



# **RAVIMITE MÄÄRAMISE UURIMINE LC-MS/MS MEETODIL**

Bakalaureusetöö

Üliõpilane: Anastasija Korovkina 225155LAAB

Juhendaja: Maria Kuchtinskaja, PhD, Keemia ja biotehnoloogia instituut, dotsent

Kaasjuhendaja: Riin Rebane, PhD, Eesti Keskkonnauuringute Keskus

Õppekava: Rakenduskeemia, toidu- ja geenitehnoloogia



# **Investigation of Pharmaceutical Analysis using HPLC-MS/MS**

Bachelor thesis

Student: Anastasija Korovkina 225155LAAB

Supervisor: Maria Kuhtinskaja, PhD, Department of Chemistry and Biotechnology, associate professor

Co-supervisor: Riin Rebane, PhD, Estonian Environmental Research Centre

Study program: Applied Chemistry, Food and Gene Technology

## Autorideklaratsioon

Kinnitan, et olen koostanud antud lõputöö iseseisvalt ning seda ei ole kellegi teise poolt varem kaitsmisele esitatud. Kõik töö koostamisel kasutatud teiste autorite tööd, olulised seisukohad, kirjandusallikatest ja mujalt pärinevad andmed on töös viidatud.

Autor: Anastasija Korovkina  
[allkiri ja kuupäev]

Töö vastab bakalaureusetööle esitatavatele nõuetele.  
Juhendaja: Maria Kuhtinskaja  
[allkiri ja kuupäev]

Töö on lubatud kaitsmisele.  
Kaitsmiskomisjoni esimees: Maksim Ošeka  
[allkiri ja kuupäev]

# Sisukord

Autorideklaratsioon.....	3
Lühendite ja mõistete sõnastik .....	5
Sissejuhatus .....	7
<b>1. Kirjanduse ülevaade.....</b>	<b>8</b>
<b>1.1. Ravimid .....</b>	<b>8</b>
<b>1.2. LC-MS/MS.....</b>	<b>8</b>
1.2.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia .....	8
1.2.2. Massispektromeetria .....	9
1.2.3. Elektropihustusionisatsioon .....	10
1.2.4. Massianalüsaatorid ja tandem-massispektromeetria.....	11
<b>1.3. Proovi ettevalmistus ravimite analüüsil.....</b>	<b>11</b>
<b>1.4. Valideerimine .....</b>	<b>12</b>
1.4.1. Stabiilsus .....	12
<b>1.5. Maatriksefekt, saagis ja protsessiefektiivsus.....</b>	<b>14</b>
<b>2. Töö eesmärk.....</b>	<b>16</b>
<b>3. Eksperimentaalne osa.....</b>	<b>17</b>
<b>3.1. Kasutatud kemikaalid ja materjalid .....</b>	<b>17</b>
<b>3.2. Kasutatud aparatuur .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3. LC-MS meetod .....</b>	<b>18</b>
<b>3.4. Lahuste valmistamine .....</b>	<b>18</b>
<b>3.5. Stabiilsuse katsed .....</b>	<b>19</b>
<b>3.6. Proovide ettevalmistamine QuEChERS meetodil.....</b>	<b>19</b>
<b>4. Tulemused ja arutelu .....</b>	<b>20</b>
<b>4.1. Standardlahuste stabiilsuse hindamine .....</b>	<b>20</b>
4.1.1. Pikaajaline stabiilsus.....	20
4.1.2. Lühiajaline stabiilsus.....	20
<b>4.2. Happe mõju ravimite töölahuste stabiilsusele. ....</b>	<b>26</b>
4.2.1. Hapestamise mõju lühiajalisele stabiilsusele .....	26
4.2.2. Lahuse hapestamise mõju ühendi ionisatsiooniefektiivsusele .....	26
<b>4.3. Ravimite analüüsil meest protsessiefektiivsuse mõõtmine.....</b>	<b>28</b>
<b>Kokkuvõte .....</b>	<b>30</b>
<b>Absract.....</b>	<b>32</b>
<b>Tänuavaldused .....</b>	<b>34</b>
<b>Kasutatud kirjandus.....</b>	<b>35</b>
<b>Lisa.....</b>	<b>37</b>

## Lühendite ja mõistete sõnastik

Lühend	Inglise keeles	Eesti keeles
%ME	<i>Matrix Effect</i>	Maatrikefekt
%PE	<i>Process Efficiency</i>	Protsessi efektiivsus
%R	<i>Recovery</i>	Saagis
%S	<i>Stability</i>	Stabiilsus
C18	<i>Octadecylsilane</i>	Oktadetsüülsilaan
DC	<i>Direct Current</i>	Alalisvool
dSPE	<i>dispersive Solid Phase Extraction</i>	Dispergeeriv tahkefaasiekstraheerimine
EKUK	<i>Estonian Enviromental Research Centre</i>	Eesti Keskkonnauuringute Keskus
EMA	<i>European Medicines Agency</i>	Euroopa Ravimamet
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>	Elektropihustusionisatsioon
FDA	<i>Electrospray Ionization</i>	Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet
GC-MS	<i>Gas Chromatography Mass Spectrometry</i>	Gaasikromatograafia- massispektromeetria
HPE	<i>High Pressure Extraction</i>	Kõrgsurve ekstraheerimine
HPLC	<i>High Perfomance Liquid Chromatography</i>	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
LC	<i>Liquid Chromatography</i>	Vedelikkromatograafia
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i>	Vedelik-vedelik ekstraktsioon
m/z	<i>charge numbers of ions</i>	Massi ja laengu suhe
MeCN	<i>Acetonitrile</i>	Atsetonitril
MS	<i>Mass Spectrometry</i>	Massispektromeetria
MS/MS	<i>Tandem Mass Spectrometry</i>	Tandem-massispektromeetria
QuEChERS	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, Safe sample preparation method</i>	<i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged,</i> Safe proovi ettevalmistamise meetod

RF

*Radio frequency*

Raadiosagedus

UV

*Ultraviolet*

Ultraviolet

## Sissejuhatus

Ravimid mängivad suurt rolli meie elus - nende kasutamine võib nii inimeste kui ka loomade haigusi ennetada ja ravida. Kasvav maailma rahvastik toonud kaasa ravimite tarbimise olulise suurenemise. Seetõttu ravimite säilitamine on üheks olulisemaks aspektiks analüüsimiseks. Kasutatavad meetodid peavad olema võimalikult kõrge tundlikkusega, et uurida nende stabiilsust, mis viitab ravimaine võimele püsida kindlaksmääratud aja jooksul kindlaksmääratud identsuse, tugevuse ja puhtuse spetsifikatsioonide piires. Tänapäeval vedelikkromatograafia koos massispektromeetrilise detektoriga (LC-MS) on üks levinumatest analüüsimeetoditest, kus vedelikkromatograafiat kasutatakse ainete lahutamiseks ning massispektromeeterit kasutatakse ainete identifitseerimiseks ja kontsentratsiooni määramiseks.

Käesolev töö tehti Eesti Keskkonnauuringute Keskuse (EKUK) laboris, mis tegeleb füüsikaliste ja keemiliste laborianalüüsidega ning geotehniliste uuringutega. EKUK on vastavate riiklike institutsioonide poolt määratud toidu, toidutoorme ja alkoholi analüüsides volitatud laboriks ning pinna-, põhja-, mere-, reo- ja heitvee ning reoveesete referentlaboriks.

Käesolev bakalaureusetöö koosneb 39 leheküljest, ning kolmest peatükist. Esimeses peatükis antakse ülevaade uuritavatest ravimitest ning kirjeldatakse kasutatud meetodite - kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, elektropihustus-ionisatsioon ning massispektromeetri detektori - põhimõtteid. Teises peatükis tuuakse välja kasutatud materjalid, meetodid ning lahuste ja proovide ettevalmistused. Kolmandas peatükis kirjeldatakse eksperimentaalse töö tulemusi ning tuuakse arutelu.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1. Ravimid

Kaasaegse meditsiini ei saa ette kujutada ilma ravimiteta. Ravimid mängivad olulist rolli nii inimeste kui loomade haiguste ravis ja ennetamisel. Kasvav maailma rahvastik, suurenevad investeeringud tervishoiusektorisse, arendustegevuses, ja vananev ühiskond viimastel aastakümnetel toonud kaasa ravimite tarbimise olulise suurenemise. Negatiivse poole pealt vaates ravimitel on ulatuslikud kõrvaltoimed, mis võivad avaldada soovimatut mõju. Inimeste ja loomade tervisele avalduvaid kõrvaltoimeid uuritakse põhjalikult ohutus- ja toksikoloogiliste uuringute käigus. Ka ravimite mõju keskkonnale samuti mängib olulist rolli meie elus - suur osa igast annusest võib erituda organismist ja kasutamata ravim sageli viskatakse kanalisatsiooni. Uuringud on näidanud, et suur osa asulareoveest sisaldab ravimühendeid, mida reovee puhastusprotsessis täielikult ei saa eemaldada. Samuti ravimite jääke leitud keskkonnas põllumajandusmaa äravooludes (koduloomade poolt eritatud veterinaaravimid) ja prügilä nõrgveest (kodumajapidamistest minema visatud ravimid). Ravimite ja nende ainevahetuse mõju veekeskkonnale ja -organismidele on suures osas teadmata, nagu ka võimalikud mõjud inimeste tervisele. (1,2,3)

Farmaatsiatoodete stabiilsus viitab toote või antud ravimaine võimele püsida kindlaksmääratud aja jooksul kindlaksmääratud idententsuse, tugevuse ja puhtuse spetsifikatsioonide piires. Ravimi koostis võib tugevalt mõjutada ravimi lagunemise kiirust ja mehhanismi. Üldiselt lagunevad ravimid lahuses palju kiiremini kui tahkes olekus ja palju kiiremini vesilahustes kui mitte vesilahustes. Stabiilsustestid annavad teada, kuidas valmisravimi kvaliteet aja jooksul muutub erinevate keskkonnategurite, nt temperatuur, niiskus, pH ja valgus, mõjul. Samuti testide käigus saab teada kuidas transport, pakkematerjalid, farmatseutilised abiained ja mikroobid ravimit võivad mõjutada. Valmisravimi stabiilsustestid viiakse läbi Euroopa Ravimamet (EMA), Ameerika Ühendriikide Toidu- ja Ravimiamet (FDA) või mõne muu autoriteetse organisatsiooni juhiste alusel. (4)

## 1.2. LC-MS/MS

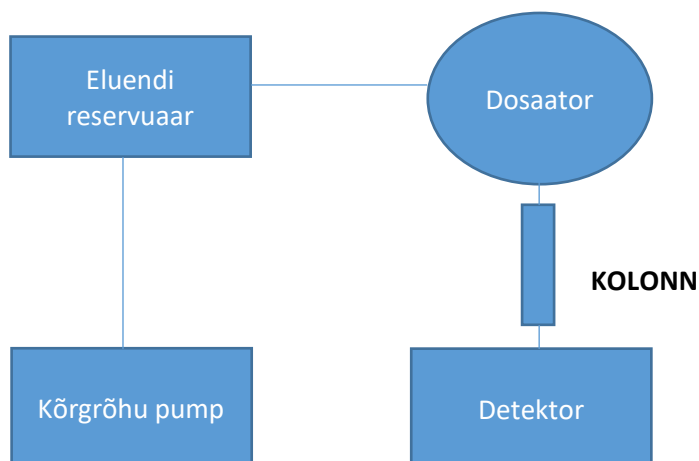
### 1.2.1. Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

Kromatograafilise analüütilise protseduuri aluseks on erinevate komponentide jaotused liikuva ja liikumatu faasi vahel. Kui proov viia liikuvasse faasi, hakkavad proovi komponendid osalema kahes protsessis: liikuv faas transpordib proovi komponendid läbi kolonni ning proovi komponendid hakkavad jaotuma liikuva ja liikumatu faasi vahel. Liikumatus faasis parema sorptsiooniga komponendid püsivad kolonnis kauem kui kehvema sorptsiooniga komponendid jaotustegurite erinevuse tõttu ning transporditakse liikuva faasi kolonnist varem välja. (5)

Töö teostamisel kasutati proovide analüüsimiseks kõrgefektiivse vedelikkromatograafiat koos tandem-massispektromeetriga (HPLC-MS/MS). HPLC on kõige mitmekülgsem ja laialdasemalt kasutatav kromatograafiline meetod, mida kasutatakse ainete eraldamiseks ja määramiseks



orgaanilistes, anorgaanilistes ja bioloogilistes proovides. HPLC süsteem koosneb eluendi reservuaarist, kõrgrõhu pumbast, dosaatorist, kolonnist ning detektorist. (Joonis 1.) (5,7)



Joonis 1 Kõrgefektiivse vedelikkromatograafi põhimõtteline skeem.

HPLC meetodis on liikuvaks faasiks vedel lahusti ehk eluend, mida pumbatakse läbi liikumatu faasi. Lahutamise protsessi sooritatakse peeneteralise täidisega kolonnis. Kolonni lõpus asub detektor, mis võimaldab aine tsooni registreerida. Proovi sisestamiseks kasutatakse dosaatorit. (5)

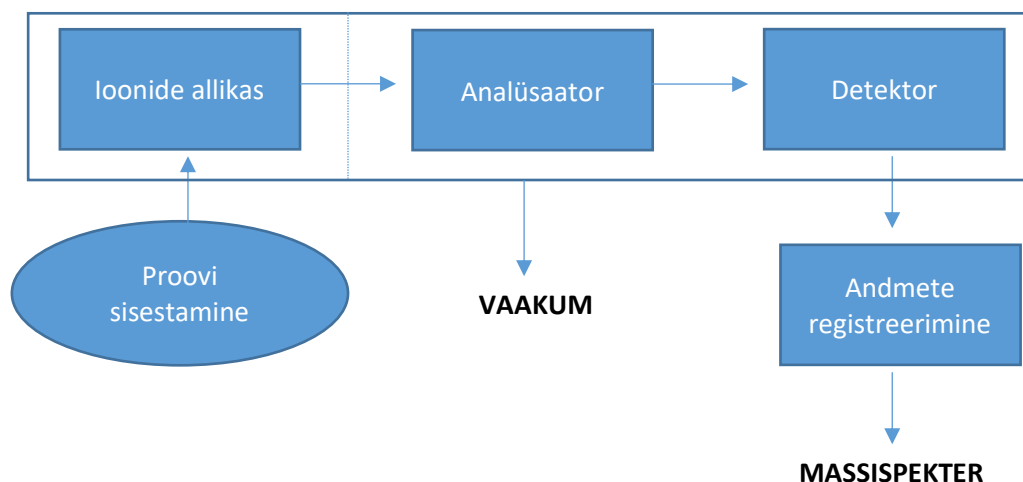
HPLC liike on palju. Kõige tuntumad on normaal- ja pööratudfaasi kromatograafia. Polaarse molekuli analüüsiks kasutatakse normaalfaasi kromatograafia, kus polaarne liikumatu faas on silikageel ning eluent on mittepolaarne (näiteks heksaan). Hüdrofoobsete ühendite analüüsiks kasutatakse pöördfaasikromatograafiat, kus mittepolaarne liikumatu faas on silikageeliga seotud pikad alküülhelad ning eluent on polaarne (näiteks vesi). (5)

Laialdaselt levinud pumbad on edasi-tagasi liikuva kolviga pumbatüübid, sest nad loovad kindla eluendivoolu kiirust ja tagavad rõhu, mis on vajalik eluendi läbi kolonni juhtimiseks. Lahutuskolonn on väga tähtis aparatuuri osa, kus toimub proovi komponentide jaotamise protsess (liikuva ja liikumatu faaside vahel). Tüüpiline kolonni pikkus on kuni 10-15 cm, sisediameeter on 4,6 mm, täidise osakeste suurus – 3,5 µm. Kolonnist väljuva ainetsooni registreerimiseks kasutatakse detektorit, et proovi komponentide kvalitatiivselt ja kvantitatiivselt analüüsida. Kõige tuntumad detektorid HPLC analüüsil on UV-detektor, fluorestsentsdetektor ja massispektromeeter. (5)

### 1.2.2. Massispektrometria

Massispektrometria (MS) on uurimismeetod, mida kasutatakse molekuli massi ja nende koguste määramiseks proovides. Massispektromeeter koosneb aine sisseviimise süsteemist, mille eesmärk on viia mikrokogus proovi iooniliskasse, kus proovi komponendid muundatakse ioonideks. Iooniliskas toimud molekuli üleminek gaasifaasi ning ioniseerimine. Sõltuvalt ionisatsioonilika tüübist võib sisse viia tahkeid aineid, vedelike ja gaase. Massianalüsaatori abil toimub ionide lahutamine nende massi ja laengu suhte järgi ( $m/z$ ). Erineva massiga ionide hulk muudetakse elektriliseks signaaliks detektoris. Andmetöötlussüsteemi abil saab registreerida

massispektreid (Joonis 2.). Massispektromeetrid nõuavad keerukat vaakumsüsteemi, et säilitada madalat rõhku massianalüsaatoris. Madal rõhk tagab suhteliselt madala kokkupõrkesageduse massispektromeetri erinevate liikide vahel, mis on oluline vabade ionide ja elektronide tootmiseks ja säilitamiseks. (6,7)



Joonis 2. Massispektromeetri põhimõtteline skeem.

Tänapäeval vedelikkromatograafia ja massispektromeetria liitsüsteemid (LC-MS) on üks levinumatest analüüsimeetoditest. HPLC kolonn võib jaotada peaaegu kõik segu komponendid eraldi aine tsoonideks. MS mõõdab analüüdi massi ja laengu suhet, mida saab kasutada proovi komponentide täpse molekulmassi arvutamiseks ning aine identifitseerimiseks. Kuna massispektromeetria jaoks on vaja, et aine oleks gaasifaasis, siis HPLC-MS süsteemide puhul kasutatakse elektropihustusionisatsiooni, mis teostab analüüdi üleminekut vedelfaasist gaasifaasi. (7,8)

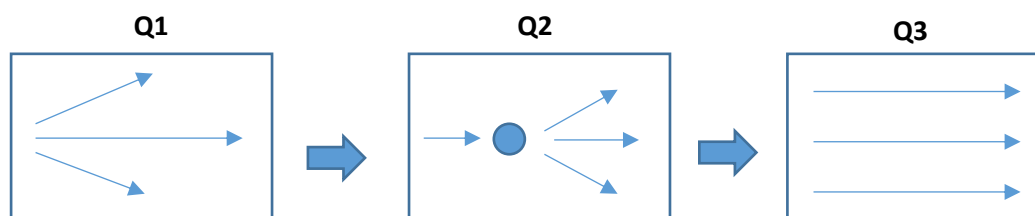
### 1.2.3. Elektropihustusionisatsioon

Elektropihustusionisatsioon (ESI) on väga pehme ionisatsiooni meetod, mis teostab analüütide ionide ülekannet lahustitest gaasifaasi. See meetod on äärmiselt efektiivne suurte, mittelenduvate, laetud molekulide analüüsi puhul. Kromatograafilist koloonist väljuv eluendi voog kiirusega keskmiselt 500 uL/min juhitakse läbi metallnõela. Nõelale rakendatakse kõrgpinge 2 kuni 6 kV. Mingi gaasi abil (tavaliselt lämmastik) pihustatakse nõelast väljub eluent aerosooliks. See aerosool koosneb laetud tilkadest suure pinnalaenguga. Need tilgad (vastavalt rakendatud potentsiaalile positiivsed või negatiivsed) liiguvad vastandelektroodi poole. Samaaegselt toimub solvendi aurustamine tilkades ja molekuli üleminek gaasifaasi ning ionisatsioon. Gaasi voog vastandelektroodi ja separaatori vahel kasutatakse laetud tilkade kuivatamiseks, nii massianalüsaatorisse jõuavad peaaegu ainult analüüsitava aine ioonid. Kuna analüsaator töötab sügavaakumis, siis kasutatakse kaheastmelist süsteemi rõhu alandamiseks. (9,10)

### 1.2.4. Massianalüsaatorid ja tandem-massispektromeetria

Kvadrupol analüsaatorit nimetatakse ka masside filtriiks. See nimetus iseloomustab väga hästi analüsaatori töö printsiibi. Kvadrupol analüsaatorid kasutavad ostsilleerivaid elektrivälju, et selektiivselt stabiliseerida või destabiliseerida raadiosagedusega kvadropoli välja läbivaid ioone. Kvadrupol massianalüsaator toimib nagu massiselektiivne filter – laseb läbi ainult teatud massi/laengu suhtega ioone. Kvadrupoolsed massianalüsaatorid koosnevad neljast paralleelsest silindrilisest metallvardast (hüperboolse sisepinnaga elektroodid), mis paiknevad keskteljest võrdsel kaugusel. Kui korruga rakendada alalisvoolu ja kõrg sagedusega vahelduvvoolu pingete kombinatsiooni, süsteemis tekib elektriväli väga kiiresti muutuva faasiga. Kvadropoli sattunud ioonid liiguvad paralleelselt varrastega ja ostsilleeriva välja mõjul hakkavad x ja y telgedel võnkuma. Samal ajal võnkumise amplituud pidevalt kasvab ja mingil hetkel ionide amplituud on nii kõrge, et ioonid neutraliseeruvad vastu varrast. Ainult nende osakeste amplituud, mille  $m/z$  suhe vastab rakendatud potentsiaalide kombinatsioonile, on fikseeritud, mistõttu osakesed takistamatult jõuavad detektorisse. Nii püsivate raadiosageduslike parameetritega skanneerides, saab üks teise järel analüüsida kõiki ioonide uuritavas proovis. (11,12,13)

Süsteem mis koosneb kolmest kvadrupolist (Joonis 3.), sobib ideaalselt tandem massi spektromeetria analüüsi läbiviimiseks. Esimene kvadrupol (Q1) laseb läbi ainult ioone etteantud  $m/z$  suhtega. Teine (Q2) töötab ainult raadiosagedusega režiimis ja selle kvadropoli kamber on täidetud inertsgaasiga. Ioonid, mis esimeses süsteemis valiti, põrkuvad kokku gaasi molekulidega ja nii toimub ionide põrkedissotsatsioon fragmentideks. Selle reaktsiooni produkte analüüsib kolmas kvadrupol (Q3). Kasutades erinevaid gaase võib muuta fragmentatsiooni taset (mida suurem on gaasi molekul, seda efektiivsem on fragmentatsioon). (11,12,13)



Joonis 3. Tandem-massispektromeetria.

### 1.3. Proovi ettevalmistus ravimite analüüsil

Ekstraheerimine on protsess, mille käigus viiakse üks või mitu huvipakkuvat ühendit ühest faasist või nende algsest maatriksist teise faasi, kus toimub edasine töötlemine ja analüüs. Ekstraheerimine võib olla tahkest faasist vedelasse, vedelast faasist vedelasse ja nii edasi. Ekstraheerimismeetodi valikul lähtutakse sageli sellest, mis on olemas ja mida on varem kasutatud. Analüütiku oskused ja kogemused on sageli ekstraheerimis- ja analüüsiprotseduuride toimimise võti. Tavaliselt kasutatavad ekstraheerimismeetodid:

- Tahke-vedelik ekstraktsioon

- Vedelik-vedelik ekstraktsioon
- Soxhlet ekstraktsioon
- Ultraheli ekstraktsioon
- Mikrolainete abil ekstraheerimine
- Kõrgsurve ekstraheerimine
- QuEChERS ekstraktsioon (14,15,16,17)

Looduslike saaduste ekstraheerimine toimub järgmiste etappide kaudu:

1. solvent tungib tahkesse maatriksisse;
2. lahustunud aine lahustub solventis;
3. lahustunud aine hajutatakse tahkest maatriksist välja;
4. ekstraheeritud lahustunud ained kogutakse kokku. (16)

Selles töö raames oli kasutatud QuEChERS-i meetod. See on akronüüm sõnadest Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged ja Safe tähistades, et see meetod on kiire, lihtne, odav, robustne, efektiivne ja ohutu. Selle meetodi avastati 2003. aastal Lehotay ja Anastassiades pestitsiidide määramiseks köögi- ja puuviljades. Nüüd on QuEChERSi laialdaselt kasutatud farmaatsia-, kliinilises ja keskkonnanalüüsis. See on kaheastmeline protseduur, mis sisaldab ekstraheerimist solventiga ja lisatud sooladega ning puhastamist dispergeeriva tahkefaasiekstraheerimisega (dSPE). QuEChERS annab täpsed analüüsitulemused suure saagisega, säästab aega ja tööjõudu, vähendab ohtlike lahustite tarbimist ja jäätmete kõrvaldamist ning kasutab minimaalse arvu sammudega vähem laboriklaasi. (17)

## **1.4. Valideerimine**

Meetodi valideerimine on protsess, millega määratakse meetodi ülesehitus, töötingimused, piirangud ning kinnitatakse, et analüütiline protseduuri kasutamine sobib konkreetse katse jaoks. Keemiliste ja bioloogiliste ravimite ja nende metaboliitide kontsentratsiooni mõõtmine bioloogilistes maatriksites on oluline aspekt ravimite arengus. Meetodi uuringute tulemuste abil saab uurida ravimite efektiivsust ja ohtu, sellepärast on väga oluline, et kasutatavad bioanalüütilised meetodid oleksid hästi nõuetekohaselt arendatud ja dokumenteeritud. (18)

### **1.4.1. Stabiilsus**

Antud töö raames keskenduti stabiilsusele, mis on väga oluline valideerimise parameeter, mille mõõtmine annab teada, et proovi ettevalmistamine, töötlemine, analüüsi etapid ning kasutatavad säilitustingimused ei mõjuta analüüdi kontsentratsiooni. Tavaliselt analüüdi stabiilsust hinnatakse kolmes paralleelis madala ja kõrge taseme kontsentratsiooniga. Kalibreerimisstandardid, mis on valmistatud teadoleva koguse analüüdi lisamisega maatriksisse, annavad kalibreerimiskõvera, mille alusel viiakse läbi kvantitatiivne analüüs. Keskmise kontsentratsioon igal tasemel peaks olema  $\pm 15\%$  võrreldes kalibreerimis käigus leitud kontsentratsioonitega. Kuna selle töö eesmärgiks oli võrrelda stabiilsust erinevates solventides, tehti hindamine ühel kontsentratsioonil. On olemas erinevaid stabiilsuse tüüpe, kuid antud töö raames hinnati lühiajalist ja pikkaajalist stabiilsust. (18)

Pikaajalise stabiilsuse ( $\%S_{piikk}$ ) ja lühiajalise stabiilsuse ( $\%S_{lüh}$ ) arvutamiseks kasutati järgmiseid valemid:

$$\%S_{piikk} = \frac{P_{vana}}{P_{uus}} \times 100\% \quad (1)$$

$$\%S_{lüh} = \frac{P_{viimane}}{P_{esimene}} \times 100\% \quad (2)$$

kus on  $P_{vana}$  vanade standardlahuste piikide pindala keskmine väärtus kolmest paralleelidest ja  $P_{uus}$  on uute standardlahuste piikide pindala keskmine väärtus kolmest paralleelidest,  $P_{viimane}$  on uuritava ühendi viimase süsti piigi pindala ja  $P_{esimene}$  on uuritava ühendi esimese süsti piigi pindala (esimese süsti piigi ja viimase süsti piigi vahe on umbes 15,5 h)

Ravimite lagunemine proovides võib toimuda kas pöörduvate või pöördumatute protsesside kaudu. Tavalised tegurid, mis stabiilsust mõjutavad, on temperatuur, valgus, pH, oksüdatsioon ja ensümaatiline lagunemine. Sageli saab analüüte nagu ravimid stabiliseerida, muutes nende maatriksi keemilist koostist. Ravimite lagunemise põhjus sageli sõltub pH-st. Tuleb alati määrata milline pH on rohkem sobilik lahuse säilitamiseks. (19). Antud töös uuriti hapestamise mõju stabiilsusele.

Hapestatud lahuste stabiilsuse arvutamiseks kasutati valemit:

$$\%S_{hapestatud} = \frac{P_{viimane}}{P_{esimene}} \times 100\% \quad (3)$$

kus  $\%S_{hapestatud}$  on protsent, mis näitab kui stabiilne lahus on,  $P_{viimane}$  on uuritava ühendi viimase süsti piigi pindala ja  $P_{esimene}$  on uuritava ühendi esimese süsti piigi pindala (esimese piigi ja viimase piigi vahe on umbes 15,5 h)

Lisaks stabiilsusele võib hape lisamine mõjutada ionisatsiooniefektiivsust. Antud juhul seda saab hinnata valemiga:

$$\%IE = \frac{P_{0,1\% HCOOH}}{P_{hapestamata}} \times 100\% \quad (4)$$

kus  $P_{0,1\% HCOOH}$  on uuritava ühendi hapestatud lahuses esimese süsti piigi pindala tulemus ja  $P_{hapestamata}$  on uuritava ühendi hapestamata lahuse esimene süsti piigi pindala tulemus.

## 1.5. Maatriksefekt, saagis ja protsessiefektiivsus

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia, mis on ühendatud elektropihustusiooniallikaga tandem-massispektromeetriga (HPLC-ESI-MS/MS) on analüütiline meetod segu komponentideks eraldamiseks ning molekulmassi arvutamiseks. Meetodi kasutamisel on oluline käsitleda maatriksefekte, mis ilmnevad siis, kui maatriksi molekulid ühendavad koos analüüdiga, mis muudavad ESI ionisatsiooniefektiivsust ja halvendavad meetodi tundluskust ja täpsust. Maatriksefeki tuvastamiseks on mitu võimalust, üks nendest ekstraheerimisjärgne proovi rikastamine, mis nõuab prooviekstrakte koos huvipakkuva analüüdi, mis oli lisatud pärast ekstraheerimist ja seda saab võrrelda koos tavalise rikastumisega ja teada saada ekstraheerimis efektiivsust. Väärtus 100% näitab, et maatriksefekt ei esine. Väärtus rohkem kui 100% tähendab signaali võimendamist, samas kui väärtus vähem 100% näitab signaali mahasurumist. (20,21)

EMA juhendi lähtudes tuleks maatriksefekt tuleks hinnata kolmes paralleelis madala ja kõrge taseme kontsentratsiooniga, ning maatriksefekt  $\pm 15\%$  loetakse olematuks. (18)

Saagis (R) tuleks alati hinnata proovide ekstraheerimise meetodites, mis näitab võrrdlus ekstraheerimiseelse rikastamisproovi ja ekstraheerimisjärgse rikastamisproovi. Saagis esitatakse protsendina ja analüüdi saagis ei pea olema 100%, kuid analüüdi ja sisestandardi saagis peaks olema ühtlane. Katset soovitatakse teha, võrreldes mitme kontsentratsiooniga, tavaliselt kolme kontsentratsiooniga (madal, keskmine ja kõrge). (18)

Protsessi efektiivsus (PE) näitab proovi ettevalmistamisel tekkivate võimalike kadude ja ionisatsiooni suurenemise või mahasuremise ionisatsiooniallikas. PE on kasulik parameeter analüüsimeetodi iseloomustamiseks. (22)

Maatriksefeki (%ME), saagise (%R) ja protsessiefektiivsuse (%PE) hindamiseks kasutati järgnevaid valemeid:

$$\%ME = \frac{S_{\text{ekstraheerimisjärgne rikastamisproov}}}{S_{\text{solvent}}} \times 100\% \quad (5)$$

$$\%R = \frac{C_{\text{ekstraheerimiseelne rikastamisproov}}}{C_{\text{ekstraheerimisjärgne rikastamisproov}}} \times 100\% \quad (6)$$

$$\%PE = \frac{C_{\text{ekstraheerimiseelne rikastamisproov}}}{C_{\text{teoreetiline rikastamisproov}}} \times 100\% \quad (7)$$

$S_{\text{ekstraheerimisjärgne rikastamisproov}}$  on ühendi signaali pindala kontsentratsiooniga 500 ng/L, mida rikastati analüüdiga pärast proovi ettevalmistamist.

$S_{\text{solvent}}$  on ühendi signaali pindala milli-Q-vees kontsentratsiooniga 500 ng/L.

$C_{\text{ekstraheerimiseelne rikastamisproov}}$  on kalibreerimisgraafiku põhjal leitud analüüdi kontsentratsioon proovis, mida rikastati ravimitega enne proovi ettevalmistamist.

$C_{\text{ekstraheerimisjärgne rikastamisproov}}$  on kalibreerimisgraafiku põhjal leitud analüüdi kontsentratsioon proovis, mida rikastati analüüdiga pärast proovi ettevalmistamist.

$C_{\text{teoreetiline rikastamisproov}}$  teoreetiline lahuse kontsentratsioon rikastamiseks.

## 2. Töö eesmärk

Töö eesmärgiks oli ravimite LC-MS/MS analüüsi mõnede mõjutavate parameetrite uurimine.

Nimelt:

1. Ravimite pikaajalist ja lühiajalist stabiilsus erinevates veeliikides
2. Hapestamise mõju stabiilsusele ja ionisatsiooniefektiivsusele
3. Protsessi efektiivsus, maatriksefekt ja saagis mee analüüsi puhul.



## 3. Eksperimentaalne osa

### 3.1. Kasutatud kemikaalid ja materjalid

Standardlahuste ettevalmistuse käigus kasutati metanooli (MeOH, pestitsiidijääkide GC-MS analüüsiks, Merck), puhast destilleeritud vett (Synergy, Millipore), 37% hüdrokloriidi (HCl, puhas analüüsiks, Sigma). Stabiilsuskatsete jaoks kasutati solventideks dest. vett, filtreeritud kraanivett ja filtreeritud pinnavett (laborisse saabunud proov).

Ravimite analüüsil meest kasutati prooviettevalmistusel atsetonitrili (MeCN, pestitsiidijääkide analüüsiks, Honeywell), sipelghapet (CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, massispektromeetria puhtusega, Fisher Chemical), magneesiumsulfaati (MgSO<sub>4</sub>, puhas analüüsiks, Sigma-Aldrich,), naatriumkloriidi (NaCl, analüüsipuhas, Honeywell) ja C18 sorbent (osakeste suurus 40 µm kuni 120 µm, Agilent Technologies).

Ravimite standardite info on toodud Lisas (Tabel 5.).

### 3.2. Kasutatud aparatuur

Ainete kaalumiseks kasutati 0,01 mg lahustusvõimega analüütilist kaalu Analüütiline kaal Mettler Toledo MS105DU.

Lahuste valmistamisel kasutati ruumalade mõõtmiseks erineva mahuga Eppendorfi automaatpipette (5000, 1000, 100, 20 µl), mis võimaldavad pipeteerida mahte 5 µl kuni 5 ml, süstlafiltreid regenereeritud tselluloosist membraaniga 0,22 µm poorisuurusega (Whatman RC, 0,2 µm, SPARTAN13/0.2), vaakumiga eluendi filtreerimise süsteemi, laboratoorseid klaasnõusid (mõõtkolvid, viaalid), prooviviaale ja kõrge LC jaoks, 50 ml ja 15 ml polüpropüleenist tsentrifuugituube ja keraamilisi homogeniseerimiskivikesi.

Lisaks kasutati tsentrifuugi Eppendorf 5430R, mille rootorisendid 50 ml ja 15 ml tuubide jaoks.

LC-MS/MS mõõtmiseks kasutati ülikõrgerõhu Infinity 1290 vedelikkromatograafi, mille detektoriks oli kolmekordne kvadrupool Agilent Technologies 6490. Massispektromeetrilisel analüüsil kasutati positiivsete ionide režiimi ning ionisatsiooniallikana elektropihustusionisatsiooni (Agilent JetStream ESI).

Töös kasutatud analüütiliseks kolonniks oli Zorbax Eclipse Plus C18 (RRHT) mõõtmetega 2.1 x 50 mm ja osakese suurusega 1,8 µm (Agilent Technologies). Eelkolonniks oli Zorbax Eclipse Plus C18 mõõtmetega 2.1 x 5 mm ja osakese suurusega 1,8 µm (Agilent Technologies).

Integreerimiseks ja tulemuste arvutamiseks kasutati Masshunteri programmi.

### 3.3. LC-MS meetod

Vedelikkromatograafia meetodis kasutati gradientelueerimist ja eluentideks olid 0,1% sipelghape (eluent A) ja metanool (eluent B). Eluent A valmistamiseks pipeteeriti 0,5 mL sipelghapet 500 mL mõõtkolbi ja täideti märgini dest.veega. Filtreeriti läbi 0,22 µm filtri kasutades solvendi filtreerimise süsteemi.

Eluendi voolukiiruseks oli 0,4 mL/min, süsti suuruseks oli 100 µl, kolonni temperatuur oli 40 °C ja proove hoiti autosampleris temperatuuril 4 °C. Optimeeritud gradientprogramm on toodud (Tabel 1.)

Tabel 1. Optimeeritud gradientprogramm.

Time [min]	A [%]	B [%]
0.00	95.00	5.00
3.25	60.00	40.00
5.00	30.00	70.00
6.00	0.00	100.00
8.00	0.00	100.00

Kromatograafist väljuva joa pihustamiseks kasutati ESI (Agilent JetStream) allikat gaasi rõhul 30 psi (207 kPa). Kuivatusgaasi voolukiirus oli 15 L/min ning temperatuur 260 °C, kardingaasi voolukiirus oli 12 L/min ning temperatuur 375 °C. Kapillaaripinge positiivses režiimis oli 3500 V. *Nozzle Voltage* positiivses režiimis oli 300 V.

### 3.4. Lahuste valmistamine

Ravimite põhistandardlahused kontsentratsiooniga 1 mg/mL valmistati tahketest analüütilistest standardainetest, solvendina kasutati MeOH, va diatrissoolhape, iopamidool, iopromiid, amoksitsilliin, mille korral korral kasutati dest. vett, kuna need ei lahustu MeOH-is ja tsiprofloksatsiini jaoks kasutati 0,1 M HCl vesilahust, kuna see lahustatab hästi ainult happelises keskkonnas. Kõik standardlahused säilitati temperatuuril -18 °C sügavkülmas.

Põhistandardlahustest valmistati kaks kontsentratsiooniga 10 µg/mL standardlahust, millest üks sisaldas MeOH-is lahustatud ravimeid ja teine vees lahustuvaid ravimeid. Need kaks standardlahust pipeteeriti kokku üheks segulahuseks kontsentratsiooniga 100 ng/mL (40 µL 10 µg/mL segulahust MeOH-s + 40 µL 10 µg/mL segulahust dest.vees + 3920 µL MeOH 4 mL viaali). Stabiilsuskatsete jaoks valmistati töölahus LC viaali 1 ng/mL (10 µL 100 ng/mL lahust + 990 µL solventi). Solventidena kasutati sõltuvalt katsest dest.vett, filtreeritud kraanivett või filtreeritud pinnavett.

Happe mõju uurimiseks ravimite stabiilsusele, valmistati LC viaali kolm erinevat töölahust kontsentratsiooniga 1 ng/mL (15 µL 100 ng/mL lahust + 1485 µL solventi), kus solventideks kasutati vastavalt dest. vett, filtreeritud kraanivett või filtreeritud pinnavett.

Kalibreerimislahused olid tehtud kraanivees kontsentratsioonidega 0 ng/L, 2,5 ng/L, 5 ng/L, 10 ng/L, 25 ng/L, 50 ng/L, 100 ng/L, 250 ng/L, 500 ng/L, 1000 ng/L.

### **3.5. Stabiilsuse katsed**

Ravimite pikaajalise stabiilsuse hindamiseks võrreldi kahte töölahust kontsentratsiooniga 1 ng/mL, millest üks oli valmistatud varem laboris kaalutud standardlahustest ja teine sellest 6 kuud hiljem töö autori poolt valmistatud standardlahustest. Amoksitsilliin, ranitidiin hüdrokloriid, tsiprofloksatsiin ja metronidasool puudusid vanemates laboris valmistatud lahustest. Pikaajalist stabiilsust hinnati milli-Q vees.

Ravimite lühiajalise stabiilsuse uurimiseks valmistati töölahus kontsentratsiooniga 1 ng/mL ja mõõtmised tehti 15,5 h vahega, millele vahetult järgnes mõõtmine. Lühiajalist stabiilsust hinnati dest. vees, filtreeritud kraanivees ja filtreeritud pinnavees

Selleks, et uurida happe mõju ravimite stabiilsustele ja ionisatsiooniefektiivsus valmistati 1 ng/mL töölahused dest.vees, filtreeritud kraanivees ja filtreeritud pinnavees nii puhtalt kui ka hapestatult (0,1% HCOOH lisandiga). Lahused valmistati vahetult enne analüüsimise algust (maksimaalselt seisid paar minutit).

### **3.6. Proovide ettevalmistamine QuEChERS meetodil**

Ravimite analüüsil meest protsessiefektiivsuse hindamise katseks valmistati nullproov ja ekstraheerimiseelne rikastamisproov ning nendest omakorda edasi ekstraheerimisjärgne rikastamisproov.

Nullproovi ning ekstraheerimisjärgse rikastamisproovi jaoks kaaluti 5 g mett (Eestist pärit ja eelnevalt kontrollitud, et see ei sisalda pestitsiide ega ravimeid) 50 ml-sse tsentrifuugituubi. Ekstraheerimiseelse rikastamisproovi valmistamiseks kaaluti samuti 5 g mett 50 ml-sse tsentrifuugituubi ning sellele lisati 25 µL 10 µL/mL ravimite standardlahust.

Seejärel lisati proovidele 10 mL dest.vett ja suur homogenisaatorkivike. Tsentrifugituube loksutati 1 minut, seejärel lisati 10 mL MeCN ja 10 µL sipelghapet, raputati käes 1 minut, siis lisati 4 g MgSO<sub>4</sub> ja 1 g NaCl. Saadud segu loksutati käes 1 minut, seejärel tsentrifugiti 4500 rpm juures 5 minutit. Peale tsentrifugimist pipeteeriti 4 mL supernatanti 15 mL tsentrifuugituubi, kus oli dSPE segu (200 mg C18 ja 600 mg MgSO<sub>4</sub>). Tsentrifugituube raputati käes 1 minut ning tsentrifugiti 4500 rpm juures 5 minutit.

Nullproovi korral tehti ekstraktist 50x lahendus, 300 µL nullproovile lisati 14,7 mL dest.vett, ning saadud lahus filtreeriti süstafiltriga 15 mL viaali ja LC-MS analüüsiks pipeteeriti omakorda LC viaali. Ekstraheerimiseelse rikastamisproovi ekstrakti korral tehti 50x lahendus, 80 µL ekstraktile lisati 3,92 mL dest.vett ning saadud lahus filtreeriti süstafiltriga 2 mL LC viaali.

Ekstraheerimisjärgne rikastamisproov valmistamiseks tehti 50x lahendus, pipeteeriti kokku 2 mL lahjendamata nullproovi ekstrakti ja 5 µL 10 µL/mL ravimite standardlahust.

## 4. Tulemused ja arutelu

### 4.1. Standardlahuste stabiilsuse hindamine

#### 4.1.1. Pikaajaline stabiilsus

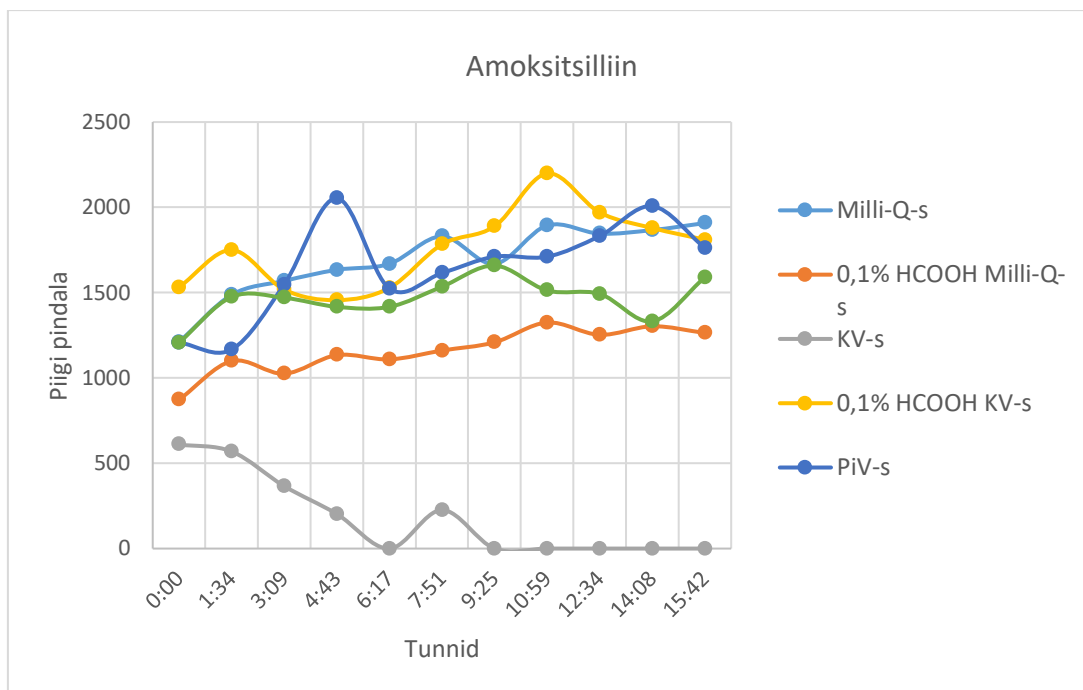
Üheks töö eesmärgiks oli uurida ravimite põhstandardlahuste pikaajalist stabiilsust 6 kuu jooksul. Tulemused on toodud Tabel 2. Kõiki standardlahused säilitati temperatuuril -18 °C. Pikaajalise stabiilsuse võrdlusest puuduvad amoksitsilliin, ranitidiin hüdrokloriid, tsiprofloksatsiin, klindamütsiin hüdrokloriid ja metaflumisoon sellepärast, et need analüüdid lisandusid analüüsimiseks laborisse hiljem ja neile on hinnatud vaid lühiajaline stabiilsus. Pikaajalise stabiilsuse hindamiseks kasutati värsketest lahustest valmistatud kalibreerimisgraafikuid.

Tulemusi hinnatakse selliselt, et 100% tähendab, et lahuse kontsentratsioon ei ole ajas muutunud ja madalam kui 100% tähendab, et on toimunud lagunemine. Tulemustest saab järeldada, et mõned ühendid polnud pikaajaliselt stabiilsed, nagu propranolool hüdrokloriid ja fenofibriinhape, mida oli peale 6 kuud alles 67%. Kuna tehtud ainult üks katse, tuleks edasise kasutuse jaoks edasi uurida, kas tegemist oli juhusliku hälbimisega või lahused tõesti ei ole stabiilsed, kas näiteks ei mõjutanud nende stabiilsust nende vahepealne kasutamine toatemperatuuril. Ibuprofeeni kõrge tulemus võib olla seostatav selle analüüsiga, sest ibuprofeen on väga madala tundlikkusega ning piik madal ja keeruline integreerida. Seetõttu võis 1 ng/mL olla liiga madal kontsentratsioon stabiilsuste hindamiseks ning kindlaid järeldusi tulemuste kohta teha pole võimalik. Muude lahuste stabiilsuse hindamise tulemused olid vahemikus 90%-116%. See, et tulemused on üle 100%, on põhjustatud sellest, et analüüsil on ikka teatud varieeruvus ning seega on ootuspärane, et tulemused on ka natuke üle 100%. Kokkuvõtvalt näitab tulemuste väike varieeruvus, et standardlahused olid metanoolis 6 kuu jooksul hästi säilinud.

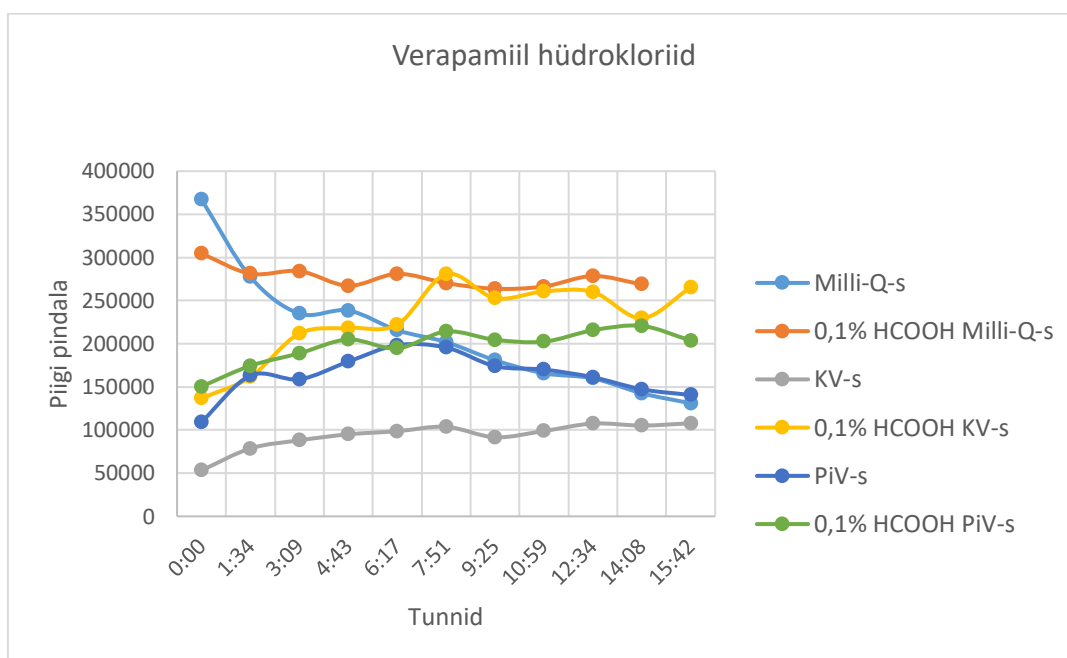
#### 4.1.2. Lühiajaline stabiilsus

Teiseks töö eesmärgiks oli uurida töölahuste lühiajalist stabiilsust erinevates veeliikides, dest. vees, kraanivees ja pinnavees. Tulemused on toodud Tabel 2. Töös ei toodud kõikidele ravimitele graafikuid lühiajalise stabiilsuse kohta, kuid teatud kohtades on töösse lisatud olulisemate tulemuste visualiseerimiseks mõned graafikud.

Lühiajalist stabiilsust hinnati 15,5 h jooksul süstides järjest sama lahust autosampleris. Lühiajalise stabiilsuse kohta võib järeldada, et üldiselt kõikides solventides 15,5 h jooksul oli uuritavate ravimite töölahuste stabiilsus väga hea. Kuid oli ka omapäraselt käituvaid ravimeid. Näiteks amoksitsilliini korral oli probleeme stabiilsusega kraanivees (Joonis 4.), samas kui dest. vees ja filtreeritud pinnavees oli amoksitsilliin stabiilne. Sarnane trend on verapamiil hüdrokloriidil (Joonis 5.), mis laguneb järk-järgult 15,5 h jooksul dest.vees ära, kuid kraanivees ja pinnavees on stabiilne. Selline käitumine võib olla tingitud sellest, et mõnikord looduslikes proovides säilitamine on parem, sest pinnavesi sisaldab erinevaid ühendeid, mis võivad aidata stabiliseerida. Neid ühendeid aga dest. vees ei esine. Samuti erinev kraanivee ja pinnavee pH dest. vee pH-st.

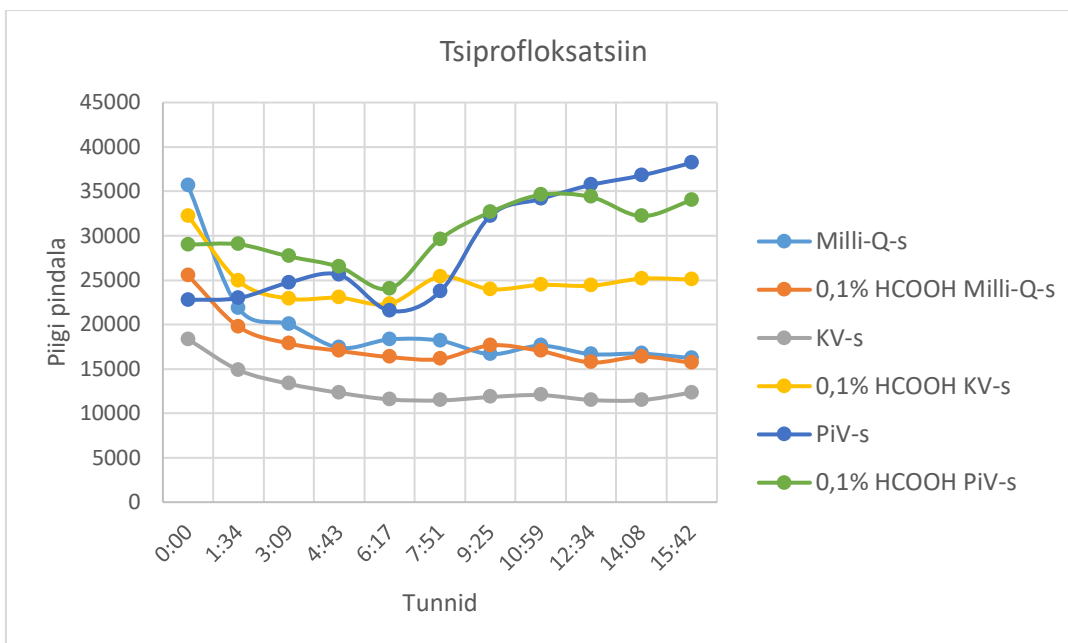


Joonis 4. Amoksitsilliini korral happe mõju lühiajalisele stabiilsusele.

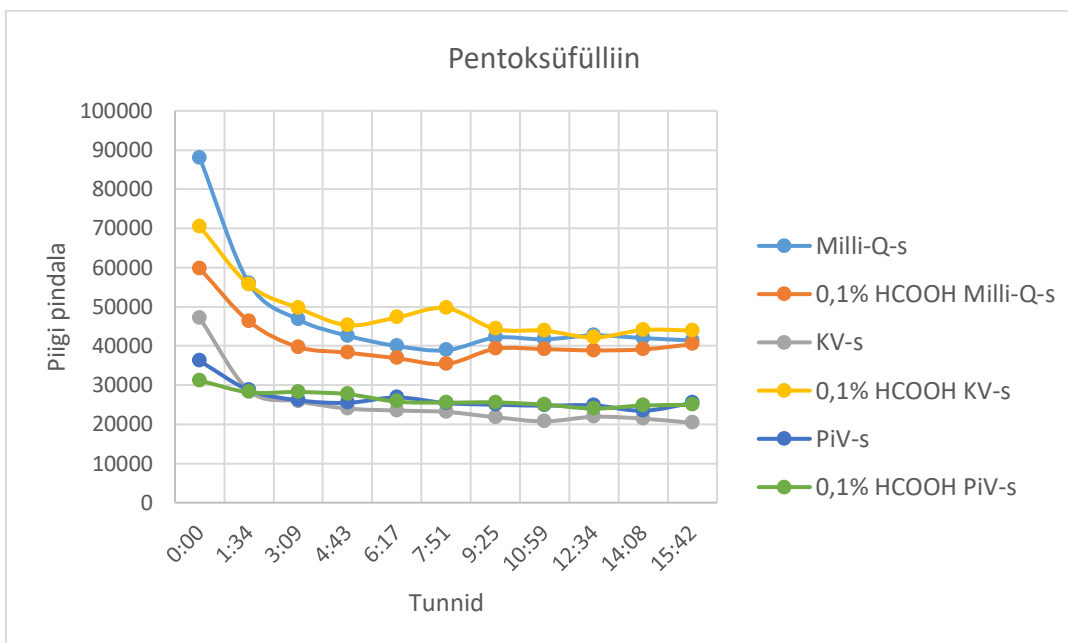


Joonis 5. Verapamiil hüdroksiidi korral happe mõju lühiajalisele stabiilsusele.

Mitmete ühendite korral esimeste tundidega ühendite kontsentratsioon lahuses mõnevõrra vähenes, kuid seejärel kontsentratsioon stabiliseerus ja ühendi sisaldus jäi püsivaks. Eelkirjeldatud muutus toimus järgnevate ühenditega: ranitidiin hüdroksiid dest.vees; 4-atsetüülaminoantipüriin, iopamidool kraanivees ja pinnavees; tsiprofloksatsiin (**Error! Reference source not found..**) Dest. vees ja kraanivees; fenofibriinhape, pentoksüfülliin (**Error! Reference source not found..**) ja oksarbatsepiin kõikides veeliikides (Tabel 2). See võib olla tingitud masina tundlikkusega, mis võib ajas väheneda kui ionisatsiooniallikasse satuvad proovide jäägid. Seega tuleks katset korrata, et teha lõplik otsus nende ravimite lühiajalise stabiilsuse kohta.

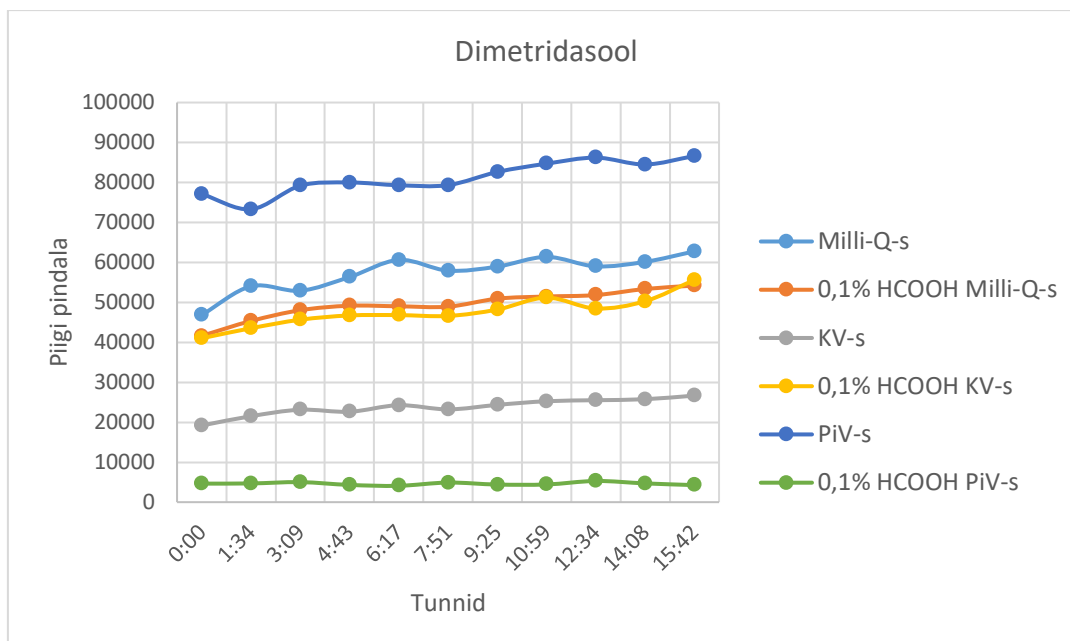


Joonis 6. Tsiprofloksatsiini korral happe mõju ühendi lühiajalisele stabiilsusele.



Joonis 7. Pentoksüfülliini korral happe mõju lühiajalisele stabiilsusele.

On näha, et osade ühendite puhul (diatriisoolhape dest.vees, amoksitsilliin dest.vees ja pinnavees, tsiprofloksatsiin (**Error! Reference source not found.**) pinnavees, dimetridasool (Joonis 8.) dest.vees ja kraanivees ja verapamiil hüdroksiid kraanivees ja pinnavees) kontsentratsioonid pole vähenenud mõõdetavates lahustes, mis osutab nende lühiajalisele stabiilsusele, kuid joonistel on näha, et masina tundlikkus nende ühendite analüüsimise ajas tõusis. See võiks tuleneda sellest, et tööd alustades masina tundlikkus ajas kõigub ning võib juhtuda, et signaal ka suureneb ajas (Tabel 2.).



Joonis 8. Dimetridasooli happe mõju lühiajalisele stabiilsusele.

Metaflumisooni kontsentratsioon vähenes lühiajalise stabiilsuse mõõtmisel kõikides veeliikides, mis viitab ühendi lagunemisele ja seda analüüsid tuleb tähele panna, et puhas dest.vesi ei ole hea solvent kalibreerimisgraafiku valmistamiseks. Tuleks leida mõni muu solvent, kus metaflumisoon oleks stabiilne või kasutada stabilisaatoreid.

Tabel 2. Ravimite pika- ning lühiajalise stabiilsuse hindamine erinevates veeliikides.

Analüüt	Pikaajaline stabiilsus	Lühiajaline stabiilsus					
	MeOH-s säilitatud, analüüsiks valmistatud milli-Q lahus	Milli-Q		Kraanivesi		Pinnavesi	
		Hapestamata	0,1% HCOOH	Hapestamata	0,1% HCOOH	Hapestamata	0,1% HCOOH
Iopamidool	98%	99%	110%	60%	68%	71%	81%
Diatrisoolhape	97%	164%	139%	112%	87%	108%	92%
Amokitsilliin	Pole vanas standardlahuses	158%	145%	0%	118%	146%	132%
Metronidasool	111%	122%	121%	129%	127%	121%	126%
Ranitidiin hüdrokloriid	Pole vanas standardlahuses	71%	79%	109%	110%	115%	97%
Dimetridasool	107%	134%	130%	139%	136%	112%	92%
Iopromiid	90%	103%	110%	81%	88%	93%	103%
Lignokaiin / lidokaiin	102%	101%	108%	102%	104%	90%	78%
4-atsetüülaminoantipüriin	106%	62%	76%	75%	78%	111%	121%
Tsiprofloksatsiin	Pole vanas standardlahuses	46%	61%	67%	78%	168%	117%
Antipüriin/Fenaksoon	91%	105%	105%	102%	109%	105%	110%
Pentoksüfülliin	103%	47%	68%	43%	62%	70%	80%
Propranolool hüdrokloriid	67%	86%	92%	86%	91%	102%	107%

Tabel 2. jätkub järgmisel lehel



Tabel 2. jätkub

Klindamütsiin hüdrokloriid	Pole vanas standardlahuses	108%	119%	116%	121%	113%	113%
Okskarbatsepiin	105%	50%	64%	49%	61%	59%	71%
Verapamiil hüdrokloriid	106%	36%	88%	202%	194%	129%	135%
Propüfenasoon	111%	101%	102%	94%	95%	109%	112%
Rosuvastatiin	107%	105%	106%	99%	100%	114%	102%
Meklosiin	116%	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Klofibriinhape	92%	109%	113%	116%	118%	99%	121%
Fenofibriinhape	67%	49%	63%	65%	61%	80%	90%
Ibuprofeen	199%	-*	-*	-*	-*	-*	-*
Metaflumisoon	Pole vanas standardlahuses	17%	11%	18%	17%	38%	37%
Ivermektiin	110%	-*	-*	-*	-*	-*	-*

\*Meklosiini piik on pinnavees kohe pärast süstimist väga väikese pindalaga, kohe ära lagunenu, aga milli-Q-s ja kraanivees piik esiteks suurema pindalaga, aga kohe pärast 1,5 h lagunes ära.

\*Ibuprofeen ja \*Ivermektiin liiga madalad piikide pindalad, et stabiilsuskatset teha.

## **4.2. Happe mõju ravimite töölahuste stabiilsusele.**

Eesmärgiks oli hinnata, kuidas happe lisamine analüüsitava ravimite analüüsil võib mõjutada töölahuste stabiilsust ja ionisatsiooniefektiivsust. Kuna näha oli, et stabiilsusega olid probleemid, tuleks uurida, kas happe lisamine võib parandada stabiilsust.

### **4.2.1. Hapestamise mõju lühiajalisele stabiilsusele**

Sarnaselt eelpool läbiviidud lühiajalise stabiilsuse hindamisele viidi läbi ka hapestatud lahuste lühiajalise stabiilsuse hindamine. Tulemused on toodud Tabel 2, mille põhjal võime järeldada, et hapestamine ei avaldanud enamikule ühenditest suurt mõju ning tulemused olid sarnased hapestatud ja hapestamata proovidel. Kuid oli üks erand ning amoksitsilliini puhul oli näha suur efekt, kui kraanivett hapestati (Joonis 4.). Puhtas kraanivees lagunes aine 5 tunni jooksul ära, aga hapestamine tõstis ühendi stabiilsust lahuses. Ka verapamiil hüdrokloriid lagunes puhtas dest.vees, aga hapet lisades on ravimi lahus stabiilsem (Joonis 5.). Seega saab järeldada, et amoksitsilliini ning verapamiil hüdrokloriidi lahuseid tasub valmistada hapestatud solventides. Samuti tuleks hapestada ka proove nende ühendite määramisel.

### **4.2.2. Lahuse hapestamise mõju ühendi ionisatsiooniefektiivsusele**

Tabel 3 on toodud tulemused happe mõju ionisatsiooniefektiivsusele. Happe mõju ionisatsiooniefektiivsusele arvutamiseks kasutati valemit 4. Tulemused 100% viidavad, et mõju ionisatsiooniefektiivsusele puudub. Üle 100% näitavad seda, et hapestamine aitab kaasa paremale ionisatsioonile ning tulemused alla 100% näitavad, et ionisatsioon hapestatud proovi korral on maha surutud. Tulemusi hinnati nii dest. veele, kraaniveele kui ka pinnaveele.

Tulemused näitavad, et happe lisamine dest.vee proovidele tegi keskmiselt ravimite ionisatsiooniefektiivsused mõnevõrra halvemaks. Selline mõju võib olla ka juhuslik ning katset tuleks korrata. Suures plaanis, aga hapestamine dest. vee korral ionisatsiooni ei paranda ning see on selgitatav sellega, et dest.vesi on ise juba nii puhas maatriks, et ionisatsiooni mahasuruvaid ühendeid ei leidu.

Pinnavees on happe lisamine teatud ravimite ionisatsiooniefektiivsusele kaasa aidanud, nt diatriisoolhape, metronidasool, 4-atsetüülaminoantipüriin, tsiprofoksatsiin (Joonis 6.), verapamiil hüdrokloriid (Joonis 5.), ibuprofeen ja ivermektin, aga nagu eelpool kirjeldatud, siis verapamiil hüdrokloriidi korral võib tegemist olla ka stabiilsuse suurenemisega. See, et erinevad ravimid on mõjutatud erinevalt on seotud sellega, et pinnavesi on piisavalt keeruline maatriks, et ionisatsiooniefektiivsust ainuüksi pH-ga muuta ei saa.

Küll aga kraanivee hapestamine kõikidel ravimitel muutis ionisatsiooniefektiivsuse paremaks ning see võib olla põhjustada asjaolust, et kraanivesi on keerulisem maatriks kui dest.vesi, aga palju lihtsam kui pinnavesi, ja hapestamine on piisav, et suurendada ravimite ionisatsiooniefektiivsust.

Dimetridasooli (Joonis 8.) ja meklosiini korral on näha, et dest.veel pole suurt mõju, aga kraanivees on positiivne mõju, pinnavees on ionisatsiooniefektiivsus veelgi kehvem. Meklosiini puhul on ilmselt tegemist lühiajalise stabiilsuse probleemidega, kuid diatrisoolhappe korral oli juba lühiajalise stabiilsuse katsetest näha, et selle signaal on hapestatud lahustes madalam kui hapestamata lahustes.

Tabel 3. Happe lisandi mõju ühendite ionisatsiooniefektiivsusele lahuses.

<b>Analüüt</b>	<b>Milli-Q</b>	<b>Kraanivesi</b>	<b>Pinnavesi</b>
Iopamidool	85%	231%	105%
Diatrisoolhape	109%	298%	143%
Amoksisilliin	72%	251%	100%
Metronidasool	93%	215%	129%
Ranitidiin hüdrokloriid	86%	192%	104%
Dimetridasool	89%	214%	6%
Iopromiid	88%	195%	104%
Lignokaiin / lidokaiin	90%	192%	104%
4-atsetüülaminoantipüriin	77%	188%	149%
Tsiprofloksatsiin	72%	176%	127%
Antipüriin/Fenaksoon	90%	187%	104%
Pentoksüfülliin	68%	150%	86%
Propranolool hüdrokloriid	91%	196%	105%
Klindamütsiin hüdrokloriid	99%	211%	111%
Okskarbatsepiin	70%	152%	95%
Verapamiil hüdrokloriid	83%	257%	138%
Propüfenasoon	84%	187%	101%
Rosuvastatiin	91%	185%	113%
Meklosiin	60%	128%	1%
Klofibriinhape	87%	208%	89%
Fenofibriinhape	66%	193%	96%
Ibufrofeen	37%	108%	142%
Metronidasool	65%	167%	95%
Ivermektiin	203%	454%	189%

### 4.3. Ravimite analüüsil meest protsessiefektiivsuse mõõtmine

Ravimite analüüsil meest kasutati eelnevalt analüüsitud ja puhtuses veendunud Eestist pärit mett. Eesmärgiks oli protsessiefektiivsuse, maatriksefekt ja saagise hindamine. Selle jaoks teostati erinevaid katseid meemaatriksiga. Esimesel juhul rikastati mett kindla ravimite kogusega enne proovi ettevalmistust, teisel juhul rikastati mee-ekstrakti pärast proovi ettevalmistust.

Maatriksefekt, saagis ja protsessiefektiivsus on esitatud ravimite kaupa Tabel 4. Maatriksefekt tulemuseks saadi 61% kuni 178% (va meklosiini 243% ja ivermektiini 17%). Meklosiin tulemus on ebaselge. Tegemist võib olla näiteks ristsaastusega, kuid analüüsi tuleks selle jaoks korrata. Ivermektiini korral võib olla tegemist lahuse lühiajalise stabiilsuse mõjudest (vt ülalpool). Muid tulemusi võib pidada ootuspäraseks, sest ionisatsiooni maatriksefektid olid antud mõõtmiste juures nii suured kui väikesed, on võimalik nii mahasurumisi kui ka signaali suurenemisi.

Saagised jäid 57% kuni 154% vahele (va metronidasool 1% ja ivermektiin 214%). Kõige madalam saagis 1% on metronidasooli korral ja võime järeldada, et see meetod ei sobi selle ühendi jaoks. Suured saagised said tsiprofloksatsiin 154% ning ivermektiin 214%, ka see võib olla seotud reostusega.

Saadud protsessiefektiivsused on 1% kuni 190% ning on seostatavad eelpool toodud saagiste ja maatriksefektide tulemustega. Kuna analüüsi käigus tehti vaid üks mõõtmine siis juhuslikud vead on väga suured ja katset oleks vaja korrata. Maatriksefektide vähendamiseks võib proovida teha kalibreerimine samas maatriksis ehk maatriksvastav kalibreerimine või lahjendada proovi maatriksi mõjude vähendamiseks.

Tabel 4. Maatriksefekt, ekstraheerimiseefektiivsus ja protsessiefektiivsuse hindamine.

Analüüt	Maatriksefekt	Saagis	Protsessiefektiivsus
Iopamidool	_*	_*	_*
Diatrisoolhape	_*	_*	_*
Amoksitsilliin	_*	_*	_*
Metronidasool	61%	96%	58%
Ranitidiin hüdrokloriid	65%	57%	37%
Dimetridasool	91%	97%	89%
Iopromiid	_*	_*	_*
Lignokaiin / lidokaiin	94%	106%	100%
4-atsetüülaminoantipüriin	117%	88%	103%
Tsiprofloksatsiin	_*	154%	_*
Antipüriin/Fenaksoon	83%	97%	81%
Pentoksüfülliin	133%	100%	133%
Propranolool hüdrokloriid	101%	93%	94%
Klindamütsiin hüdrokloriid	105%	74%	78%

Okskarbatsepiin	104%	119%	124%
Verapamiil hüdrokloriid	178%	107%	190%
Propüfenasoon	94%	101%	95%
Rosuvastatiin	87%	110%	95%
Meklosiin	243%	76%	184%
Klofibriinhape	107%	92%	98%
Fenofibriinhape	76%	107%	81%
Ibuprofeen	_*	_*	_*
Metronidasool	97%	1%	1%
Ivermektiin	17%	214%	36%

\* Iopamidool, diatrisoolhape, amoksitsilliin, iopromiid, tsiprofloksatsiin, ibuprofeen liiga madala tundlikkusega, et neid mees analüüsida.

## Kokkuvõte

Käesoleva bakalaureusetöö tulemusena kasutati varem optimeeritud meetodikat ravimite kvalitatiivseks ja kvantitatiivseks määramiseks erinevates veeliikides ning mee analüüsiks kasutades kõrgeefektiivset vedelikkromatograafiat ja massispektromeetriaat. Töös kasutati 24 ravimit.

Ravimite analüüs viidi läbi kasutades standardlahuseid metanoolis või dest.vees. Kasutati gradientelueerimist ja eluendideks oli 0,1% sipelghape ja metanool. Eluendi voolukiiruseks oli 0,4 mL/min ja kolonni temperatuur oli 40 °C. Kasutati elektropihustus-ionisatsioon allikat (ESI) ning teostati tandem-massispektromeetrilised analüüsid (MS/MS).

Ravimite pikaajalise stabiilsuse hinnati dest. vees, võrreldes kahte töölahust kontsentratsiooniga 1 ng/mL. Üks oli valmistatud varem laboris tehtud standardlahustest ja teine sellest 6 kuud hiljem töö autori poolt valmistatud standardlahustest. Ravimite lühiajalise stabiilsuse hinnati dest. vees, filtreeritud kraanivees ja filtreeritud pinnavees, võrreldes töölahust kontsentratsiooniga 1 ng/mL ja mõõtmised tehti 15,5 h vahega. Stabiilsuse arvutamiseks kasutati piikide pindalasid.

Happe mõju ravimite stabiilsuste uurimiseks kasutati 1 ng/mL töölahuseid dest.vees, filtreeritud kraanivees ja filtreeritud pinnavees nii puhtalt kui ka hapestatult (0,1% HCOOH lisandiga). Happe mõju arvutamiseks võrreldati hapestatud ning hapestamata esimese süsti piigi pindala tulemusi.

Seejärel oli teostatud mee analüüs, mille käigus leiti maatriksefekt, saagis ning protsessiefektiivsus. Maatriksefekt oli arvutatud 500 ng/L lahuste signaalide väärtuste põhjal. Saagise leidmiseks võrreldati ekstraheerimiseelse rikastamisproovi kontsentratsiooni ekstraheerimisjärgse rikastamisproovi kontsentratsiooniga. Protsessiefektiivsuse leidmiseks võrreldati ekstraheerimiseelse rikastamisproovi kontsentratsioon ja teoreetilise rikastamisproovi kontsentratsioon.

Töö käigus leiti, et mõned ühendid ei ole pikaajaliselt stabiilsed, aga enamik standardlahustest olid metanoolis 6 kuu jooksul hästi säilinud. Lühiajalise stabiilsuse vaates võime järeldada, et üldiselt oli uuritavate ravimite töölahuste stabiilsus suhteliselt hea kõikides solventides 15,5 h jooksul, kuid mõned ühendid olid probleemsed. Hapestamine ei andnud enamikule ühenditest suurt efekti stabiilsuse parandamisele. Vaadates kuidas happe lisand mõjub ühendite ionisatsiooniefektiivsusele lahuses, võime järeldada, et pinnavees hape lisamine ei andnud suurt efekti, aga dest.vees tegi kes tulemused halvemaks. Samas kraanivees kõikide ravimite puhul tegi ionisatsiooniefektiivsuse paremaks.

Mee analüüsi käigus saadi meemaatriksis maatrikefekti väärtuseks 61 kuni 178%. Saagised jäid 57% kuni 154% vahele ja protsessiefektiivsused 1% kuni 190%.

Töö tulemusena teostati, et varasemalt optimeeritud LC-MS/MS meetodika ning lahuste valmistamise meetodikad on sobilikud enamikule ravimite stabiilsuse hindamiseks. Katsetest selgus, et hapestamine aitab ionisatsiooniefektiivsust tõsta kraanivees. Mee analüüsi tulemuste vaates, on vaja teha rohkem uuringuid, ning ka maatriksefekti vähendamiseks võib proovida teha

kalibreerimine samas maatriksis ehk maatriksvastav kalibreerimine või lahjendada proovi maatriksi mõjude vähendamiseks.

## Absract

Investigation of Pharmaceutical Analysis using HPLC-MS/MS.

As a result of this bachelor's thesis, previously optimized methodology was used for the separation and quantitative determination of drugs in different types of water and for honey analysis using high-performance liquid chromatography and a mass spectrometer. 24 drugs were used which included HPLC-MS/MS methodology.

Drug analysis was performed by parameter optimization using standard solutions in methanol, milli-Q water, hydrochloride. A gradient elution was used and the eluents were 0.1% formic acid and methanol. The eluent flow rate was 0.4 mL/min and the column temperature was 40 °C. An electrospray ionization source (ESI) was used and tandem mass spectrometric analyzes (MS/MS) were performed.

The long-term stability of the drugs was evaluated in milli-Q water by comparing two working solutions with a concentration of 1 ng/mL, one was prepared from standard solutions which was previously made in the laboratory and the other from standard solutions prepared by the author of the thesis 6 months later. The short-term stability of the drugs was evaluated in milli-Q water, filtered tap water and filtered surface water. Comparison was made of the working solution at a concentration of 1 ng/mL and measurements were made 15.5 h apart. Peak areas were used to calculate stability.

To investigate the effect of acid on drug stabilities, working solutions of 1 ng/mL were used in milli-Q, filtered tap water, and filtered surface water both pure and acidified (with 0.1% HCOOH). To calculate the effect of acid, the results of the peak area of acidified and non-acidified samples were compared by the first injection.

Then honey analysis was performed, during which the matrix effect, recovery and process efficiency were found. The matrix effect was calculated from the signal values of the 500 ng/L solutions. The concentration of the pre-extraction sample was compared to the concentration of the post-extraction sample to find the recovery. To find the process efficiency, the concentration of the pre-extraction sample was compared with the concentration of the theoretical extraction sample.

This study found that some analytes were not long-term stable, but most of the standard solutions were well preserved in methanol for 6 months. In terms of short-term stability, we can conclude that, in general, the stability of the working solutions of the studied drugs in all solvents was good for 15.5 h, but some analytes were problematic. Acidification did not have a major effect on stability improvement for most of the analytes. Looking at how the addition of acid affects the ionization efficiency of analytes in solution, we can conclude that the addition of acid in surface water did not have a great effect, but in milli-Q water it made the results worse on average, but ionization efficiency in tap water was improved for all analytes.

During the honey analysis, the matrix effect value in the honey matrix was 61 to 178%, the recovery ranged from 57% to 154%, and the process efficiency ranged from 1% to 190%.



As a result of this thesis, it was realized that the previously optimized HPLC-MS/MS methodology and the preparation of solutions are suitable for evaluating the stability of most drugs. The tests showed that acidification helps increase the ionization efficiency in tap water. In view of honey analysis results, it is necessary to do more research, and also to reduce the matrix effect, for example to try calibration in the same matrix (matrix matching calibration) or dilute the sample to reduce matrix effects.

## Tänuavaldused

Soovin avaldada tänu käesoleva lõputöö juhendajatele Maria Kuhtinskaja ja Riin Rebane, kes oli suurimaks abiks oma soovitude ja teadmistega töö valmimise protsessis. Tänan ka Siiri Saaver tagasiside ning toetuse eest, mis olid suureks abiks töö valmimisel.

Bakalaureusetöö oli läbi viidud Eesti Keskkonnauuringute Keskuse laboris, kõike EKUK-I töötajaid nende abi ja sõbralikkuse eest.

## Kasutatud kirjandus

1. Beek T. A. D., Weber F., Bergmann A., Hickmann S., Ebert I., Hein A., Küster A. (2015). *Environmental Toxicology and Chemistry*. Wiley Online Library, lk 823-835.
2. Boxall A. B. A. (2004). *The environmental side effects of medication*. EMBO reports, lk 1110-1116.
3. Waters, the science of what's possible. Waters Corporation. (2008). <https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/WA60205.pdf> (accessed march 25, 2023).
4. Loftsson T. (2014). *Drug stability for pharmaceutical scientists*. (1st ed.) Elsevier, lk 1.
5. Kaljurand M., Kuldvee R. (1997). *Instrumentaalanalüüs III*. Tallinna Tehnikaülikool, keemiainstituut, anorgaanilise ja analüütilise keemia õppetool, lk 3-33.
6. Talvari A. (2000). *Instrumentaalanalüüs*. Sisekaitseakadeemia, lk 44-46.
7. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. (2013). *Foundamentals of Analytical Chemistry* (9th ed.). Cengage Learning, lk 802-935.
8. McMaster M. C. (2005). *LC/MS a practical user's guide*. John Wiley & Sons, Inc, lk 1-9.
9. Skoog D. A., Holler F. J., Crouch S. R. (2016). *Principles of instrumental analysis* (7th ed.). Cengage Learning.
10. Smith R. M. (2004). *Understanding Mass Spectra: A Basic Approach*. (2nd ed.). John Wiley & Sons, Inc.
11. Clarke W., Marzinke M. A. (2020). *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. (4<sup>th</sup> ed.) Elsevier Inc.
12. Quadrupole Analyzers and MS/MS Analysis. <https://www.chromacademy.com> (accessed may 15, 2023).
13. Kuhtiskaja M. (2018). Instrumentaalanalüüs (YKA0011).
14. Sankar K. U. *Conventional and Advanced Food Processing Technologies*. (2014). John Wiley & Sons, Ltd, lk 129-158.
15. Dean J. R., Cresswell S. L. (2002). Extraction techniques for solid samples. *Comprehensive Analytical Chemistry*. (559-586). Elsevier Inc.
16. Zhang QW., Lin LG., Ye WC. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chin Med*.
17. Qiu C., Raynie D. E. (2017). The Use of Extraction Technologies in Food Safety Studies. (158–169). LCGC North America.
18. ICH guideline M10 on bioanalytical method validation and study sample analysis. EMA/CHMP/ICH/172948/2019 Committee for Medicinal Products for Human Use. (2022).
19. Allen L. V., Donnelly R. pH and Solubility, Stability, and Absorption, Part II. *The International Journal of Pharmaceutical Compounding (IJPC)*. [https://compoundingtoday.com/Newsletter/Science\\_and\\_Tech\\_1112.cfm](https://compoundingtoday.com/Newsletter/Science_and_Tech_1112.cfm) (accessed may 20, 2023).
20. P. J. Taylor. (2005). Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry*. (328 – 334). Elsevier Inc.

21. F. Raposo, D. Barceló. (2021). Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. *Trends in Analytical Chemistry*. ( 116068). Elsevier Inc.
22. LC-MS Method Validation. 5.1 Bias and constituents. [https://sisu.ut.ee/lcms\\_method\\_validation/51-Bias-and-its-constituents](https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/51-Bias-and-its-constituents) (accessed may 20, 2023).

## Lisa

Tabel 5. Ravimite standardid.

	Ravim	Nimi EST	CAS	Režiim	Kvantiseeriv üleminek	Kinnitav üleminek	Ret. aeg	LoD	LoQ	Tootja	Puhtus
1	Clindamycine	Klindamütsiin hüdrokloriid	58207-19-5	pos	425 -> 126	425 -> 377	5,22	0,001	0,001	Sigma-Aldrich, kood PHR1159	92,50%
2	Clofibric acid	2-(4-klorofenoksü)-2-metüülpropioonhape	882-09-7	neg	213 -> 127	213 -> 85	6,35	0,014	0,023	Dr. Ehrenstorfer, kood 11484000	98,00%
		Klofibriinhape									
3	Diatrizoic Acid	Diatriisoolhape	50978-11-5	pos	615 -> 361	615 -> 233	1,77	0,15	0,26	European Pharmacopeia, kood A0365000	Analüüsiks puhas
4	Dimetridazole	Dimetridasool	551-92-8	pos	142 -> 96	142 -> 81	2,22	0,014	0,023	Dr. Ehrenstorfer, kood C12772000	99,46%
5	Fenofibric acid	Fenofibriinhape	42017-89-0	pos	319 -> 233	-	6,77	0,0014	0,0023	European Pharmacopeia, kood F0048010	Analüüsiks puhas
6	Iopamidol	Jopamidool	60166-93-0	pos	778 -> 559	795 -> 778	1,46	0,016	0,026	European Pharmacopeia, kood I0329000	Analüüsiks puhas
7	Iopromide	Jopromiid	73334-7-3	pos	792 -> 573	792 -> 300	2,66	0,016	0,026	European Pharmacopeia,	Analüüsiks puhas

										kood Y0001020	
8	Ivermectine	Ivermektiin	70288-86-7	pos	898 -> 754	898 -> 183	7,52	0,14	0,23	Dr. Ehrenstorfer, kood C14488000	88,50%
9	Lidocaine	Lignokaiin / lidokaiin	137-58-6	pos	235 -> 57,7	235 -> 85	3,28	0,0014	0,0023	Dr. Ehrenstorfer, kood C14629790	99,50%
10	Meclozine	Meklosiin	569-65-3	pos	391 -> 200	-	6,34	0,14	0,23	European Pharmacopeia, kood M0220000	Analüüsiks puhas
11	Metronidazole	Metronidasool	443-48-1	pos	172 -> 82	172 -> 128	2,15	0,017	0,028	Dr. Ehrenstorfer, kood C15201000	99,80%
12	N-Acetyl-4- aminoantipyrin	4- atsetüülaminoantipüriin	83-15-8	pos	246 -> 83	246 -> 228	3,23	0,0014	0,0023	Dr. Ehrenstorfer, kood C10011900	99,70%
13	Oxcarbazepine	Okskarbatsepiin	28721-07-5	pos	253 -> 180	253 -> 207,5	5,4	0,0013	0,0022	Dr. Ehrenstorfer, kood C15782500	99,00%
14	Pentoxifylline	Pentoksüfülliin	06.05.6493	pos	279 -> 181	-	4,72	0,0013	0,0022	Dr. Ehrenstorfer, kood C15981800	99,90%
15	Phenaxone (Phenazone)	Antipüriin/Fenaksoon	60-80-0	pos	189 -> 56	189 -> 147	3,91	0,0014	0,0024	Sigma-Aldrich, kood A5882	97,50%

16	Propranolol	Propranolool hüdrokloriid	318-98-9	pos	260 -> 116	260 -> 72	5,13	0,0012	0,002	Dr. Ehrenstorfer, kood 16501000	Analüüsiks puhas
17	Propyphenazon	Propüfenasoon	479-92-5	pos	231 -> 189	231 -> 201	5,78	0,0014	0,0023	Dr. Ehrenstorfer, kood C16535000	99,34%
18	Ranitadine (Raniditine)	Ranitidiin hüdrokloriid	66357-59-3	pos	315 -> 176	315 -> 125	2,26	0,014	0,023	Carbosynth Limited, kood FR65147	95,00%
19	Rosuvastatin	Rosuvastatiin	287714-41-4	pos	482 -> 258	482 -> 272	6,17	0,014	0,023	European Pharmacopeia, kood Y0001719	99,30%
20	Verapamil	Verapamiil hüdrokloriid	152-11-4	pos	455 -> 165	455 -> 303	5,51	0,0014	0,0023	Sigma-Aldrich, kood PHR1131	99,90%
21	Ibuprofeen	Ibuprofeen	15687-27-1	pos	205 -> 161	-	6,84	0,096	0,16	Dr. Ehrenstorfer, kood DRE-C14278000	98,91%
22	Amoxicillin	Amoksitsilliin	-	pos	366 -> 208	366 -> 114	2,19	0,033	0,056	Dr. Ehrenstorfer, kood DRE-C10242500	98,74%
23	Ciprofloxacin	Tsiprofloksatsiin	-	pos	332 -> 231	332 -> 314	3,67	0,0016	0,0026	Sigma-Aldrich, kood 33434	98,00%
24	Metaflumizone	Metaflumisoon	-	neg	505,5 -> 302	505,5 -> 116,5	7,03	0,0014	0,0023	Sigma-Aldrich, kood 32966	98%

## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks<sup>1</sup>**

Mina Anastasija Korovkina

1. Annan Tallinna Tehnikaülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose RAVIMITE MÄÄRAMISE UURIMINE LC-MS/MS MEETODIL,

mille juhendaja on Maria Kuhtinskaja ja Riin Rebane,

1.1 reprodutseerimiseks lõputöö säilitamise ja elektroonse avaldamise eesmärgil, sh Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogusse lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2 üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tallinna Tehnikaülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas Tallinna Tehnikaülikooli raamatukogu digikogu kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. Olen teadlik, et käesoleva lihtlitsentsi punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest ning muudest õigusaktidest tulenevaid õigusi.

---

30.05.2023

---

<sup>1</sup> Lihtlitsents ei kehti juurdepääsupiirangu kehtivuse ajal vastavalt üliõpilase taotlusele lõputööle juurdepääsupiirangu kehtestamiseks, mis on allkirjastatud teaduskonna dekaani poolt, välja arvatud ülikooli õigus lõputööd reprodutseerida üksnes säilitamise eesmärgil. Kui lõputöö on loonud kaks või enam isikut oma ühise loomingu tegevusega ning lõputöö kaas- või ühisautor(id) ei ole andnud lõputööd kaitsvale üliõpilasele kindlaksmääratud tähtajaks nõusolekut lõputöö reprodutseerimiseks ja avalikustamiseks vastavalt lihtlitsentsi punktidele 1.1. ja 1.2, siis lihtlitsents nimetatud tähtaja jooksul ei kehti.