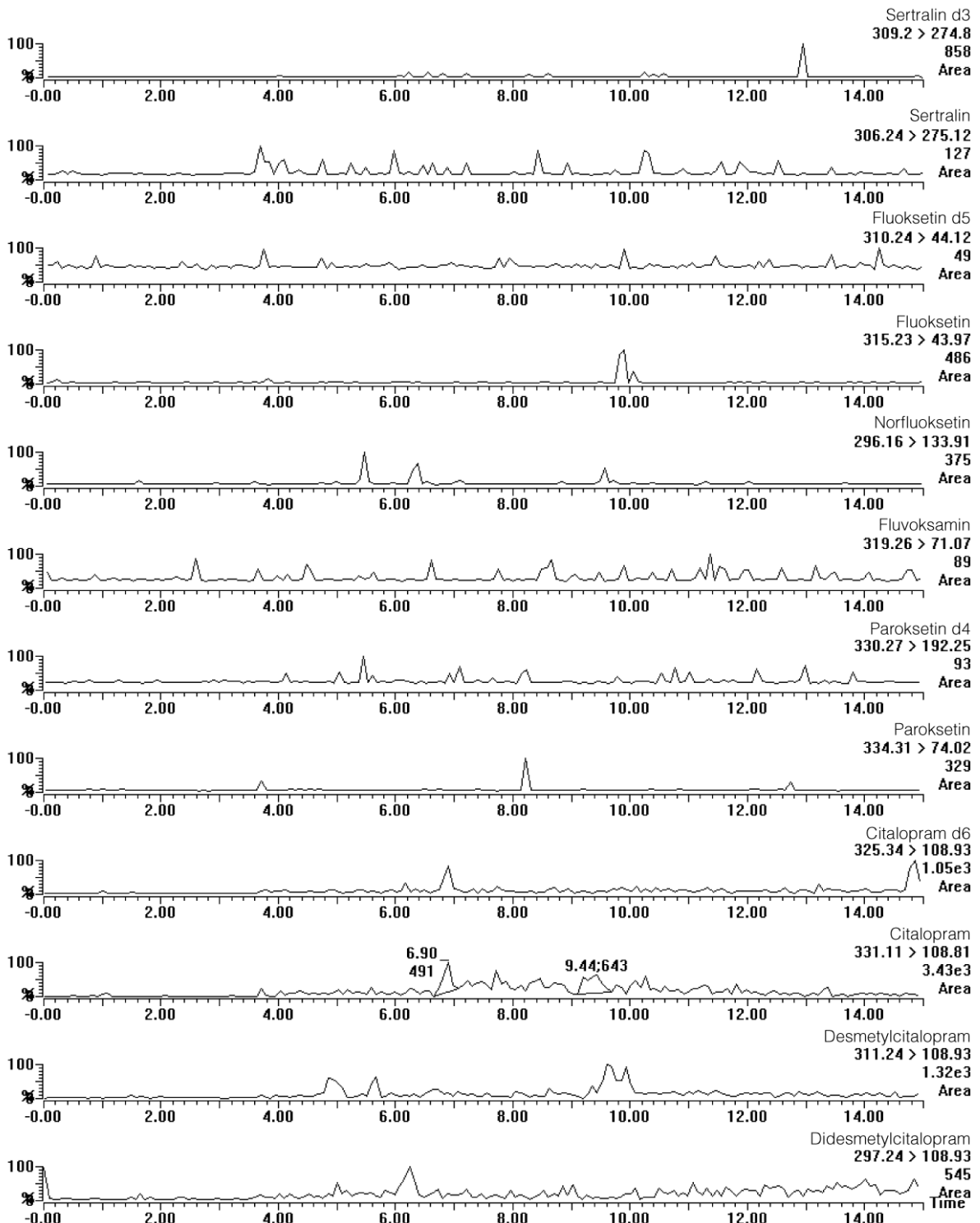
For å teste filtrering av prøver tilsatt 150 ml base ble 3 paralleller á 10 l tillaget. 50 ng SSRI'er og IS i mengder etter Tabell 6 ble tilsatt, samt 150 ml 5M NaOH-løsning. Prøvene fikk stå til neste dag før dobbel filtrering ved hjelp av vakuumpumpe (KNF laboport) ble utført.

Tidsforbruk på hver 10 l prøve ble anslått til å være 3,5 til 4 timer.

Prøvene ble deretter ekstrahert på 60 ml kolonner med 25 g sorbent, vasket med 50 ml MeOH og kondisjonert med 50 ml vann. Etter ekstraksjon ble kolonnene vasket med 500 ml vann og tørket ved å suge luft gjennom før de ble eluert med 2 fraksjoner á 15 ml MeCN. Prøvene ble så satt i fryser over natt. Neste dag ble MeCN-fasene tatt ut, dampet ned og deretter reoppløst i 200 µl 20:80 MeCN:vann og overført til Eppendorf LoBind microsentrifugerør (Sigma). Prøvene ble så sentrifugert ved 13 000 rpm i 5 minutter. Supernatantene ble så tatt ut og tilsatt 50 µl maursyre før analyse.

Disse prøvene ble så sammenlignet med prøver tilsatt 100 ml base (ellers samme parametre som over).

Ingen av prøvene ga god kromatografi ved analyse.



Figur 30 – Trinn 9, introduksjon av 60 ml kolonne og 25 g sorbent (XAD7). 10 l sjøvann uten base ekstrahert. Prøvene ble tilsatt forbindelser i mengder tilsvarende sluttkonsentrasjon på 50 ng/10 l.

Trinn 12: Tillaging av prøver for bestemmelse av LOD og LOQ.

Prøver á 10 l blir tilsatt SSRI konsentrasjoner på henholdsvis 1, 0,1 og 0,01 ng/10L, samt IS. Prøvene blir opparbeidet, ekstrahert og eluert etter samme metode som i Trinn 11. Analysene gir ingen god kromatografi og har derfor ingen verdi.

Trinn 13: Forsøk med ulike væske-væske-ekstraksjoner.

Det ble mistenkt at det fortsatt var komponenter som kunne gi ionsuppresjon eller addukter tilstede i prøvene. Det ble derfor forsøkt to ulike væske-væske-ekstraksjoner [3] på prøver opparbeidet, ekstrahert og eluert etter metode i Trinn 11.

Metode 1: MeCN-fase fra induksjon av faseskille i fryser ble dampet ned og reoppløst i 2 ml vann. Prøven ble tilsatt 2 dråper 5M NaOH-løsning slik at legemidlene ikke skulle være ioniserte, og deretter ekstrahert med 3 volum á 0,5 ml n-pentan i den hensikt å ekstrahere legemidlene. Samlet pentanfase ble dampet ned og reoppløst i 20:80 MeCN:vann.

Analyse ga ingen resultater.

Metode 2: MeCN-fase fra induksjon av faseskille i fryser ble dampet ned og reoppløst i 2 ml vann. Prøven ble tilsatt 2 dråper maursyre slik at legemidlene skulle være ioniserte, og deretter ekstrahert med 3 volum á 0,5 ml n-pentan – dette for å se om forstyrrende komponenter også var løselige i pentan. Vandig fase ble her analysert.

Analyse ga ingen resultater.

Trinn 14: Stammer interfererende komponenter fra sorbent?

For å teste om komponenter som kunne forstyrre kromatografien stammet fra sorbenten, ble 2 kolonner med 25 g XAD7 pakket. Sorbentene ble vasket med 50 ml MeOH og deretter kondisjonert med 50 ml vann. Deretter ble kolonnene eluert direkte med 3 fraksjoner á 30 ml MeCN. Hver eluerte fraksjon ble så tilsatt 50 ng SSRI og IS.

I laboratoriet ved UNIS hadde man tilgang på TurboVap 500 fordampningssystem (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA, USA). Fraksjonene ble ved hjelp av TurboVap dampet ned til ~1 ml, overført til HPLC-vialer og deretter dampet ned på varmeblokk under N₂-strøm til tørrhet.

Videre ble ytterligere 2 kolonner pakket med 25 g sorbent og deretter vasket med ~10 l vann før kondisjonering med 100 ml MeOH og deretter 250 ml vann. Kolonnene ble som over eluert direkte med 3 fraksjoner á 30 ml MeCN, og fraksjonene dampet ned og overført til HPLC-vialer.

I Tromsø ble prøvene reoppløst i 20:80 MeCN:vann og analysert. Fraksjon 1 for begge metoder viste kromatografiforstyrrelser lik de man hadde sett tidligere, mens fraksjon 2 og 3 ikke viste de samme forstyrrelsene.

Trinn 15: Preliminær endelig ekstraksjonsmetode

Basert på resultatene fra **Trinn 14** valgte man derfor å gå videre med en metode hvor man:

1. Vasker sorbent med ~10 l vann
2. Vasker sorbenten med 50 ml MeCN
3. Vasker sorbenten med 50 ml MeOH
4. Kondisjonerer med 250 ml vann
5. Ekstraherer med 50 ml MeCN.

3 paralleller á 10 l ble tilsatt 100 ng SSRI og IS i mengder etter Tabell 6. Prøvene ble så opparbeidet med dobbel filtrasjon og deretter ekstrahert med metoden over. Eluatene ble neddampet og det ble observert at eluatene var vesentlig mindre turbid enn med tidligere metoder. Prøvene ble overført til HPLC-vialer og reoppløst i 20:80 MeCN:vann og 50 µl maursyre før analyse.

Analysene viste en bedre, men ikke tilfredsstillende kromatografi.

Trinn 16: Endelig metode

Prøvene fra Trinn 15 ble overført til reagensrør og dampet til tørrhet. Deretter ble prøvene reoppløst i en blanding av 1 ml vann og 2 ml MeCN. Vialene ble så satt i fryser for induksjon av faseskille. MeCN-fase ble så tatt ut og dampet ned til lite volum og overført til HPLC-vialer. 50 µl maursyre ble tilsatt vialene før analyse. Her ble ikke prøvene tilsatt vann da restvolumet på grunn av langsom neddamping ble vurdert til å inneholde vann.

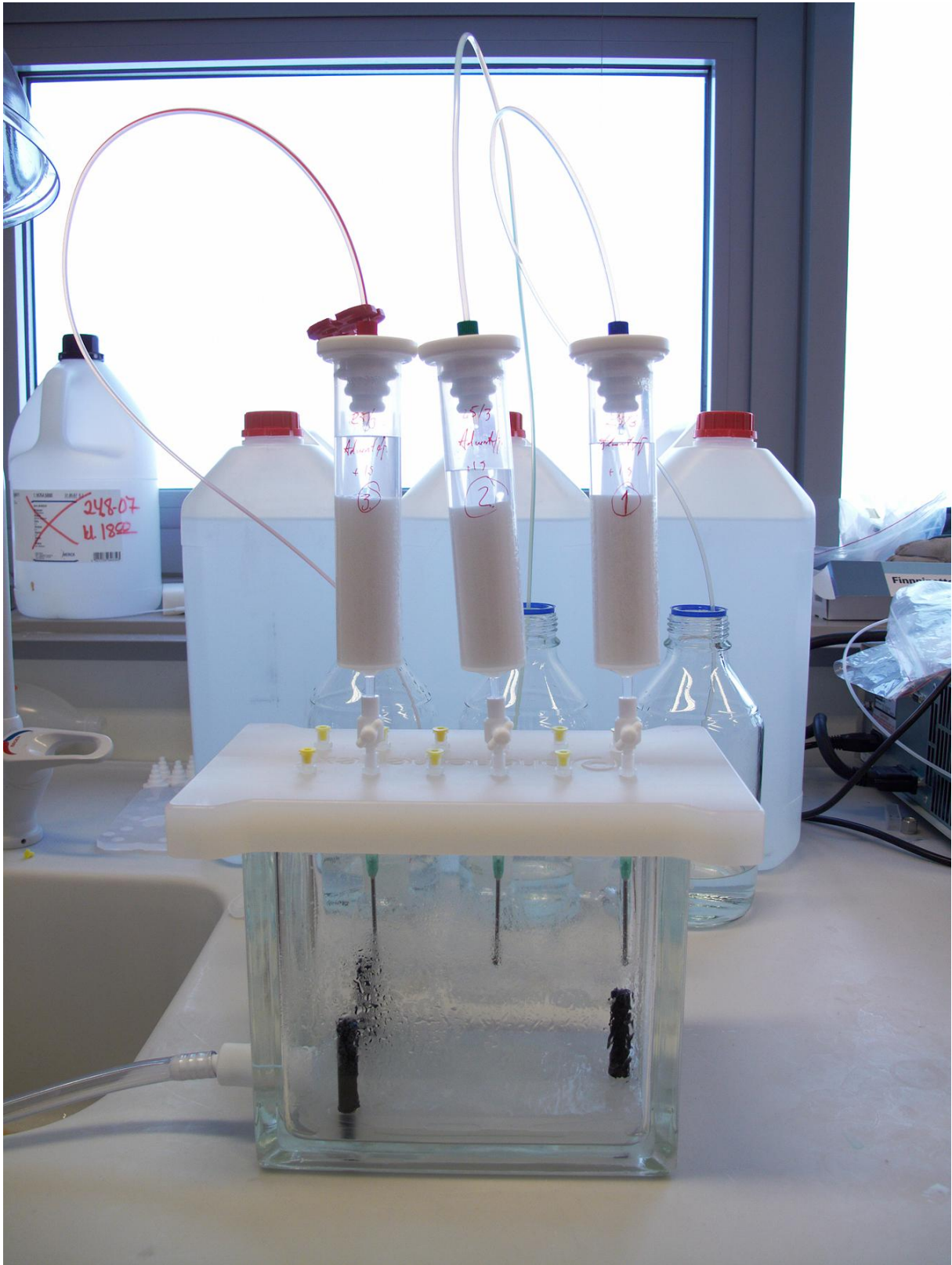
Analysene viste nå en relativt tilfredsstillende kromatografi (Figur 32).

Da SSRI'ene ved nøytral pH har god vannløselighet ble det forsøkt å ekstrahere samme vannfase som over på nytt, men nå med tilsatt base. 2 dråper 5M NaOH-løsning ble tilsatt reagensrørene, sammen med 2 ml MeCN. Prøvene ble satt i fryser for induksjon av faseskille og MeCN-fasen ble på nytt tatt ut, dampet ned, overført til HPLC-vialer og tilsatt 50 µl maursyre før analyse.

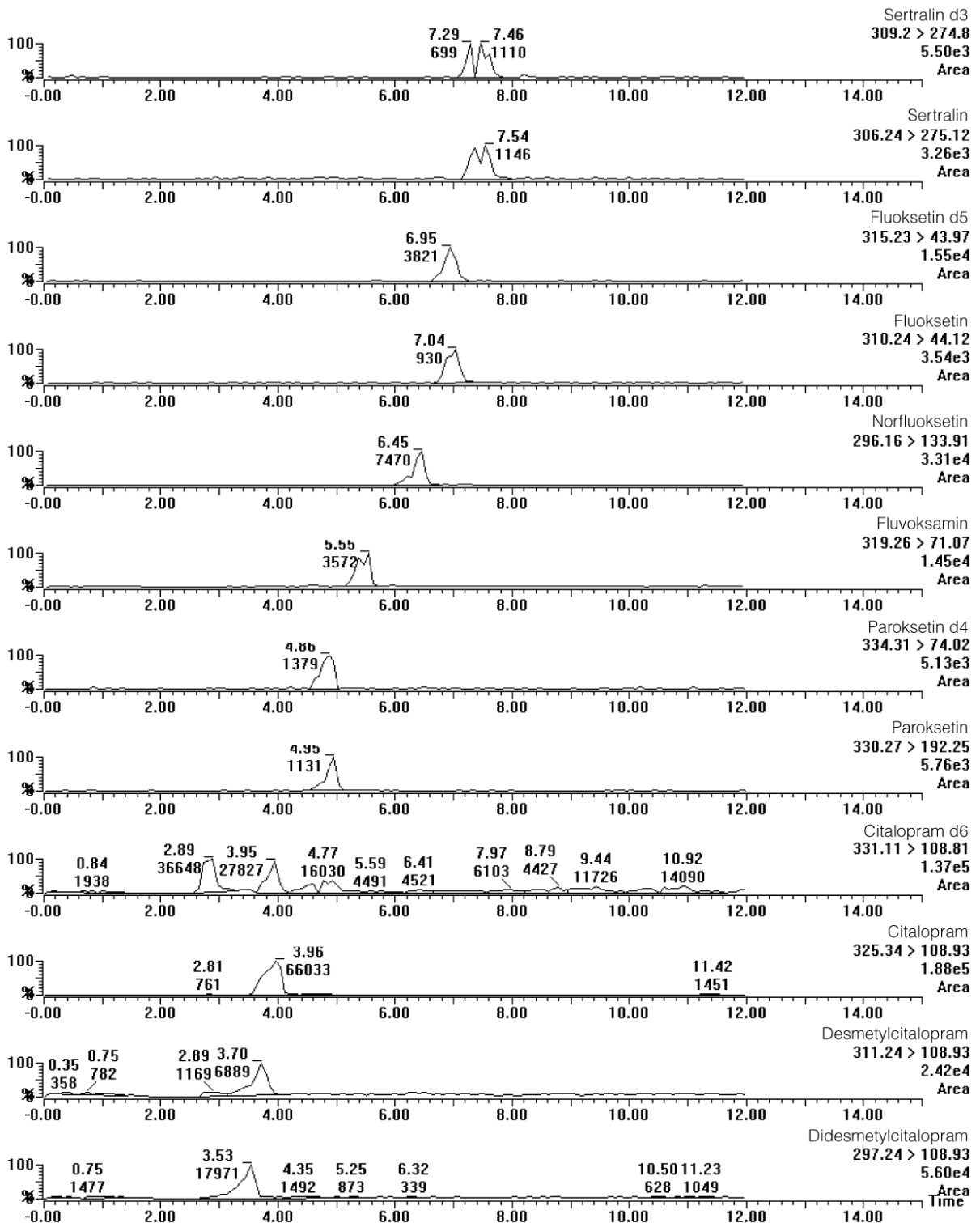
Denne metoden ga en tilfredsstillende kromatografi (Figur 33). Endelig metode er oppsummert i Tabell 7.

Tabell 7 - Endelig metode oppsummert.

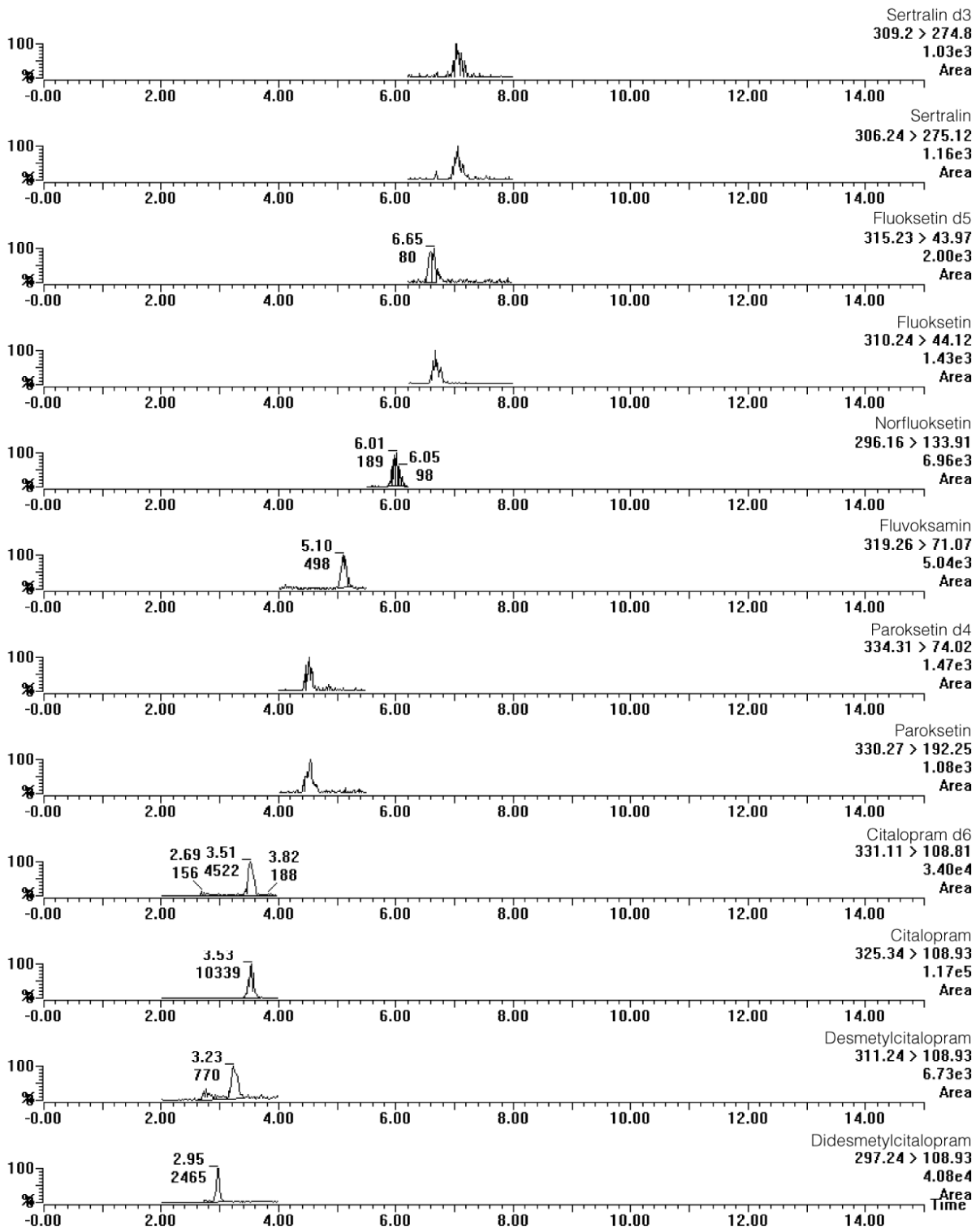
Prøveopparbeidelse	Ekstraksjon	Eluering
Prøve tilsettes IS etter mengde i Tabell 6	60 ml PE-kolonne pakkes med 25 g XAD7HP sorbent; PE-fritter over og under sorbent	
↓	↓	
Prøve tilsettes 100 ml 5M NaOH-løsning; Prøve står i minimum 12 timer før filtrering	Kolonne vaskes med ~10 l vann	
↓	↓	
Prøven filtreres to ganger vha. vakuumpumpe og glassfiberfilter.	Kolonne vaskes med 50 ml MeCN og deretter 50 ml MeOH, før den kondisjoneres med 250 ml vann	
→	↓	
	Prøve ekstraheres med gjennomstrømningshastighet på ca. 130 - 150 ml/min	
	↓	
	Kolonne skylles med 500 ml vann og tørkes vha. vakuum i 5 minutter	
→	↓	
	↓	↓
	↓	Eluat tilsettes 50 µl 5M NaOH-løsning og settes i fryser for induksjon av faseskille; MeCN-fase tas ut, dampes ned, 50 µlmaursyre tilsettes og prøvene analyseres



Figur 31 - SPE-oppsett med 60 ml kolonner på vakuumanifold. Prøver på 10 l PE-kanner i bakgrunnen.



Figur 32 - Trinn 16, forsøk med ytterligere vask av sorbent før ekstraksjon. 10 l sjøvannsprøve tilsatt forbindelser tilsvarende sluttkonsentrasjon på 100 ng/10 l.



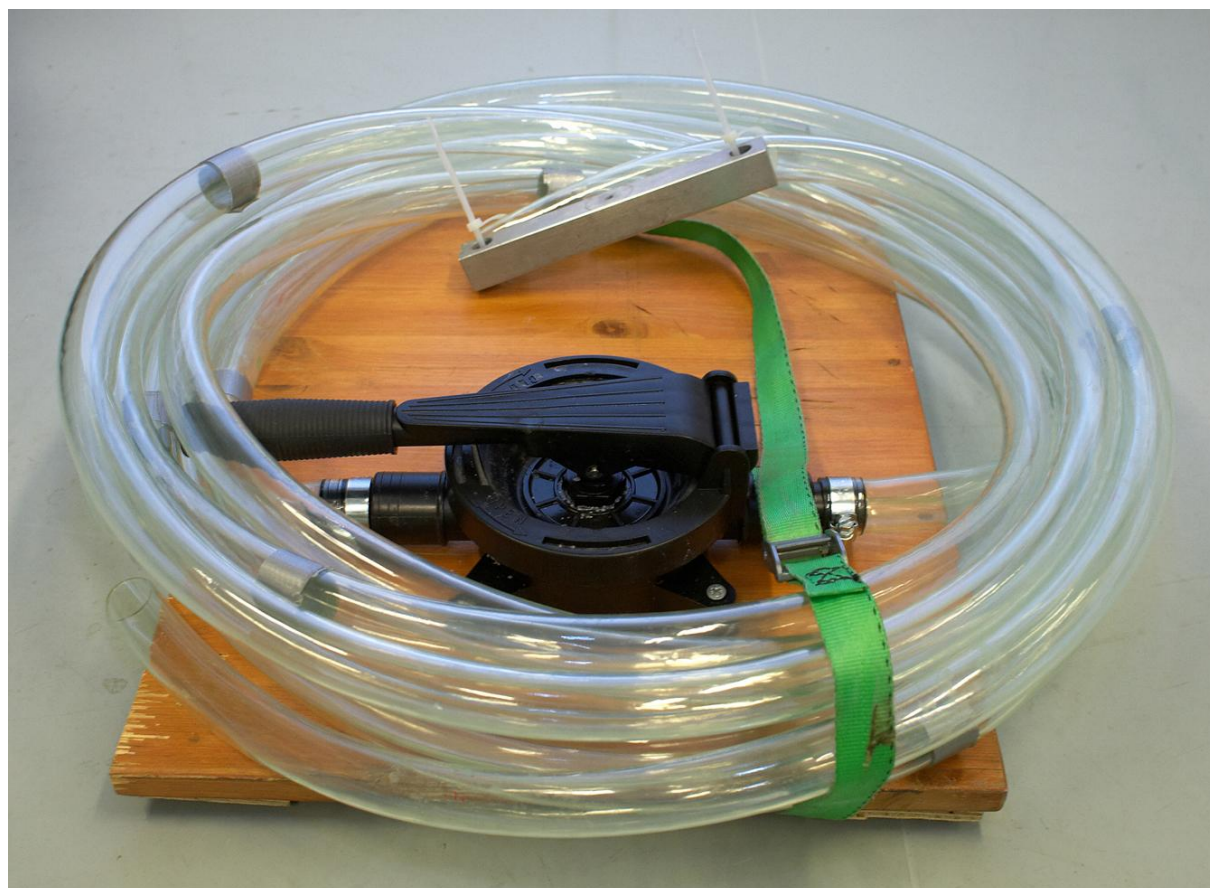
Figur 33 - Trinn 16. Samme prøve som i Figur 32, men med MeCN faseskillemetode og påfølgende basisk væske-væske-ekstraksjon (Trinn 16 metode).

4.3.4 Steder for prøvetaking

Sjøvannsprøver ble samlet inn fra Longyearbyen og Ny-Ålesund (begge Svalbard). Se Tabell 8 for ytterligere informasjon. Det var i utgangspunktet ønskelig å samle prøver i umiddelbar nærhet av avløpsvannutslippene ved hjelp av båt, men på grunn av sjøisforholdene lot dette seg ikke gjennomføre. Sjøvannsprøvene ble derfor samlet ved å bore hull i sjøisen og ved hjelp av håndpumpe pumpe sjøvann direkte i 10 l PE-kanner fra om lag 5 meters dyp.

Tabell 8 - Lokalteter og tidspunkt for prøveinnsamling

Lokalitet	Koordinater	Tidspunkt	Mengde	Kart
Longyearbyen	N78°15,041' Ø15°39,019'	25/03-2009	3 x 10L	Figur 38 Punkt 1
Ny-Ålesund	N78°55,699' Ø11°56,134'	11/03-2009	3 x 10L	Figur 39 Punkt 1



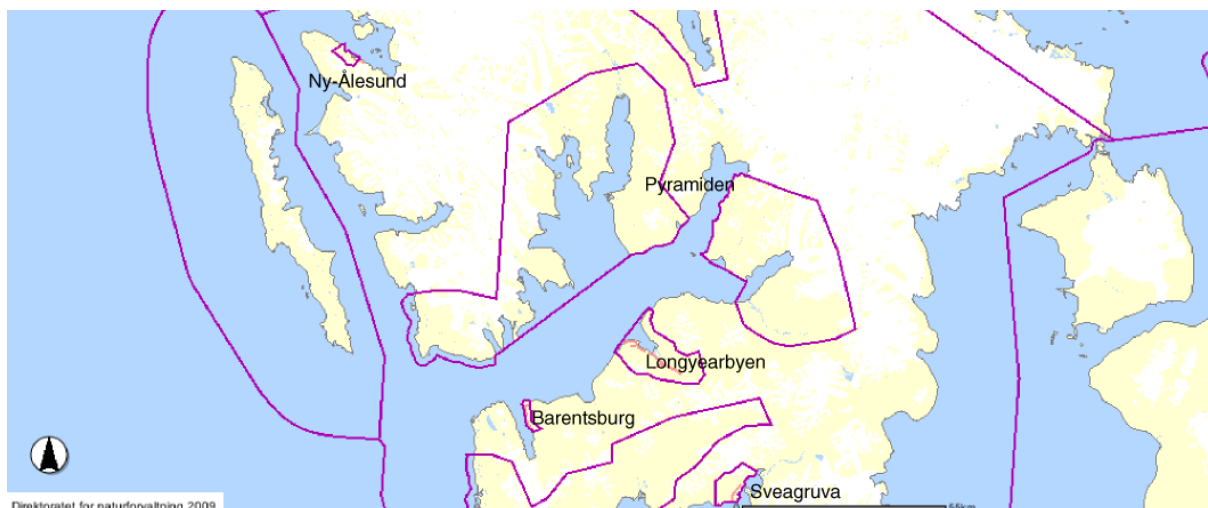
Figur 34 - Pumpe for prøvetaking. Håndpumpe (membrantype) med kapasitet på 0,5 l/slag og 10 m 1" vinylslange med lengdemerking. Slangen er påmontert blylodd.



Figur 35 - Prøvetaking på sjøis på Adventfjorden, 25/03-2009



Figur 36 - Prøvetaking på sjøis ved Ny-Ålesund, 11/03-2009



Figur 37 - Oversiktskart over Midt-Spitsbergen (Kart: Direktoratet for naturforvaltning)



Figur 38 - Lokaliteter for prøveinnsamling i Longyearbyen. (Blå stiplet linje viser eksisterende avløpsvannledning.) X: Utslipp for avløpsvann, 60 meter under overflaten. 1: Prøveinnsamling 25/3-09 (Kart: Direktoratet for naturforvaltning)



Figur 39 - Lokaliteter for prøveinnsamling i Ny-Ålesund. X: Utslipp for avløpsvann fra marinlab. Y: Utslipp for avløpsvann fra Ny-Ålesund. 1: Prøveinnsamling 11/03-09 (Kart: Direktoratet for naturforvaltning)

5. Resultater og diskusjon

5.1 Metodeutviklingen

Det har i løpet av oppgaveperioden blitt testet en lang rekke ulike parametre i forsøk på å komme frem til en fungerende metode. Som man kan se fra de 3 innledende trinnene av metodeutviklinga var man i stand til å produsere gode resultater i form av god kromatografi ved bruk av små prøvevolum og små mengder sorbent. Problemene skulle imidlertid vise seg å bli større etter hvert som prøve- og sorbentvolumene ble oppskalert.

Basert på anbefalinger i produktdata for sorbenten XAD2 [37] ble ikke sorbentene kondisjonert med vann før ekstraksjon, men bare skylt med MeOH. Kolonnene ble heller ikke skylt med vann etter ekstraksjon, men eluert direkte. Utilfredsstillende kromatografi i trinn 1 og 2 (Figur 12, Figur 13 og Figur 14) kan nok delvis forklares på grunn av dette. I trinn 2 (Figur 14) ser man også en betydelig forverring i kromatografien når basisk prøve ble introdusert. Det ble mistenkt at dette kunne skyldes Na^+ -addukter, men ”full scan” ved hjelp av MS for å lete etter molekylion, $[\text{M}+\text{Na}]^+$ ble ikke utført. Mye taler likevel for en slik årsakssammenheng da kromatografien ble betydelig forbedret ved skylling av sorbenten med vann etter ekstraksjon (Figur 15 og Figur 16).

Basert på forholdet mellom arealene til standardløsninger og prøver ekstrahert ble gjenvinningen for 0,5g anslått til å være 20-30%, og det ble derfor bestemt å øke sorbentmengden.

Ved oppskalering til 2,5 g sorbent (trinn 3) fikk man også god kromatografi. I dette trinnet var det ønskelig å avklare hvilken sorbent som ga best gjenvinning, og XAD7 ga vesentlig bedre areal under toppene enn XAD2 (Figur 17 og Figur 18). XAD7 ble derfor valgt som sorbent i den videre metodeutviklingen.

I trinn 4 ble ammoniakk testet som alternativ base til natriumhydroksid. Det var ønskelig å undersøke hvorvidt en annen base ville gi endring i gjenvinning. Om man sammenligner arealene under toppene i Figur 19 med Figur 18, er det tydelig at prøven tilsatt natriumhydroksid ga vesentlig bedre gjenvinning enn prøven tilsatt ammoniakk. NaOH ble valgt som base videre i metoden.

Fra trinn 5 ble alle prøver analysert på Nano UPLC LC-MS/MS-oppsett. Figur 20 viser samme prøve som i Figur 18 og økningen i respons på analyttene er betydelig.

I trinn 5 ble prøvevolumet oppskalert fra 1 l til 9 l. Det var også i dette trinnet at problemene begynte å manifestere seg. Sammenlignet med standardløsninger ble retensjonstidene for ferskvannsprøvene betydelig forskjøvet og betydelige mengder støy kunne observeres (Figur 21). Ved andre gangs analyse med MS-metode uten tidsvinduer (Figur 22) viste samme prøve mindre støy og bedre toppform. Likevel var retensjonstiden for første forbindelse (didesmetylcitalopram) forskjøvet med omtrent 1,5 minutter, mens forskyvningen for påfølgende forbindelser ble gradvis mindre. Retensjonstiden for sertralin, sist eluert, ble forskjøvet med om lag 1 minutt.

Saltvannsprøvene i trinn 5 ble filtrert kun én gang, og dette resulterte i at utfelt salt stoppet gjennomstrømningen i kolonnene. Derfor ble kun 7 av 9 l ekstrahert. Kromatografien for saltvannsprøvene var imidlertid svært dårlig, og kun desmetylcitalopram, didesmetylcitalopram, paroksetin og paroksetin d4 ga topper som var særlig høyere enn bakgrunnsstøyen (Figur 23).

Utfelling av tungtløselige salter var en utfordring under hele metodeutviklingsprosessen. Sjøvann inneholder om lag 3,48% salt, hvorav NaCl utgjør om lag 86%. Resten utgjøres av blant annet Mg^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Br^+ , I^- , SO_4^{2-} og CO_3^{2-} [40]. Det kan derfor være nærliggende å tro at de tungtløselige saltene kan være ulike karbonater eller sulfatsalter av for eksempel Ca^{2+} og K^+ , men saltene har ikke blitt identifisert.

For å unngå at saltene skulle tette kolonnene under ekstraksjon ble det erfart at prøvene måtte filtreres to ganger. Dette fordi dersom prøvene ble filtrert før utfellingen var komplett kunne man oppleve en ny utfellingsreaksjon i prøven. Det ble derfor besluttet å la prøvene stå med base en natt før filtrering. I hvilken grad denne utfellingen påvirket pH i prøven ble undersøkt i trinn 10. Det ble funnet at ved tilsetning av 100 ml base var pH 9,5 ved utfellingsreaksjonens slutt. Dette er i nedre del av SSRI'enes pKa-område. Likevel ble det besluttet å ikke øke mengden tilsatt base av tidshensyn. Filtrering av en prøve med 150 ml tilsatt base tok om lag 4 til 4,5 timer, mot 1,5 til 3 timer for prøver tilsatt 100 ml base.

Saltet måtte ved jevne mellomrom fjernes under filtrering, noe som førte til et mindre tap av prøve. Adhesjon og binding av SSRI'er til utfelt salt er ikke vurdert som av særlig betydning [41], men saltet binder noe vann som kan inneholde små mengder analytt.

I trinn 6 ble mengden sorbent økt til 4,5 gram og MeCN ble tatt i bruk som elueringsvæske. Ved neddamping av prøven etter eluering ble det observert utfelling av salt. Det ble da besluttet å benytte n-pentan på tørre prøver for å ekstrahere analyttene fra saltet. Analyse av

prøvene viste ingen signaler for noen av forbindelsene utover desmetylcitalopram. I og med at man ikke gjorde prøvene basiske ved ekstraksjon med pentan kan det tenkes at forbindelsene var ioniserte og dermed ikke lot seg løse av pentan. Da prøvene ikke ble analysert uten tidsvinduer kan det likevel ikke utelukkes at retensjonstidene var forskjøvet og at man derfor ikke kunne se signaler for forbindelsene (Figur 24).

I trinn 7 ble avsaltingsteknikken som går ut på å inducere et faseskille mellom analyttholdig MeCN-fase og saltholdig vannfase ved frysing tatt i bruk. Dette ga en bedring i kromatografien, men for enkelte av analyttene var retensjonstiden fortsatt kraftig forskjøvet – primært i form av kortere retensjonstider enn for standardløsninger (Figur 25). Det ble også observert brede topper (opp til 2 minutter brede) og tendenser til deling av toppene.

Ved sentrifugering og analyse av supernatanten fikk man imidlertid bedre toppform, men fortsatt til dels kraftig endrede retensjonstider (Figur 26).

Et annet fenomen som ble observert ved analyse av prøver i dette trinnet er illustrert i Figur 27 og Figur 28. Prøver som ved første gangs analyse ga dårlig kromatografi (Figur 27) fikk etter noen timers henstand vesentlig bedret kromatografi både med hensyn på toppform og retensjonstid (Figur 28). Mekanismene bak denne bedringen er ukjent, og hvorvidt det kan være et resultat av maursyren som ble tilsatt prøven i dette trinnet er usikkert. Introduksjonen av sur mobilfase i trinn 8 kan imidlertid tyde på en årsakssammenheng; analyser av prøvene fra trinn 7 med sur mobilfase ga en vesentlig forbedret kromatografi (Figur 29) sammenlignet med prøver analysert uten.

I trinn 9 ble 60 ml kolonner introdusert, og mengden sorbent ble oppskalert til endelig mengde: 25 g. Det ble i dette trinnet undersøkt hvorvidt økt sorbentmengde kunne kompensere for å ikke tilsette base til prøven. Analyser av disse prøvene viste imidlertid svært dårlig kromatografi og ingen tydelige signaler for noen av forbindelsene (Figur 30). Prøver med nøytral pH ble derfor oppgitt.

Fram til nå hadde man primært testet teorien om at salt var årsaken til problemene med å oppnå akseptabel kromatografi. Det ble imidlertid etter hvert klart at salt alene ikke kunne være problemet, men at også komponenter fra sorbenten kunne være en årsak – eventuelt i kombinasjon med salter.

Produktinformasjonen for sorbentene påpeker at sorbenten kan inneholde forurensninger fra produksjon i form av monomerer og oligomerer. Disse kan påvirke resultatene i sensitive

applikasjoner og må da fjernes. Produktinformasjonen oppgir imidlertid ikke hvordan disse forurensningene skal fjernes [35-37].

Det ble derfor i trinn 13 og videre gjort ulike eksperimenter med tanke på å teste sorbenten og hvilken betydning forurensningene har for de kromatografiske resultatene.

I trinn 13 ble to ulike ekstraksjonsmetoder med pentan i henholdsvis basisk- og surgjort prøve benyttet for å undersøke hvorvidt forstyrrende komponenter er løselige i vandig eller organisk fase. Ingen av metodene ga resultater og mistanken om at monomerer og oligomerer var tilstede i prøvene ble derfor styrket.

Det ble derfor i trinn 14 designet et forsøk for å teste denne teorien. Kondisjonert sorbent som ikke var benyttet til ekstraksjon ble eluert med 3 fraksjoner á 50 ml MeCN. De eluerte fraksjonene ble deretter tilsatt alle forbindelser inkludert interne standarder og analysert. Sorbent kondisjonert etter vask med stort volum vann ble også testet. Resultatene fra dette forsøket viste en sammenheng mellom forstyrrelser av kromatografien og vask av sorbenten før bruk. Fraksjon 1 for begge metodene ga ingen gode kromatografiresultater, mens fraksjon 2 og 3 hadde gode resultater.

Dette bekreftet langt på vei mistanken om at forurensninger i sorbenten forårsaket forstyrrelsene. Vask med både vann og MeCN ble derfor innført i den endelige metoden (Tabell 7).

En utfordring under hele metodeutviklingen har vært den tid- og arbeidskrevende prøveopparbeidelsen. Dette har ført til at antall prøver tilgjengelig for testing av ulike parametre har vært begrenset og følgelig har det vært vanskelig å fastslå i hvilken grad resultatene av de ulike trinnene lot seg reproducere.

Metoden i Tabell 7 ga akseptable resultater (Figur 32 og Figur 33) og på grunn av begrenset tid ble det besluttet å benytte denne metoden til miljøanalysene.

Muligheten for at prøveresultatene kan være forstyrret av Na⁺-addukter har blitt vurdert, og det har derfor blitt lett etter Na⁺-addukter i en prøve tilsatt forbindelser i mengde tilsvarende sluttkonsentrasjon 100 ng/10 l. Kromatogrammene fra utført full scan (*m/z* 40-450) er vist i appendiks 2. For citalopram d6, desmetylcitalopram, fluvoksamin og paroksetin d4 kan markerte signaler med lik retensjonstid tyde på tilstedeværelse av Na⁺-addukter. *m/z* for Na⁺-adduktet til didesmetylcitalopram (319,24) og *m/z* for fluvoksamin (319,26) er imidlertid så like at de vil gi samme signal.

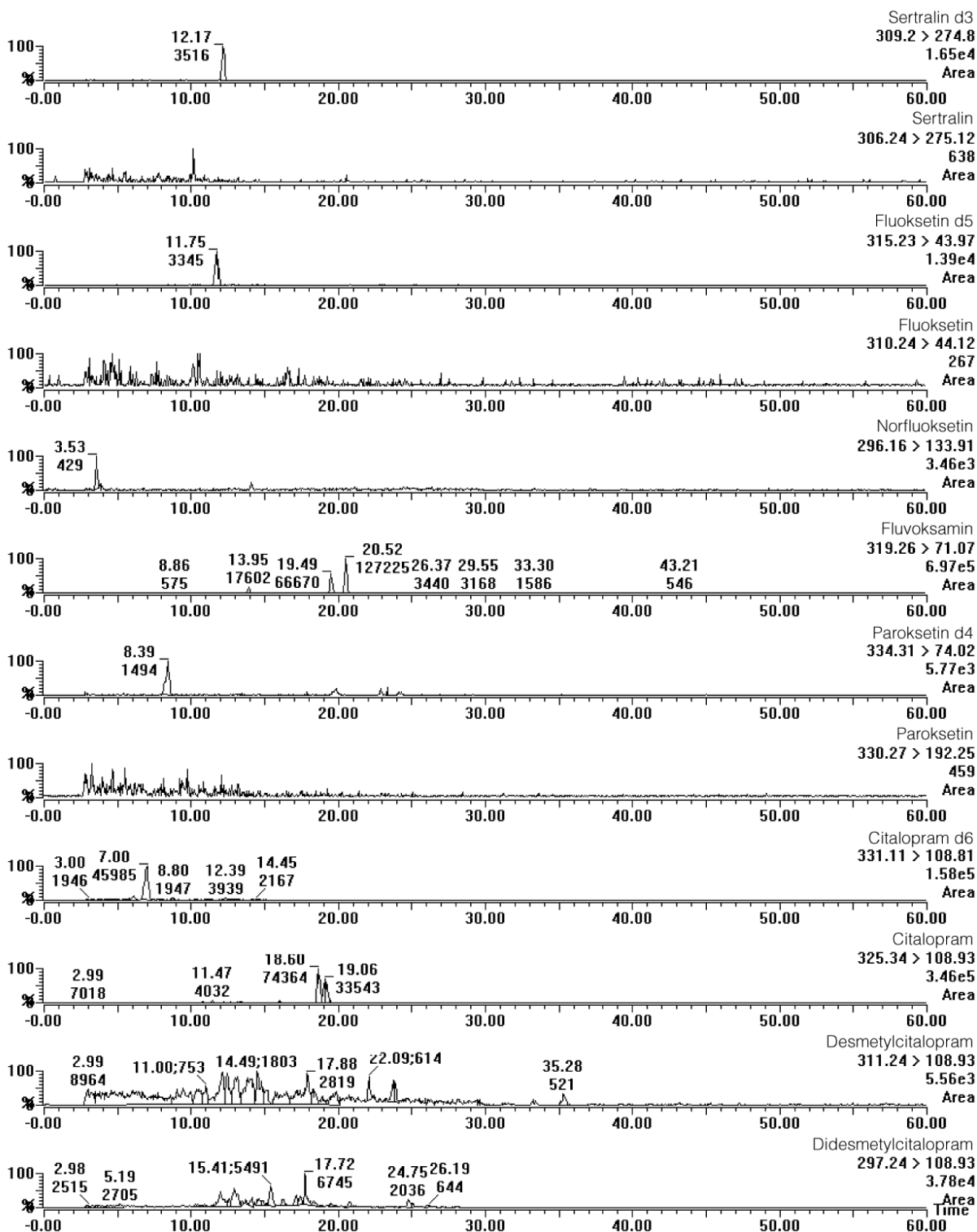
5.2 Prøver fra Ny-Ålesund og Adventfjorden

Prøver fra Ny-Ålesund (Figur 40, Figur 41 og Figur 42), Adventfjorden ved Longyearbyen (Figur 43, Figur 44 og Figur 45) og prøver til standardkurve ble alle opparbeidet og ekstrahert etter endelig metode. Analyser av disse prøvene viste imidlertid store kromatografiske forstyrrelser. Det er derfor vanskelig å kunne uttale seg om hvorvidt det er SSRI tilstede i prøvene fra miljøet.

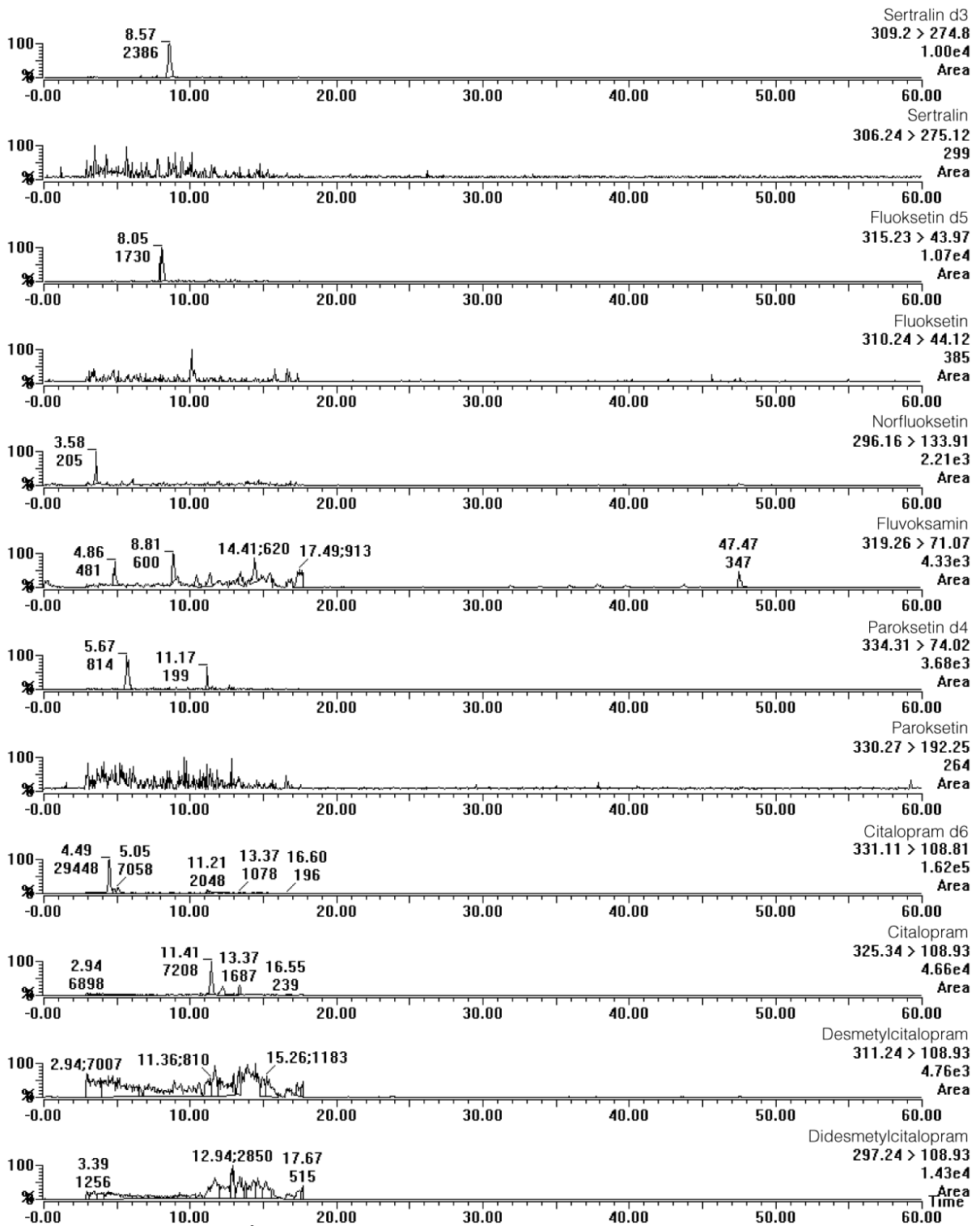
De deutererte standardene gir signaler i alle prøvene, men forskyvningen i retensjonstid gjør positiv identifikasjonen problematisk. Fluvoksamin gir et likt signalmønster i prøver fra både Ny-Ålesund og Longyearbyen, men også her gjør forskyvning i retensjonstid identifikasjon vanskelig.

Om man ser på citalopram og citaloprams metabolitter vil man i alle prøvene se høye og brede signaler som kan minne om støy. Sammenlignet med blanke prøver som har svært lavt støynivå er disse signalene påfallende høy. Det sammen med signalenes relativt markerte start og slutt kan indikere en tilstedeværelse, men det er vanskelig å positivt identifisere forbindelsene eller si noe om eventuell mengde tilstede.

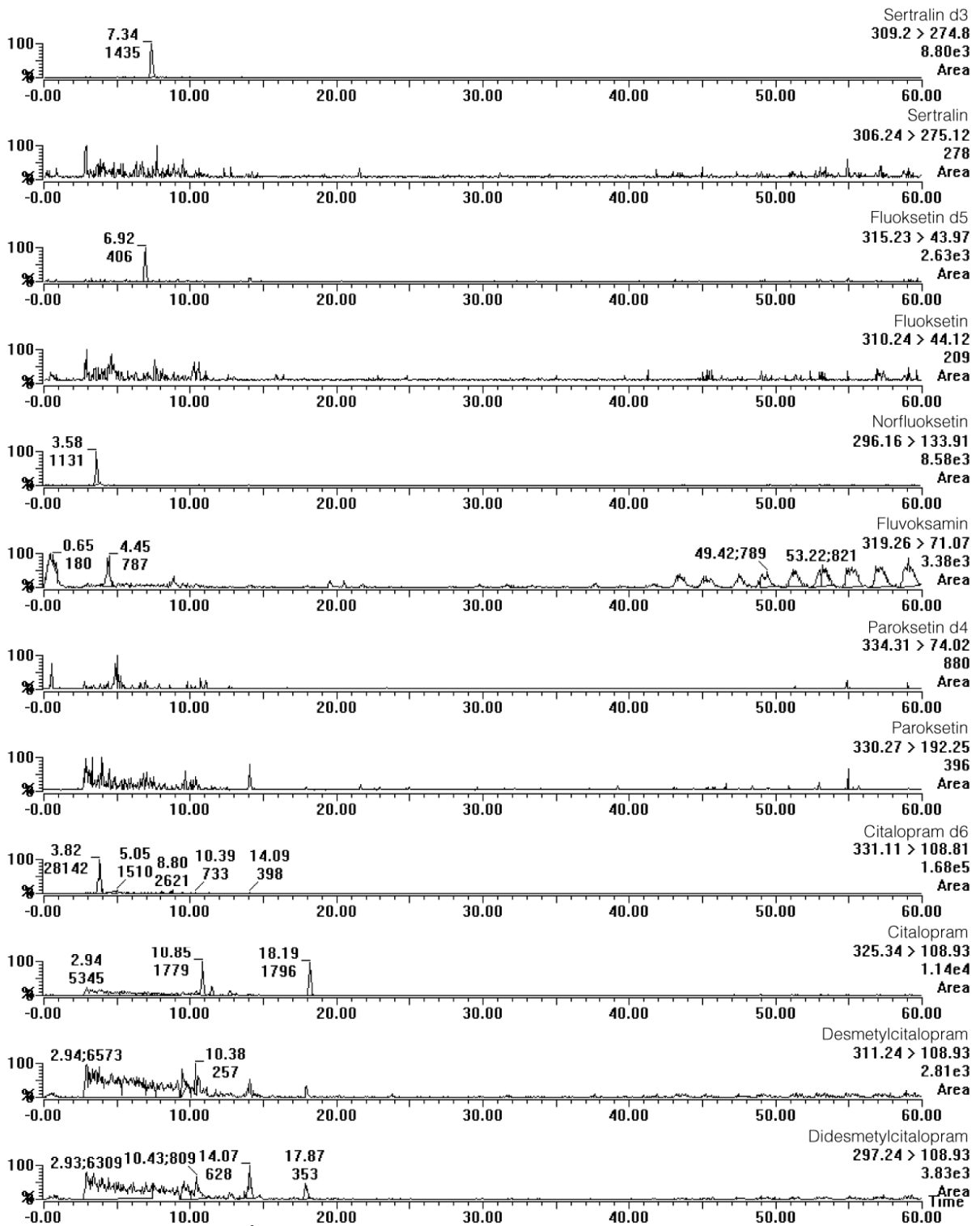
Vasskog et al. har imidlertid tidligere påvist fluvoksamin, paroksetin og sertralin i Adventfjorden, samt citalopram og desmetylcitalopram i kloakk fra Longyearbyen [2]. Citalopram, escitalopram og fluvoksamin er også de SSRI'ene som har blitt solgt ved Spitsbergen apotek i perioden 01/09-2008 til 01/03-2009 (Tabell 2), men prøvene er tatt etter turistseongens oppstart – noe som med stor sannsynlighet vil kunne gi et ytterligere bidrag. Hvor stort et eventuelt forbruk av disse legemidlene er i Ny-Ålesund er ukjent, men trolig svært lavt.



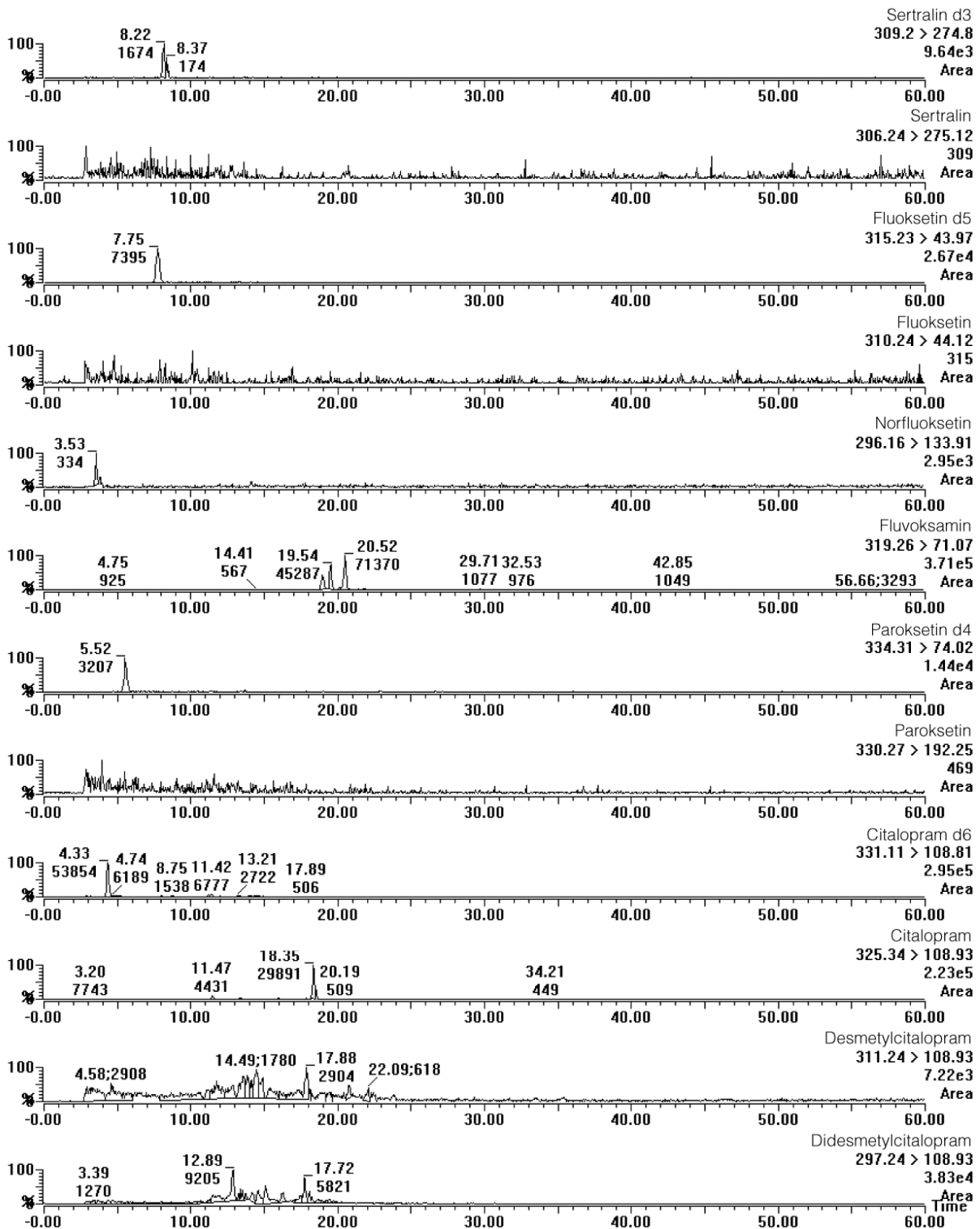
Figur 40 - Prøve fra Ny-Ålesund, 11/03-2009 (parallell 1). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.



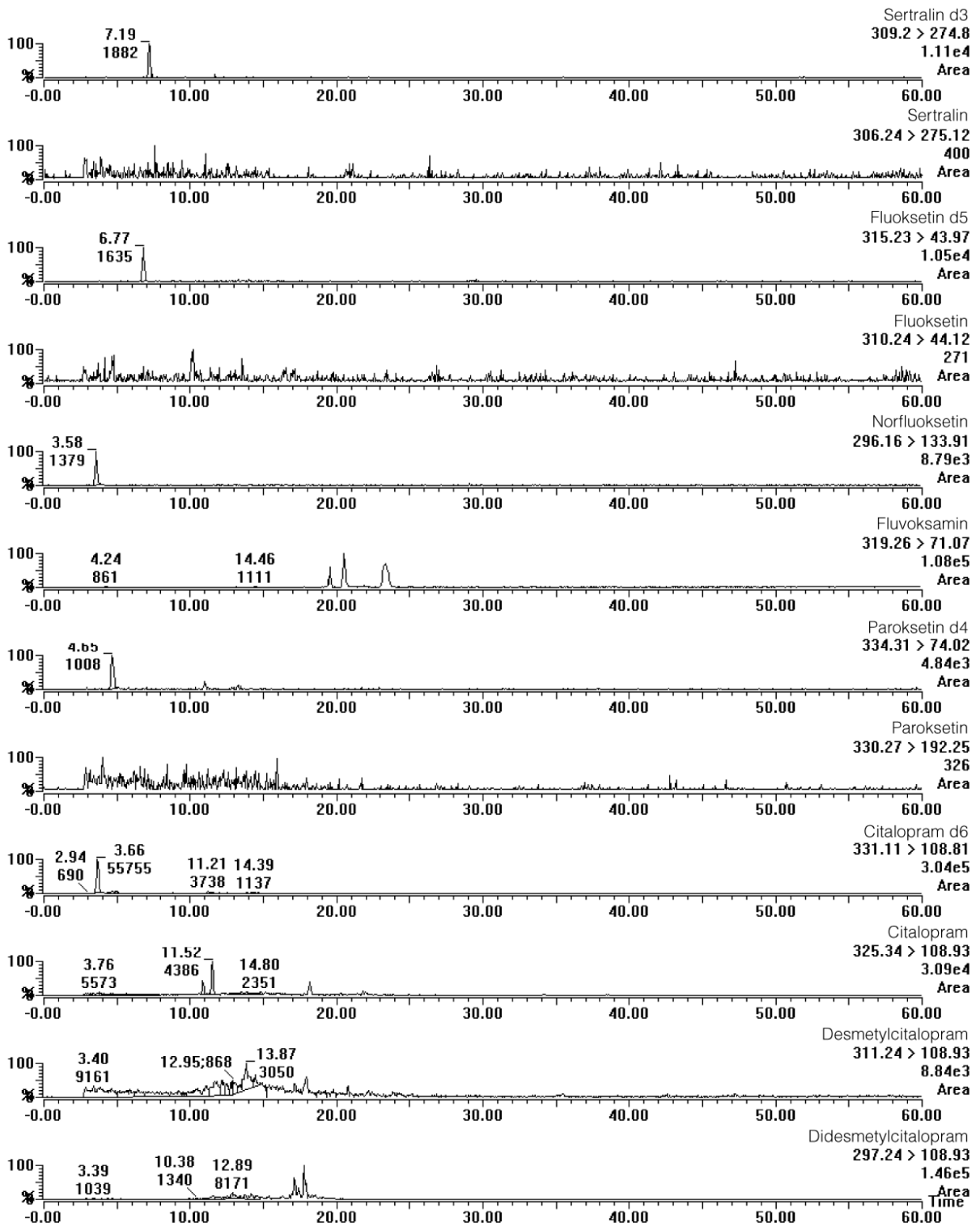
Figur 41 - Prøve fra Ny-Ålesund, 11/03-2009 (parallell 2). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.



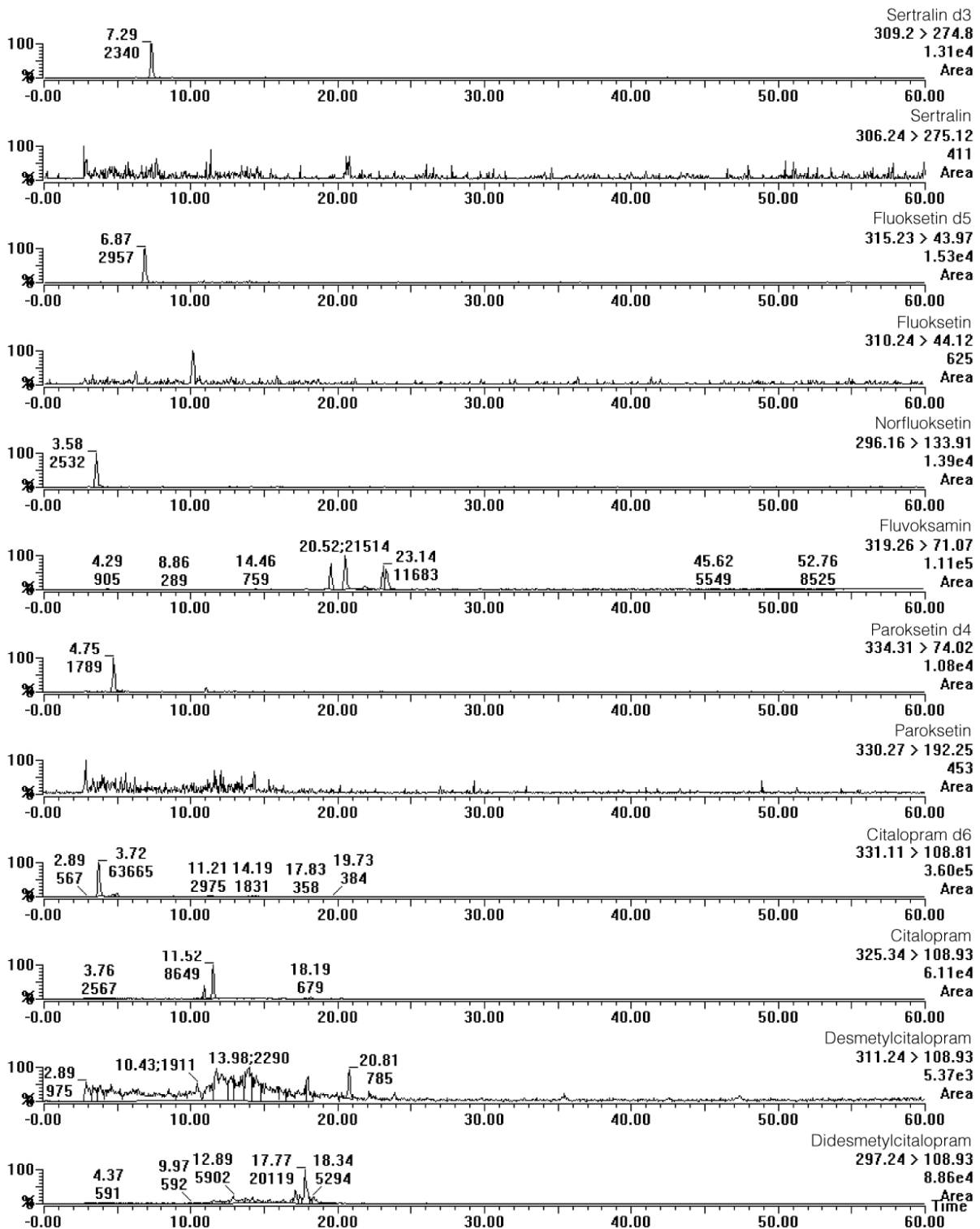
Figur 42 - Prøve fra Ny-Ålesund, 11/03-2009 (parallell 3). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.



Figur 43 - Prøve fra Adventfjorden, 23/03-2009 (parallell 1). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.



Figur 44 - Prøve fra Adventfjorden, 23/03-2009 (parallell 2). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.



Figur 45 - Prøve fra Adventfjorden, 23/03-2009 (parallell 3). Prøven er tilsatt deutererte standarder i mengder etter Tabell 6.

6. Konklusjon

Fra resultatene oppnådd i denne oppgaven kan vi trekke følgende konklusjoner:

- Sammenlignet med tradisjonelle sorbenter har XAD-sorbentene fysiske egenskaper som muliggjør hurtig ekstraksjon av store volumer.
- Forutsatt at man kan utvikle en effektiv metode for fjerning av interfererende komponenter, vil denne metoden kunne være en brukbar for separasjon og kvantifikasjon av selektive serotonin reopptakshemmere fra sjøvannsprøver med stort volum.
- Under samme forutsetning som i forrige punkt vil sorbenten være godt egnet for ekstraksjon av sure og nøytrale forbindelser hvor prøver ikke vil måtte gjøres basiske og utfelling av salt unngås.
- Det lyktes ikke å ferdigutvikle metoden innenfor tidsrammen som sto til disposisjon. Resultater som ble oppnådd underveis i metodeutviklingen lot seg ikke reprodusere på reelle prøver, og det er derfor per i dag ikke mulig å kunne benytte metoden til påvisning og kvantifisering av selektive serotonin reopptakshemmere i sjøvannsprøver med stor volum.
- Det er ikke mulig å fastslå årsaken til kromatografiforstyrrelsene. Likevel er det mye som taler for at monomerer og oligomerer i sorbentmaterialet, eventuelt i kombinasjon med matrikseffekter (salter), er inkompatible med UPLC-separasjon.
- Metodens mangler har gjort det umulig å validere metoden med hensyn på linearitet, gjenvinning og metodens generelle feilestimat.

Referanser

1. Lov om legemidler m.v. (legemiddeloven) av 12. april 1992 nr. 132.
2. Vasskog, T., et al., *Occurrence of selective serotonin reuptake inhibitors in sewage and receiving waters at Spitsbergen and in Norway*. Journal of Chromatography A, 2008. **1185**(2): p. 194-205.
3. Vasskog, T., et al., *Selective serotonin reuptake inhibitors in sewage influents and effluents from Tromsø, Norway*. Journal of Chromatography A, 2006. **1115**(1-2): p. 187-195.
4. Kümmerer, K., *Pharmaceuticals in the environment*. 2008, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 3-23.
5. Kümmerer, K., *Pharmaceuticals in the environment*. 2008, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 37-42.
6. Vasskog, T., *Pers. kom.: Pålegg om filtrering av avløpsvann i Nord-Norge*.
7. Fass.se. *Miljøinformasjon*. 20.05.2009]; Available from: <http://www.fass.se/LIF/miljo/miljoinfo.jsp>.
8. Vasskog, T., *Occurrence of selected antidepressants in the Norwegian environment*. 2008, Department of Pharmacy, University of Tromsø: Tromsø.
9. Kümmerer, K., *Pharmaceuticals in the environment*. 2008, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 61-73.
10. Folkehelseinstituttet, *Legemiddelforbruket i Norge 2004 - 2008*, M. Rønning, Editor. 2009.
11. Kümmerer, K., ed. *Pharmaceuticals in the environment*. 3 ed. 2008, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.
12. Reseptregisteret, *Rapport: Data på bruk av SSRI'er i Norge i årene 2004-2008 for alle aldre, kvinne, mann og begge kjønn* 2009, Nasjonalt folkehelseinstitutt.
13. Sysselmannen, *Årsrapport for Sysselmannen på Svalbard 2008*. 2009, Sysselmannen på Svalbard.
14. Pedersen, S.T. *Turismen på Svalbard i vekst*. 2008 18.05.2009]; Available from: <http://www.sysselmannen.no/hoved.aspx?m=44267&amid=2119304>.
15. Olsen, A.L. *Om Longyearbyen; fakta*. 2009 26.03.2009 18.05.2009]; Available from: <http://www.lokalstyre.no/Modules/theme.aspx?Category.ID=699&ObjectType=Article&ElementID=1882>.
16. Fosslund, B., *Pers. kom.: Rapport: Salg av legemidler i ATC-gruppe N06A B ved Spitsbergen apotek*. 2009.
17. Folkehelseinstituttet. *Antidepressiver - fakta om serotonin-reopptakshemmere (SSRI)*. 26.09.2007 19.05.2009]; Available from: http://www.fhi.no/eway/default.aspx?pid=233&trg=MainLeft_5648&MainArea_5661=5648:0:15,2917:1:0:0:::0:0&MainLeft_5648=5544:56672::1:5647:5:::0:0.
18. Neal, M.J., *Medical pharmacology at a glance*. 5 ed. The at a glance series. 2005, Malden, Mass.: Blackwell.
19. H. P. Rang, M.M.D., J. M. Ritter, P. K. Moore, *Pharmacology*. 5 ed. 2003, Edinburgh: Churchill Livingstone.
20. Perreault, H.A.N., K. Semsar, and J. Godwin, *Fluoxetine treatment decreases territorial aggression in a coral reef fish*. Physiology & Behavior, 2003. **79**(4-5): p. 719-724.
21. Beulig, A. and J. Fowler, *Fish on Prozac: Effect of Serotonin Reuptake Inhibitors on Cognition in Goldfish*. Behavioral Neuroscience, 2008. **122**(2): p. 426-432.

22. Gaworecki, K.M. and S.J. Klaine, *Behavioral and biochemical responses of hybrid striped bass during and after fluoxetine exposure*. *Aquatic Toxicology*, 2008. **88**(4): p. 207-213.
23. Winder, V.L., et al., *Effects of fluoxetine exposure on serotonin-related activity in the sheepshead minnow (Cyprinodon variegatus) using LC/MS/MS detection and quantitation*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2009. **149**(4): p. 559-565.
24. Fong, P.P., *Zebra Mussel Spawning Is Induced in Low Concentrations of Putative Serotonin Reuptake Inhibitors*. *Biology Bulletin*, 1998. **194**: p. 143-149.
25. Johnson, D.J., et al., *Toxicity and hazard of selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants fluoxetine, fluvoxamine, and sertraline to algae*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2007. **67**(1): p. 128-139.
26. Henry, T.B., et al., *Acute and chronic toxicity of five selective serotonin reuptake inhibitors in Ceriodaphnia dubia*. *Environ Toxicol Chem*, 2004. **23**(9): p. 2229-33.
27. Kolpin, D.W., et al., *Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999−2000: A National Reconnaissance*. *Environmental Science & Technology*, 2002. **36**(6): p. 1202-1211.
28. Zorita, S., L. Mårtensson, and L. Mathiasson, *Occurrence and removal of pharmaceuticals in a municipal sewage treatment system in the south of Sweden*. *Science of The Total Environment*, 2009. **407**(8): p. 2760-2770.
29. Kümmerer, K., *The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges*. *Journal of Environmental Management*, 2009. **In Press, Corrected Proof**.
30. Redshaw, C.H., V.G. Wootton, and S.J. Rowland, *Uptake of the pharmaceutical Fluoxetine Hydrochloride from growth medium by Brassicaceae*. *Phytochemistry*, 2008. **69**(13): p. 2510-2516.
31. Pedersen-Bjergaard, S., Rasmussen, K. E., *Legemiddelanalyse*. 2004, Bergen: Fagbokforlaget.
32. Hoffmann, E.d. and V. Stroobant, *Mass spectrometry: principles and applications*. 2007, Chichester: Wiley. XII, 489 s.
33. Hvistendahl, G., *Mass Spectrometry*. 1996, Oslo: Department of Chemistry, University of Oslo.
34. Petrick, G., et al., *An in-situ filtration/extraction system for the recovery of trace organics in solution and on particles tested in deep ocean water*. *Marine Chemistry*, 1996. **54**(1-2): p. 97-105.
35. Rohm&Haas, *Amberlite XAD7HP Product data sheet*. 2003, Rohm&Haas co. .
36. Rohm&Haas, *Amberlite XAD Polymeric Adsorbents brochure*. 2000, Rohm&Haas.
37. Supelco, *Amberlite XAD2 Product data sheet*. 2003, Supelco
38. Gu, T., et al., *Phase separation of acetonitrile-water mixture in protein purification*. *Separations Technology*, 1994. **4**(4): p. 258-260.
39. Gu, Y. and P.-H. Shih, *Salt-induced phase separation can effectively remove the acetonitrile from the protein sample after the preparative RP-HPLC*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004. **35**(6-7): p. 592-597.
40. Aarnes, H., *Saltvann*, in *Botanisk og plantefysiologisk leksikon*, H. Aarnes, Editor. 2005.
41. Vasskog, T., *Pers. kom.: Adsorpsjon og binding av forbindelser til utfelte salter*.

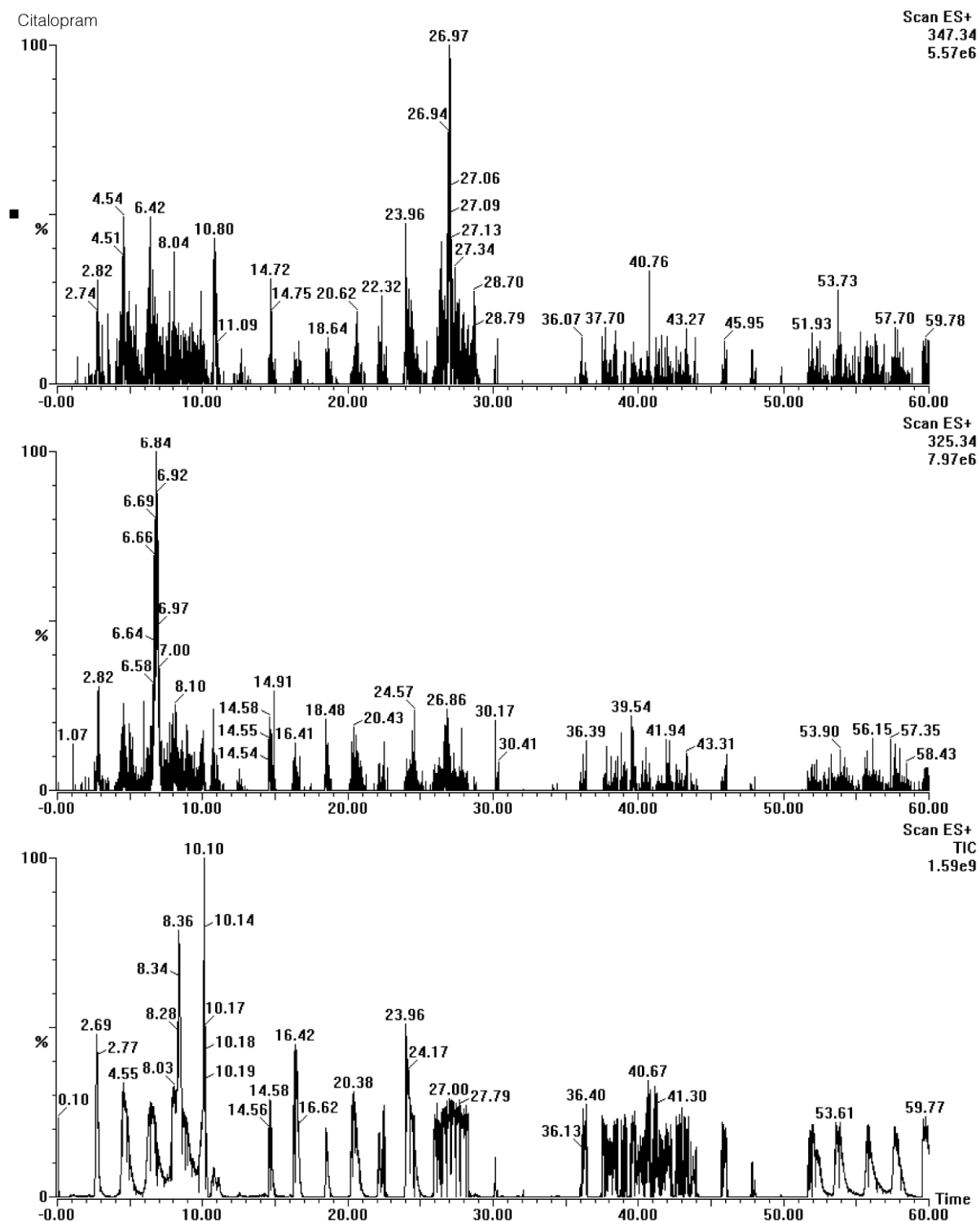
Appendiks

Appendiks 1: MS-paramtere

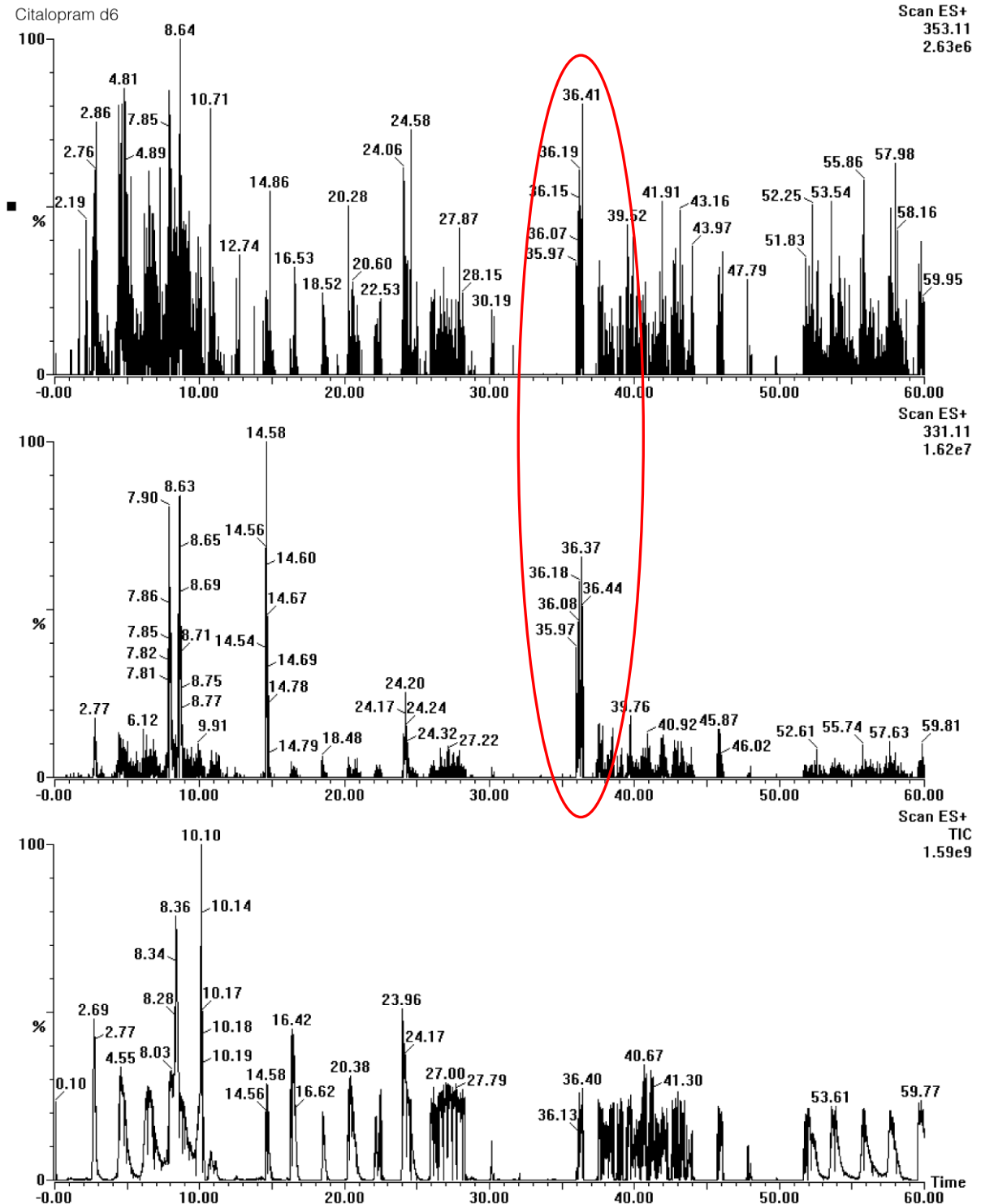
Source (ES+)	Settings
Capillary voltage (kV)	3,30
Cone voltage (V)	17-42
Extractor voltage (V)	2,00
RF lens (v)	0,20
Source temperature (C)	100
Desolvation temperature (C)	250
Cone gas flow (L/Hr)	25
Desolvation gas flow (L/Hr)	200
Analyser	Settings
Low Mass 1 resolution	15,00
High Mass 1 resolution	15,00
Ion energy 1	1,00
Entrance	0,00
Collision	7-29
Exit	0,00
Low Mass 2 resolution	14,50
High Mass 2 resolution	14,50
Ion energy 2	1,00
Multiplier (V)	650,00
Gas Cell Pirani pressure (mbar)	~1,7e-3
MRM-parametre	Settings
Dwell time (s)	0,1 – 0,3
Inter channel delay (s)	0,02
Inter scan time (s)	0,05
Span (Da)	0,1

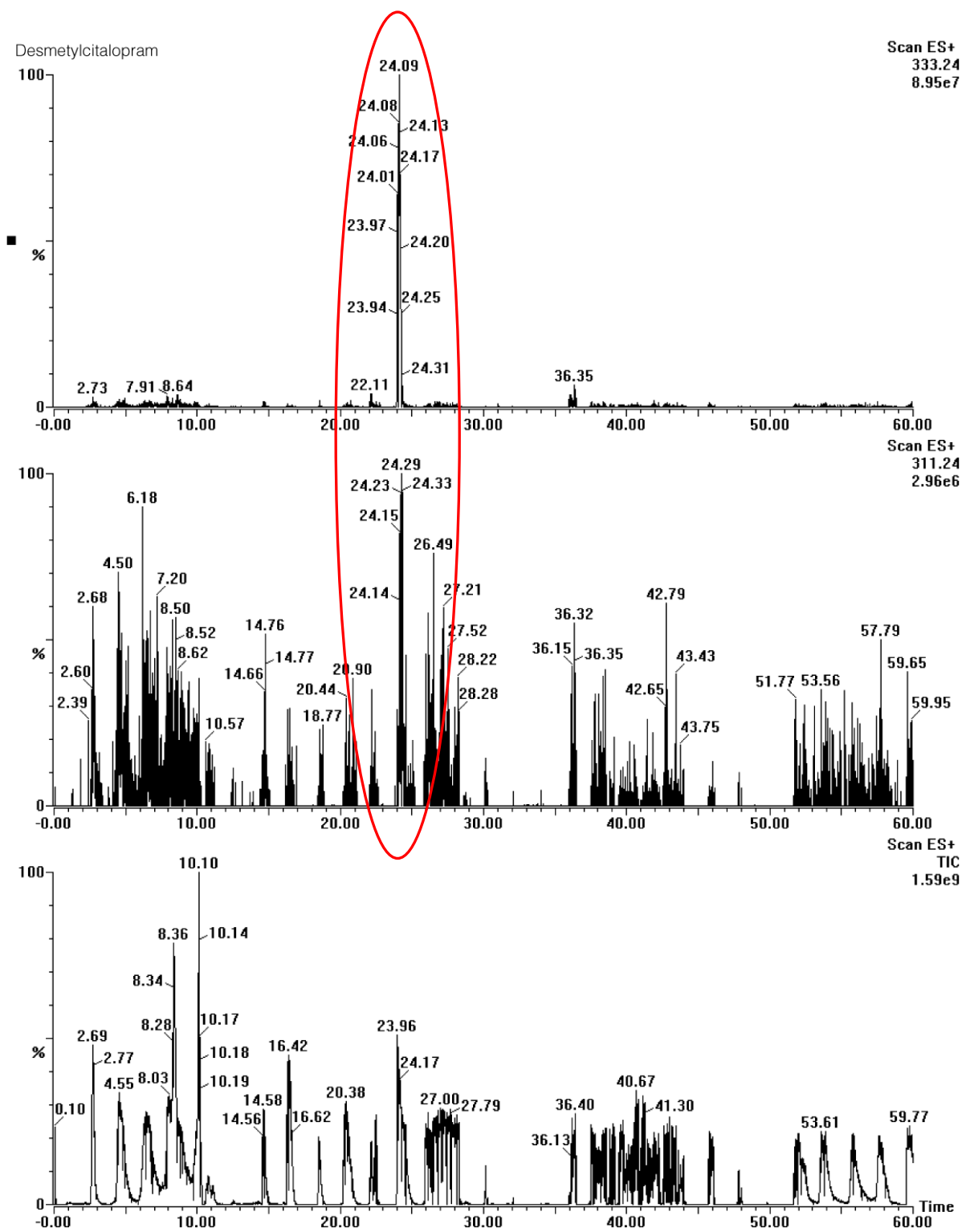
Appendiks 2: Kromatogrammer fra full scan etter Na⁺-addukter

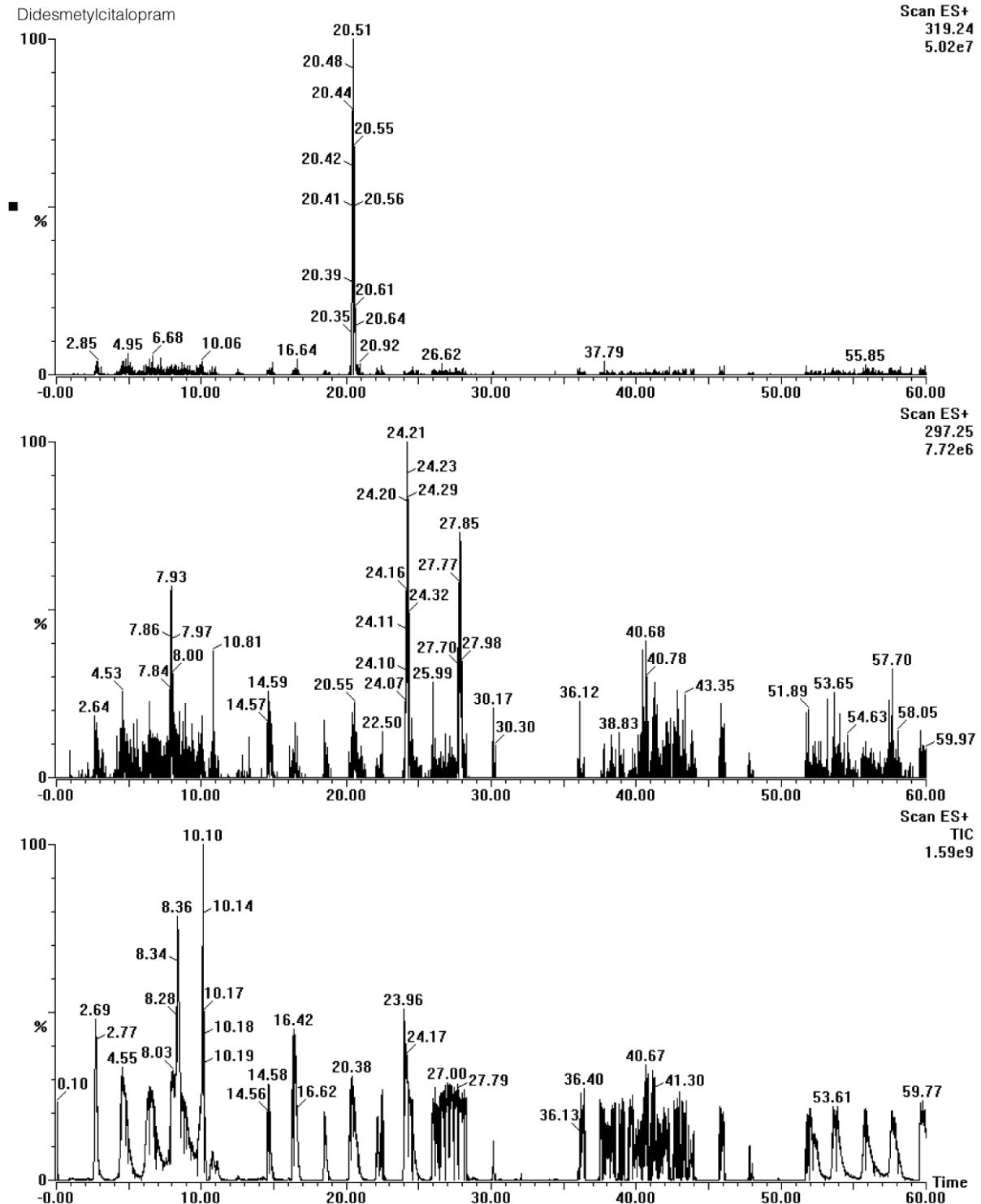
For hver forbindelse vises, fra bunn til topp, fullscan kromatogram, [M+H]⁺ og [M+H]⁺Na⁺.



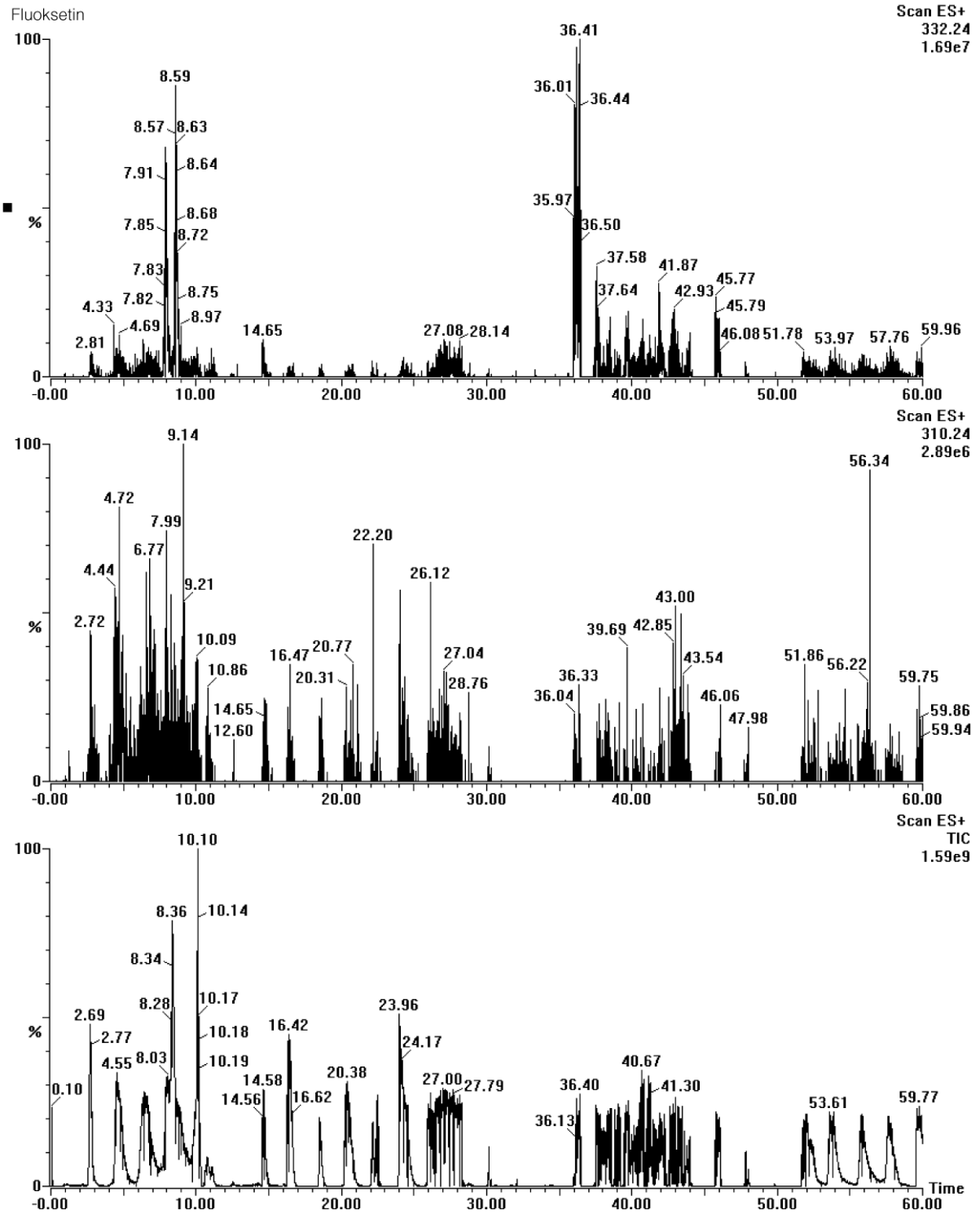
Figur 46 – Full scan av citalopram: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.



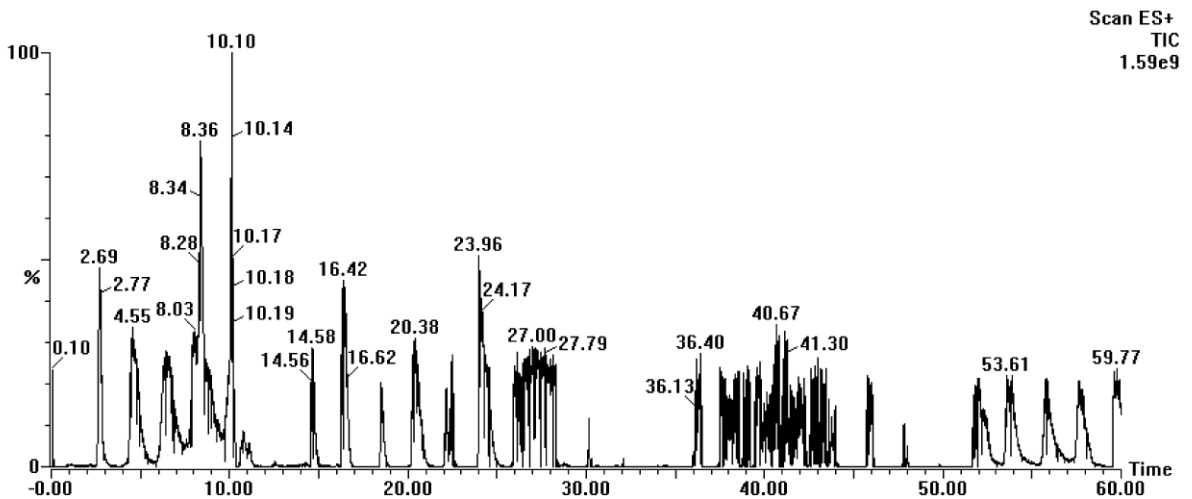
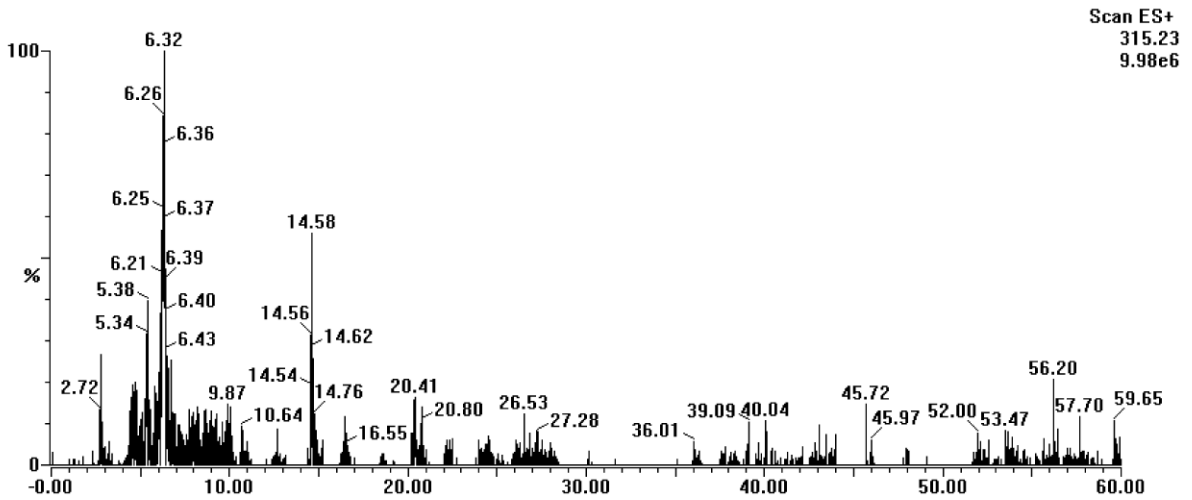
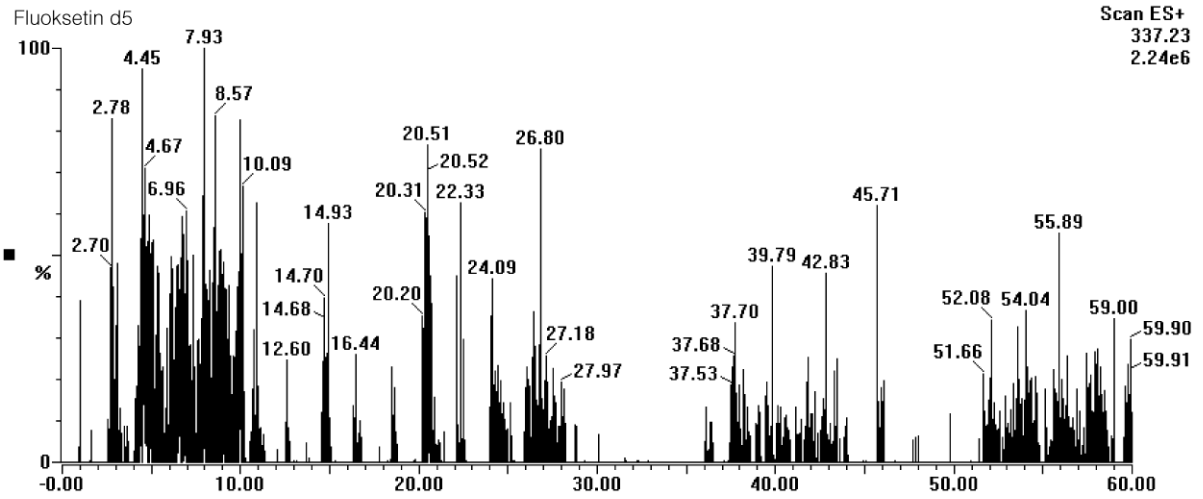




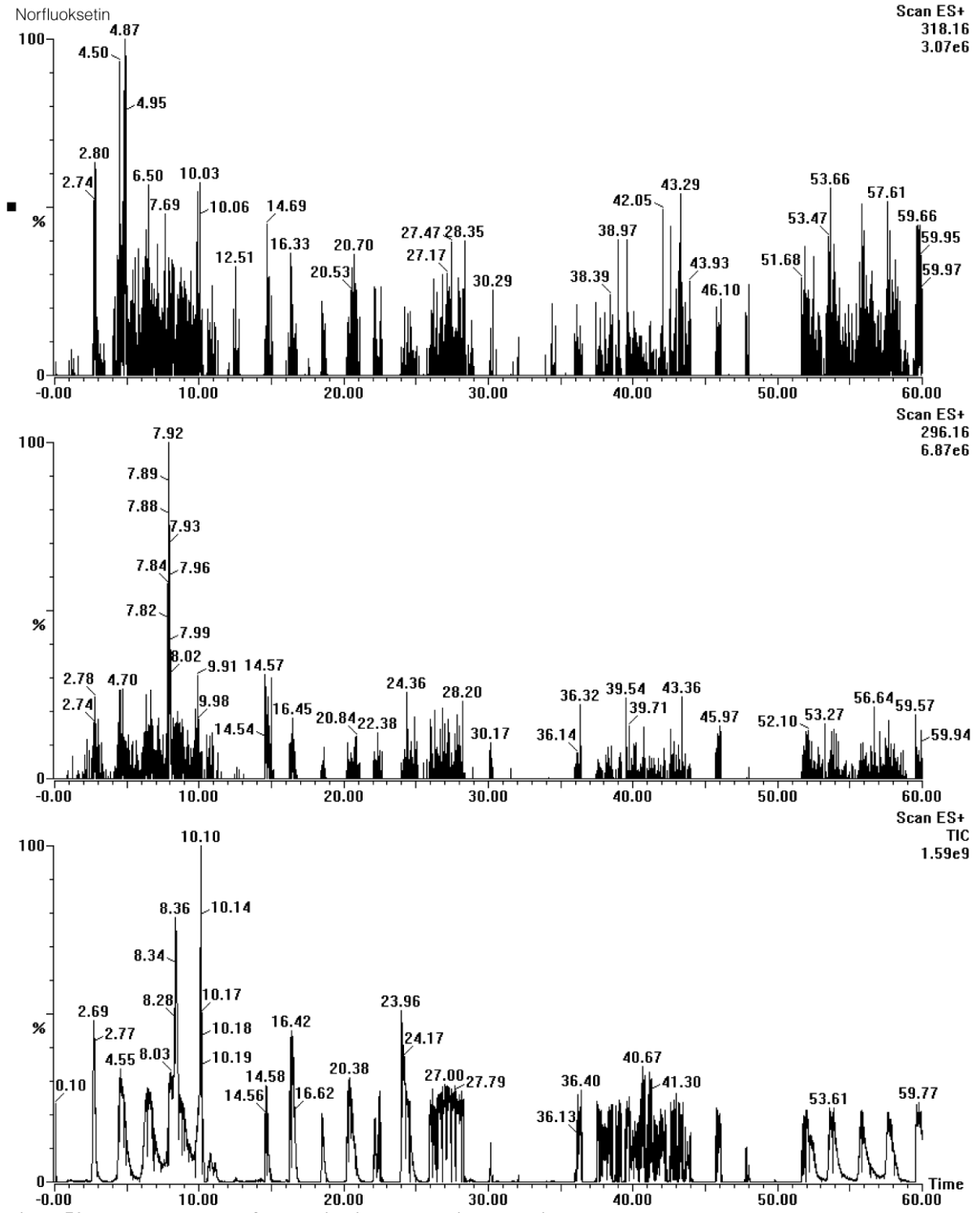
Figur 49 - Full scan av didesmetylcitalopram: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter. Merk sammenfallende *m/z* for didesmetylcitalopram og fluvoksamin (Figur 53).



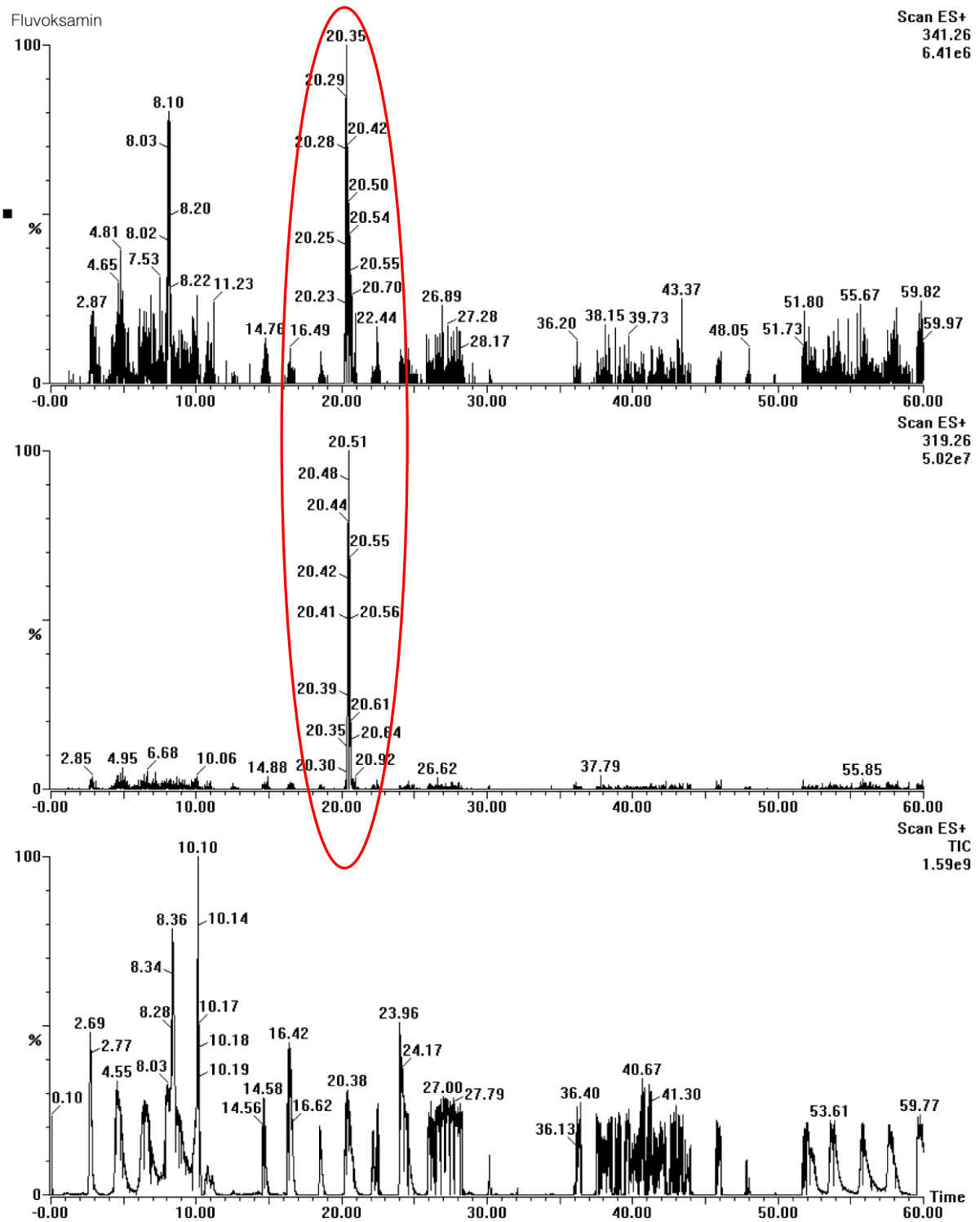
Figur 50 - Full scan av fluoksetin: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.



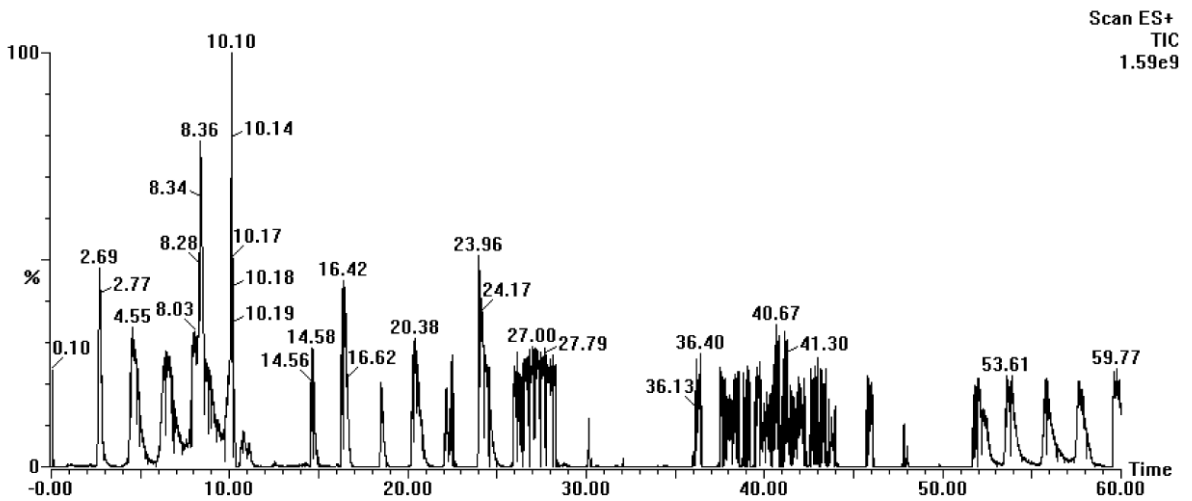
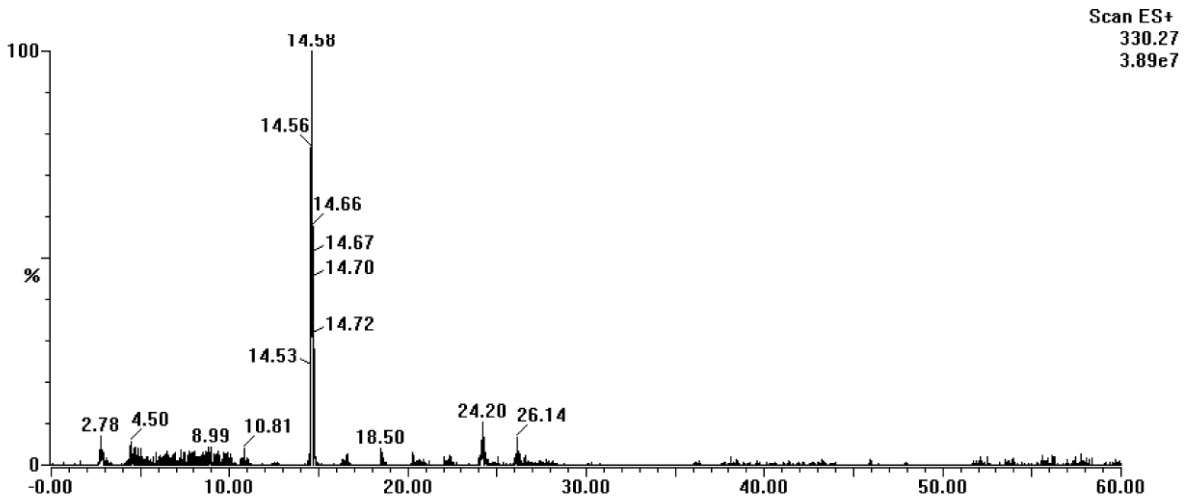
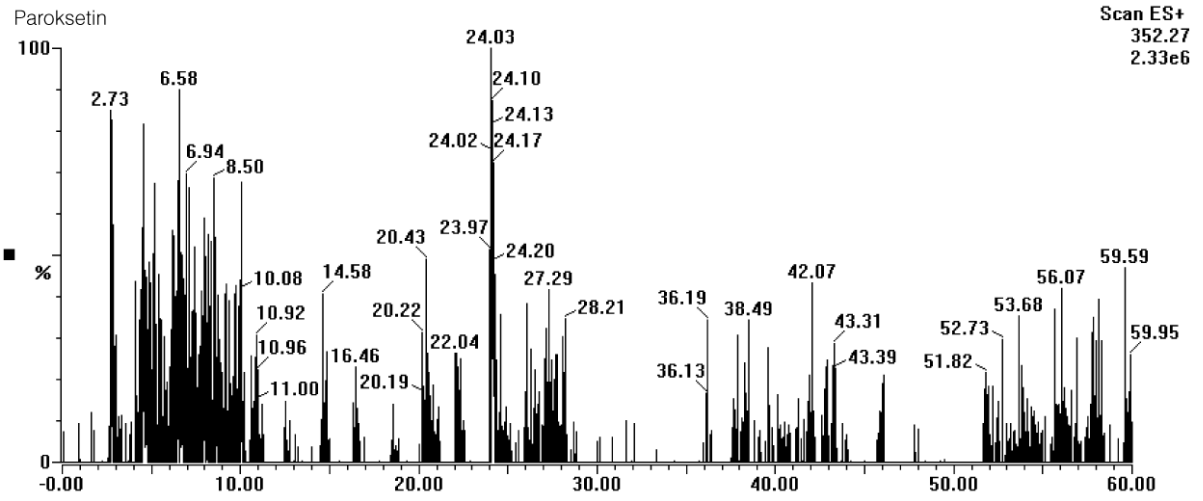
Figur 51 - Full scan av fluoksetin d5: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.



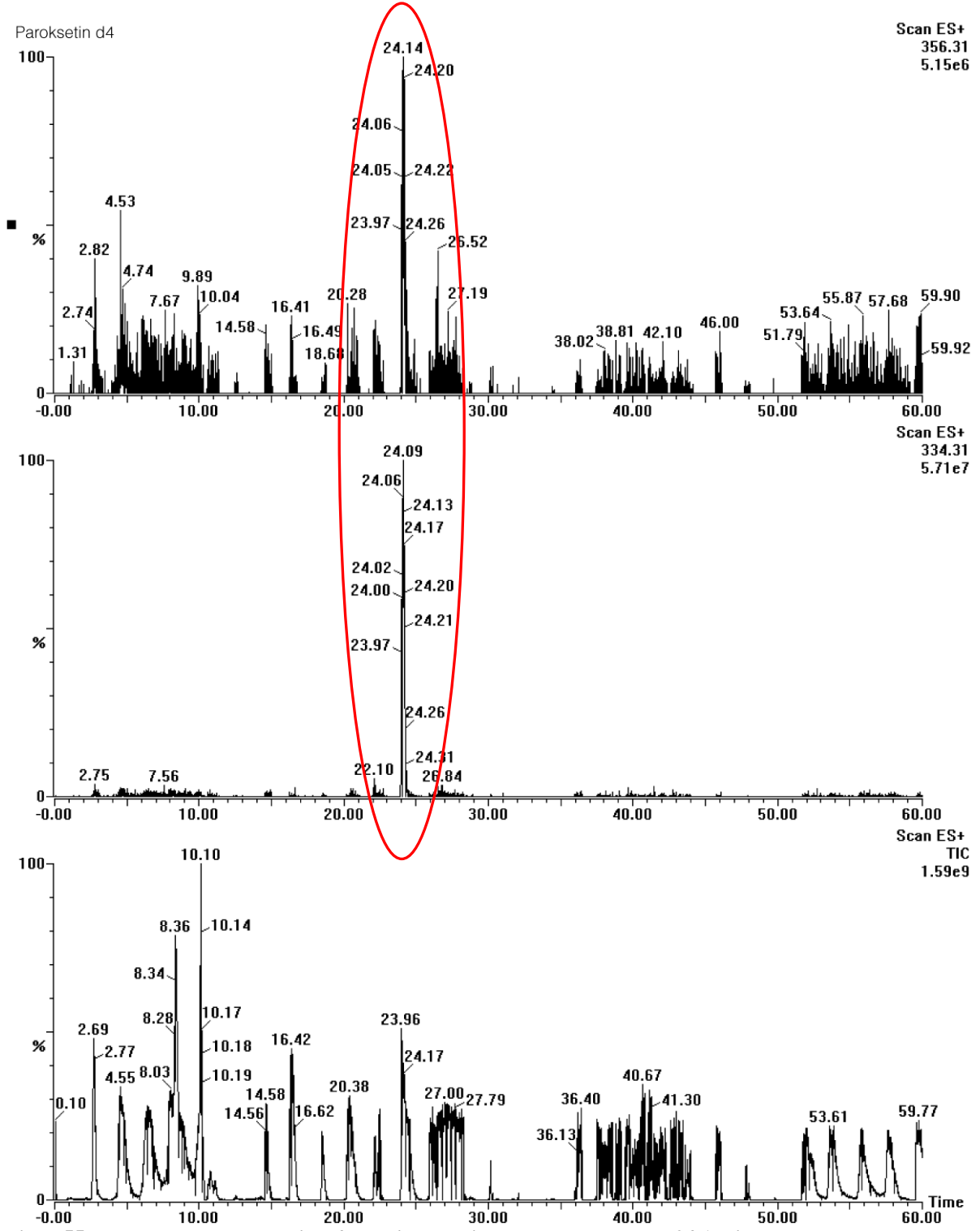
Figur 52 - Full scan av norfluoksetin: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.

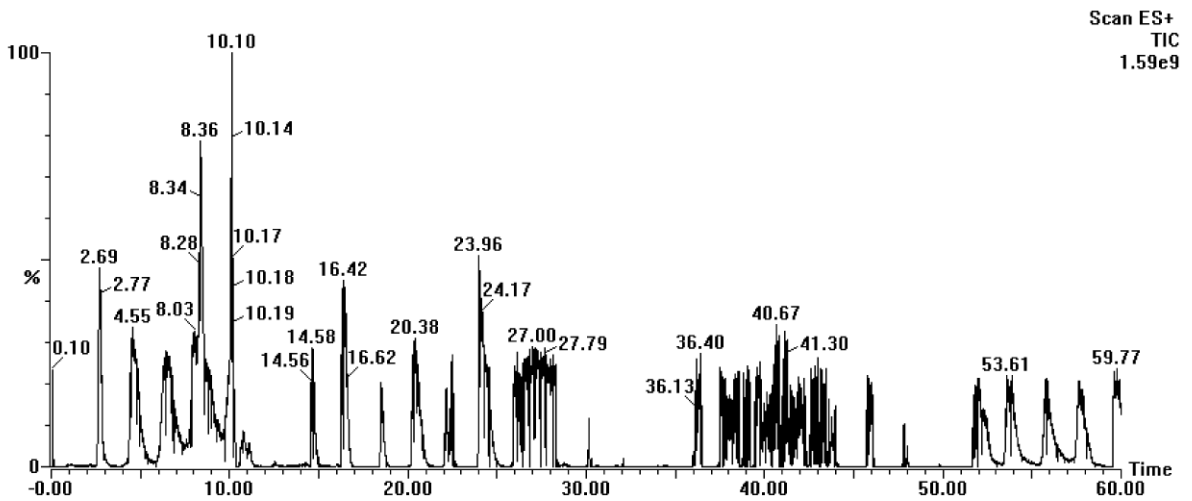
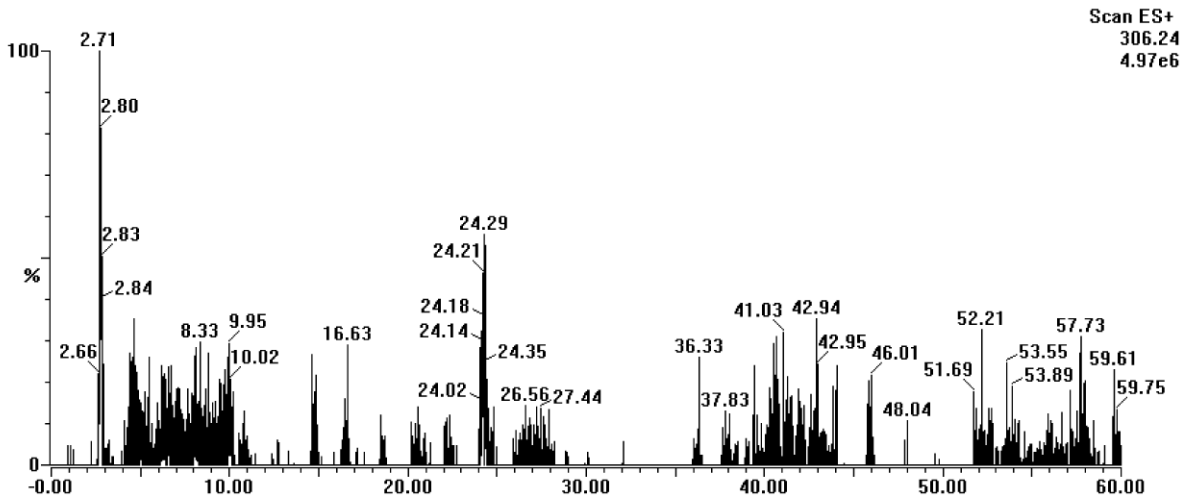
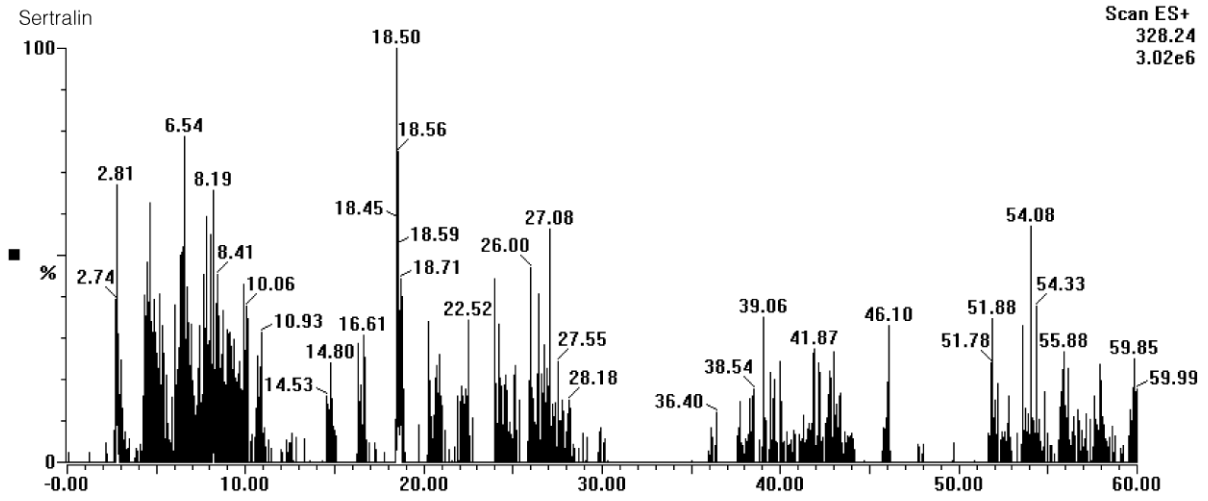


Figur 53 - Full scan av fluvoksamin: Mulig tegn til Na⁺-addukter ved ~20,4 minutter. Merk sammenfallende *m/z* for fluvoksamin og didesmetylcitalopram (Figur 49).

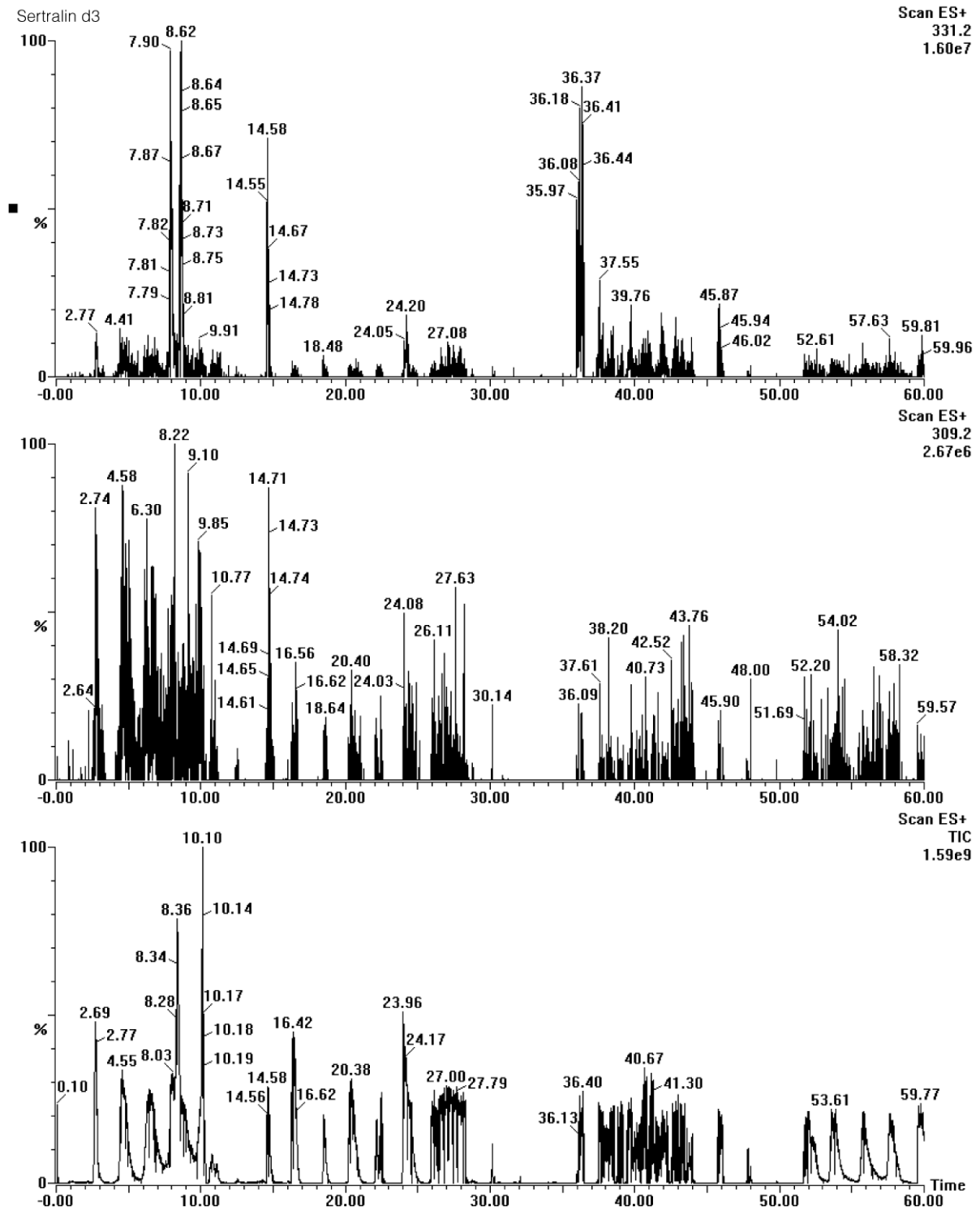


Figur 54 - Full scan av paroksetin: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.





Figur 56 - Full scan av sertralin: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.



Figur 57 - Full scan av sertralin d3: ingen tydelige tegn til Na⁺-addukter.