

Masteroppgave i analytisk kjemi for master i farmasi

# **Analyse av ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler i miljøet ved hjelp av væske-væske mikroekstraksjon og UPLC-MS/MS på Svalbard og i Tromsø**

**Bente Helene Stafne**

Mai 2009



Veiledere:

Terje Vasskog,

Roland Kallenborn og Einar Jensen

Avdeling for legemiddelkjemi

Institutt for farmasi

Universitetet i Tromsø



## Forord

Denne masteroppgaven ble utført ved avdeling for legemiddelkjemi, ved institutt for farmasi i Tromsø, samt ved universitetssenteret på Svalbard, UNIS. Veiledere var forsker Terje Vasskog, og professor Einar Jensen ved universitetet i Tromsø, og professor Roland Kallenborn ved universitetssenteret på Svalbard.

Jeg vil rette en stor takk til min hovedveileder Terje Vasskog for å introdusere meg til denne oppgaven og for at jeg fikk muligheten til å dra til Svalbard. Du har vært en enestående veileder, og din tålmodighet overfor mine dumme spørsmål er imponerende. Takk for gode råd underveis, og for konstruktiv kritikk under skrivingen av oppgaven.

Takk til Roland for all støtte, og for at du også var med på å gjøre Svalbard-eventyret mulig for meg. Doktorgradsstudent Monika Trümper ved UNIS fortjener også en stor takk for all hjelp i forbindelse med oppholdet mitt på UNIS.

Jeg vil også takke Berit Fossland ved Spitsbergen Apotek og Håkan Eriksson ved Longyearbyen bydrift. Takk til UNIS for at jeg fikk være der å utføre mastergradsarbeidet mitt, og for all hjelp jeg har fått med innsamling av prøver på Svalbard.

Takk til min medstudent, Kristian, for å holde ut med meg hele vinteren på Svalbard.

Jeg vil også takke Sparebanken Nord-Norges gavefond og Svalbards Miljøvernfond for finansiering.

Takk til mine gode venninner på lesesalen, Karina, Ninja og Susanne, for den støtten dere har vært, for å opprettholde et noenlunde sosialt liv under masterskrivingen, for all hjelp jeg har fått med tekniske problemer, for våre mer eller mindre faglige diskusjoner, og for all gleden vi har hatt sammen.

Min familie fortjener en stor takk for den tro de har hatt på meg gjennom hele studiet, og for all støtte jeg har fått fra dere. Spesielt min kjære Bjørn-Willy fortjener en ekstra stor takk, som har ventet i mange år på at jeg skal flytte hjem igjen etter studiene. Du har vært en enorm støtte for meg.

## **Hensikt**

Hensikten med oppgaven var å undersøke hvorvidt det var mulig å påvise legemidler innenfor gruppen ikke-steroidale antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) i sjø- og avløpsvann på Svalbard og i Tromsø. I tillegg ble det gjort et forsøk på hvorvidt legemidlene brytes ned raskere under UV-lys enn under mørke forhold. Dette var interessant å undersøke pga forholdene på Svalbard med lang mørketid, midnattssol i sommerhalvåret, og kaldt vann i sjøen.

## Sammendrag

Forbruket av legemidler hos mennesker og dyr øker stadig, og som en konsekvens av dette, skilles mer legemidler ut, og ender opp i miljøet, og kan ende opp i bl.a. sjøvann, jord og drikkevann til slutt. Legemidler kan ha toksiske effekter på andre organismer enn dem de er ment for, særlig siden legemidlene ikke er designet for å brytes hurtig ned.

Enkelte ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) med noen metabolitter ble valgt ut, i et forsøk på å påvise disse legemidlene i sjø- og avløpsvann på Svalbard og i Tromsø.

Det ble utviklet en væske-væske mikroekstraksjonsmetode for å ekstrahere prøvene, samt en analysemetode ved hjelp av UPLC-MS/MS.

Resultatene viste at noen av legemidlene ble påvist i sjøvann, dog ingen i kvantifiserbare konsentrasjoner, mens i avløpsvann ble det kvantifisert de fire legemidlene og en av metabolittene. Det var naturlig nok høyere konsentrasjoner i avløpsprøvene fra Tromsø enn i Longyearbyen, folketallet tatt i betraktning.

Den samme metoden ble også benyttet til et UV-forsøk over 15 dager, der det ble undersøkt hvorvidt de analyserte legemidlene brytes ned i UV-lys sammenlignet med en kontrolløsning i mørket. Det legemidlet som det selges mest av, ibuprofen, ble ikke brutt ned i UV-lys, mens både naproxen, ketoprofen og diklofenak ble brutt ned, mens kontrolløsningene ikke ble brutt ned for noen stoffer. Det kunne ikke påvises noen av de undersøkte metabolittene, hvilket tyder på at de undersøkte metabolittene ikke dannes under UV-nedbrytning.

## Forkortelser

AC	Alternating Current
CE	Collision energy
CV	Cone Voltage
DC	Direct Current
DDD	Definerte Døgn Doser
ESI	Electrospray Ionisation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IS	Internstandard
LPME	Liquid Phase Microextraction
LOD	Limit Of Detection
LOEC	Lowest Observable Effect Concentration
LOQ	Limit Of Quantification
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS	Mass Spectrometry
<i>m/z</i>	masse over ladning ratio
NSAIDs	Non-Steroidal-Antiinflammatory Drugs
UPLC	Ultra Performance Liquid Chromatography
UV	Ultraviolet

## Innholdsfortegnelse

<b>Forord</b> .....	<b>1</b>
<b>Hensikt</b> .....	<b>2</b>
<b>Sammendrag</b> .....	<b>3</b>
<b>Forkortelser</b> .....	<b>4</b>
<b>Innholdsfortegnelse</b> .....	<b>5</b>
<b>1. Innledning</b> .....	<b>7</b>
<b>1.1</b> Hvordan legemidler havner i miljøet .....	<b>7</b>
<b>1.2</b> NSAIDs .....	<b>8</b>
<b>1.3</b> Legemiddelforbruk av NSAIDs i Norge i 2008 .....	<b>9</b>
<b>1.4</b> Rensing av avløpsvann .....	<b>10</b>
<b>1.5</b> NSAIDs påvirkning på dyrelivet .....	<b>10</b>
<b>1.6</b> Tidligere funn av legemidler i miljøet .....	<b>11</b>
<b>2. Teori</b> .....	<b>12</b>
<b>2.1</b> Væskekromatografi .....	<b>12</b>
<b>2.2</b> Massespektrometri .....	<b>12</b>
2.2.1    Elektrosprayionisasjon (ESI) .....	12
2.2.2    Trippel kvadrupol .....	13
2.2.3    Multiple Reaction monitoring (MRM) .....	14
<b>2.3</b> Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler .....	<b>15</b>
2.3.1    Ibuprofen .....	15
2.3.2    Ketoprofen .....	15
2.3.3    Diklofenak .....	16
2.3.4    Naproxen .....	16
<b>2.4</b> Væske-Væske mikro ekstraksjon (LPME) .....	<b>17</b>
<b>3. UV degradering av legemidler i miljøet</b> .....	<b>20</b>
<b>4. Materialer og metode</b> .....	<b>21</b>
<b>4.1</b> Kjemikalier .....	<b>21</b>
<b>4.2</b> Utvikling av metode .....	<b>23</b>
4.2.1    Utvikling av ekstraksjonsteknikk .....	23
4.2.1.1    Væske-væske mikro ekstraksjon (LPME) .....	24
4.2.2    Utvikling av separasjonsteknikk .....	25
4.2.2.1    UPLC .....	25
4.2.3    Deteksjonsteknikk .....	26
4.2.3.1    MSMS .....	26
<b>4.3</b> Innsamling og bearbeiding av prøver .....	<b>27</b>
<b>4.4</b> UV-forsøket .....	<b>31</b>

<b>5. Kvalitetskontroll.....</b>	<b>33</b>
5.1 Blanke prøver.....	33
5.2 LOD og LOQ.....	33
5.3 Linearitet .....	34
5.4 Presisjon .....	35
5.5 Recovery.....	36
5.6 Internstandard .....	37
<b>6. Resultat og diskusjon.....</b>	<b>38</b>
6.1 Metodeutvikling.....	38
6.2 Standardkurve .....	41
6.3 Resultat avløpsvann .....	42
6.4 Resultat sjøvannsprøver .....	47
6.5 Resultat UV forsøk .....	54
6.6 Internstandard .....	62
6.7 Feilkilder .....	63
<b>7. Konklusjon .....</b>	<b>66</b>
<b>8. Referanser.....</b>	<b>67</b>
<b>9. Vedlegg.....</b>	<b>70</b>
9.1 Standardkurver .....	70
9.1.1 Standardkurver fra desember 2008 .....	70
9.1.2 Standardkurver fra februar 2009 .....	72
9.2 Tabeller.....	74
9.2.1 Tabeller avløpsvann .....	74
9.2.2 Tabeller sjøvann .....	75
9.2.3 Tabeller UV-forsøk .....	82



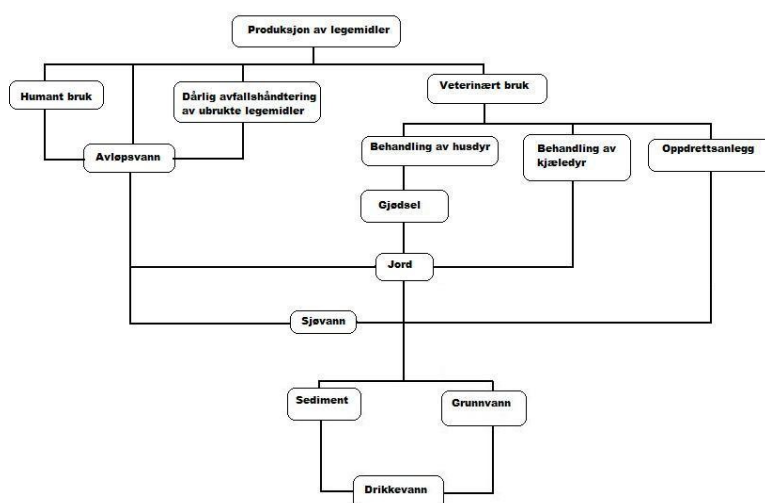
## 1. Innledning

Legemidler er designet for å ha en fysiologisk effekt på mennesker og dyr, og til å virke ved lave konsentrasjoner, og kan dermed utgjøre en fare for livet i vandige miljøer [1, 2].

Legemidler er en type miljøforurensning som for tiden øker som en konsekvens av økt forbruk av legemidler hos mennesker og dyr. Legemidler er kjemikalier som er designet til å ha effekt på metabolske og molekylære prosesser, noen er også laget for og ikke brytes ned lett. Det betyr at legemidler kan ha potensielle effekter på flora og fauna i vandige miljø der legemidlene eller rester av dem ender opp til slutt. Dersom andre organismer i miljøet har lignende målorganer, celler, vev eller biomolekyler kan de påvirkes av legemiddelforurensninger. For en rekke legemidler er det uklart hvordan de virker helt eksakt, og de kan ha andre effekter enn det man forventer, også hos andre arter enn dem legemidlene er laget for. Foreløpig eksisterer det begrenset informasjon om legemidlers økotoksikologiske effekter på organismer både i vann og på land [3].

### 1.1 Hvordan legemidler havner i miljøet

Inntak av legemidler hos mennesker og dyr, og påfølgende utskillelse via urin og avføring er en vei for legemidler til å nå ut i miljøet. De kan skilles ut i sin opprinnelige form, eller metaboliseres i kroppen til andre forbindelser. Ved bruk av legemidler i oppdrettsanlegg går legemidlene direkte i sjøen, i tillegg kan legemidler fra veterinærmedisinsk bruk komme ut i miljøet via f.eks gjødsel [3, 4].



Figur 1: Legemidlers ferd fra produksjon og ut i miljøet. Figuren er inspirert av Kümmerer[5] og Vasskog [6].

## 1.2 NSAIDs

Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler (NSAIDs) er en gruppe legemidler som studeres mye i miljøsammenheng på grunn av det høye forbruket av legemidler i denne gruppen verden over[7]. Særlig ibuprofen og diklofenak påvises mye av i miljøet helt opp på  $\mu\text{g/l}$  nivå i avløpsvann. I overflatevann var nivåene noe lavere. [3]

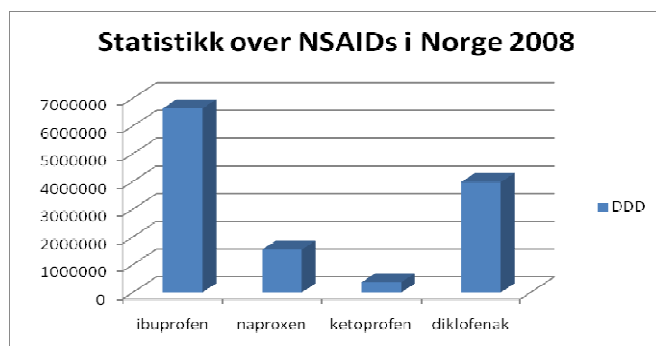
Allerede i 1986 ble det påvist naproxen og ibuprofen i avløpsvann i Canada.[8] Etter hvert som teknikkene for å påvise polare forbindelser har blitt bedre, har det blitt mulig å påvise en rekke legemidler i miljøet.

Legemidler med log  $K_{OW}$  3-5 som NSAIDs er tilstrekkelig vannløselige til ikke å fjernes med kloakkslammet, og være tilstede i den oppløste fasen i avløpsvannet. Likevel er legemidlene lipofile nok til å akkumulere i dyr. Det er påvist opptak av NSAIDs til laboratoriefisk, og det eksisterer også data på kronisk toksisitet. [9]

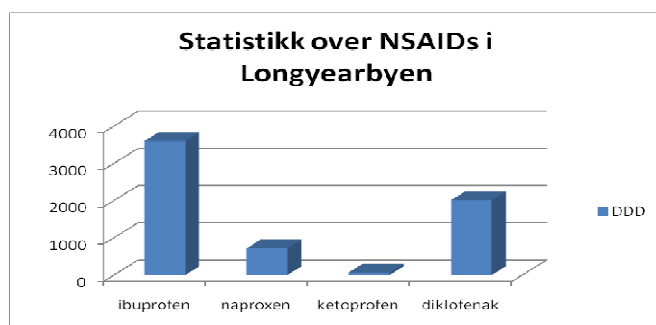
:

### 1.3 Legemiddelforbruk av NSAIDs i Norge i 2008

Ikke-steroide antiinflammatoriske legemidler tilhører ATC-kode M01A, og det ble solgt legemidler innenfor denne gruppen for 415,3 millioner norske kroner i 2008. Det er 46,27 definerte døgn doser (DDD) per 1000 innbyggere per dag. Ibuprofen er det legemidlet som brukes mest innenfor denne gruppen med 18,18 DDD/1000 innbyggere/ døgn i 2008. Det tilsvarer et totalt forbruk på 38 216 kg. Forbruket av naproxen var 4,22 DDD/1000 innbyggere/døgn (totalt forbruk 3850 kg); ketoprofen 1,0 DDD/1000 innbyggere/døgn (totalt 263 kg) diklofenak 10,89 DDD/1000 innbyggere/døgn (totalt 1908 kg)[10]. Tallene er beregnet med et folketall på 4 799 300 per 1.1.2009 (data fra Statistisk Sentralbyrå)



Figur 2: Statistikk over forbruket av NSAIDs i DDD i Norge i 2008



Figur 3: figuren viser hvilke NSAIDs det ble solgt mest av i Longyearbyen. Tallene går tilbake til apotekets åpning høsten 2008.

Forbruket av legemidler på Svalbard kan estimeres grovt ut fra salgsstatistikk fra stedets eneste apotek, som åpnet der høsten 2008. Ettersom tilgangen på legemidler er begrenset i et slik "lukket" samfunn er det nærliggende å tro at statistikken gir et bilde over hvilke legemidler som brukes mest, og som man eventuelt kan forvente å finne igjen i miljøet. Samtidig kan man ikke være sikker på at legemidlene kommer bare fra apoteket, ettersom det er et sted med mye turisme, og tilreisende kan ha med seg legemidler.

Det ser ut til at tendensene for hvilke legemidler det selges mest av i Longyearbyen, stemmer overens med landsgjennomsnittet.

## **1.4 Rensing av avløpsvann**

Ved rensing av avløpsvann er det som regel to typer eliminering som foregår, adsorpsjon til slam og biodegradering. Hvorvidt et stoff adsorberes til slam avhenger av dets hydrofobe og elektrostatiske egenskaper med partikler og mikroorganismer. NSAIDs er sure legemidler og har  $pK_a$  verdier mellom 4 og 5, er ionisert ved nøytral pH, og har liten affinitet for slammet. De vil ved nøytral pH være løst i avløpsvannet. Dermed vil biodegradering være mest aktuelt for å fjerne legemidler i vannfasen. Legemidler i overflatevann kan omdannes via biotransformasjon, men sannsynligvis er andre degraderingsmetoder som f.eks fotolyse mer relevant for nedbrytning. Fotolyse har bl.a vist seg å være hoveddegraderingsmetoden for diklofenak i overflatevann. [11] Hvorvidt fotodegradering er effektivt avhenger av hvor sterk strålingen er fra sola, og dermed geografisk plassering og årstid. Det har også betydning om det er andre forbindelser i vannet som kan fremskynde fotolysereaksjonen ved å danne hydroksylradikaler, som f.eks nitrater.[3]

Kloakkrenseanlegg er ikke designet for å fjerne legemidler og andre forurensninger fra overflatevann og grunnvann[12], og klarer ikke nødvendigvis å fjerne alle legemidler og metabolitter. Vanningssystem med avløpsvann er en nyttig måte å resirkulere vann og næringsstoffer i kloakken. Dette bidrar til ytterligere rensing av kloakken ved å redusere eller fjerne næringsstoffer som nitrogen og fosfor fra den vandige fasen og danne et renere avløpsvannfiltrat[13], men dersom avløpsvannet inneholder rester av legemidler, kan det bidra til å spre legemidlene ut over de områdene som vannes med avløpsvannet.

## **1.5 NSAIDs påvirkning på dyrelivet**

Fra India og Pakistan kom det i 2004 rapporter på uvanlig mange dødsfall blant flere ulike arter gribb. Dødsårsaken var opphopning av urinsyre og nyresvikt, på grunn av eksponering for diklofenak etter å ha spist buskap som var behandlet med dette legemidlet [3, 14].

Marine organismer som utsettes for rester fra avløpsvann gjennom hele sin levetid er nyttige målorganismer når det gjelder kartlegging av økotoksisitet.[3] I 1995 kom EU med krav om at det skulle være med studier på økotoksisitet i søknader for nye legemidler innenfor veterinærmedisin. Et EU-direktiv fra 2001 fastslo at det må utføres miljørisikovurderinger av humane legemidler av produsentene før de kommer på markedet.[3]

## 1.6 Tidligere funn av legemidler i miljøet

Ibuprofen, naproxen, ketoprofen og diklofenak er påvist og kvantifisert i avløpsvann i Ungarn[15] I en studie ble det vist at naproxen og ketoprofen utgjorde liten risiko for å påvirke regnbueørret i nærheten av kloakkrenseanlegg, mens ibuprofen og diklofenak hadde høy risiko for farmasøytiske interaksjoner med ørreten[9]. I dag foreligger det stort sett bare litteratur på akutt toksisitet på marine organismer i standardiserte tester. Det er forsket lite på toksisitet av metabolitter i miljøet. Diklofenak ser ut til å ha høyest toksisitet blant NSAIDs, blant annet på plankton. Det foreligger lite data på NSAIDs akutte toksisitet for fisk. Når det gjelder kroniske effekter er det gjort noen studier som bl.a viser at regnbueørret (*Oncorhynchus mykiss*) og brun ørret (*Salmo trutta*) fikk skader i nyrer, lever og gjeller ved konsentrasjoner som kan finnes i miljøet, laveste observerbare effekt 1µg/l. Ibuprofen har vist seg å forstyrre regnbueørretens heat shockresponse, ved konsentrasjoner nede i 1µg/l [16-18] Studier viser også at når NSAIDs er blandet sammen kan det gi toksiske effekter sammenlignet med samme konsentrasjon av hvert enkelt stoff som ga liten eller ingen effekt. Det ser ut til at effekten blir additiv hvis man har flere stoffer tilstede samtidig. Det betyr at om man har stoffer med konsentrasjoner under laveste observerte effekt (Lowest Observable Effect Concentration, LOEC) kan de likevel ha betydning for toksisitet dersom det er andre NSAIDs tilstede.[3, 19]

## 2. Teori

### 2.1 Væskekromatografi

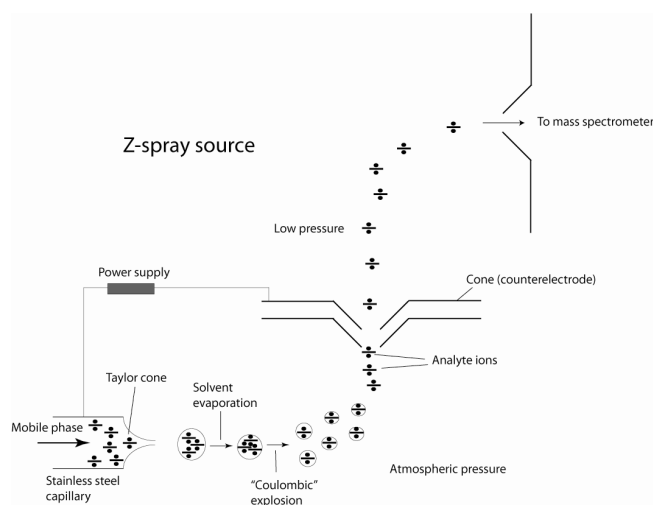
High Performance Liquid Chromatography (HPLC) er en type væskekromatografi som benyttes ofte for å påvise og bestemme legemidler i farmasøytiske preparater og biologisk materiale. Prinsippet for separasjon av stoffer med denne metoden er at en mobilfase presses gjennom en kolonne pakket med et materiale som retarderer stoffene. Prøven injiseres i mobilfasen, stoffene retarderes i ulik grad, og de som kommer ut av kolonnen detekteres av en detektor. [20]

Hvor godt et HPLC system kan separere stoffer avhenger av selektiviteten til mobilfase/stasjonærfasesystemet og effektiviteten til kolonnen. Kolonnens effektivitet avhenger av dens lengde og partikkelstørrelsen til partiklene den er pakket med, og den er invers proporsjonal med partikkelstørrelsen. Til HPLC har kolonner med partikkelstørrelse 3-5  $\mu\text{m}$  vært brukt, men introduksjonen av kolonner med under 2  $\mu\text{m}$  i et Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC) system har vist seg å gi hurtigere analyser og bedre sensitivitet, med å bruke mindre partikkelstørrelser og økt trykk[21].

### 2.2 Massespektrometri

#### 2.2.1 Elektrosprayionisasjon (ESI)

Fra HPLC kommer det en væskestrøm og presses gjennom et kapillær. Væsken forstøves av høy spenning og nitrogengass, som danner aerosoler av prøveløsningen. Kapillæret er pålagt spenning, som gir ladning til molekylene i aerosolen. Væsken i dråpene fordamper, ofte ved hjelp av en tørkegass ( $\text{N}_2$  er vanlig), mens analyttene beholder ladningen og sendes videre til masseanalytoren. ESI er en "myk" ioniseringsteknikk, det dannes stort sett molekylioner som ikke fragmenterer videre. Det benyttes på sure eller basiske forbindelser, noe som innebærer at analyttene må være mulig å ionisere i væskestrømmen fra HPLC[20].



Figur 4 Elektrospray ionisering i negativ modus, viser hvordan det dannes ioner fra ladde dråper [6].

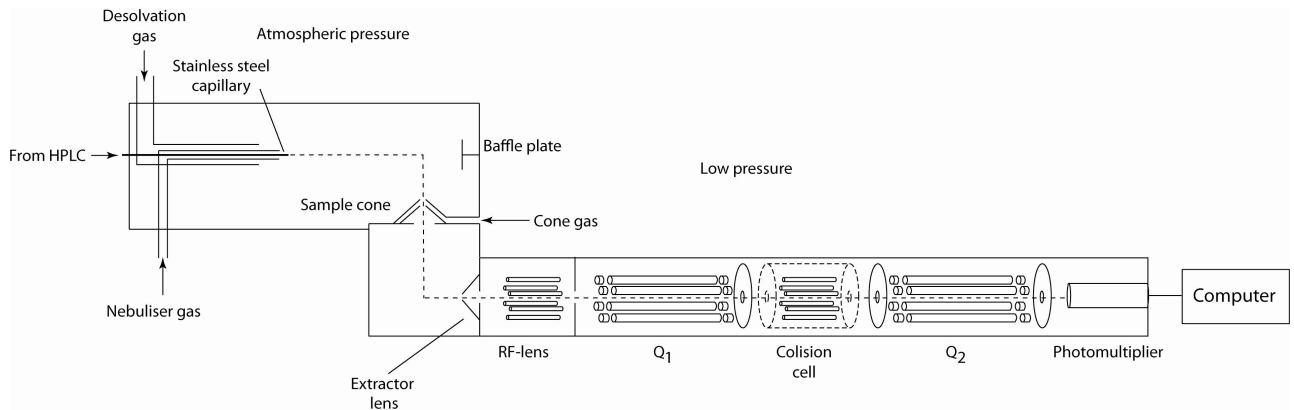
### 2.2.2 Trippel kvadrupol

En trippel kvadrupol består som oftest av to kvadrupoler med en heksapol, eller oktapol i midten. En kvadrupol består av 4 parallelle metallstaver som pålegges et elektrisk felt. Det settes vekselstrøm (Alternating Current, AC) mellom de to parene, og likestrøm (Direct Current, DC) legges over denne spenningen. Dette fører til at bare ioner med spesifikk masse over ladning ratio ( $m/z$ ) kan passere kvadrupolen ved bestemte AC og DC verdier.

De to kvadrupolene fungerer som masseanalysatorer ut fra masse/ladning ratio, mens heksapolen eller oktapolen i midten er kollisjonscelle. I kollisjonscellen er det bare vekselstrøm over stavene, som sender ionene gjennom uten å separere de. Det introduseres en inert gass som kolliderer med ionene som dermed kan fragmenteres og videre separeres i den siste kvadrupolen. Instrumentet kan benyttes som både spesifikk og generell detektor. Når det benyttes som spesifikk detektor, settes AC og DC til bestemte verdier, for å bare slippe gjennom ioner med en bestemt  $m/z$  i et gitt tidsintervall. Det er mulig å undersøke flere ioner samtidig. Dersom flere forbindelser analyseres på samme tidspunkt, vil detektoren bruke mindre tid på hver enkel forbindelse. Det kan også separere isotopmerkede forbindelser fra hverandre, noe som gjør det mulig å benytte deutererte eller  $^{13}\text{C}$  forbindelser som internstandarder[6].

### 2.2.3 Multiple Reaction monitoring (MRM)

MRM er en selektiv metode for å påvise forbindelser i en prøve. Ved å bestemme hvilket molekylion som skal slippe gjennom den første masseanalysatoren begrenser man mengden ioner som går inn i kollisjonscellen. I MRM bestemmes også det mest intense fragmentet av forbindelsen, slik at det bare er like fragmenter fra forbindelser med den bestemte molekylmassen som slippes gjennom masseanalyseurene. Det er en veldig spesifikk metode, ettersom få andre forbindelser har like molekylioner og fragmenter[22]



Figur 5 Oversikt over massespektrometeret



## **2.3 Ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler**

Legemidlene i denne klassen er smertestillende, febernedsettende og betennelsesdempende, og er mye brukt ved revmatiske lidelser. NSAIDs virker ved å hemme enzymet cyklooxygenase (COX-1/ COX-2) som katalyserer dannelsen av prostaglandiner fra arakidonsyre.[23] Prostaglandiner er involvert i en rekke funksjoner i kroppen, bl.a inflammasjon og smerte, regulering av blodstrømmen i nyrene, koaguleringsprosesser, og syntese av det beskyttende laget i slimhinnen i magesekken. Bivirkninger av langtidsbruk av NSAIDs dreier seg i hovedsak om redusert nyrefunksjon og magesår som følge av redusert produksjon av prostaglandiner. I regnbueørret er det påvist COX-2 homolog med et translasjonsprodukt som ligner relativt mye på humane COX enzymer[3].

Når legemidlene metaboliseres, dannes det ofte glukuronidkonjugater. Når de kommer ut i miljøet, kan de fungere som et reservoar for den aktive substansen hvis konjugatene hydrolyseres. Dersom legemidler metaboliseres i høy grad humant, vil de kunne få kortere levetid når de kommer ut i vandige miljø[24].

### **2.3.1 Ibuprofen**

Ibuprofen administreres oralt eller lokalt på smertefulle områder. Det brukes i relativt høye doser, opptil 1200 mg i døgnet for voksne. Ibuprofen har de samme metabolismeproduktene i miljøet, som i kroppen, 2-hydroxy ibuprofen og carboxyibuprofen[7]. I kroppen skilles ibuprofen og metabolitter i hovedsak (95%) ut i urin[25]. I oksidering og fotodegraderingsstudier har det blitt påvist 13 nedbrytningsprodukter til ibuprofen[26], minst to av disse har vist seg å være toksiske. Omtrent 14 % av ibuprofen som skilles ut av kroppen kommer ut som glukuronidkonjugater, og viser seg å ha omtrent 1-2 dager nedbrytningstid i vandige miljø, avhengig av forhold som temperatur og stråling[24].

### **2.3.2 Ketoprofen**

Oral administrasjon, daglig dose bør ikke overstige 200 mg. Det meste av ketoprofen skilles ut som glukuronidat i urin. Ketoprofen hemmer også prostaglandinsyntese, dette kan utgjøre et problem for personer med svekket nyrefunksjon[27].

Mer enn 80 % av ketoprofen som går gjennom kroppen, skilles ut som acylglukuronider[24].

### 2.3.3 Diklofenak

Administreres oralt, rektalt, men dosen bør individualiseres etter sykdomstilstand i doser opptil 150 mg/døgn. 60 % skilles ut i urinen som glukuronidkonjugater av det intakte molekylet eller av metabolittene. Mindre enn 1 % skilles ut som uendret substans. Resten av dosen skilles ut gjennom galle i fæces [28].

Mindre enn 1 % diklofenak skilles ut som glukuronidkonjugat, brytes ned i omtrent samme hastighet som ibuprofen[24].

### 2.3.4 Naproxen

Administreres oralt, doseres inntil 1000 mg/døgn. Naproxen har ingen aktive metabolitter, og metaboliseres ved demetylering og konjugering. Ca 95 % skilles ut i urinen i hovedsak som inaktive metabolitter, 10 % skilles ut i opprinnelig form[29].

Naproxen demetyleres og konjugeres in vivo, og fototransformeres og biodegraderes i miljøet. Det ser ut til at naproxen hovedsakelig nedbrytes via fotodegradering i miljøet. I en studie der kronisk og akutt toksisitet av naproxen og fotodegraderingsprodukter ble undersøkt, var degraderingsproduktene med toksisk enn naproxen for *Daphnia magna* og *Vibrio fischeri*. Fotodegraderingsproduktene var mindre polare enn naproxen, og toksisiteten økte med avtagende polaritet[30].

65 % av mengden naproxen som skilles ut fra mennesker kommer i form av acylglukuronider. [24].

## 2.4 Væske-Væske mikro ekstraksjon (LPME)

I 1999 ble væske-væske mikroekstraksjon (LPME) med hult fiber introdusert[31]. Det er en metode som er enkel, hurtig og billig, og har svært lavt forbruk av organiske løsemidler. LPME kan utføres som både to- og tre-faset ekstraksjon. Forbindelsene man ønsker å analysere ekstraheres fra en vandig prøve, via en organisk fase og videre til en akseptorfase. Det benyttes et hult porøst polypropylen fiber for å få til en slik ekstraksjon. Porene i fibret fylles med den organiske fasen, og lumen av fibret fylles med akseptorfase. Når fibret dyppes i det organiske løsemidlet, sørger kapillærkrefter for at porene i fibret fylles[31]. Analyttene ekstraheres over fra den vandige prøven, gjennom den organiske membranen, og ”fanges” i akseptorfase i lumen av fibret.

Dersom det er en tofaset ekstraksjon fylles både lumen og porene av fibret med organisk løsning. Organisk akseptorfase kan benyttes videre til analyse i kapillært gasskromatografi system, mens den vandige fasen kan analyseres i HPLC eller i kapillært elektroforese system[31, 32].

LPME er en likevektsreaksjon, der konsentrasjonen av analytt i akseptorfase øker til et visst nivå, helt til systemet inngår likevekt [31].

Mengden analytt som ekstraheres ved LPME etter en viss tid avhenger av overførselen av analytt fra den vandige fasen til det organiske løsemidlet, og analyttens fordelingskoeffisient mellom den vandige prøven og den organiske fasen. Flere parametre kan påvirke ekstraksjonen som f.eks type organisk løsemiddel, pH i prøven, ekstraksjonstid, omrøringshastighet og tilsats av ulike salter. [7] Det er nødvendig med en stor fordelingskoeffisient mellom den vandige og organiske fasen for å få tilfredsstillende ekstraksjon og høy oppkonsentreringsfaktor. pH i prøven må være slik at analyttene er på nøytral form og kan diffundere over i organisk fase.

Prøvevolum ved bruk av LPME kan variere fra 50 µl til over 1 liter, mens volum av akseptorfase vanligvis ligger mellom 2-30 µl. på grunn av den store volumforskjellen, kan man oppnå en høy oppkonsentreringsfaktor. En stor fordel med LPME er at man kan oppnå høy oppkonsentrering uten avdamping og reoppløsning av stoffer[31]. Oppkonsentreringsfaktoren bestemmes av analyttrecovery, prøvevolum og volum av akseptorfase.

Forbruket av organisk løsemiddel er også svært lavt ettersom det ikke benyttes mer enn 5-30 µl for å fylle porene i fibret, noe som er gunstig med tanke på miljøet og reduksjon av forbruket av

toksiske organiske løsemidler. Det er også mulig å gjøre ekstraksjoner med f.eks soyaolje som organisk fase.

I tillegg er LPME en effektiv teknikk for å prøveopprensing, og å redusere eller eliminere eventuelle problemer med forbindelse i matrix. Det er en gunstig metode å benytte til prøver med komplisert matrix, som prøver fra miljøet eller biologiske prøver. 3-faset LPME er særlig gunstig ettersom det bare er forbindelser som kan ioniseres igjen som kan gå over til akseptorfase[31].

Recovery for trefaset LPME avhenger av fordelingskoeffisientene mellom prøven og organisk fase, og mellom organisk fase og akseptorløsning. I tillegg avhenger den av volum av organisk løsemiddel, akseptorfase og prøve. Det oppnås høy recovery for forbindelser med stor fordelingskoeffisient. Riktig valg av organisk fase og passende valg av pH for sure/basiske analytter kan bidra til høy recovery. For sure forbindelser er det gunstig med pH i prøveløsningen helst 3 enheter under analyttens  $pK_a$ -verdi, og akseptorfase bør ha pH ca 3 enheter høyere enn  $pK_a$ . Volum av prøve og akseptorfase bør være så små som mulig for å oppnå høy recovery[31].

LPME kan benyttes til analyser av biologisk materiale, til mat og drikkevarer (f.eks etter skadedyrmedler), miljøanalyser, urenheter i aktive farmasøytiske ingredienser, legemiddel-proteinbinding og mengde fritt legemiddel i plasma[32].

Etttersom LPME baserer seg på passiv diffusjon, og transporten av analytter over den organiske membranen kontrolleres av fordelingsratio, har det blitt utviklet en metode som danner høyere potensial over membranen og er drivkraften for ekstraksjon basert på elektrokinetisk migrasjon. Denne teknikken kalles elektromembran ekstraksjon. Det er gjort et forsøk på sure og basiske legemidler med NaOH (sure) eller HCl (basiske) i både donor og akseptorfase, en negativ elektrode i prøven og den positive i akseptorløsningen for de sure legemidlene, og omvendt for de basiske. Det ble satt på en spenning på 300 V over den organiske membranen. Fordelen med denne metoden er at den er raskere enn andre LPME-ekstraksjoner[32-34], særlig for prøver med små volum, på grunn av var kort avstand mellom elektrodene i prøven. I denne typen ekstraksjoner, er det en ekstra justerbar parameter, sammenlignet med LPME; det elektriske potensialet som kontrollerer fluks. Det bidrar dermed til kontrollerte ekstraksjonshastigheter og bedrer selektiviteten og fleksibiliteten av systemet. Repeterbarheten og lineariteten har vist seg å være lovende for denne typen ekstraksjoner[35]. En studie gjort på basiske legemidler med ulike

sammensetninger i den organiske membranen ga recovery helt opp i 83 %, avhengig av hva membranen bestod av[36]. Transport over den elektrokinetiske membranen kan påvirkes av sammensetningen av den organiske fasen, noe som gjør det mulig å kontrollere selektiviteten[36].

En stor ulempe med kvantitativ analyse ved hjelp av LC-MS er matrixeffekter, hovedsakelig som undertrykkelse av signal under ioniseringen, dette kan påvirke dataene og øke deteksjonsgrensene. Signal undertrykking kan kompenseres for ved å benytte internstandard, eller ved standard tilsetning, men det kan føre til lengre analysetid, særlig ved standard tilsetning, og bedrer heller ikke sensitiviteten[37]. Ved å benytte LPME, som en ett-trinns konsentrasjons og opprensingsteknikk, kan man unngå matrix effekter ved analyse av sure legemidler i miljøet. Det er utført analyser på NSAIDs med trefaset LPME i avløpsvann og vann med HPLC-UV med god selektivitet, akseptable kvantifiseringsgrenser og god linearitet med lavere forbruk av prøve (22 ml), likevel var presisjonen dårlig som følge av manuell håndtering av fibre, og små ekstraksjonsvolum[38]. En annen studie ble gjort på avløpsvann med LC-ESI-MS/MS, der metoden ble optimalisert ved hjelp av å teste ut ulike løsemidler, konsentrasjon av donor fase og akseptorfase, omrøringshastighet og varighet av ekstraksjonen, samt ionestyrken av prøveløsningen [37].

### 3. UV-degradering av legemidler i miljøet

Tidligere forsøk med Xe-lampe, som simulerer dagslys, har vist at naproxen og diklofenak brytes relativt lett ned, mens ibuprofen er noe mer stabil. Årsaken til dette kan være at naproxen og diklofenak absorberer langt mer lys enn ibuprofen [39].

Legemidler som kommer ut i miljøet via avløpsvann kan ende opp i overflatevann og sannsynligvis utsettes for direkte fotokjemisk degradering. Fotokjemisk nedbryting kan være en viktig måte å få fjernet legemidler i miljøet på[40].

Naproxen er utsatt for fotokjemisk nedbryting. Naproxen har maksimal UV-absorbans på 230 nm, men absorberer også på 273 nm og 330 nm [40]. I en studie ble mer enn 90 % av konsentrasjonen av ketoprofen brutt ned i løpet av 10 minutter under en lampe som utstråler 254 nm [41]. Ketoprofen har absorpsjonsmaksimum på 255 nm[42].

Ibuprofen er relativt fotostabilt. UV-stråler fra sola med bølgelengde 200-280 nm blir for det meste absorbert i ozonlaget, dermed når det lite lys av disse bølgelengdene ned til jorden[43, 44]. Ibuprofen har det laveste UV-absorbansmaksimum av forbindelsene undersøkt i dette forsøket på 223 nm[40], noe som tilsier at det tar opp mindre energi fra solstråling enn de andre undersøkte forbindelsene, noe som kan indikere at det er mindre utsatt for UV-nedbryting.

Diklofenak brytes raskt når det er utsatt for stråling, med en minimumshalveringstid på 84 minutter ved 45°N, under optimale solforhold. [40]. Diklofenak har UV-absorpsjonsmaksimum på 273 nm, men det strekker seg godt over 300 nm. Etersom diklofenak absorberer så mye lys fra området sollys stråler, kan det forklare hvorfor diklofenak brytes så hurtig ned[40]. I en studie ble diklofenak degradert ned til 4 % av opprinnelig konsentrasjon ved å sette en vandig diklofenakløsning under naturlig sollys i 4 timer [41].

Når alifatiske aminer degraderes, skjer det som oftest gjennom en kløyving av bindingen mellom N og H, men kan også skje mellom C og N. Aromatiske amin kan kløyves på samme måte. Karboksylsyrer degraderes hovedsakelig ved kløyving av R-COOH under fotolyse. Aldehyd og ketoner fotolyses på samme måte som karboksylsyrer, men det er lavere fotolytisk aktivitet involvert i kløyving av en karboksylsyre enn for et aldehyd eller keton. En halogenert forbindelse kan under påvirkning av UV-lys bryte bindingen mellom halogenet og C.[41]

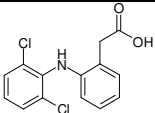
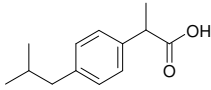
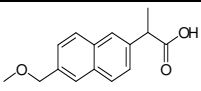
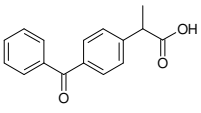
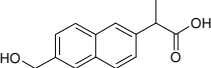
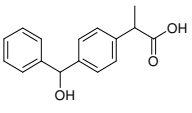
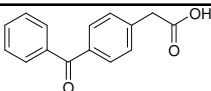
## 4. Material og metode

### 4.1 Kjemikalier

Det ble valgt ut legemidler ut fra salgsstatistikk, og noen sannsynlige metabolitter ble også valgt. Ibuprofen med metabolittene 2-hydroksy ibuprofen og karboksyibuprofen, diklofenak med metabolittene 4-hydroksydiklofenak og 5-hydroksydiklofenak, naproxen med metabolitten 6-O-desmetylnaproxen og ketoprofen med metabolittene dihydroketoprofen og desmetylketoprofen. Acetylsalisylsyre med metabolitt salisylysyre ble også valgt, men etter hvert tatt ut av metoden. Også 2-hydroxyibuprofen og karboxyibuprofen ble fjernet fra metoden på grunn av at de ikke egnert seg for metoden, da de ikke ga detekterbare eller kvantifiserbare topper.

5-hydroksy diklofenak var bare tidvis tilstede i prøvene, særlig i de ekstraherte. I de tilfellene analytten var påvisbar ga den svært små areal sammenlignet med mengden som var tilsatt prøven. Det ble derfor bestemt å ta også denne metabolitten ut av metoden. 4-hydroxydiklofenak så ut til å være litt mer stabil, men med en regresjonskoeffisient i standardkurven på 0,77, ble det bestemt at denne analytten heller ikke var kvantifiserbar, i mange tilfeller var den ikke detekterbar heller, selv i prøver med tilsatte legemidler. Derfor ble denne også tatt ut av metoden.

Tabell 1: Legemidler og metabolitter

Legemiddel	Kjemisk struktur	Molekylformel	Molekylvekt	Log K <sub>OW</sub>	pKa
Diklofenak		C <sub>14</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> N O <sub>2</sub>	296.15	4.51	4.18±0.10
Ibuprofen		C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>2</sub>	206.28	3,72	4.41±0.10
Naproxen		C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	230.26	3.18	4.84±0.30
Ketoprofen		C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> O <sub>3</sub>	254.28	3.12	4.23±0.10
6-O-Desmethyl naproxen		C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	216.23	2,34	4.87±0.30
Dihydroketoprofen		C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> O <sub>3</sub>	256.30	2,37	4.31±0.10
Desmetyl ketoprofen		C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>3</sub>	240.25		

Ketoprofen, ibuprofen og naproxen ble skaffet fra Sigma-Aldrich, Steinheim, Tyskland. Diklofenak ble skaffet fra Maharashtra Industrial Development Corporation (M.I.D.C), Tarapur, India.

De deutererte forbindelsene diklofenak D<sub>4</sub>, ibuprofen D<sub>3</sub>, naproxen D<sub>3</sub> og ketoprofen <sup>13</sup>CD<sub>3</sub> ble brukt som internstandarder (IS), og kom fra Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada. Det gjorde også metabolittene 4-hydroksydiklofenak, dihydroketoprofen, 6-0-desmetyl naproxen, desmetylketoprofen. Polypropylenfiber ble skaffet fra Membrana, Wuppertal, Tyskland.



Saltsyre 37 % ble skaffet fra Merck, Darmstadt, Tyskland og Fluka Chemika (Sigma-Aldrich), Steinheim Tyskland.

Dihexylether, Sigma Aldrich. Maursyre og 32 % ammoniakkløsning ble skaffet fra Merck, Tyskland

Glassfiberfilter med partikkelretensjon på 1,2µm kom fra VWR, Leuven, Frankrike. Det ble brukt metalltråder med diameter på 0,18 mm til å lukke fibrene med og 0,25 mm til å feste fibrene til korken på flasken.

Renset vann ble hentet fra MilliQ rensesystem, Millipore, Bedford, USA

RCT Basic magnetrørere fra Ika Labortechnik, Tyskland. Ultralydbad fra Branson Ultrasonics BV, Soest, Nederland.

Analysevekt XP 204 fra Mettler Toledo, Columbus, OH, USA

## **4.2 Utvikling av metode**

### **4.2.1 Utvikling av ekstraksjonsteknikk**

Grunnen til at man gjør prøveopparbeidelse er å isolere og oppkonsentrere analytten og samtidig overføre analytten til et medium som egner seg for den videre analyse. Væske-væske ekstraksjoner er mye benyttet teknikk for å oppnå dette, men det er en tidskrevende metode som har et høyt forbruk av rene organiske løsemidler som kan være skadelige og er også dyre.[32, 45] Fast fase ekstraksjoner (SPE) bruker ikke like mye organiske løsemidler, men det kan være problemer som for eksempel utfelling under oppkonsentrering av prøven, og eluentet må dampes av etter ekstraksjonen. Matrixeffekter kan være et problem i fast-fase ekstraksjon. Fast fase mikroekstraksjon (SPME) er løsemiddelfri, er enkel i bruk og har lavt forbruk av utstyr. Begrensninger med denne metoden er at fibrene som brukes er dyre og kan ha for kort levetid for enkelte applikasjoner. I tillegg er det viktig å skille ut analytter mellom ulike forsøk for å hindre at de blir med over i neste ekstraksjon. [32]

#### 4.2.1.1 Væske-væske mikro ekstraksjon (LPME)

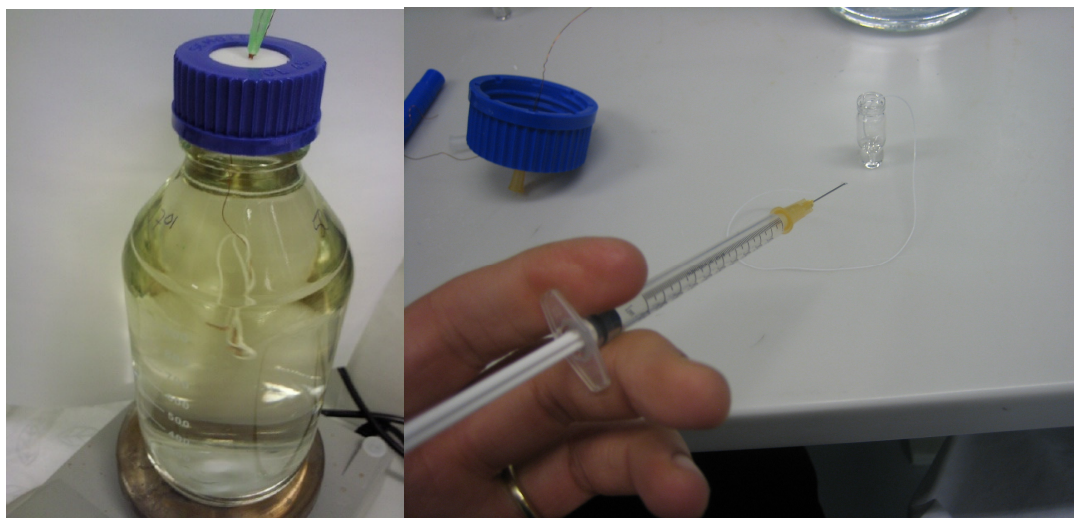
Prøvene ble overført til 1 l flasker, og tilsatt internstandard og evt. NSAID mix før det ble tilsatt 4 ml HCl. På fibrene ble det satt på en kanyle på 0,5  $\mu\text{m}$  i diameter, i hver ende. Fibrene ble holdt i u-form og dyppet i dihexyleter i omtrent 10 sekunder, før overskuddet ble fjernet i ultralydbad. Deretter ble fibrene fylt med  $\text{NH}_3$  løsning med pH 12, før kanylene fjernes og de ble lukket igjen med en metalltråd og festet til en kork. Deretter ble det senket ned i prøven, og stått under omrøring, på omtrent 800 rpm på magnetrører. Etter to timer ble prøven tatt av, og ved hjelp av en sprøyte ble det blåst luft gjennom fibret og presset akseptorfase ut i en vial. Akseptorfase ble så dampet tørr ved hjelp av varmeplate og nitrogengass, før det ble tilsatt 10 % maursyre i vann til vialen. Metoden var basert på tidligere arbeid med LPME[46].

Det ble ekstrahert milliporevann i begynnelsen, men etter hvert ble alle ekstraksjoner utført i sjøvann.

Volumet av prøveløsning ble satt til å være 1,1 l. Ettersom analyttene er sure forbindelser, ble donorfasen gjort sur, for å holde analyttene på nøytral form. 0,05 M HCl ble benyttet i donorfasen som beskrevet i litteraturen [47]. 0,01 M NaOH ble brukt som akseptorfase i artikkelen nevnt ovenfor, og ga gode resultater der. Det er ikke så gunstig å benytte NaOH i ESI-MS, derfor ble det forsøkt vandig  $\text{NH}_3$  som akseptorfase, med tilsvarende pH til 0,01 M NaOH. Det tilsvarer pH 12 med vandig  $\text{NH}_3$ .

Ulike akseptorfaser ble testet ut. Bare vann, samt vann justert til pH 10 og 12 med  $\text{NH}_3$ . Vandig  $\text{NH}_3$  tilsatt eddiksyre i ulike mengder ble også forsøkt, det ble laget en eddiksyreløsning med samme konsentrasjon som ammoniakkløsningen, og laget 3 ulike blandingsforhold, der den ene bestod av 0,25 ml syre, og 0,75 ml base, den neste av 0,5 ml av hver, og den siste med 0,75 ml syre og 0,25 ml base. Det ble ikke kontrollert hvilken pH det var i løsningene.

Det ble også forsøkt å dampe av akseptorfase, og å reoppløse stoffene i 30 % metanol, 10 % maursyre i vann, og 10 % maursyre i 30 % metanol. NaOH ble også forsøkt som akseptorfase som ble dampet av og analyttene reoppløst i maursyre og vann. I den endelige metoden ble det brukt vann justert til pH 12 med  $\text{NH}_3$  som akseptorfase, som ble dampet av, og analyttene reoppløst i 10 % maursyre i vann.



Figur 6: Til venstre står prøve som ekstraheres, til høyre overføres akseptorfasen fra et fiber til vial

## 4.2.2 Uvikling av separasjonsteknikk

### 4.2.2.1 UPLC

Prøvene ble analysert på UPLC-MS, med MS i

Multiple Reaction Monitoring modus. Det ble brukt Waters nano Aquity ultraperformance LC med Quattro premier XE detektor. Separasjonen ble gjort på Acquity UPLC BEH C18 kolonne, 1,7 $\mu$ , 1.0x150 mm, med vann og acetonitril som mobilfase, og gradienteluert.

Tabell 2: gradient

Tid (minutter)	Flow	%-andel vann	%-andel 90 % acetonitril i vann	Curve
0	50	60	40	initial
15	50	45,5	54,5	6
18	50	35	65	6
18,5	50	60	40	6
22	50	60	40	6

## 4.2.3 Deteksjonsteknikk

### 4.2.3.1 MSMS

Det ble kjørt sprøyteinjeksjoner av alle stoffene, men acetylsalisylsyre og salisylysyre ble tatt ut, da de ikke egnet seg i denne metoden.

Analyttene ble ionisert under negativ elektroprayionisasjon (ESI).

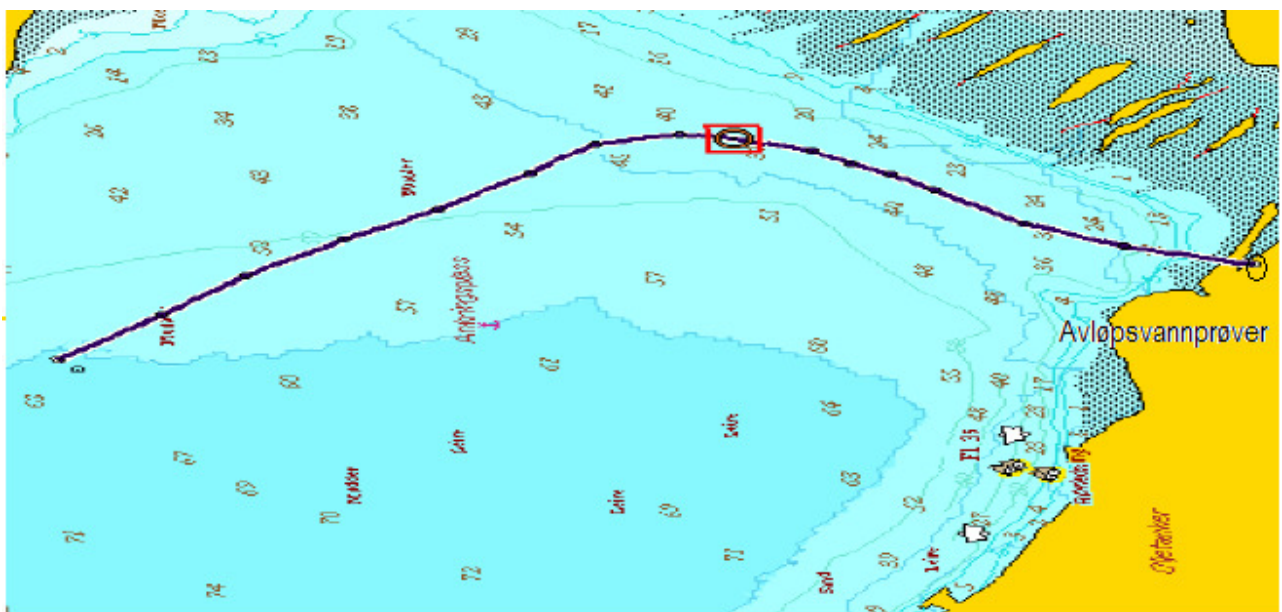
**Tabell 3: Molekylvekt, molekylion, datterion, CV og CE for de undersøkte forbindelsene**

Navn	M <sub>w</sub>	[M-H] <sup>-</sup> m/z	Datterion m/z	CV	CE
Ibuprofen	206,3	205,0	160,9	16	7
Ibuprofen D3	209,3	208,1	163,9	16	9
Diklofenak	296,2	294,1	250,1	18	11
4-hydroxy-diklofenak	312,2	310,2	265,9	19	11
Diklofenak D4	300,2	298,2	254,0	19	11
Ketoprofen	254,3	253,1	209,1	16	8
Ketoprofen <sup>13</sup> CD3	258,3	257,2	213,0	15	8
Desmetyl ketoprofen	240,3	239,2	194,9	12	7
Dihydroketoprofen	256,3	255,0	211,0	13	9
Naproxen	230,3	229,1	185,0	17	8
Naproxen D3	233,3	232,2	187,9	12	7
Desmetyl naproxen	216,2	215,1	170,9	14	7

### 4.3 Innsamling og bearbeiding av prøver

Innsamling av sjøvannsprøver skjedde i to ganger i Longyearbyen, på Adventfjorden (N 78° 13,965; E 15° 39,452, og N 78° 15,041; E 15° 39,019), en gang i Ny-Ålesund (N 78° 55,699, E 11° 56,134), og en gang i Tromsø. På grunn av vær og isforhold i Adventfjorden, samt logistikkproblemer lot det seg ikke gjøre å få tatt flere prøver. Det ble forsøkt å nå avløpsutslippet, men heller ikke det var mulig å nå eksakt. Første gangen var det noe problematisk å finne utslippet, ettersom avløpsrøret var flyttet, og det viste seg å ta for lang tid å få tak i de nye koordinatene før innsamlingen fant sted. De første prøvene ble hentet med båt i november i Adventsfjorden. Andre prøveinnsamling var det is på fjorden, og på grunn av usikker is enkelte steder, ble prøvene tatt et lite stykke unna utslippet. I Ny-Ålesund var det også is, så prøvene ble tatt like ved kai. Alle sjøvannsprøvene på Svalbard ble samlet inn ved hjelp av en pumpe med 10 m slange, og pumpet opp av sjøen.

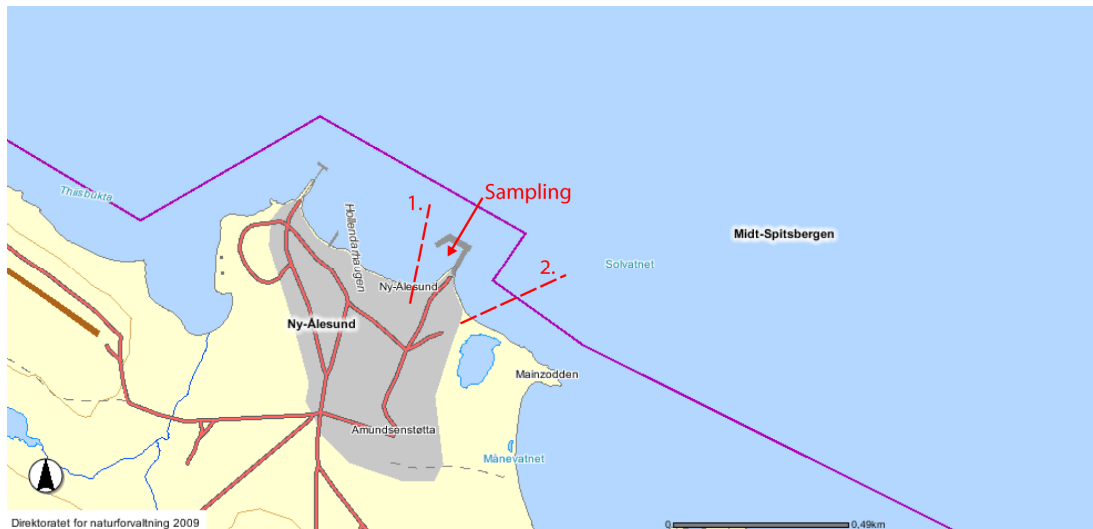
Sjøvannsprøvene i Tromsø ble hentet fra kai, ved Polaria.



Figur 7: Innsamling av prøver i Adventfjorden. Avløpsvannprøvene ble samlet inn ved utløpet før samlerøret går ut i fjorden. Sjøvannsprøvene ble tatt i nærheten av det nye utløpet, som er i enden av rørledningen til venstre i bildet. Kartet kommer fra Bydrift, Longyearbyen



**Figur 8:** Innsamling av sjøvannsprøver i Longyearbyen. Øverst: Prøver samlet inn i Adventfjorden i desember med båt. Nederst: Innsamling av sjøvann fra Adventfjorden med hjelp av snøskuter, mars 09. Foto: Kristian L. Forsberg



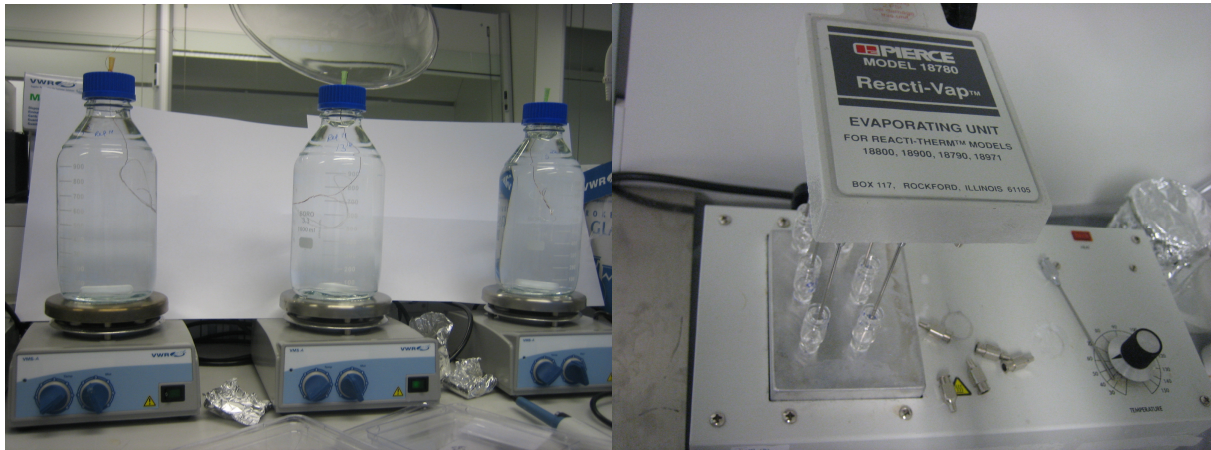
**Figur 9: Oversikt over prøveinnsamling i Ny-Ålesund, 1: Avløpsledning fra marinlab, 2: Avløpsledning fra Ny-Ålesund. Kartet er hentet fra SysseImannen på Svalbards nettsider.**

Avløpsvannprøver på Svalbard ble hentet med hjelp av Longyearbyen bydrift ved et punkt der alle avløpsrør i Longyearbyen går sammen før de slippes ut i fjorden. Kummen ble demmet opp og en bølge senket ned for å hente opp vann. Avløpsvann fra Tromsø ble hentet på rensesanlegget, og var tappet fra en kran. Avløpsvannet var filtrert med et filter med partikkelstørrelse på 330  $\mu\text{m}$ . Sjøvannsprøvene ble pumpet opp, med en delvis hjemmelaget pumpe og samlet inn i 10 l plastkanner. Til hver prøve ble det målt opp 1,1 l vann som ble tilsatt internstandard. Hver gang det ble samlet inn prøver, ble det ekstrahert 8 paralleller, 4 tilsatt bare internstandard, og 4 tilsatt internstandarder og legemidler.



**Figur 10: Henting av avløpsvann i Longyearbyen i januar. Vannet ble øst opp i en bøtte, og helt over på flasker. Foto: Kristian L, Forsberg**

Prøvene ble filtrert med glassfiberfilter med partikkelretensjon på 1,2  $\mu\text{m}$  og ekstrahert ved hjelp av LPME som beskrevet under utvikling av metode. Etter ekstraksjon ble fibrets innhold overført til vial, ved å presse luft gjennom fibret. Det ble først forsøkt å analysere akseptorfasen direkte i UPLC-MS/MS, men pga forstyrrelser fra vandig  $\text{NH}_3$  på kromatografien, ble det forsøkt å dampe akseptorfasen i vialen tørr, og deretter reopløse stoffene i 20  $\mu\text{l}$  10 % maursyre i vann.



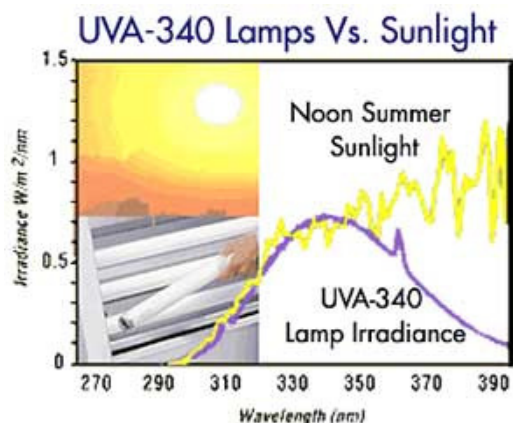
**Figur 11:** LPME-ekstraksjon i flaskene til venstre. Til høyre: avdamping av akseptorfasen med varmeblokk og nitrogengass.

Det ble ekstrahert standardkurver i sjøvann med konsentrasjonene 1, 5, 10, 50, 100, 250, og 500 ng/1,1 l av hvert stoff. Internstandard tilsatt var 50 ng i 1,1 l. I to omganger ble det ekstrahert standarder til standardkurven, begge i Tromsø, den ene i desember med 6 paralleller per konsentrasjon, og den andre i februar med 3 paralleller per konsentrasjon.



## 4.4 UV-forsøket

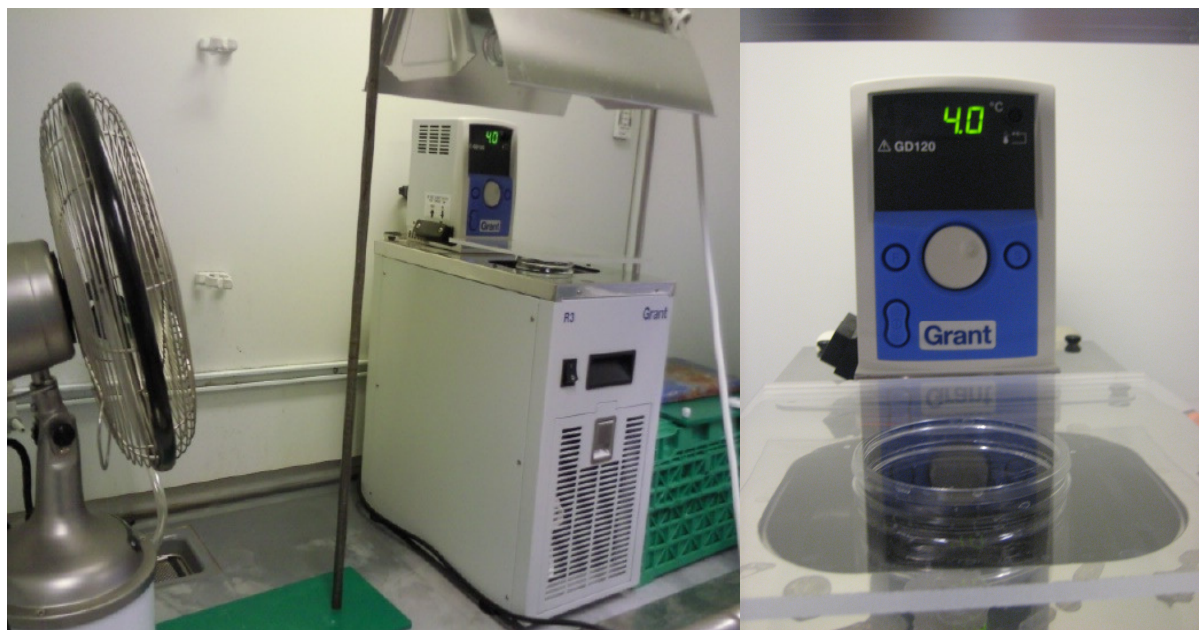
Prøve- og kontroll- løsnings ble laget ved å veie ut 100 µg av ibuprofen, ketoprofen, naproxen og diklofenak, og løse stoffene i MeOH, og fortynne de i sjøvann til konsentrasjoner på 250 ng/ml. Kontrollløsningen står i mørke i kjøleskap under hele forsøket, mens prøveløsningen settes i under UV-lys. UV-lampen hadde et strålingsmaksimum på 340 nm.



Figur 12: Strålingsområde fra UV-lampen,

Prøven ble satt i et bad som kjøler og sirkulerer vann for å tilpasse forholdene til reelle forhold i havet. Badet er en tank i rustfritt stål med termostat, av typen Grant GD120 R3. Lampen sto omtrent 20-25 cm fra prøveløsningen.

Det ble tatt ut 3 paralleller av 1 ml 1 gang om dagen i 2 uker på omtrent samme tidspunkt hver dag. Prøvene ble fortynnet til 1,1 L sjøvann, tilsvarende en konsentrasjon på 250 ng/1,1 l, og deretter ekstrahert som beskrevet under utvikling av væske-væske mikroekstraksjon.



Figur 13: Oppsett for UV-forsøk

Tabell 4: UV forsøk: Tidspunkt og temperatur for innhenting av prøver

Dag	Referanse		UV-løsning		kommentarer
	Klokkeslett	Temperatur	Klokkeslett	Temperatur	
0	11 <sup>10</sup>	4 °C	11 <sup>25</sup>	7 °C	
1	11 <sup>30</sup>	4 °C	11 <sup>35</sup>	6 °C	
2	11 <sup>20</sup>	4 °C	11 <sup>30</sup>	6 °C	
3	11 <sup>15</sup>	4 °C	11 <sup>20</sup>	6 °C	
4	11 <sup>05</sup>	4 °C	11 <sup>15</sup>	6 °C	
5	11 <sup>48</sup>	4 °C	11 <sup>55</sup>	6 °C	
6	10 <sup>35</sup>	4 °C	10 <sup>45</sup>	6 °C	
7	10 <sup>35</sup>	4 °C	10 <sup>45</sup>	6 °C	
8	10 <sup>35</sup>	4 °C	10 <sup>45</sup>	6 °C	
9	10 <sup>30</sup>	4 °C	10 <sup>40</sup>	10 °C	Økt temperatur i cryostat, 4,9 °C
10	11 <sup>00</sup>	4 °C	11 <sup>20</sup>	-	Knust termometer
11	10 <sup>35</sup>	5 °C	10 <sup>50</sup>	7 °C	
12	10 <sup>37</sup>	4 °C	10 <sup>50</sup>	6 °C	Mangler ketoprofen <sup>13</sup> CD3
13	10 <sup>35</sup>	4 °C	10 <sup>40</sup>	6 °C	Mangler ketoprofen <sup>13</sup> CD3
14	10 <sup>35</sup>	4 °C	10 <sup>35</sup>	6 °C	Mangler ketoprofen <sup>13</sup> CD3

## 5. Kvalitetskontroll

### 5.1 Blanke prøver

Å utføre blanke tester er en del av kvalitetskontrollen for å oppdage eventuell kontaminering, og i hvilket trinn prøvene kontamineres. Det ble ikke utført blanke prøver fra feltarbeid, men en transportblank ble kjørt. Som forventet ga det ikke topper for noen av analyttene. Det ble også utført en test av internstandard som også kan ses på som en metodeblank, ettersom det ble brukt vann fra springen som ikke inneholder legemiddel, og prøven fulgte nesten hele prosessen bortsett fra filtrering av vannet.

### 5.2 LOD og LOQ

Limit of Detection (LOD) for den aktuelle analysemetoden er den laveste konsentrasjonen det kan detekteres analytter i prøven. Den oppgis som konsentrasjon av stoff i prøven.

Deteksjonsgrensen kan påvirkes av bl.a. prøvens sammensetning, og utbytte etter prøveopparbeidelse. Dersom analytten har lik eller høyere konsentrasjon enn deteksjonsgrensen, er den detekterbar. Grensen bestemmes ved å beregne forholdet mellom signal og støy, som skal være 3:1, for at stoffet skal være detekterbart[20].

Limit of Quantification (LOQ) er kvantifiseringsgrensen. Det er den laveste konsentrasjon av analytt som kan bestemmes med akseptabel presisjon. Den bestemmes også med signal til støy forholdet, men for å kvantifisere en analytt bør forholdstallet være likt eller over 10[20].

Tabell 5: LOD og LOQ for analyttene ng/1, 1 l

Forbindelse	LOD	LOQ
ketoprofen	15	50
diklofenak	31	104
naproxen	32	107
ibuprofen	38	127
6-O-desmetylnaproxen	69	230
desmetylketoprofen	24	80
dihydroketoprofen	14	45

LOD og LOQ ble bestemt ut fra sjøvann. Noen prøver er ekstraherte i avløpsvann og det er usikkert hvorvidt en kan benytte de samme verdiene for detektering og kvantifisering av prøver,

ettersom det er to veldig ulike matrixer som kan påvirke analyttene og ekstraksjonen på ulik måte.

Det kan også være forskjeller i instrumentet som gir ulik støy mellom hver gang man kjører prøver, og dermed kan verdien av LOD og LOQ være annerledes enn den som er beregnet. I tillegg kan det være ulik matrix i de sjøvannsprøvene som er kjørt, som for eksempel ulikt saltinnhold, ettersom de er hentet fra ulike steder, og det dermed kan være forskjeller som kan påvirke ekstraksjonen og dermed LOD og LOQ.

### 5.3 Linearitet

Metodens linearitet forteller om hvorvidt den kan gi standardkurver der responsen er en lineær funksjon av konsentrasjonen. Ut fra en standardkurve beregnes regresjonslinje, og regresjonskoeffisient. Regresjonslinjen er på formen  $y = ax + b$ , der  $y$  er responsen,  $x$  er konsentrasjonen og  $b$  er skjæringspunkt med  $y$ -aksen. Regresjonskoeffisienten bør være 0,999, men lavere verdier kan aksepteres, avhengig av hva metoden skal benyttes til[20].

**Tabell 6: Regresjonskoeffisient til analyttene fra standardkurvene ekstrahert i desember 08 og februar 09,**

Analytt	$r^2$ , std kurve desember	$r^2$ , std kurve februar
Ketoprofen	0,993	0,977
Diklofenak	0,934	0,930
Naproxen	0,997	0,978
Ibuprofen	0,999	0,983
Desmetylnaproxen	0,925	0,975
Desmetylketoprofen	0,954	0,970
dihydroketoprofen	0,950	0,974

I standardkurven fra februar har  $r^2$  sunket noe for ketoprofen, naproxen og ibuprofen sammenlignet med standardkurven fra desember. For desmetylnaproxen, dihydroketoprofen og desmetylketoprofen har den imidlertid blitt litt bedre. Fra den siste standardkurven ble det bare ekstrahert 3 paralleller, mens det ble ekstrahert 6 paralleller fra standardkurven i desember. I tillegg ble metoden endret på i mellomtiden, med økt flow. Variasjoner i instrumenteringen kan også påvirke resultatene.

Det er ikke oppnådd optimal linearitet, men den er akseptabel til dette formål, man må da ta i betraktning at nøyaktigheten vil bli redusert med lavere linearitet.

## 5.4 Presisjon

Presisjon er spredning i analyseresultatene og angis i prosent relativt standardavvik for et statistisk signifikant antall prøver. For å bestemme presisjon bør man ha minst 6 paralleller per konsentrasjon. Det må minst være 3 konsentrasjoner som skal dekke området der analytter forventes å bestemmes i.

Metodens repeterbarhet er en måte å beregne presisjon på. Da sammenlignes relativ standardavvik ut fra gjentatte analyser under identiske omgivelser over en kort periode.

Reproduserbarhet er en annen metode som sier noe om spredningen i analysemetoden i flere laboratorier. Det blir analysert identiske prøver og beregnet relativt standardavvik[20].

**Tabell 7: Tabellene viser gjennomsnitt, standardavvik og relativ standardavvik for de 6 parallellene av hver konsentrasjon av standardkurven ekstrahert desember 08. Konsentrasjoner er oppgitt i ng/1,1 l.**

### dihydroketoprofen

Std.kons	gj.snitt	std.avvik	rel.std.avvik
1	0,58	0,17	29,70
5	2,70	1,33	49,19
10	17,75	1,27	7,17
50	73,47	12,33	16,79
100	99,67	22,00	22,08
250	271,97	27,49	10,11
500	450,18	77,07	17,12

### desmetylnaproxen

Std.kons	Gj.snitt	Std.avvik	Rel.std.avvik
1	0,85	0,74	87,65
5	3,2	1,22	38,27
10	9,1	3,68	40,44
50	82,7	28,37	34,30
100	97,13	41,64	42,87
250	273,62	47,89	17,50
500	449,47	51,01	11,35

### ketoprofen

Std.kons	Gj.snitt	Std.avvik	Rel.std.avvik
1	0,78	0,26	32,71
5	5,55	1,80	32,35
10	10,57	0,48	4,58
50	52,98	2,24	4,22
100	101,70	5,24	5,15
250	250,98	13,42	5,35
500	493,48	49,87	10,11

### diklofenak

Std.kons	gj.snitt	st.avvik	rel.std.avvik
1	0,1		
5	6,5	0,90	13,83
10	13,98	1,54	11,03
50	78,73	3,57	4,54
100	144,87	18,67	12,88
250	254,80	14,22	5,58
500	417,40	45,39	10,87

**desmetylketoprofen**

Std.kons	gj.snitt	std.avvik	Rel.std.avvik
1	2,08	0,5	24,18
5	3,43	1,76	51,3
10	5	4,4	87,91
50	46,02	3,75	8,14
100	69,57	6,99	10,04
250	264,17	55,92	21,17
500	525,78	87,88	16,71

**ibuprofen**

Std.kons	gj.snitt	std.avvik	rel.std.avvik
1	1,32	0,31	23,24
5	4,48	0,54	12,09
10	10,28	1,34	13,02
50	49,20	3,03	6,16
100	97,23	2,46	2,53
250	247,13	5,64	2,28
500	506,35	15,70	3,10

**naproxen**

Std.kons	gj.snitt	std.avvik	rel.std.avvik
1	0,73	0,45	60,78
5	5,13	0,67	13,02
10	11,3	1,48	13,14
50	54,27	2,94	5,41
100	103,22	7,88	7,64
250	245,67	22,23	9,05
500	495,67	28,49	5,75

Det er ekstrahert 6 paralleller av hver konsentrasjon, og beregnet relativt standardavvik for hver enkelt konsentrasjon for hvert stoff. Ved lave konsentrasjoner er det en tendens til at usikkerheten øker, mens den går ned på høyere konsentrasjoner. Det er altså større variasjoner mellom ekstraksjonene i lave konsentrasjoner, noe som kan være påvirket av små pipetteringsvolum og usikkerheten som følge av det. Repeterbarheten er god for de fleste stoffene fra 10 ng/1,1 l. noen stoffer har også brukbar repeterbarhet på 5 ng/1,1 l.

## 5.5 Recovery

På grunn av tidsmangel, og at det ikke var en passende recoverystandard tilgjengelig, ble det ikke utført recoverytester.

## 5.6 Internstandard

For å finne problemer relatert til matrix, er det nødvendig å bruke en intern referansestandard. Internstandarder tilsettes til prøven i kjent konsentrasjon før prøveopparbeidelsen starter, og kan gi informasjon om tap av forbindelse i ulike trinn av prøveopparbeidelsen og identifisere forstyrrelser som kommer av matrix i prøven. I tillegg benyttes internstandarden som standard for kvantifisering, dermed kan små tap av analytter automatisk korrigeres for.

En internstandard bør ha så like kjemiske egenskaper og oppførsel som den forbindelsen man ønsker å analysere. Den må heller ikke være tilstede i prøven. Isotopmerkede internstandarder har identisk kjemisk og fysikalsk oppførsel, sett bort fra kinetiske prosesser. De oppfører seg likt med tanke på mekanismer som gir tap av analytt under prøveopparbeidelsen, men det krever også at man har en metode som kan skille mellom isotoper [20, 48].

Analyser ved bruk av internstandard kan brukes til bl.a. å bestemme legemidler i biologisk materiale. For kvantifisering av legemidler i tilsettes internstandard i kjent konsentrasjon, og kvantifiseringen baseres på forholdet mellom areal av topp til analytt og internstandard. I en standardkurve sammenlignes arealet av standardløsninger i en konsentrasjonsrekke, med arealet av internstandard som har samme konsentrasjon. Ved analyse av ukjente prøver kan man finne konsentrasjonen ved å sette inn forholdstallet mellom arealet av analytt og arealet av internstandard til den ukjente prøven inn i standardkurven. Den ukjente prøven tilsettes samme mengde internstandard som i standardløsningene[20].

## 6. Resultat og diskusjon

### 6.1 Metodeutvikling

Under metodeutviklingen ble det forsøkt ulike parametere for å teste hva som ga de beste resultatene.

Vann justert til pH 12 med  $\text{NH}_3$  tilsatt NSAIDs ble forsøkt å kjøre direkte i UPLC-MS/MS. Det ga en retensjonstid på rundt 2 minutter for alle stoffene. Det ble så forsøkt å nøytralisere  $\text{NH}_3$  løsningen med samme konsentrasjon av  $\text{CH}_3\text{COOH}$  som ammoniakkløsningen, i ulike blandingsforhold for å se hvordan det påvirket separasjonen. 0,25 mm syre, og 0,75 mm base endret ikke separasjonen i særlig stor grad, men ga ca 1 minutt lengre retensjonstid for noen av stoffene, men alle kom ut på stort sett samme tidspunkt. 0,50 mm av hver av syre og base ga noen stoff bedre separasjon, men de aller fleste toppene kom likevel ut relativt samtidig relativt tidlig. 0,75 mm syre og 0,25 mm base ga bedre separasjon enn de to forgående. Analyttene var litt mer spredt, men fremdeles var det vanskelig å skille alle fra hverandre.

Vandig  $\text{NH}_3$  med pH 10 som akseptorfase ga ikke særlig gode resultat, ettersom de fleste toppene kom tidlig ut, og ikke alle analyttene ga signal i spekteret.

Det ble forsøkt å dampe av  $\text{NH}_3$  løsningen og tilsette vann, men heller ikke det ga brukbare topper.

Tilsats av 30 % metanol i stedet for vann, etter avdamping av den vandige  $\text{NH}_3$ -akseptorfase, ga et delt spekter, med de fleste av toppene samlet på rundt 2 minutter, mens noen få hadde retensjonstid på nesten 13 minutter.

Det ble både forsøkt å ekstrahere med vann som akseptorfase, som ble analysert direkte uten bearbeiding, og det ble forsøkt å dampe av vannet og reoppløse analyttene i 30 % metanol, men ingen av delene ga noen topper i kromatogrammet.

Analyttene ble forsøkt reoppløst i 10 % maursyre i 30 % metanol, noe som ga bedre separasjon enn det som var sett tidligere. Samtidig ble det også testet ut å reoppløse analyttene i 10 % maursyre i vann i stedet for metanol. Det var ingen tydelig forskjell på de to, det ble valgt å bruke 10 % maursyre i vann videre i metoden. Hvorfor det fungerte å reoppløse de sure analyttene i maursyre, kan forklares med at det sannsynligvis var rester av basisk salt fra  $\text{NH}_3$ -løsningen som ble mer nøytralt i sur løsning, og dermed ga analyttene bedre separasjon.



Det ble prøvd ut ulike volum av væsken til å reoppløse stoffene med, 20, 50 og 100 µl. Ulempen med å benytte et så lite volum som 20 µl er at man kan miste analytter som sitter igjen på innsiden av glasset. Det vil man kunne redusere ved å benytte et større volum som 100 µl, men det vil fortynne prøvene. Det ble derfor valgt å benytte 20 µl videre for å kunne sette lavere deteksjonsgrenser i metoden.

NaOH ble forsøkt som alternativ akseptorfase ettersom det er en sterkere base enn vandig NH<sub>3</sub>. Det ble testet ut på konsentrasjoner på 1 ng og 50 ng. På 1 ng var ikke forskjellen så stor mellom de to akseptorfasene, da den eneste detekterbare toppen var naproxen, som ga høyere areal i NH<sub>3</sub> løsningen enn for NaOH. Vandig NH<sub>3</sub> viste seg å være en bedre akseptorfase enn NaOH på 50 ng, da toppene hadde høyere areal for NH<sub>3</sub> løsningen jevnt over. Hvorfor det ble slikt er ikke helt klart, men det antas at tilstedeværelse av Na<sup>+</sup> forstyrrer analysen. Na<sup>+</sup> har vist seg å påvirke analyser av basiske forbindelser, det kan heller ikke utelukkes at analyser av sure forbindelser blir påvirket.

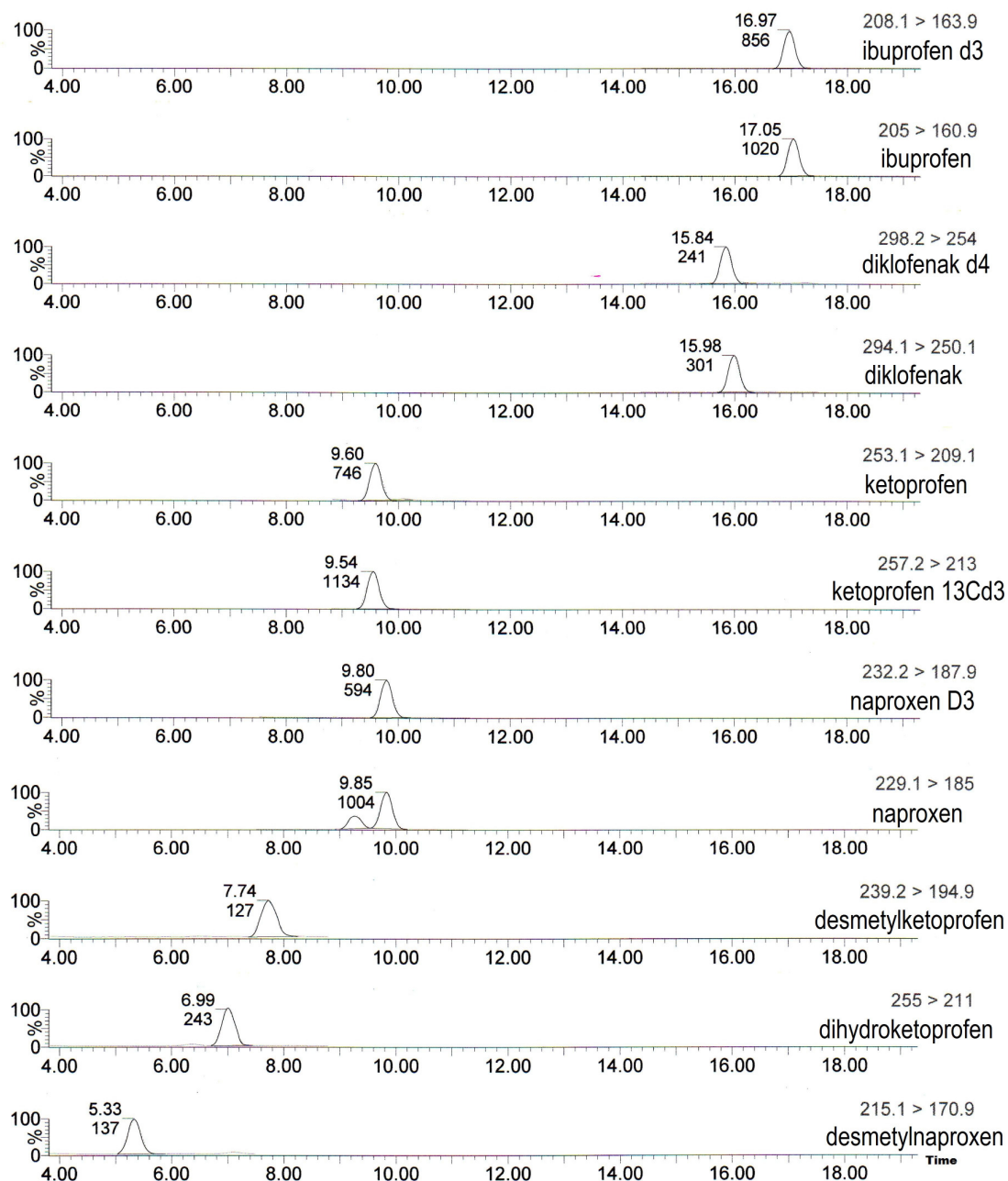
Det viste seg at ikke alle analyttene var egnet for denne metoden, og enkelte ble fjernet tidlig i prosessen. Når det ble gjort sprøyteinjeksjoner av acetylsalisylsyre, løst i metanol, i MS viste det bare signal for salisylysyre. Det ble derfor forsøkt å løse acetylsalisylsyren opp i vann for å teste om det fremdeles ble brutt ned til salisylysyre, noe det viste seg å gjøre. Ettersom acetylsalisylsyre ble brutt ned til salisylysyre, ble begge tatt ut av metoden, da det ikke fungerte å analysere acetylsalisylsyren, var det lite interessant å analysere metabolitten salisylysyre.

Karboksyibuprofen ga bare gode signal i standardløsningene som ikke var ekstraherte, etter ekstraksjon var det ikke mulig å detektere denne metabolitten. Det ble derfor testet ut med å tilsette vandig NH<sub>3</sub> i en vial, og 10 % maursyre i en annen for å se om det påvirket signalet i MS, hvilket viste seg å gi gode signal både for syren og basen. Det kan ikke utelukkes eventuelle matrixeffekter i sjøvannet, eller at analytten ikke egner seg for denne typen ekstraksjon. Både karboksyibuprofen og 2-hydroxyibuprofen ble tatt ut av metoden ettersom de ikke ga signal i MS.

Det ble ofte sett to topper på kromatogrammet der man forventet å se naproxen. For å sjekke om det ble påvirket av vandig NH<sub>3</sub> eller maursyre, ble det kjørt en løsning med basen og en med syren uten å ekstrahere den. I NH<sub>3</sub>løsningen ga ikke naproxen noen signal, mens i maursyre ga naproxen signal, men det ble en dobbel topp. Denne ekstra toppen gir ikke signal når det kjøres

analyse av naproxen i rent vann, og ikke er ekstrahert løsning. Toppen er ikke tilstede hele tiden, men dukker opp i bl.a. transportblank og i enkelte sjøvannsprøver. Det ser ikke ut til at den er i avløpsvannprøver. Hva som forårsaker denne toppen, og hvorfor den dukker opp i en MRM metode, der sannsynligheten for at et stoff har samme  $m/z$ , likt fragment og relativt nær retensjonstid til naproxen, er vanskelig å slå fast.

## 6.2 Standardkurve

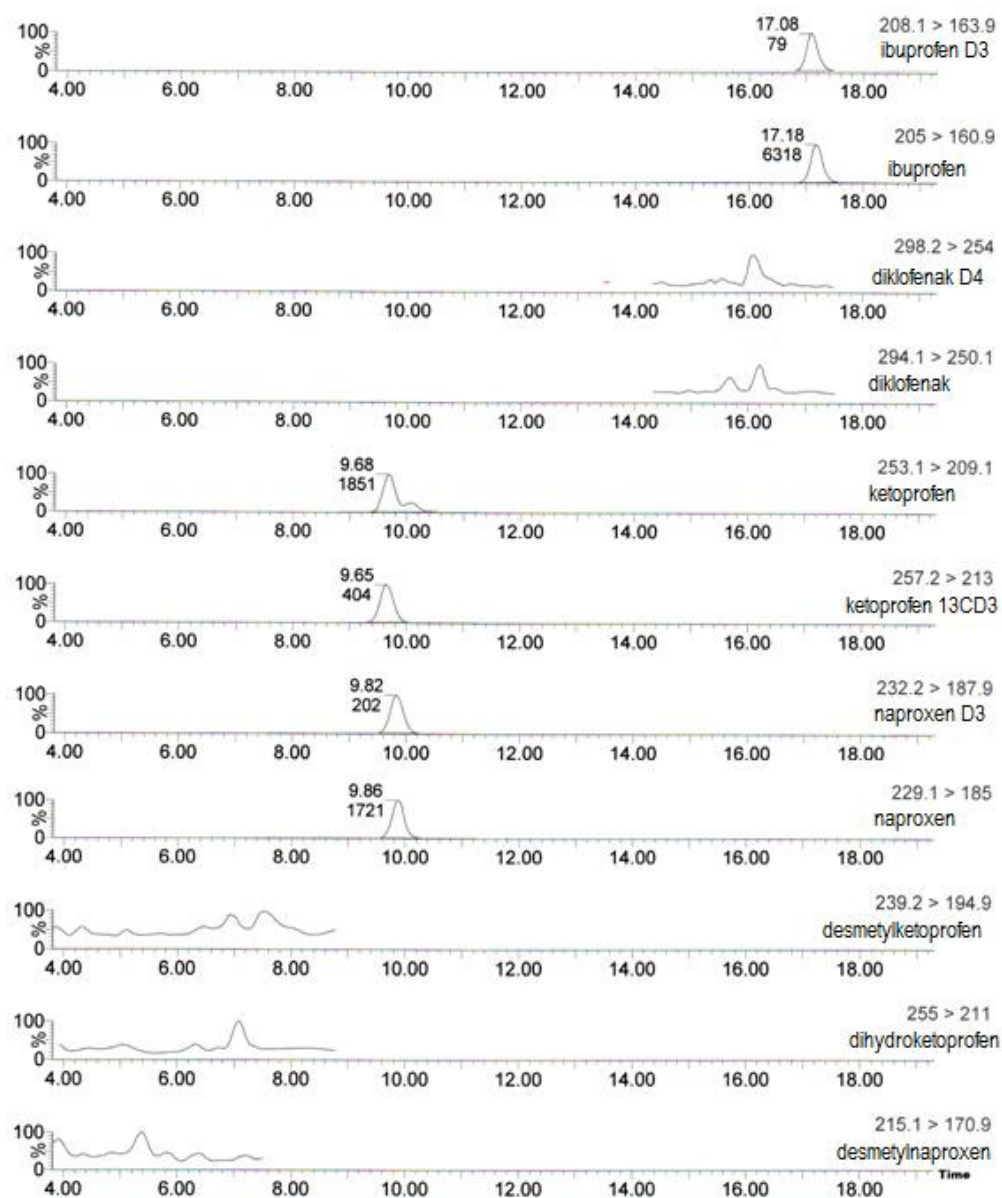


Figur 14: kromatogram standardkurve 50 ng, ekstrahert des 08

Det ble ekstrahert to standardkurver, en i desember og en i mars. Underveis i prosjektet ble det gjort reparasjoner på MS der enkelte kapillær ble byttet ut. Dette gjorde at flow-hastigheten kunne justeres opp, uten at trykket ble for høyt. Det resulterte i at retensjonstidene for analyttene

ble kortere, og er dermed forklaringen på hvorfor kromatogrammene har ulike retensjonstider for de samme analyttene. De prøvene som ble kjørt før endringen fant sted ble kvantifisert med standardkurven som også ble kjørt før endringene, mens det ble ekstrahert nye standardløsninger som ble kjørt etter endringen.

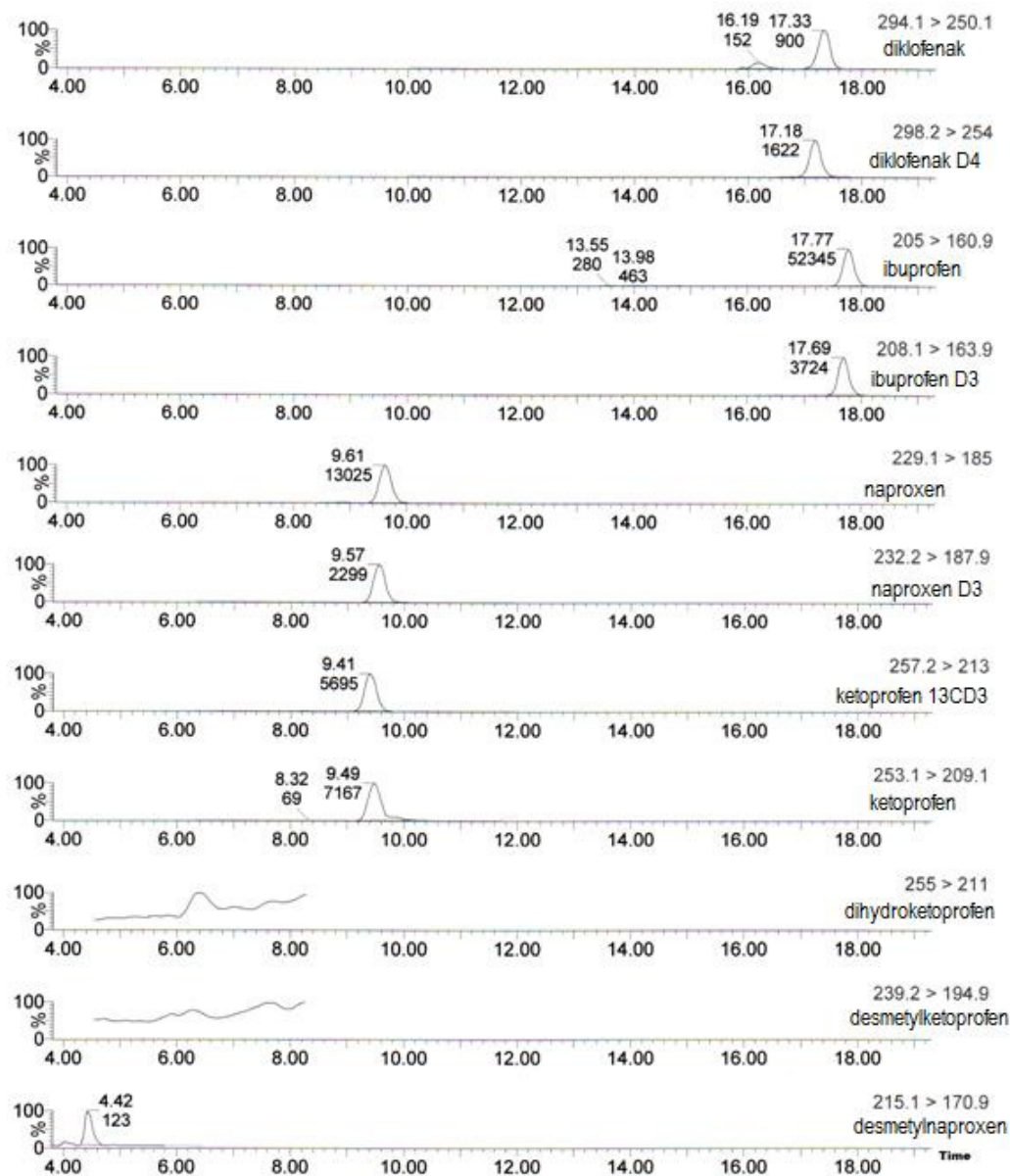
### 6.3 Resultat avløpsvann



Figur 15: Resultat avløpsvann fra Svalbard, prøven er tilsatt 50 ng internstandard

## Resultat og diskusjon

Som figur 15 viser, er arealene til internstandardene mye lavere enn for kromatogrammet i figur 16. Ettersom de fleste av analyttene har et relativt høyt areal, antas det at de ikke har blitt redusert slik som internstandardene. Det kan man likevel ikke vite sikkert, derfor anslås resultatene fra avløpsvannet i Longyearbyen som et grovt estimat av hvor mye det kan befinne seg der.



Figur 16: Avløpsvannprøver fra Tromsø April 09, tilsatt 50 ng IS

Arealene av internstandard er normale i avløpsvannprøvene fra Tromsø, og det ses relativt store areal av analyttene. Av og til dukker der opp flere topper enn den det forventes å se i kromatogrammet. Det er vanskelig å forklare hvorfor det slipper gjennom flere stoffer, med

samme  $m/z$  ratio som analyttene og med relativt lik retensjonstid, gjennom massespektrometeret. I noen tilfeller er toppene relativt høye, noe som tyder på at det er relativt mye av de ukjente forbindelsene tilstede. Avløpsvann er i midlertidig en svært komplisert matrix, hvis sammensetning og forbindelser den inneholder ikke er kjent. Samtidig var avløpsvannet fra Longyearbyen sannsynligvis en langt verre matrix enn det som ble hentet i Tromsø, ettersom det ikke var filtrert, men hentet rett fra avløpsledningen. Dermed var det en god del mer uklart og grumsete enn vannet fra Tromsø som ble tappet fra en kran der partikler større enn 300  $\mu\text{m}$  ble filtrert bort. Figur 17 viser før og etter filtrering av avløpsvann i Longyearbyen.

Dermed kan avløpsvannet ha forstyrret både ekstraksjonen og analysen, særlig hvis noen av analyttene binder seg til partikler i vannet, og dermed filtreres bort.

I avløpsvannprøvene fra Longyearbyen ble ikke alle internstandardene ekstrahert over som normalt sammenlignet med samme mengde tilsatt internstandard i avløpsvannprøvene fra Tromsø. Derfor ble det i stedet gjort et estimat av konsentrasjonene i avløpsvannet i Longyearbyen ved å sammenligne forholdstallet mellom arealene av toppene fra Tromsø og Longyearbyen, å relatere det til konsentrasjonen av stoff funnet i Tromsø. Det gir bare et estimat av hva man kan regne med å finne. Estimater ble beregnet ut ifra gjennomsnittsverdier til areal og konsentrasjoner for de 4 parallellene av hver prøve.

I avløpsprøvene fra Tromsø er ketoprofen, naproxen og ibuprofen kvantifiserbare, mens diklofenak er kun detekterbar. Desmetylketoprofen og dihydroketoprofen blir ikke funnet i det hele tatt. 6-O-desmetylnaproxen ble påvist, men de verdiene som er oppgitt i tabell er under den detekterbare grensen. Likevel er den oppgitt i tabellen fordi LOD og LOQ er beregnet for prøver ekstrahert i sjøvann og ikke i avløpsvann. Det kan se ut til at ekstraksjonsbyttet er høyere i avløpsvann enn det er i sjøvann, uten at man vet det helt sikkert. Resultatet viser at det er en indikasjon på at det er 6-O-desmetylnaproxen tilstede i sjøvannet, selv om konsentrasjonen som står oppgitt i tabellen ikke nødvendigvis er korrekt.

## Resultat og diskusjon

**Tabell 8: avløpsvann resultat. Konsentrasjoner er oppgitt i ng/1,1 l. Resultatene fra Svalbard er oppgitt som estimat av omtrentlig konsentrasjon man kan finne der, sammenlignet med prøver fra Tromsø. Gjennomsnitt, standardavvik og relativt standardavvik er oppgitt for prøvene fra Tromsø.**

Avløpsprøver	Longyearbyen	Tromsø			
	15.01.2009	28.04.2009			
navn	estimat kons.	konsentrasjon	gjennomsnitt	std. avvik	Rel.std.avvik %
<u>ketoprofen</u>	20 Detekterbar, men ikke kvantifiserbar	77,8 91,2 70,9 88,2	82,03	9,38	11,43
<u>diklofenak</u>	Ikke detekterbar	42,9 47,1 40,7 48,2	44,73	3,52	7,87
<u>naproxen</u>	30 Detekterbar, ikke kvantifiserbar	230,8 237,6 202,7 210,9	220,5	16,41	7,44
<u>ibuprofen</u>	100 Detekterbar, kan sannsynligvis kvantifiseres	662,4 673 675,5 823,6	708,63	76,86	10,85
<u>6-O-desmetylnaproxen</u>	5 Estimert konsentrasjon er ikke detekterbar	31,4 36,3 33,1 50,1	37,73	8,5	22,53
<u>dihydroketoprofen</u>	ikke detekterbar	ikke detekterbar			
<u>desmetylketoprofen</u>	ikke detekterbar	ikke detekterbar			

Kommentarene i tabellen til avløpsvannprøvene fra Longyearbyen er basert på analyttens LOD og LOQ, men det bør tas i betraktning av LOD og LOQ er beregnet for sjøvann og ikke nødvendigvis gir de samme verdiene for avløpsvann.

De relative standardavvikene for avløpsprøvene fra Tromsø, varierer mellom 7 og 23 %. Dersom man sammenligner med relative standard avvik fra avløpsvannprøver fra Tromsø og Svalbard, ekstrahert med LPME, men for Selektive Serotonin Reopptakshemmere (SSRI) fra 2007 [49], varierte det relative standardavviket mellom 1,4 % og 60 % for ulike SSRI på ulike avløpsanlegg.

Det er et akseptabelt resultat, særlig med tanke på at metoden man sammenligner med hadde færre trinn.

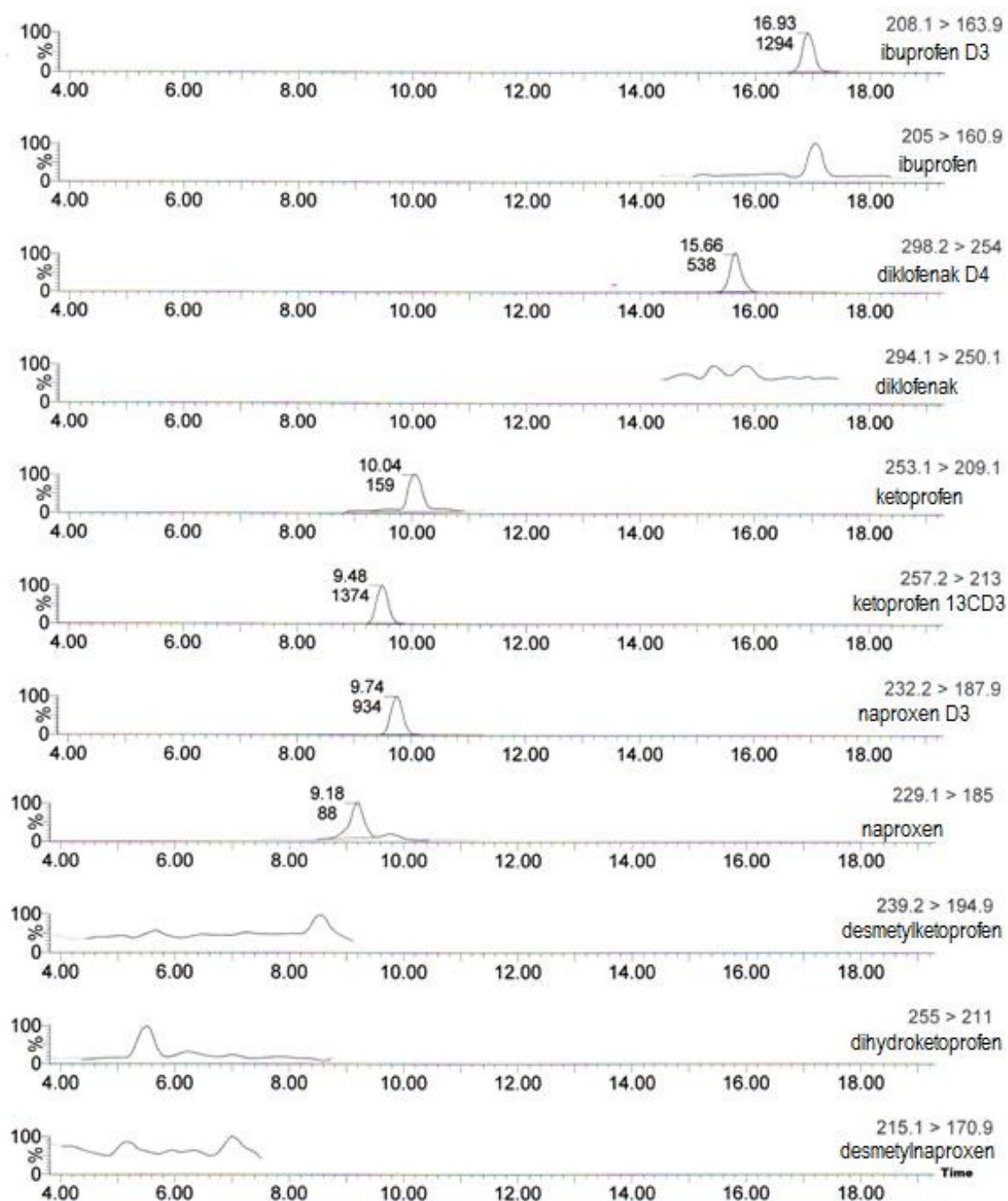
Ut i fra salgsstatistikken, for Norge og Svalbard, nevnt i innledningen av oppgaven, selges det mest av ibuprofen, deretter diklofenak, naproxen og minst av ketoprofen. I avløpsprøvene ble det funnet mest ibuprofen, deretter naproxen, ketoprofen og så diklofenak. I følge statistikken burde det finnes mer diklofenak, men den er ikke alltid stabil i metoden, noe som gjenspeiles i lineariteten som for diklofenak har regresjonskoeffisient på 0,93, sammen lignet med ibuprofen, ketoprofen og naproxen som alle har  $r^2=0,99$  fra standardkurven i desember. For øvrig ser funnene ut til å stemme overrens med statistikken.



Figur 17: Før og etter filtrering av avløpsvann. Prøven til høyre er ikke filtrert. Foto: Kristian L, Forsberg



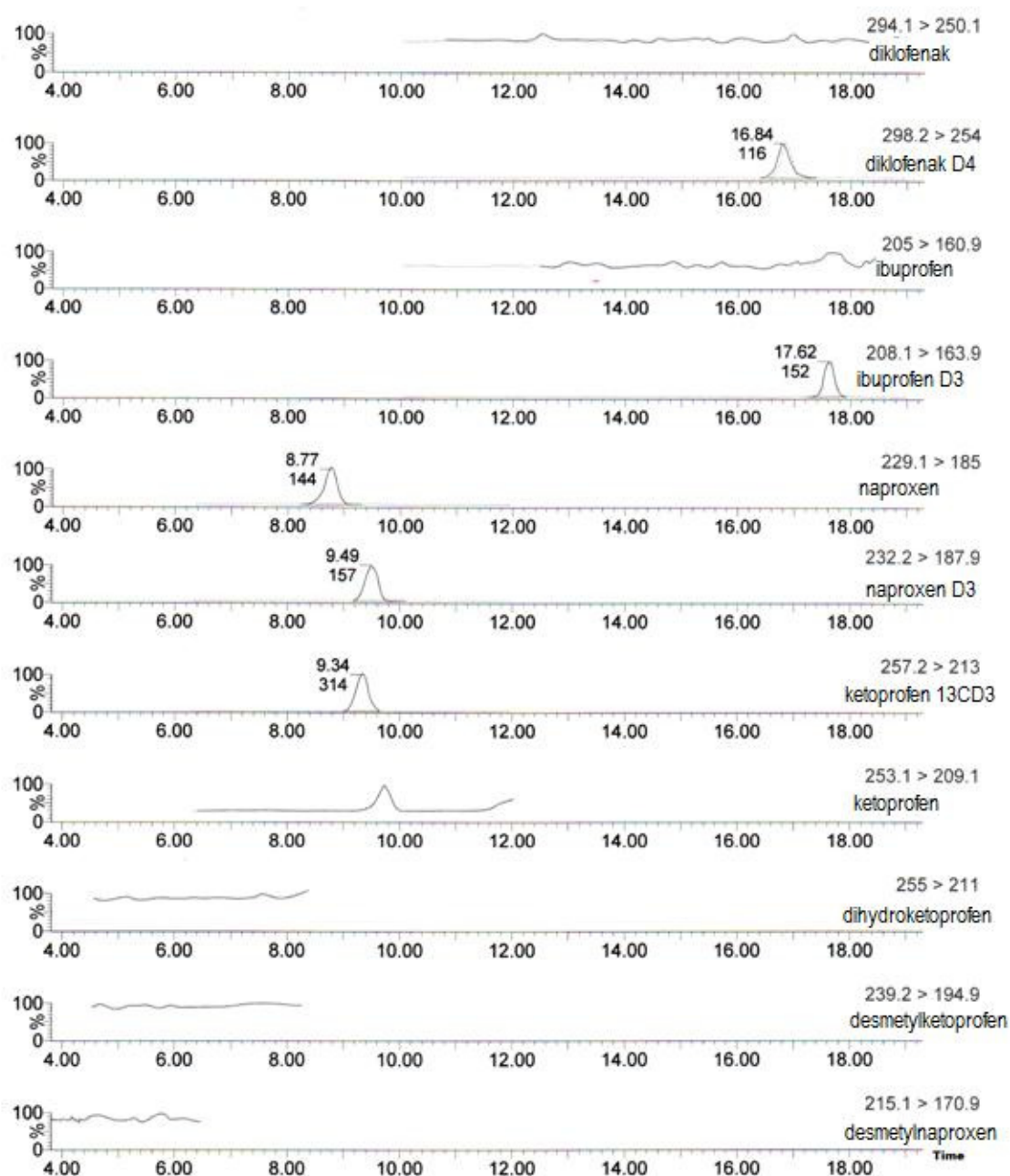
## 6.4 Resultat sjøvannsprøver



Figur 18: Sjøvannsprøver Adventfjorden desember 08, tilsatt 100 ng is

## Resultat og diskusjon

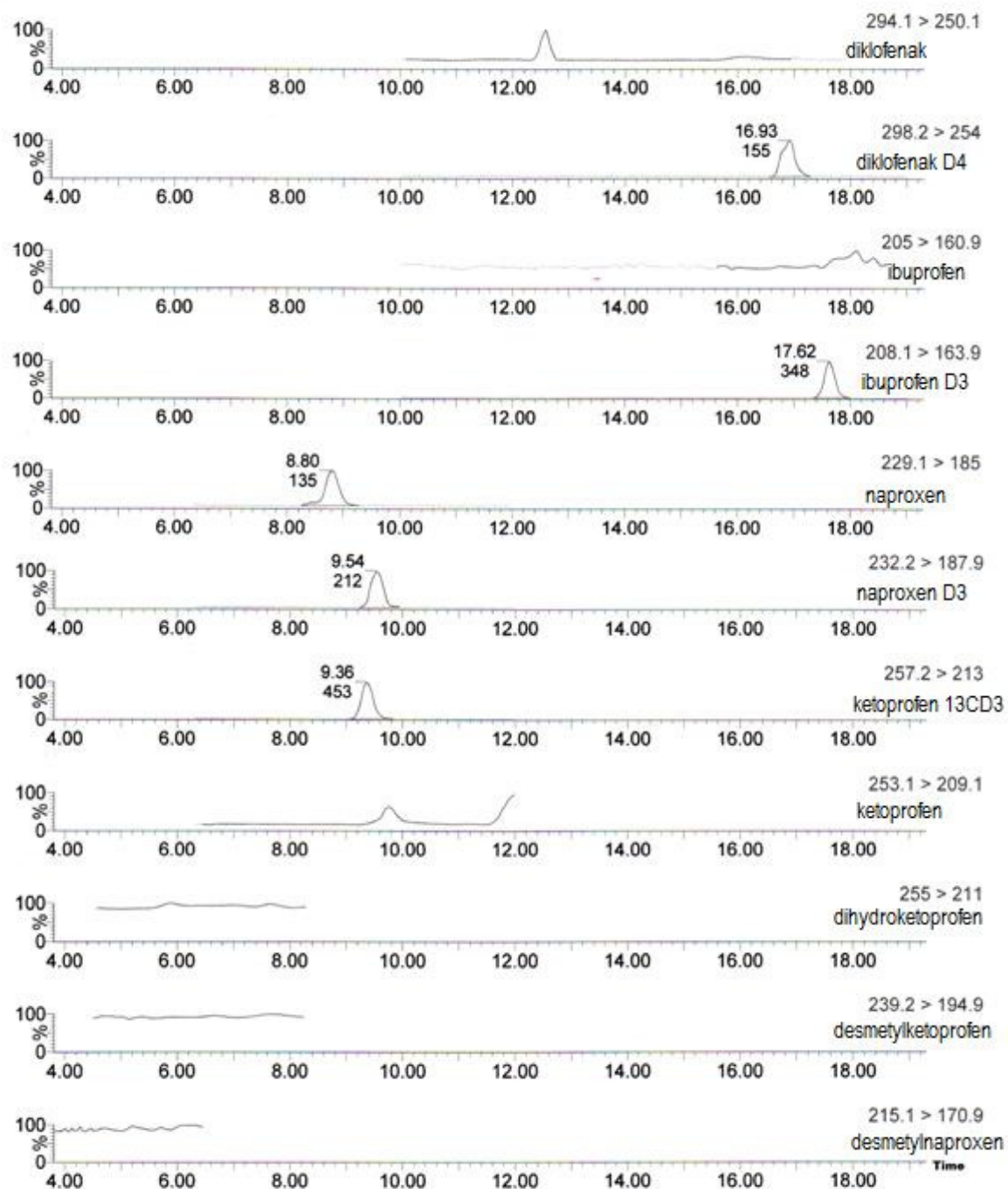
Ut ifra resultatene av avløpsvannet kunne man kanskje forventet å finne ibuprofen ([M-H]<sup>-</sup> 205), ettersom det var mest av det som slippes ut i Adventfjorden. Den eneste analytten som ga topp med areal var ketoprofen ([M-H]<sup>-</sup> 253). Det kan se ut til at naproxen ([M-H]<sup>-</sup> 229) er tilstede i prøven, men dersom man sammenligner retensjonstiden med standardkurven, ser man at naproxen skal ha en retensjonstid på nærmere 9,8 minutter, og at denne toppen dermed ikke er naproxen.



Figur 19: Resultat sjøvannsprøve fra Adventfjorden mars 09, tilsatt 50 ng internstandard

## Resultat og diskusjon

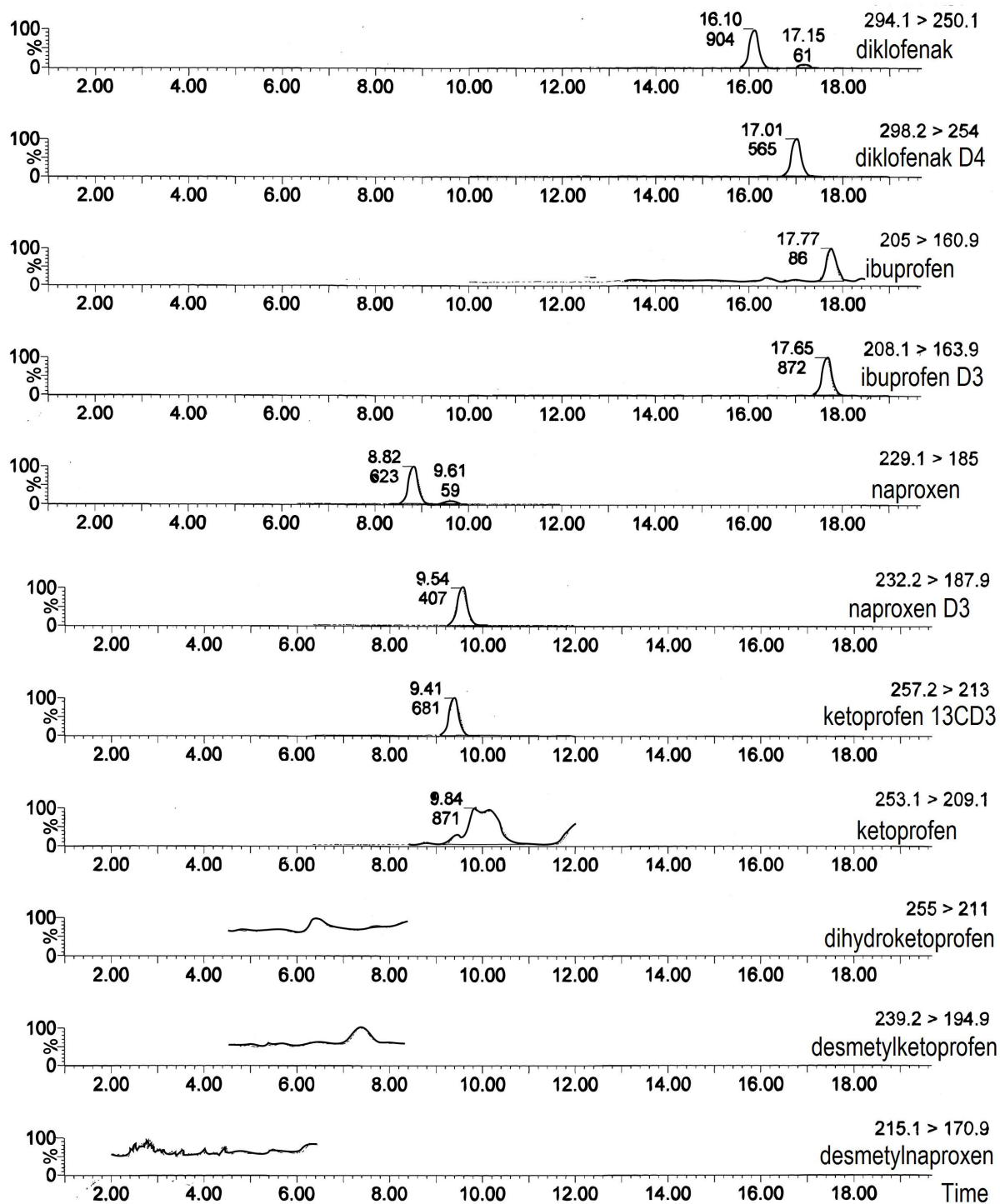
Den andre sjøvannsprøven hentet fra Longyearbyen viser bare antydning til en topp for ketoprofen, og ingen av de andre analyttene, toppen for naproxen er ikke reell her heller, ettersom den skulle hatt retensjonstid i nærheten av den deutererte internstandard, naproxen d3 (M-HJ 232), på rundt 9,5 minutt i denne prøven.



Figur 20: Resultat av sjøvannsprøver fra Ny-Ålesund, tilsatt 50 ng IS

## Resultat og diskusjon

Sjøvannsprøvene fra Ny-Ålesund inneholder kanskje som forventet ikke noen av de undersøkte analyttene. Det bor ca 30 personer der, og det vites ikke om og eventuelt hvor mye legemidler som benyttes av de som oppholder seg der. Igjen ses en topp som kan mistolkes som naproxen.



Figur 21: Kromatogram fra sjøvannsprøver i Troms

Det ser ut til å være en del diklofenak (294) tilstede i denne prøven, men det viser seg å ikke stemme, da den toppen med det laveste arealet på 61 er den toppen som er diklofenak. Ut fra retensjonstider til tidligere analyser av diklofenak, samt ved sammenligning med internstandardens (298) retensjonstid, kan man se at toppen som kommer 16.10, ikke er diklofenak. Naproxen (229) har også her en ekstra topp, som ikke er forventet, og det er toppen på 9.61 som er naproxen. I denne prøven fra Tromsø ble det påvist både ibuprofen, diklofenak, naproxen og ketoprofen.

## Resultat og diskusjon

**Tabell 9: sjøvannsprøver, konsentrasjon i ng/1,1 l.**

	Adventfjorden 02.12.2008		Adventfjorden 25.03.2009		Ny-Ålesund 11.03.2009		Tromsø 15.04.2009
	Konsentrasjon ng/1,1 l	konsentrasjon tilsatt 100 ng/1,1l	Konsentrasjon ng/1,1 l	konsentrasjon tilsatt 50 ng/1,1 l	Konsentrasjon ng/1,1 l	konsentrasjon tilsatt 50 ng/1,1 l	Konsentrasjon ng/1,1 l
<b><u>ketoprofen</u></b>	Detekterbar	119,2	Detekterbar	44,4		44,9	Detekterbar
	Detekterbar	103	Detekterbar	49	Detekterbar	53,5	
	Detekterbar	104,4	Detekterbar	40,5	Detekterbar	51,1	
	Detekterbar	108,8		31		55,3	
Gj.snitt		108,85		41,23		51,2	
Std.avvik		7,33		7,65		4,54	
Rel.std.avvik		6,73		18,55		8,87	
<b><u>diklofenak</u></b>		114,4		97,2		65,2	Detekterbar
		103,2		174,4		73,7	
		91,6		89,9		81,2	
		113,2		64,3		66,1	
Gj.snitt		105,6		106,45		71,55	
Std.avvik		10,60		47,45		7,48	
Rel.std.avvik		10,04		44,57		10,45	
<b><u>naproxen</u></b>		108,2		48		61,2	Detekterbar
		97,6		48,1		70,6	
		98,2		52,1		69,5	
		112,2		70,3		62,1	
Gj.snitt		104,05		54,63		65,85	
Std.avvik		7,29		10,62		4,88	
Rel.std.avvik		7,01		19,44		7,41	
<b><u>ibuprofen</u></b>	Detekterbar	101,4		79,5		69,9	Detekterbar
	Detekterbar	98		66,9		58,2	
	Detekterbar	93,4		61		58,4	
		100,6		44,7		79,6	
Gj.snitt		98,35		63,03		66,53	
Std.avvik		3,61		14,45		10,29	
Rel.std.avvik		3,67		22,93		15,47	
<b><u>6-O-desmetylnaproxen</u></b>		7,4		28,9		54,3	
		9,4		43,7		52,1	
		8,4		165,5		58,4	
		8,6		22,8		33,1	
Gj.snitt		8,45		65,23		49,48	
Std.avvik		0,82		67,42		11,22	
Rel.std.avvik		9,73		103,36		22,68	

## Resultat og diskusjon

<b>dihydroketoprofen</b>	Detekterbar	176,8		28,6		49	
	Detekterbar	148,4		89,3		28,1	
	Detekterbar	113,4		124		49,8	
	Detekterbar	127		42,6		54,8	
Gj.snitt		141,4		71,13		45,43	
Std.avvik		27,65		43,77		11,83	
Rel.std.avvik		19,55		61,54		26,04	
<b>desmetylketoprofen</b>		124,6		49,1		37,4	
		98,4		47,7		59,9	
		87,2		71		55,1	
		97,2		36,4		42,1	
Gj.snitt		101,85		51,05		48,63	
Std.avvik		15,98		14,46		10,61	
Rel.std.avvik		15,69		28,33		21,82	

Det er tilsatt 100 ng/1,1 l av internstandard og NSAIDs i prøvene fra 02.12.08. Konsentrasjonene i disse prøvene er derfor doblet, ettersom det er tilsatt dobbelt så mye internstandard som i de andre prøvene. Det er ikke optimalt å gjøre det på denne måten, men prøvene fra desember 08 ble hentet og ekstrahert før man ekstraherte standardkurven, og bestemte at man kunne bruke 50 ng internstandard i resten av prøvene.

Selv om noen av analyttene er detekterbare, er det noen som bare så vidt kan detekteres med signal:støy ratio høyere enn 3:1. Det skal ikke mye variasjon i prøve eller ekstraksjon til, før analytten havner under den detekterbare grensen.

6-O-desmetylnaproxen er relativt ustabil i denne metoden. Dersom man ser på de prøvene fra desember i Longyearbyen er de tilsatt 100 ng/1,1 l NSAIDs, de fleste gir konsentrasjoner på rundt 50 ng/1,1 l, men 6-O-desmetylnaproxen bare har 4 ng/1,1 l. i neste sjøvannsprøve som er tilsatt 50 ng/1,1 l, er derimot gjennomsnittskonsentrasjonen for 6-O-desmetylnaproxen høyere enn for de andre stoffene. I sjøvannsprøven fra Ny-Ålesund er derimot gjennomsnittskonsentrasjonen ganske nært 50 ng/1,1 l, altså det som var tilsatt prøven. Hvorfor den gir så ulike verdier er uvisst, men sannsynligvis er den ikke alltid like stabil under ekstraksjonene.

De relative standardavvikene varierer fra 3,66 til 103, 36 %. Det er et nokså langt sprang mellom avvikene. Det høye avviket på 103 % er for 6-O-desmetylnaproxen, som tidligere nevnt var

ustabil i ekstraksjonene. Det er likevel større forskjell mellom avvikene i sjøvannsprøvene enn det var i avløpsvannprøvene.

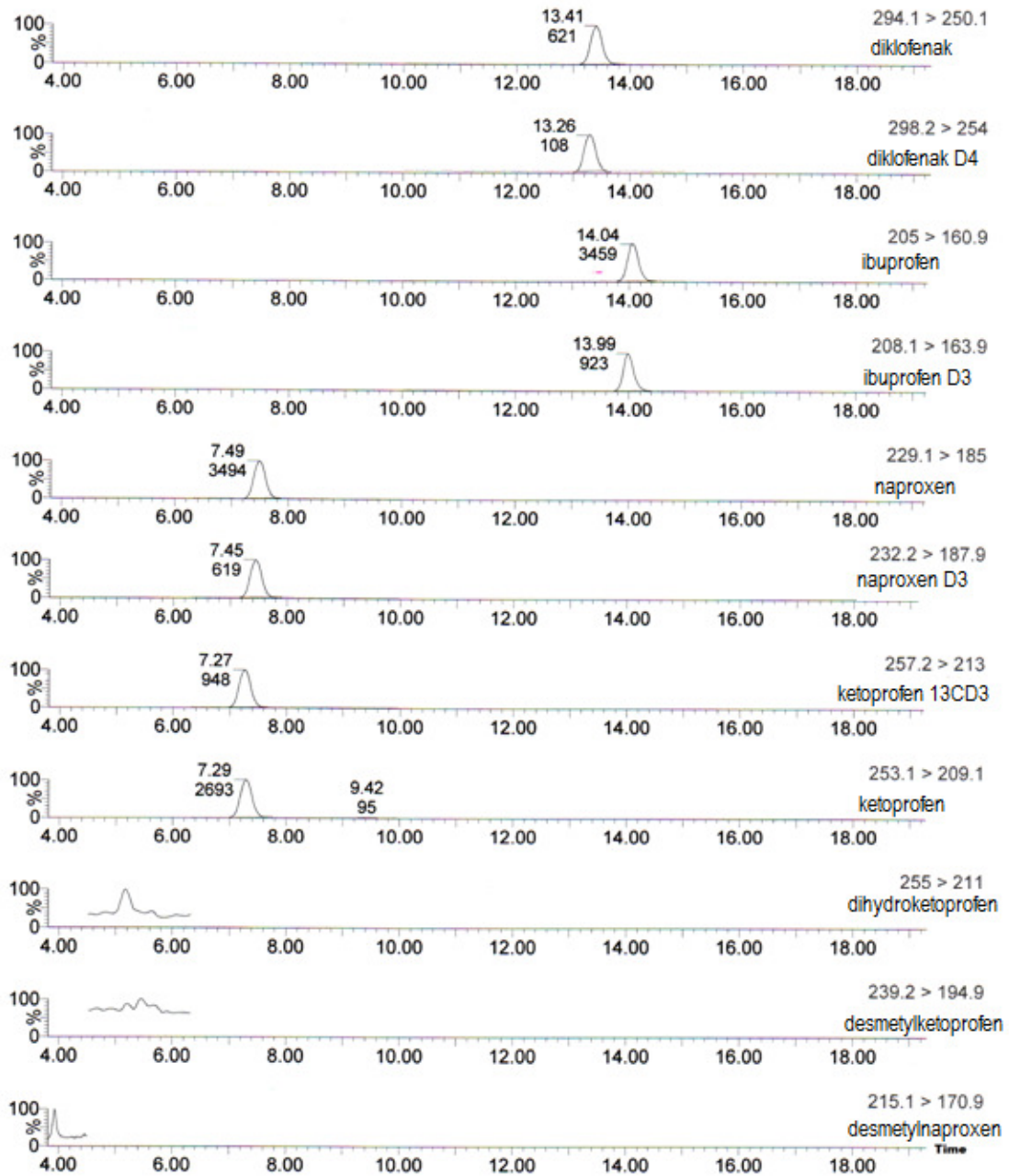
Desmetylketoprofen var ikke å finne i noen av prøvene. Dette er ikke så rart, ettersom det egentlig ikke er en metabolitt av ketoprofen, men derimot en urenheter. Det ble først konstatert etter at stoffene var bestilt inn, men det ble likevel valgt å analysere også denne forbindelsen for å sjekke om man likevel fant den. Dersom vi skulle finne noe av desmetylketoprofen, ville det være svært overraskende, og muligens et tegn på at metoden ikke fungerer som ønsket. Dersom desmetylketoprofen er et forurensningsprodukt som er i preparater med ketoprofen, vil det likevel være i så små mengder sammenlignet med metabolitter av utgangsstoffet ketoprofen, at det sannsynligvis ikke vil være påvisbart i miljøet uansett.

## **6.5 Resultat UV forsøk**

Til UV-forsøket ble det veid ut 100 µg tørrstoff, på en analysevekt, løst opp i 2 ml metanol, og fortynnet i sjøvann til 250 ng/ml. Sannsynligvis er det relativt store variasjoner mellom de ulike stoffene i løsningen ettersom det var en liten mengde å veie ut. Det vil sannsynligvis ikke påvirke forsøket i veldig stor grad, ettersom det er den samme løsningen som ble brukt til både referanseløsningen og til løsningen som skulle stå under UV-lys. og hensikten med forsøket var å teste hvorvidt analyttene brytes ned i UV-lys. Det er derfor ikke verdien av konsentrasjonene som er mest interessant, men tendensen til nedbryting.



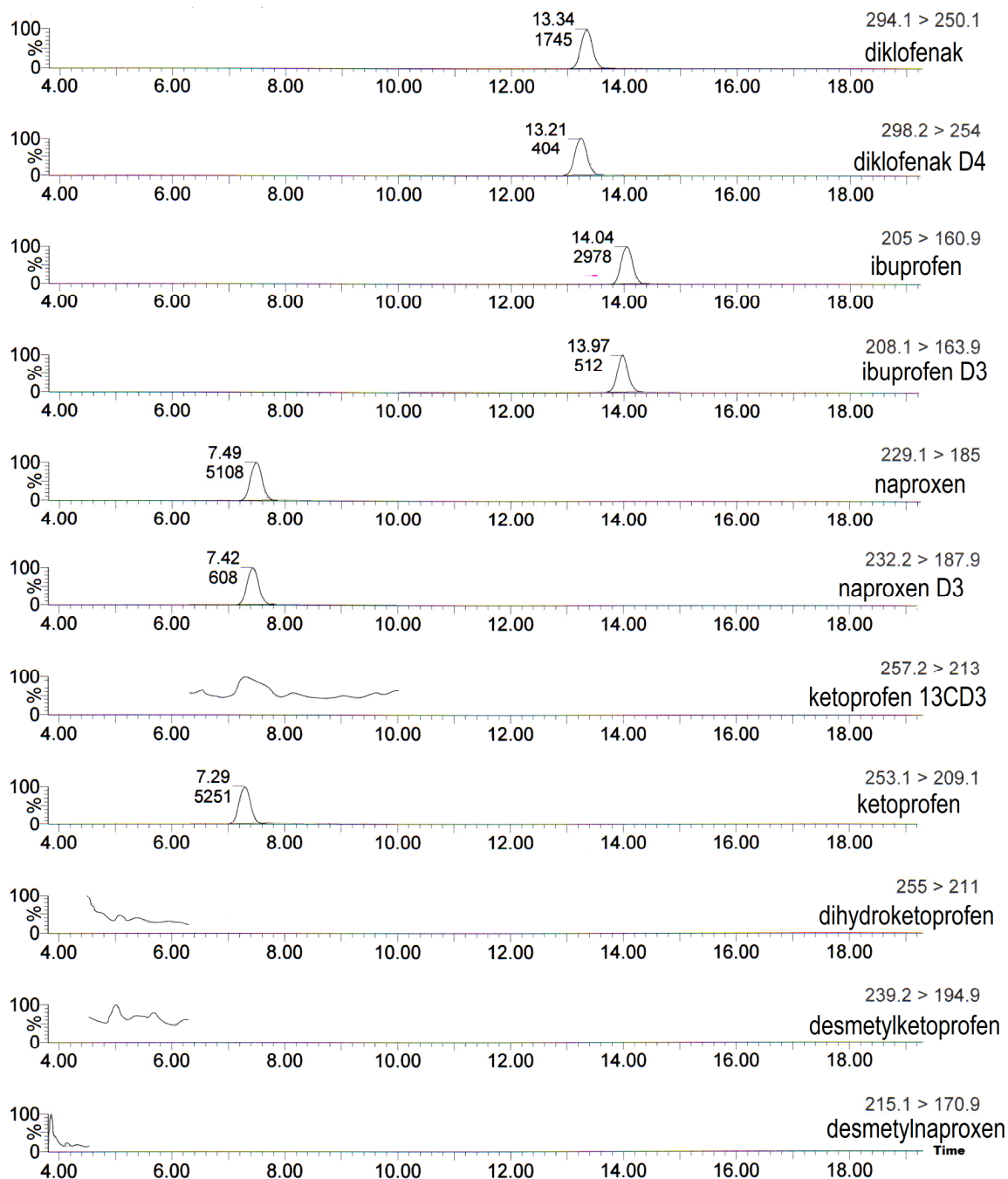
## Resultat og diskusjon



Figur 22: UV forsøk, referanseløsning dag 0

Figur 22 er fra den første dagen i UV-forsøket. Som forventet ses internstandardene, og de fire analyttene tilsatt løsningen, ibuprofen, ketoprofen, diklofenak og naproxen. Det er ikke noen av metodens metabolitter tilstede, selv om det kan se ut som om naproxen er der, er det ikke naproxen, men en annen forbindelse. Hva denne forbindelsen kan være er usikkert.

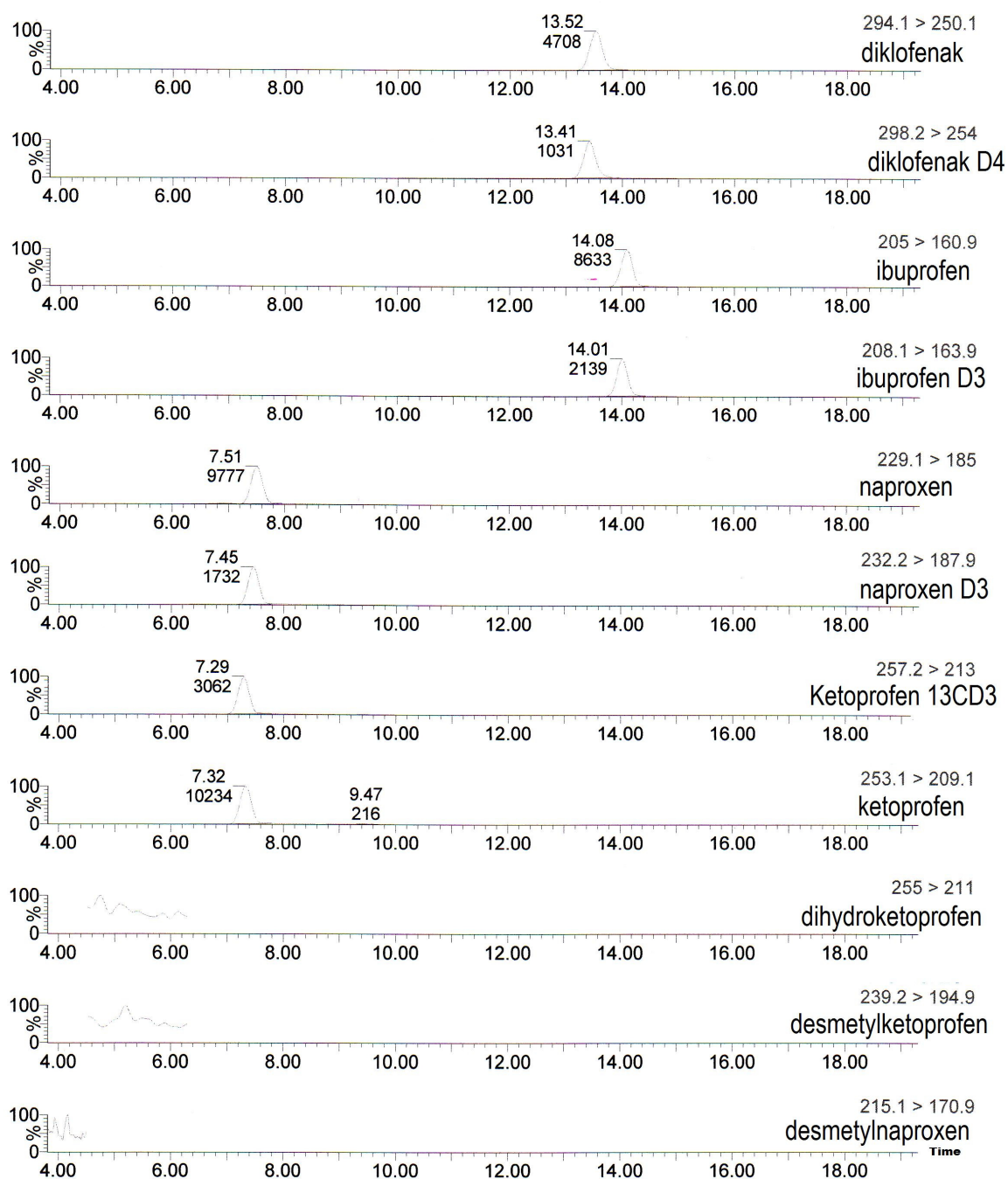
## Resultat og diskusjon



Figur 23: UV forsøk referanse dag 14

Referanseløsningen fra siste dag i UV-forsøket, figur 23, viser de samme analyttene som fra første dag, figur 22. Arealene varierer noe fra dag 0, trolig som følge av variasjoner mellom ekstraksjonene. Det var også noe variasjon mellom de 3 parallellene som ble ekstrahert daglig, noe som kan ses på standardavvikene til analyttene i stolpediagrammene.

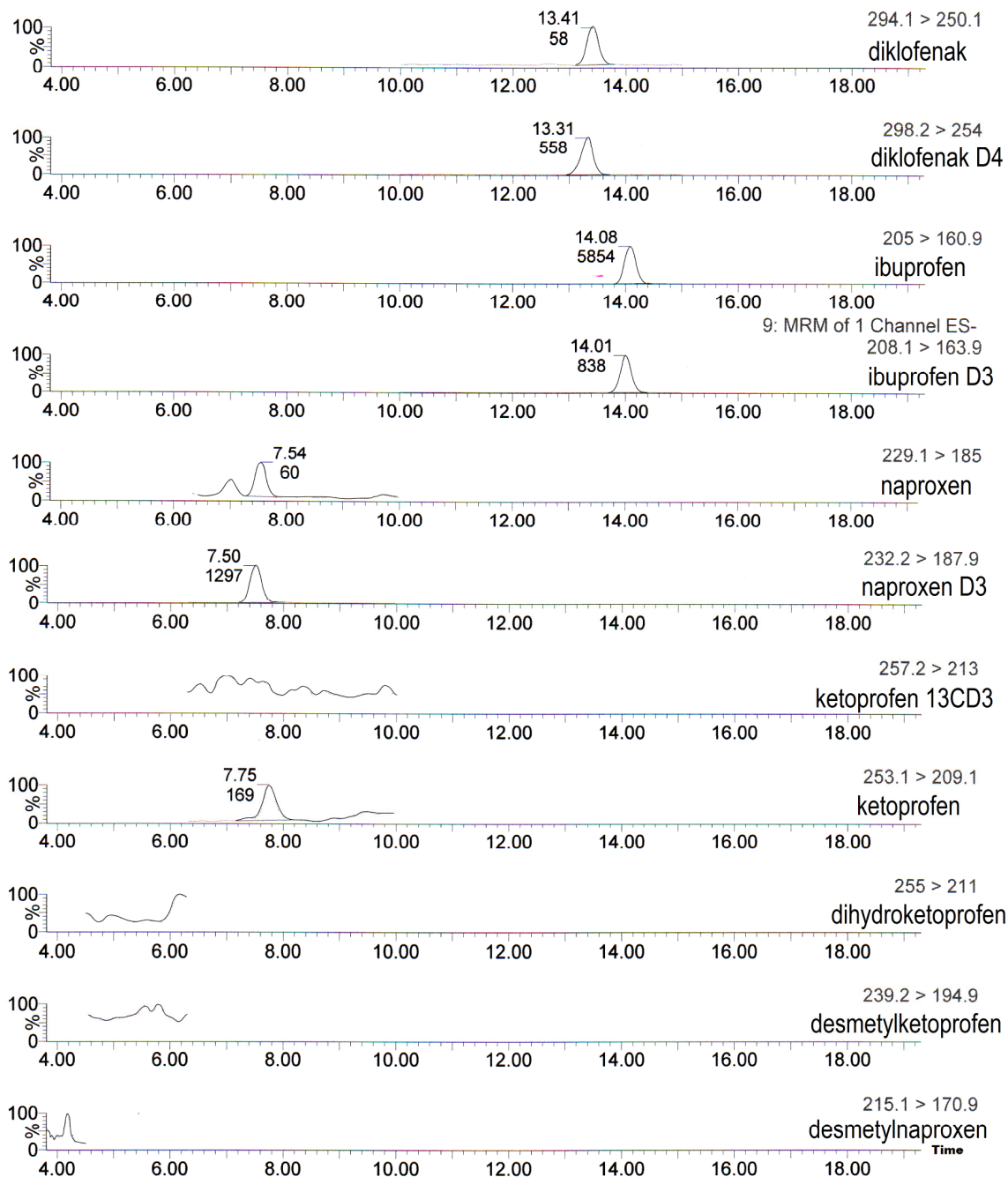
## Resultat og diskusjon



Figur 24: UV forsøk dag 0

Resultater fra første dag til løsningen som skal stå i UV-lys, figur 24, viser stort sett et samme som det referanseløsningen gjør første dag, figur 22 ettersom begge løsningene foreløpig er behandlet likt. Det vises ingen metabolitter, men de resterende analyttene og internstandardene er der.

## Resultat og diskusjon

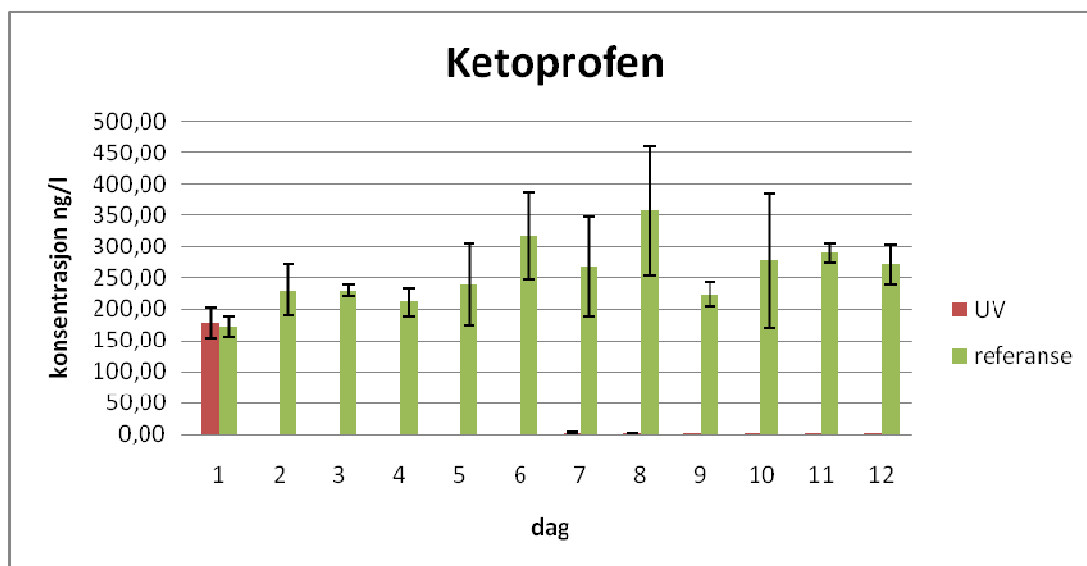


Figur 25: UV forsøk dag 14

Kromatogrammet (figur 25) fra den siste dagen av forsøket, viser at internstandardene holder seg stabile i areal, mens både diklofenak, naproxen og ketoprofen har redusert sine areal. Det kan

tyde på at de har blitt brutt ned under UV-lyset. Ibuprofen derimot har fremdeles en relativt høy topp, og ser ut til å være mer stabil i UV-lys enn de andre forbindelsene.

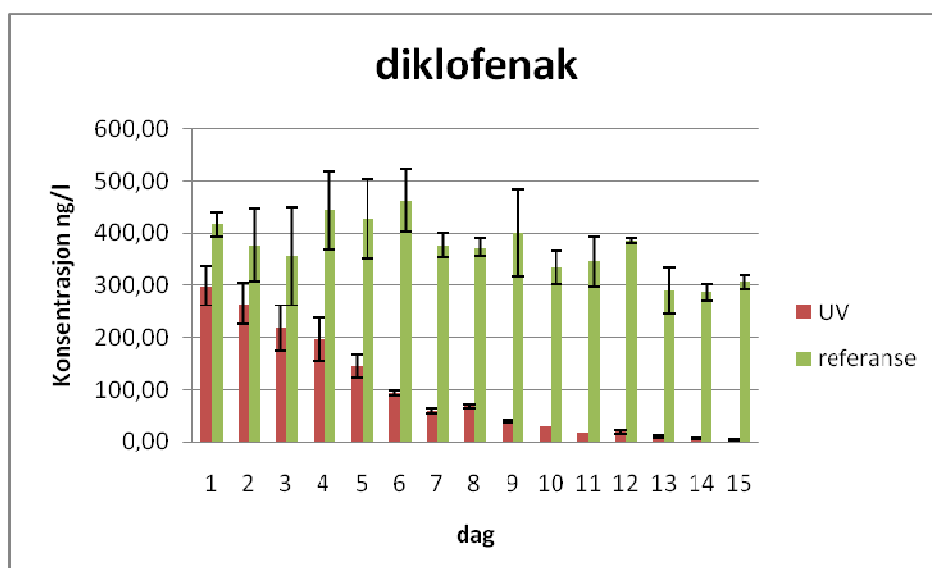
I figur 25 mangler internstandard for ketoprofen, det var en konsekvens av en logistisk misforståelse. Forsøket ble utført i Longyearbyen, men standardløsningene som ble brakt med fra Tromsø, ble brukt opp tidligere enn beregnet, og da man fikk ettersendt mer. En misforståelse førte til at ketoprofen<sup>13</sup>CD<sub>3</sub> ikke kom med. Derfor er data for de forbindelsene som har denne som internstandard ekskludert fra forsøket fra dag 13 og utover. Ettersom ketoprofen er nedbrutt etter den første dagen er ikke dette et problem.



Figur 26: Resultat UV forsøk, nedbrytning av ketoprofen i løpet av 12 dager.

Ketoprofen er stort sett borte i løpet av den første dagen se figur 26. Ketoprofen inneholder et keton mellom to aromatiske ringer, noe som kan bidra til å bryte ned molekylet fotolytisk som forklart i teoridelen.

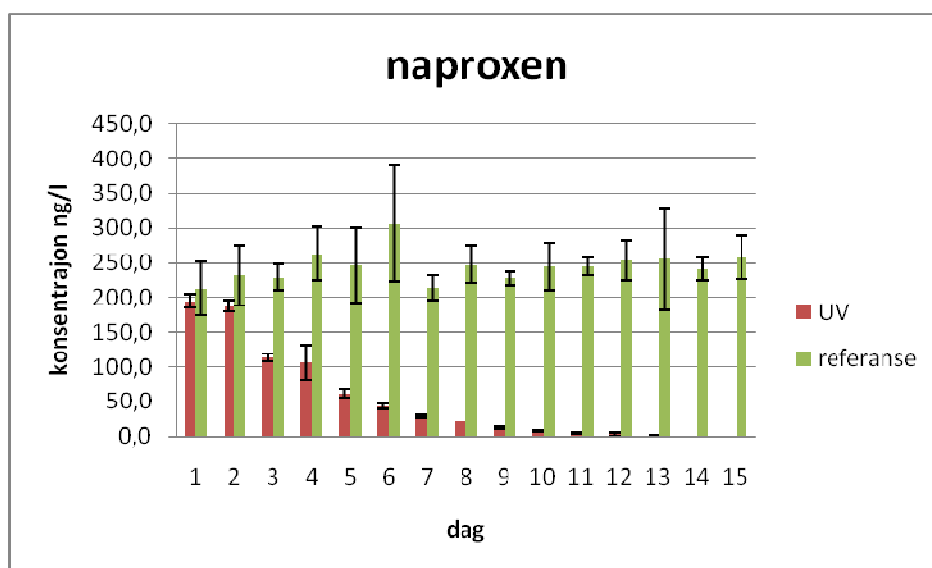
Referanseløsningen varierer en del i konsentrasjon gjennom forsøket som vist i figur 26, det er interessant at det ser ut som om den øker underveis, noe som ikke er mulig. Variasjoner mellom ulike ekstraksjoner kan være en forklaring, dette ses også gjennom relativt høyt standardavvik for noen av prøvene.



Figur 27: Resultat UV forsøk, nedbryting av diklofenak over 15 dager

Diklofenak inneholder både N-H, R-COOH, og to Cl-ioner. Det gjør dette molekylet lett nedbrytbart, selv om det ser ut til at det går noen dager før det forsvinner.

Det er relativ stor forskjell mellom referanseløsningen, og den som skal settes i under UV-lys på den første dagen se figur 27. Det er ikke helt forventet ettersom begge to kommer fra samme løsning, og er til det tidspunktet behandlet likt. Men referanseløsningen ser ut til å gi høye topper under hele forsøket, selv om det kan se ut til å være en liten nedgang på slutten. Likevel er det tydelige forskjeller på de to løsningene, og en markant nedgang av analytt i løsningen som stod under UV-lampen under forsøket.

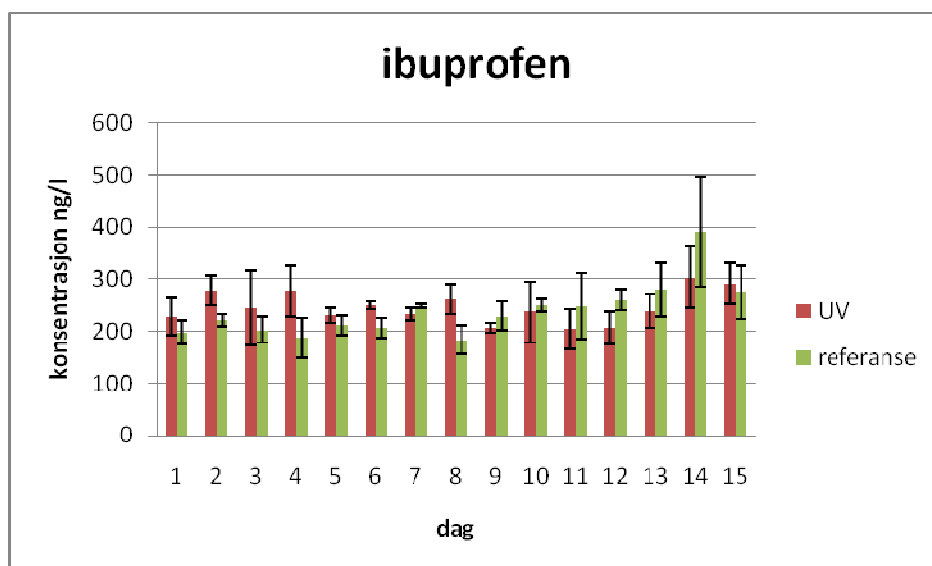


Figur 28: Resultater UV-forsøk, nedbrytning av naproxen i løpet av 15 dager

Naproxen brytes gradvis ned som vist i figur 28.

Referanseløsningen holder seg relativt jevn, mens naproxen tydelig brytes ned under UV- lyset.

Som det ses i figur 22, fra den siste dagen i UV-forsøket, er det en liten topp for naproxen. Den kan detekteres, men er for liten til å kvantifiseres.



Figur 29: Resultater UV forsøk, nedbrytning av ibuprofen i løpet av 15 dager

Ibuprofen holder seg på et relativt stabilt nivå gjennom hele forsøksperioden. Det er som forventet ut fra resultater fra tidligere forskning nevnt i teoridelen. Både referanseløsningen og UV-løsningen ser ut til å holde seg på samme nivå hele tiden.

De utvalgte metabolitter av naproxen, ketoprofen, ibuprofen og diklofenak kunne ikke kvantifiseres i dette forsøket, noe som tyder på at de sannsynligvis ikke dannes under UV-nedbrytning av utgangsstoffene, men at det i stedet dannes andre stoffer.

Lampen som ble benyttet til dette forsøket, sendte ut lys på 340 nm. Ibuprofen har lavest absorpsjonsmaksimum av stoffene, på 223 nm, og ble ikke brutt ned. Legemidlene med høyere absorpsjonsmaksimum ble alle brutt ned, og var ikke lenger kvantifiserbar den siste dagen av forsøket.

I de forsøk nevnt i teoridelen ble analyttene brutt raskere ned enn i dette forsøket. Det kan ha sammenheng med at det vanligvis utføres UV-forsøk ved 20 °C, mens i dette forsøket var temperaturen 4 °C. Det ser ut til at det brytes saktere ned ved kjøligere temperaturer, men det kan ikke sies sikkert før man har gjort tester under samme forhold og med likt utstyr.

## 6.6 Internstandard

Det ble valgt deutererte forbindelser av analyttene som internstandarder, ettersom de skal oppføre seg mest mulig likt som analyttene i matrix og under ekstraksjonsprosessen. Alle analytter og internstandarder ble oppbevart i metanol i fryser under hele prosjektperioden. Dersom de deuterte protonene byttes ut med hydrogen, vil de gi signal på samme retensjonstid som analytten siden de får samme molekylmasse. For å teste ut dette ble det kjørt en ekstraksjon med internstandarder i milliporevann. Det viste seg å ikke bare gi topper for internstandardene, men også for de opprinnelige stoffene, selv om arealet av toppen var liten sammenlignet med arealet for internstandardtoppen. Igjen dukket det opp en stor topp på naproxen, som ikke var naproxen. Både naproxen, ibuprofen, og ketoprofen ga små topper i dette forsøket. Det kan tyde på at internstandardene mistet noe av de deutererte protonene under lagring, og samtidig kunne det ha gitt høyere topper for analyttene enn det som faktisk var tilfellet, ettersom det kom signal for analytt som egentlig stammet fra internstandard. Alternativt kunne alle tre paralleller blitt kontaminert med legemidler, men da burde de andre analyttene også gitt topper. For å ha kontroll



over et slikt problem, burde det vært kjørt ekstraherte tester av internstandarden under hele forsøket, og ikke bare helt på slutten for å kontrollere om og når internstandardene ble brutt ned. Med en slik internstandard var det samtidig vanskelig å utføre blanke prøver for metoden, ettersom nedbryting av internstandard kunne oppleves som kontaminering av prøver, og omvendt, en eventuell kontaminering kunne tolkes som nedbrytning av internstandard. For å kontrollere om denne nedbrytningen av internstandard har hatt betydning for resultatene av prøvene ble det sammenlignet hvor mye arealet av analyttene utgjorde i forhold til internstandard i testen av internstandard, og hvor stor del av arealet til analytter i reelle prøver ville være. Det viste seg å utgjøre en svært liten del av arealet, og følgelig så liten del av konsentrasjonen av stoffet, at det ble valgt å se bort fra toppene av analytt som dukket opp i kromatogrammet for internstandardene.

## 6.7 Feilkilder

Metoden ble utviklet i Tromsø, men mange av ekstraksjonene ble gjort i Longyearbyen. Det forutsetter at metoden har relativt god repeterbarhet. Selv om det meste av utstyret ble tatt med fra Tromsø til Longyearbyen, var det en del som ikke kunne tas med. Bl.a. magnetrørerne var forskjellige. I Tromsø ble de satt på omtrent 800 rpm, men ettersom det var en annen type magnetrørere på laboratoriet i Longyearbyen måtte man sette på en hastighet som ga omtrent samme bevegelse i flasken. Det kan dermed ikke utelukkes at ekstraksjonene kan ha blitt påvirket av ulik omrøringshastighet. Det er usikkert hvorvidt det kan ha betydning for ekstraksjonen.

Det ble heller ikke tatt tid med klokke når man dyppet fibret i organisk fase, men telt til ti av operatøren mens fibret var i den organiske fasen, omtrent 10 sekunder. Selv om det ble gjort av samme operatør hele veien, kan det også gi rom for forskjeller mellom ekstraksjonene. Samtidig kan det også ha blitt forskjeller da overskuddet av organisk fase ble fjernet i ultralydbad. Intensiteten og varigheten kan ha variert mellom de ulike fibre, da det ikke var noen standardisert metode for å fjerne overskuddet. Ultralydbadene som ble brukt i Longyearbyen og i Tromsø er også forskjellige, og kan resultere i forskjeller i tillaging av fiber og ekstraksjon. Det arbeides med små volum, og arbeidet med fibre gjøres for hånd, slik at muligheten for at det skjer feil er tilstede.

Dersom metoden kunne automatiseres, kunne man redusert de ovennevnte problemer.

Selv om det benyttes en internstandard som oppfører seg veldig likt originalen, kan man likevel ikke utelukke eventuelle forstyrrelser fra matrix, ettersom forbindelsene ikke har vært gjennom samme prosess. Analytten har sannsynligvis vært gjennom metabolismer i kroppen, hvis den ikke har havnet direkte i miljøet uten å gå via en vert. I både avløpsvann og sjøvann kan det skje reaksjoner man ikke kan ha fullstendig kontroll på, siden det er vanskelig å vite nøyaktig hva prøvene inneholder. Dermed er det mulig at internstandard og analytt kan binde seg til elementer i prøvene på ulik måte. Analytten har også hatt lengre tid på seg til å vekselvirke med matrix, mens internstandarder tilsettes like før ekstraksjonen, og dermed kan oppføre seg annerledes enn analytten.

En mulig feilkilde kan være prosessen med å dampe ned akseptorfase for deretter å reoppløse i vann med syre. Veggene i vialen ble også skylt, for å få med seg analytt festet på glassveggen. Likevel kan man ikke utelukke tap av forbindelse i løsningen. I noen tilfeller hang det fast dråper øverst i vialen som var vanskelig å få ned i bunnen av vialen, og der kan også analytter sitte igjen. Dersom forbindelsene i tillegg adsorberer til glassveggen i vialen, kan det også gi feil konsentrasjon i prøven til slutt. I mange av prøvene tilsatt legemidler ble det gjenfunnet omtrent lik konsentrasjon som ble tilsatt, noe som kan tyde på at det ikke ser ut til å være et problem med adsorpsjon til glass. De prøvene som var tilsatt legemidler og ga varierende verdier kan komme av variasjoner i ekstraksjoner, eller for eksempel at det har blitt igjen litt av prøven i vialen som ikke har blitt reoppløst.

I begynnelsen gikk det mye tid med til å innøve metoden, ofte var fibrene helt tomme etter ekstraksjon. Årsaken til hvorfor dette skjedde er ikke lett å si, men problemet løste seg da metalltråden som brukes til å lukke fibrene før ekstraksjon, ble byttet ut med en annen type som var litt tykkere. Muligens ble den tynneste tråden så skarp at den punkterte fibret, men dette vites ikke sikkert. Den tynneste tråden hadde en diameter på 0,14 mm, mens tråden som ble benyttet videre var 0,18 mm.

Ettersom sjø- og avløpsvannprøvene ble filtrert, kan man risikere å fjerne forbindelser som adsorberer på partikler større enn 1,2 µm. Dersom noen av analyttene adsorberer til partikler i avløpsvann eller sjøvann vil man sannsynligvis miste en del ved filtrering.

Det ble ikke testet blanker med hensyn på å finne ut hvorvidt pumpen eller tilhørende slange kan kontaminere prøvene. Det er lite sannsynlig at eventuell kontaminasjon kan stamme fra andre steder enn tidligere prøveinnsamlinger. Slangen og pumpen ble ikke skylt med løsemiddel før innsamling av prøver, ettersom det ikke ville vært hensiktsmessig, og heller ikke økonomisk gjennomførbart. For å begrense eventuell kontaminasjon, ble pumpe og slange skylt med varmt ferskvann etter bruk, og ved prøveinnsamling ble det pumpet gjennom sjøvann før fylling av kanner av prøvene som ble samlet inn på Svalbard.

Kannene ble gjenbrukt fra tidligere innsamling av sjøvann, og det kan ikke utelukkes at eventuelt adsorberte analytter kan kontaminere påfølgende prøver. Kannene ble vasket med varmt vann og såpe etter innsamling av prøver for å redusere kontamineringsrisiko ved senere bruk. Til avløpsvannprøvene, ble det brukt glassflasker, som bare ble benyttet til det formålet for å unngå kontaminering av andre prøver.

Prøvene fra Ny-Ålesund ble lagret noen dager før de ble tatt tilbake til Longyearbyen og fordelt i mindre flasker og tilsatt syre. Dermed kan det ikke utelukkes eventuell mikrobiologisk aktivitet som kan ha brutt ned analyttene. Ettersom analyttene foreligger på ionisert form ved nøytral pH, ble det ikke tilsatt syre til prøvene, for å unngå at analyttene skulle adsorbere til kannene. For å unngå nedbrytning av analyttene i lys, ble de lagret i zargesbokser (lystette kasser) helt frem til de ble tilsatt syre og ekstrahert.

Fibrene som ble benyttet var relativt sprø, ettersom de kom fra en pose som hadde ligget åpen, sannsynligvis over lengre tid. Det er mulig at fibrets egenskaper kan påvirkes av endringen i konsistensen, men det kan ikke sies sikkert om det har hatt noen betydning for ekstraksjonene.

## 7. Konklusjon

Det ble utviklet en metode for å påvise ikke-steroid antiinflammatoriske legemidler med enkelte metabolitter i sjø- og avløpsvann. Metodens linearitet var relativt god, men ikke optimal, 3 av analyttene hadde  $r^2 = 0,99$ , mens de øvrige hadde noe lavere. Lineariteten var noe lavere for den neste standardkurven som ble ekstrahert, der ingen av analyttene hadde regresjonskoeffisienter større enn 0,98, noe som likevel ble vurdert til å være akseptabel. En av de undersøkte analyttene, 4-hydroxy-diklofenak, ble tatt ut av metoden på grunn av uakseptabel regresjonskoeffisient = 0,77. Metodens recovery ble ikke testet, dels på grunn av tidsmangel, og dels på grunn av at passende recoverystandard ikke var tilgjengelig. LOD og LOQ ble beregnet, og lå mellom 15-69 ng/1,1 l for LOD og 45-230 ng/1,1 l for LOQ for de ulike analyttene.

Ved hjelp av LPME og ULPC-MS/MS ble det påvist ketoprofen, naproxen, ibuprofen og 6-O-desmetylnaproxen i avløpsprøver fra Svalbard, og det ble påvist ketoprofen, diklofenak, naproxen, ibuprofen og 6-O-desmetylnaproxen i avløpsprøver fra Tromsø. Ketoprofen ble også påvist i alle sjøvannsprøvene som ble tatt i Adventfjorden, i Ny-Ålesund og i Tromsø. I sjøvannsprøvene fra Adventfjorden 02.12.08, ble det i tillegg til ketoprofen påvist ibuprofen og dihydroketoprofen. I sjøvannsprøvene fra Tromsø 15.04.09 ble det påvist både diklofenak, ibuprofen og naproxen i tillegg til ketoprofen. Merk at ingen av de påviste stoffene i sjøvannsprøvene var kvantifiserbare.

UV-forsøket ble utført med en løsning under UV-lampe, og en kontroll i mørke i kjøleskap, begge under relativt like temperaturer. Ibuprofen ble ikke brutt ned, mens både ketoprofen, naproxen og diklofenak fotodegraderte i løsningen som sto under UV-lampen. Det ble ikke påvist noen av de metabolittene som var undersøkt, noe som tyder på at analyttene ikke ble brutt ned til de aktuelle metabolittene som ble undersøkt.

## 8. Referanser

1. Comeau, F., et al., *The occurrence of acidic drugs and caffeine in sewage effluents and receiving waters from three coastal watersheds in Atlantic Canada*. Science of the total environment, 2008.
2. Letzel, M., G. Metzner, and T. Letzel, *Exposure assessment of the pharmaceutical diclofenac based on long-term measurements of the aquatic input*. Environment International, 2009.
3. Fent, K., A. Weston, and D. Caminada, *Ecotoxicology of human pharmaceuticals*. Aquatic Toxicology, 2006. **76**.
4. Persson, M., E. Sabelström, and B. Gunnarsson, *Handling of unused prescription drugs — knowledge, behaviour and attitude among Swedish people*. Environment International, 2008.
5. Kümmerer, K., *Pharmaceuticals in the environment*. 2008, Springer-Verlag: Berlin Heidelberg. p. 61-62.
6. Vasskog, T., *Occurrence of selected antidepressants in the Norwegian environment*. 2009.
7. Zorita, S., T. Barri, and L. Mathiasson, *A novel hollow-fibre microporous membrane liquid-liquid extraction for determination of free 4-isobutylacetophenone concentration at ultra trace level in environmental aqueous samples*. Journal of Chromatography A, 2007. **1157**: p. 30-37.
8. Rogers, I.H., I.K. Birtwell, and G.M. Kruznyski, *Organic extractables in municipal wastewater of Vancouver, British Colombia*. Water Pollut. Res. J. Can, 1986. **21**: p. 187-204.
9. Brown, J., et al., *Variations in bioconcentration of human pharmaceuticals from sewage effluents into fish blood plasma*. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2007.
10. Folkehelseinstituttet. *Legemiddelforbruket i Norge*. Available from: <http://www.legemiddelforbruk.no/>.
11. Buser, H.R., T. Poiger, and M. Müller, *Occurrence and Fate of the Pharmaceutical Drug Diclofenac in Surface Waters: Rapid Photodegradation in a Lake*. Environment Science and Technology, 1998. **32 (22)**: p. 3449-3456.
12. 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.
13. Gielen, G.J.H.P., et al., *Factors impacting on pharmaceutical leaching following sewage application to land*. Chemosphere, 2009.
14. Oaks, J.L., et al., *Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan*. Nature, 2004. **427(6975)**: p. 630-633.
15. Sebo, A., et al., *Identification and quantification of ibuprofen, naproxen, ketoprofen and diclofenac present in waste-waters, as their trimethylsilyl derivatives, by gas chromatography mass spectrometry*. Talanta, 2008.
16. Schwaiger, J., et al., *Toxic effects of the non-steroidal anti-inflammatory drug diclofenac Part I: histopathological alterations and bioaccumulation in rainbow trout*. Aquatic Toxicology, 2004. **68**: p. 141-150.
17. Hoeger, B., et al., *Water-borne diclofenac affects kidney and gill integrity and selected immune parameters in brown trout (salmo trutta f.fario)*. Aquatic Toxicology, 2005. **75**: p. 53-64.

18. Gravel, A. and M.M. Vijayan, *Non-steroidal-antiinflammatory drugs disrupt the heat shock response in rainbow trout*. Aquatic Toxicology, 2007. **81**(197-206).
19. Cleuvers, M., *Mixture toxicity of the anti-inflammatory drugs diclofenac, ibuprofen, naproxen and acetylsalicylic acid*. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004. **59**: p. 309-315.
20. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Legemiddelanalyse*. 2004, [Bergen]: Fagbokforl.
21. Waters, *Acquity uplc system application notebook*. 2008
22. Ashcroft, A.E., *Ionization Methods in Organic Mass Spectrometry*, N. Barnett, Editor. 1997, The Royal Society of Chemistry: Leeds. p. 19.
23. Vane, J.R. and R.M. Botting, *Mechanism of action of antiinflammatory drugs*. . Int. J. Tissue React. , 1998. **20 (1)**: p. 3-15.
24. Bendz, D., et al., *Occurrence and fate of pharmaceutically active compounds in the environment, a case study: Höje River in Sweden*. Journal of Hazardous Materials, 2005. **122**(3): p. 195-204.
25. Legemiddelverket. *Preparatomtale ibuprofen*. 2008; Available from: [http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_80333.aspx](http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx).
26. Caviglioli, G., et al., *Identification of degradation products of ibuprofen arising from oxidative and thermal treatments*. Journal of Chromatography A, 2002. **30**(3): p. 499.
27. Legemiddelverket. *Preparatomtale ketoprofen*. 2007; Available from: [http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_80333.aspx](http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx).
28. Legemiddelverket. *Preparatomtale diklofenak*. 2008; Available from: [http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_80333.aspx](http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx).
29. Legemiddelverket. *Preparatomtale naproxen*. 2008; Available from: [http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch\\_80333.aspx](http://www.legemiddelverket.no/custom/Preparatsok/prepSearch_80333.aspx).
30. Isidori, M., et al., *Ecotoxicity of naproxen and its phototransformation products*. Science of the total environment, 2005. **348**(1-3): p. 93-101.
31. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Liquid phase microextraction with porous hollow fibers, a miniaturized and highly flexible format for liquid-liquid extraction*. Journal of Chromatography A, 2008. **1184**: p. 132-142.
32. Lee, J., et al., *Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **624**: p. 253-268.
33. Pedersen-Bjergaard, S. and K.E. Rasmussen, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes New concept for rapid sample preparation of biological fluids*. Journal of Chromatography A, 2006. **1109**: p. 183-190.
34. Balchen, M., et al., *Electrokinetic migration of acidic drugs across a supported liquid membrane*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**(1-2): p. 220-225.
35. Lee, J., et al., *Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane liquid-phase microextraction: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. **624**(2): p. 253-268.

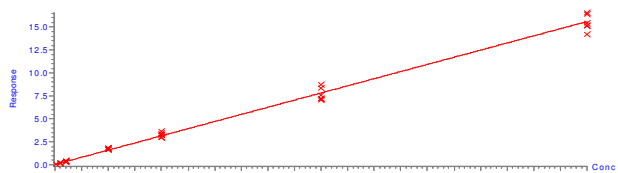
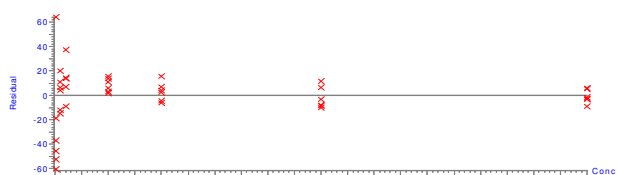
36. Gjelstad, A., K.E. Rasmussen, and S. Pedersen-Bjergaard, *Electrokinetic migration across artificial liquid membranes: Tuning the membrane chemistry to different types of drug substances*. Journal of Chromatography A, 2006. **1124**(1-2): p. 29-34.
37. Quintana, J.e.B., R. Rodil, and T. Reemtsma, *Suitability of hollow fibre liquid-phase microextraction for the determination of acidic pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry without matrix effects*. Journal of Chromatography A, 2004. **1061**.
38. Wu, J. and H.K. Lee, *Orthogonal array designs for the optimization of liquid–liquid–liquid microextraction of nonsteroidal anti-inflammatory drugs combined with high-performance liquid chromatography-ultraviolet detection*. Journal of Chromatography A, 2004. **1092**.
39. Mendez-Arriaga, F., S. Esplugas, and J. Gimenez, *Photocatalytic degradation of non-steroidal anti-inflammatory drugs with TiO<sub>2</sub> and simulated solar irradiation*. Water research, 2008. **42**: p. 588.
40. Packer, J.L., et al., *Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibric acid, and ibuprofen*. Aquatic Sciences, 2003. **65**: p. 342-351.
41. Kim, I. and H. Tanaka, *Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment*. Environment International 2009: p. 793-802.
42. *European Pharmacopea 6.4, Ketoprofen*. 2008; Available from: [http://online6.edqm.eu/ep604/#doc\\_2\\_of\\_31](http://online6.edqm.eu/ep604/#doc_2_of_31).
43. *UV definitions and terminology*. Available from: <http://www.americanairandwater.com/uv-definitions/index.htm>.
44. Lippestad, H. *Meteorologisk institutt, ozonlaget*. Available from: <http://met.no/?module=Articles;action=Article.publicShow;ID=774>.
45. Cruz-Vera, M., et al., *Ionic liquid-based dynamic liquid-phase microextraction: Application to the determination of anti-inflammatory drugs in urine samples*. Journal of Chromatography A 2008.
46. Ho, T.S., et al., *25,000-fold pre-concentration in a single step with liquid-phase microextraction*. Analytica Chimica Acta, 2007. **592**(1): p. 1-8.
47. Wen, X., C. Tu, and H.K. Lee, *Two-step Liquid-Liquid-Liquid Microextraction of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs in Wastewater*. Analytical Chemistry, 2004. **76**: p. 230.
48. Oehme, M., *Quality control in organic trace analysis, in Principals and practical aspects of quality assurance, lecture from University Centre in Svalbard* 2007.
49. 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.

## 9. Vedlegg

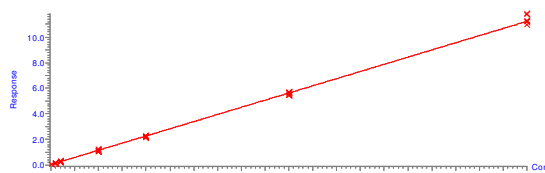
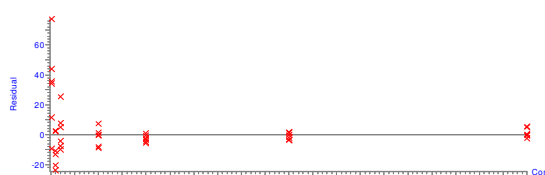
### 9.1 Standardkurver

#### 9.1.1 Standardkurver fra desember 2008

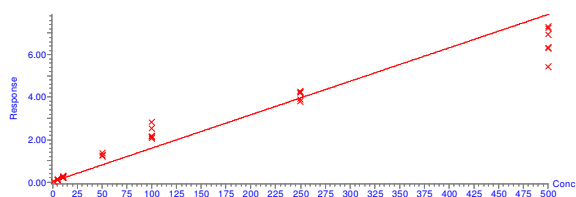
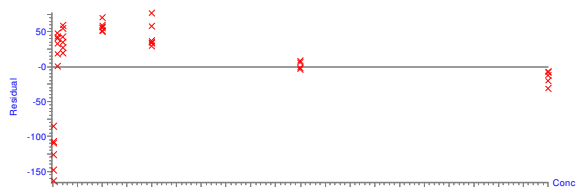
Compound name: naproxen  
 Correlation coefficient:  $r = 0.997220$ ,  $r^2 = 0.994447$   
 Calibration curve:  $0.0310885 \cdot x + 0.0545073$   
 Response type: Internal Std ( Ref 8 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighing: 1/x, Axis trans: None



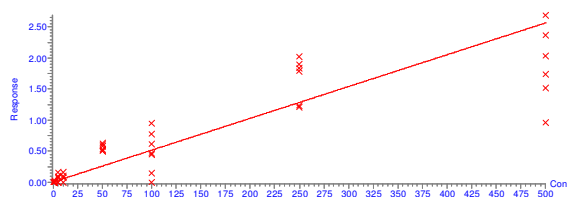
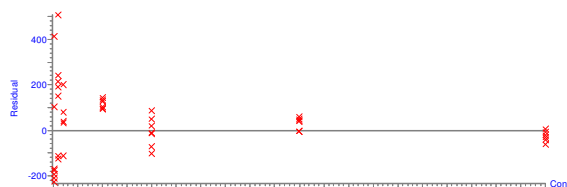
Compound name: Ibuprofen  
 Correlation coefficient:  $r = 0.999085$ ,  $r^2 = 0.998190$   
 Calibration curve:  $0.0224103 \cdot x + 0.0270261$   
 Response type: Internal Std ( Ref 5 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighing: 1/x, Axis trans: None



Compound name: diklofenak  
 Correlation coefficient:  $r = 0.966524$ ,  $r^2 = 0.934168$   
 Calibration curve:  $0.0157039 \cdot x + 0.0322619$   
 Response type: Internal Std ( Ref 4 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighing: 1/x, Axis trans: None



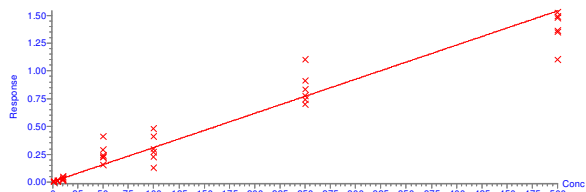
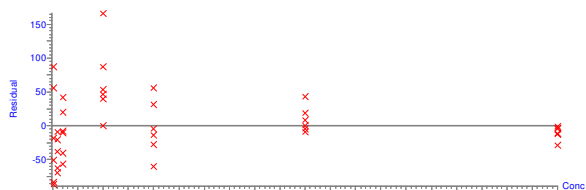
Compound name: diklOH  
 Correlation coefficient:  $r = 0.877646$ ,  $r^2 = 0.770263$   
 Calibration curve:  $0.00511784 \cdot x + 0.00652236$   
 Response type: Internal Std ( Ref 4 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighing: 1/x, Axis trans: None



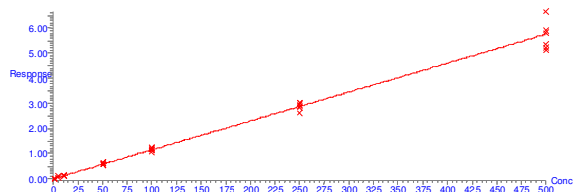
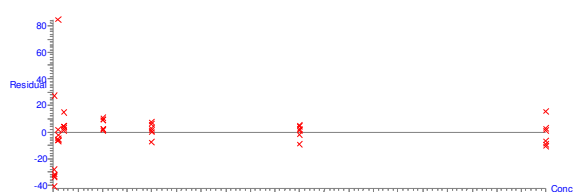


# Vedlegg

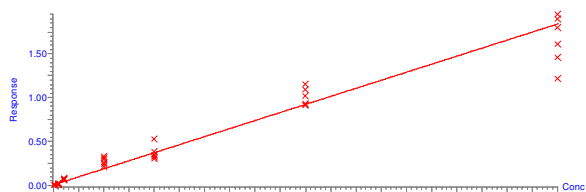
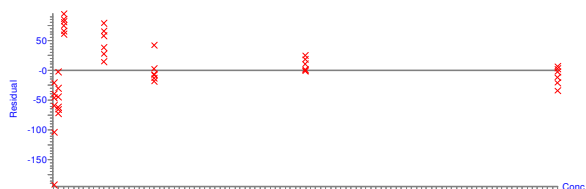
Compound name: desmetylnaproxen  
Correlation coefficient:  $r = 0.961819$ ,  $r^2 = 0.925095$   
Calibration curve:  $0.00307308 \cdot x + 0.0029442$   
Response type: Internal Std ( Ref 8 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



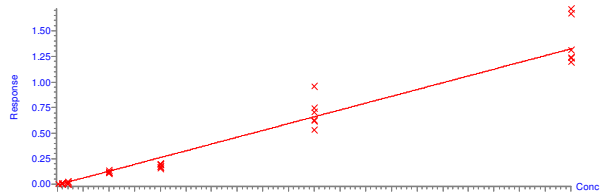
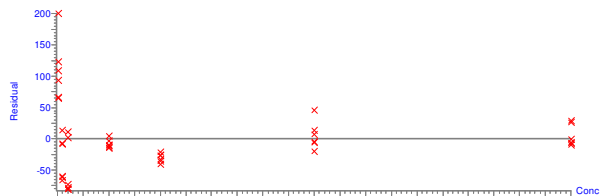
Compound name: ketoprofen  
Correlation coefficient:  $r = 0.996537$ ,  $r^2 = 0.993086$   
Calibration curve:  $0.0114937 \cdot x + 0.00560948$   
Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: dihydroketoprofen  
Correlation coefficient:  $r = 0.975177$ ,  $r^2 = 0.950971$   
Calibration curve:  $0.00366948 \cdot x + 0.00575343$   
Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

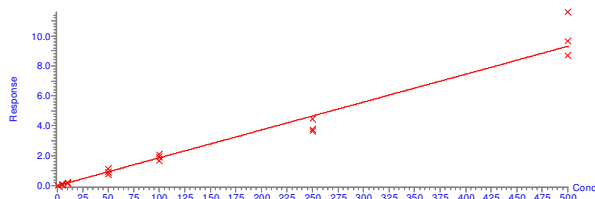
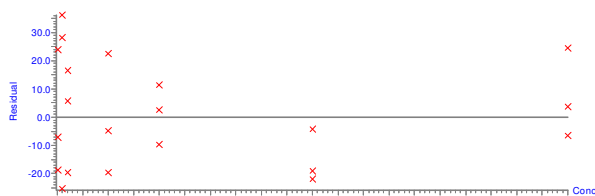


Compound name: desmetylketoprofen  
Correlation coefficient:  $r = 0.976835$ ,  $r^2 = 0.954206$   
Calibration curve:  $0.00265663 \cdot x + 0.00405181$   
Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

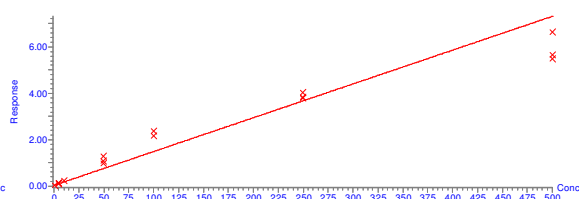
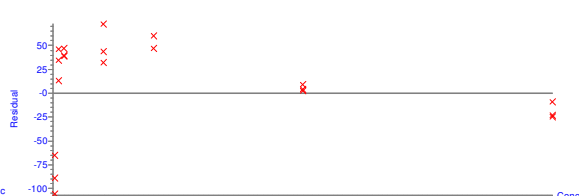


## 9.1.2 Standardkurver fra februar 2009

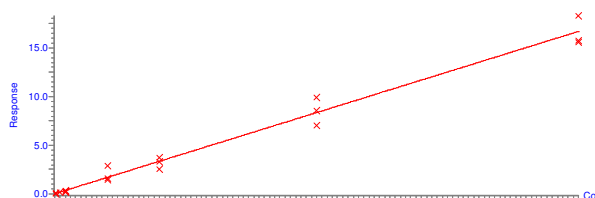
Compound name: ketoprofen  
 Correlation coefficient:  $r = 0.988274$ ,  $r^2 = 0.976685$   
 Calibration curve:  $0.0185109 \cdot x + 0.00331922$   
 Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



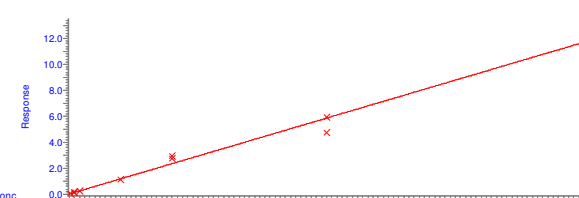
Compound name: diklofenak  
 Correlation coefficient:  $r = 0.964436$ ,  $r^2 = 0.930138$   
 Calibration curve:  $0.0145671 \cdot x + 0.0324458$   
 Response type: Internal Std ( Ref 4 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: naproxen  
 Correlation coefficient:  $r = 0.986299$ ,  $r^2 = 0.976734$   
 Calibration curve:  $0.0333426 \cdot x + 0.0228893$   
 Response type: Internal Std ( Ref 8 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

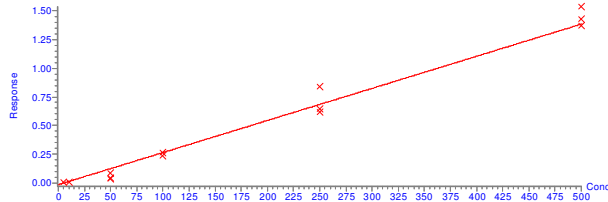
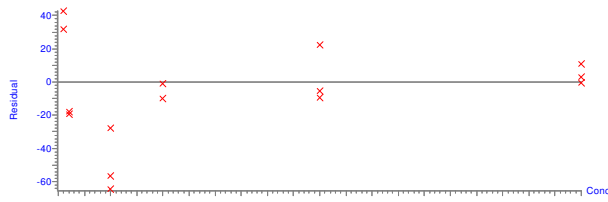


Compound name: ibuprofen  
 Correlation coefficient:  $r = 0.991534$ ,  $r^2 = 0.983141$   
 Calibration curve:  $0.0233958 \cdot x + 0.0199785$   
 Response type: Internal Std ( Ref 5 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
 Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None

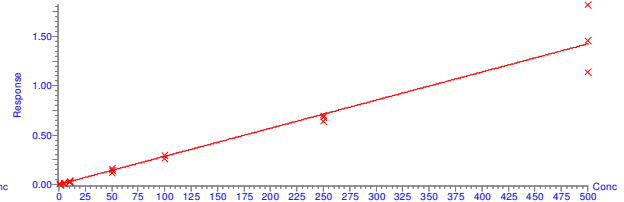
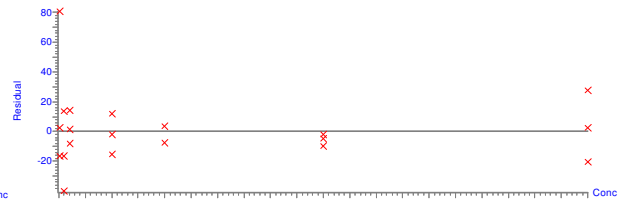


# Vedlegg

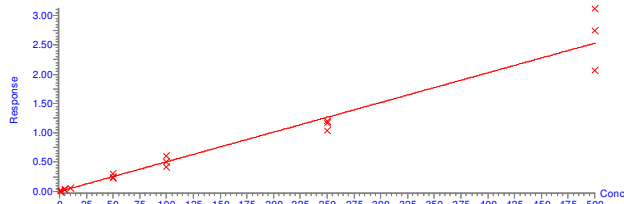
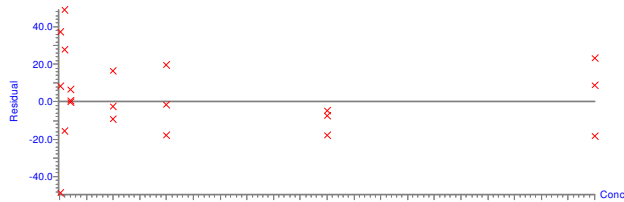
Compound name: desmetylnaproxen  
Correlation coefficient:  $r = 0.985355$ ,  $r^2 = 0.970924$   
Calibration curve:  $0.00279591 \cdot x + -0.0142672$   
Response type: Internal Std ( Ref 8 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: dihydroketoprofen  
Correlation coefficient:  $r = 0.987232$ ,  $r^2 = 0.974627$   
Calibration curve:  $0.00285067 \cdot x + 0.0004235$   
Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



Compound name: desmetylketoprofen  
Correlation coefficient:  $r = 0.987308$ ,  $r^2 = 0.974777$   
Calibration curve:  $0.00505614 \cdot x + 0.00269992$   
Response type: Internal Std ( Ref 2 ), Area \* ( IS Conc. / IS Area )  
Curve type: Linear, Origin: Include, Weighting: 1/x, Axis trans: None



## 9.2 Tabeller

### 9.2.1 Tabeller avløpsvann

**Tabell 10: Avløpsvannprøver fra Tromsø, dihydroketoprofen og desmetylketoprofen er ikke med, da det ikke var noen topper for disse stoffene**

ketoprofen

RT	Area	IS Area	Response	Conc.
9,36	5566	4389,644	1,268	77,80
9,44	6630	4464,574	1,485	91,20
9,49	6590	5698,129	1,156	70,90
9,49	4198	2920,905	1,437	88,20

diklofenak

RT	Area	IS Area	Response	Conc.
17,17	774	1277,521	0,606	42,90
17,27	855	1293,65	0,661	47,10
17,3	909	1577,469	0,576	40,70
17,3	330	487,76	0,676	48,20

Ibuprofen

RT	Area	IS Area	Response	Conc.
17,74	38147	2751,95	13,862	662,40
17,77	47387	3365,164	14,082	673,00
17,77	52304	3700,639	14,134	675,50
17,77	16887	980,198	17,228	823,60

naproxen

RT	Area	IS Area	Response	Conc.
9,56	12308	1891,013	6,508	230,8
9,61	14146	2112,253	6,697	237,6
9,61	13027	2276,673	5,722	202,7
9,61	7125	1197,362	5,951	210,9

desmetylnaproxen

RT	Area	IS Area	Response	Conc.
4,41	95	1891,013	0,05	31,40
4,41	125	2112,253	0,059	36,30
4,41	121	2276,673	0,053	33,10
4,43	101	1197,362	0,084	50,10

## 9.2.2 Tabeller sjøvann

Tabell 11: ketoprofen, sjøvannsprøver. Prøvene merket med lm er tilsatt 50 ng NSAIDs, prøvene fra Svalbard fra desember 2008 er tilsatt 100 ng/1,1 l NSAIDs.

	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons. ng/1,1l
Tromsø					
	9,44	75	688	0,109	6
	9,38	28,8	1099,4	0,026	1
	9,44	11,4	1023	0,011	0,1
Ny-Ålesund					
	8,83	4,7	452	0,01	0,1
	9,44	1,4	435,3	0,003	
	9,44	25,4	863,3	0,029	1,2
			483,1		
Lm	9,36	391,6	515,9	0,759	44,9
Lm	9,36	543,9	601,8	0,904	53,5
Lm	9,38	362,2	419,8	0,863	51,1
Lm	9,59	295,9	316,7	0,934	55,3
Adventfjorden mars 09					
	9,71	20,9	315,8	0,066	3,4
	9,74	50,7	734,7	0,069	3,6
	9,79	25,4	202,7	0,125	7
			254,6		
Lm	9,28	167,1	222,3	0,751	44,4
Lm	9,36	85,9	103,6	0,829	49
Lm	9,33	103,2	150,5	0,686	40,5
Lm	9,38	100,1	189,8	0,527	31
Adventfjorden des 08					
	9,66	10,797	1377,459	0,008	0,3
			968,894		
			1116,798		
			1407,134		
Lm	9,58	915,861	1281,338	0,715	119,2
Lm	9,58	811,225	1311,284	0,619	103
Lm	9,55	1037,006	1653,747	0,627	104,4
Lm	9,55	989,022	1515,386	0,653	108,8

Vedlegg

Tabell 12: diklofenak, sjøvannsprøver. Prøvene merket LM er tilsatt 50 ng/1,1 NSAIDs, men prøvene fra Adventfjorden fra desember 08 er tilsatt 100 ng/1,1 I NSAIDs.

diklofenak	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons
Tromsø					
	17,17	89,6	571,6	0,157	9
	16,97	27,5	883,7	0,031	
			573,9		
Ny-Ålesund					
			110,5		
lm	16,97	207,2	227,6	0,91	65,2
lm	16,92	254,3	248,2	1,024	73,7
lm	16,97	121,6	108	1,126	81,2
lm	17,24	132,2	143,2	0,924	66,1
Adventfjorden mars 09					
	17,02	1	100,7	0,01	
			179,3		
	16,1	0,2	60,9	0,003	
lm	16,85	57,2	42,7	1,34	97,2
lm	16,95	28,5	12	2,374	174,4
lm	16,99	106,7	85,9	1,242	89,9
lm	17,02	38,7	43	0,899	64,3
Adventfjorden des 08					
	15,74	0,448	534,254	0,001	
	15,47	1,23	462,171	0,003	
	15,96	0,888	442,607	0,002	
	16,04	0,75	529,37	0,001	
lm	15,86	181,662	196,272	0,926	114,4
lm	15,88	180,298	214,974	0,839	103,2
lm	15,88	114,154	152,591	0,748	91,6
lm	15,86	156,65	170,837	0,917	113,2

**Tabell 13: ibuprofen, sjøvannsprøver. Prøvene merket lm er tilsatt 50 ng/1,1 l NSAIDs, utenom prøvene fra Adventfjorden fra des 08, som er tilsatt 100 ng/1,1 l NSAIDs**

ibuprofen	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons.
Tromsø					
	17,74	86,2	810,967	0,106	3,8
	17,71	43,32	881,835	0,049	1,1
Ny-Ålesund					
	14,85	0,217			
lm	17,69	398,444	263,503	1,512	69,9
lm	17,67	448,259	354,941	1,263	58,2
lm	17,74	426,416	336,67	1,267	58,4
lm	17,87	395,795	230,305	1,719	79,6
Adventfjorden mars 09					
			146,062		
			254,906		
			136,427		
lm	17,67	190,634	111,164	1,715	79,5
lm	17,66	98,544	68,079	1,447	66,9
lm	17,67	182,217	137,792	1,322	61
lm	17,71	62,267	63,85	0,975	44,7
Adventfjorden des 08					
	16,99	15,711	1279,75	0,012	
	17,03	11,083	1026,798	0,011	
	17,07	11,809	1223,988	0,01	
	17,07	11,34	1414,828	0,008	
lm	17,03	1108,503	953,569	1,162	101,4
lm	17,01	1073,523	955,525	1,123	98
lm	17,01	1318,924	1230,974	1,071	93,4
lm	16,99	1167,401	1011,682	1,154	100,6

Vedlegg

Tabell 14: naproxen, sjøvannsprøver. Prøvene merket Lm er tilsatt 50 ng/1,1 l NSAIDs, men prøvene fra Adventfjorden des 08 er tilsatt 100 ng/1,1 l.

naproxen	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons
Tromsø					
	9,58	56,863	408,611	0,139	3,2
	9,56	33,193	524,191	0,063	0,6
			605,212		
Ny-Ålesund					
			212,286		
			165,916		
			359,109		
			201,71		
lm	9,56	419,764	233,2	1,8	61,2
lm	9,56	506,892	245,119	2,068	70,6
lm	9,56	371,034	182,048	2,038	69,5
lm	9,73	311,076	170,341	1,826	62,1
Adventfjorden mars 09					
			155,23		
	9,51	4,541	455,126	0,01	
			116,105		
			119,225		
lm	9,48	169,184	119,052	1,421	48
lm	9,48	83,566	58,662	1,425	48,1
lm	9,56	121,739	79,085	1,539	52,1
lm	9,58	137,752	66,888	2,059	70,3
Adventfjorden des 08					
	9,76	17,968	931,889	0,019	
	9,24	342,745	568,322	0,603	
	9,24	280,41	774,781	0,362	
	9,24	350,317	1017,995	0,344	
lm	9,82	975,528	561,009	1,739	108,2
lm	9,82	894,024	568,218	1,573	97,6
lm	9,82	956,531	603,892	1,584	98,2
lm	9,79	1157,136	641,743	1,803	112,2



Vedlegg

Tabell 15: desmetylnaproxen, Sjøvannsprøver, prøven market Lm er tilsatt 50 ng/1,1 l NSAIDs, utenom prøven fra Adventfjorden des 08, som er tilsatt 100 ng/1,1 l

desmetylnaproxen	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons.
Tromsø					
			408,611 524,191 605,212		
Ny-Ålesund					
			212,286 165,916 359,109 201,71		
Lm	4,42	22,549	233,2	0,097	54,3
Lm	4,39	22,725	245,119	0,093	52,1
Lm	4,39	18,952	182,048	0,104	58,4
Lm	4,61	9,9	170,341	0,058	33,1
Adventfjorden mars 09					
			155,23 455,126 116,105 119,225		
Lm	4,35	5,998	119,052	0,05	28,9
Lm	4,4	4,543	58,662	0,077	43,7
Lm	4,39	23,676	79,085	0,299	165,5
Lm	4,4	2,634	66,888	0,039	22,8
Adventfjorden des 08					
	5,13	2,798	931,889	0,003	
	5,4	2,641	568,322	0,005	
	5,36	3,048	774,781	0,004	
	5,5	1,315	1017,995	0,001	
lm	5,33	7,905	561,009	0,014	7,4
lm	5,33	9,769	568,218	0,017	9,4
lm	5,33	9,312	603,892	0,015	8,4
lm	5,33	10,133	641,743	0,016	8,6

Vedlegg

Tabell 16: dihydroketoprofen, sjøvannsprøver, prøven merket lm er tilsatt 50 ng/1,1 l, utenom prøvene fra Adventfjorden des 08, som er tilsatt 100 ng/1,1l,

dihydroketoprofen	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons.
Tromsø					
			687,981 1099,352 1023,016		
Ny-Ålesund					
			451,973 435,306 863,283 483,084		
Lm	6,35	52,819	515,88	0,102	49
Lm	6,35	35,908	601,799	0,06	28,1
Lm	6,35	43,671	419,842	0,104	49,8
Lm	6,58	36,208	316,716	0,114	54,8
Adventfjorden mars 09					
			315,809 734,671 202,662 254,644		
Lm	6,28	13,514	222,321	0,061	28,6
Lm	6,3	19,147	103,597	0,185	89,3
Lm	6,35	38,498	150,49	0,256	124
Lm	6,35	16,978	189,779	0,089	42,6
Adventfjorden des 08					
	6,96	1,996	1377,459	0,001	
	6,69	0,977	968,894	0,001	
	6,99	6,11	1116,798	0,005	
	6,69	7,738	1407,134	0,005	
lm	6,99	422,926	1281,338	0,33	176,8
lm	6,99	364,168	1311,284	0,278	148,4
lm	6,99	353,094	1653,747	0,214	113,4
lm	6,99	361,096	1515,386	0,238	127

## Vedlegg

**Tabell 17: desmetylketoprofen, sjøvannsprøver. Prøvene merket lm er tillatt 50 ng/1,1 l NSAIDs, utenom prøvene fra Adventfjorden des 08, som er tilsatt 100 ng/1,1 l.**

desmetylketoprofen	RT	Areal	IS Areal	Respons	Kons.
Tromsø					
			687,981		
			1099,352		
			1023,016		
Ny-Ålesund					
			451,973		
			435,306		
			863,283		
			483,084		
lm	7,34	85,215	515,88	0,165	37,4
lm	7,25	157,847	601,799	0,262	59,9
lm	7,3	101,324	419,842	0,241	55,1
lm	7,55	58,73	316,716	0,185	42,1
Adventfjorden mars 09					
			315,809		
			734,671		
			202,662		
			254,644		
lm	7,17	47,961	222,321	0,216	49,1
lm	7,25	21,719	103,597	0,21	47,7
lm	7,3	46,682	150,49	0,31	71
lm	7,34	30,561	189,779	0,161	36,4
Adventfjorden des 08					
	7,2	1,394	1377,459	0,001	1,8
	7,1	0,609	968,894	0,001	1,7
	7,34	1,084	1116,798	0,001	1,8
	7,03	1,33	1407,134	0,001	1,7
lm	7,66	207,048	1281,338	0,162	124,6
lm	7,7	166,412	1311,284	0,127	98,4
lm	7,7	184,954	1653,747	0,112	87,2
lm	7,66	189,875	1515,386	0,125	97,2

### 9.2.3 Tabeller UV-forsøk

Tabell 18: ibuprofen, UV forsøk

Dag	Resultater					Referanser				
	RT	Areal	IS Areal	Respons	konsentrasjon	RT	Areal	IS Areal	Respons	konsentrasjon
14	14,06	6529	1075	6,07	284,3	14,01	2351	457	5,15	240,9
14	14,09	5839	821	7,12	333,5	14,04	3776	530	7,12	333,9
14	14,06	3774	689	5,48	256,4	14,01	2875	537	5,35	250,5
13	14,03	5567	958	5,81	272,0	14,04	4198	401	10,47	491,1
13	14,08	7489	946	7,92	371,2	14,03	3085	360	8,57	402,0
13	14,04	5819	1021	5,70	267,0	14,01	2707	454	5,97	279,4
12	14,06	6051	1199	5,05	236,1	14,03	2359	364	6,48	303,5
12	14,08	7241	1247	5,81	272,0	14,04	1024	217	4,73	221,1
12	14,01	4992	1122	4,45	208,0	14,06	940	140	6,72	315,0
11	14,04	4683	1195	3,92	183,1					
11	14,04	6787	1652	4,11	192,0	14,06	3629	621	5,84	273,5
11	14,08	6867	1332	5,16	241,4	14,04	3774	721	5,23	244,9
10	14,03	4487	1293	3,47	162,0	14,04	2863	733	3,90	182,4
10	14,06	7241	1434	5,05	236,2	14,04	4217	788	5,35	250,4
10	14,06	5914	1291	4,58	214,2	14,04	7409	1123	6,60	309,2
9	14,03	6897	1769	3,90	182,2	14,06	160	29	5,57	261,0
9	14,06	9821	1541	6,37	298,6	14,03	5458	1082	5,05	236,1
9	14,08	6655	1350	4,93	230,7	14,08	5468	1026	5,33	249,6
8	14,06	7179	1704	4,21	197,0	14,06	5014	977	5,13	240,2
8	14,08	5997	1299	4,62	215,9	14,08	7846	1466	5,35	250,5
8	14,08	6794	1534	4,43	207,2	14,03	6291	1497	4,20	196,5
7	14,06	9188	1875	4,90	229,3	14,09	6446	1450	4,45	207,9
7	14,09	5848	980	5,97	279,5	14,06	7502	2279	3,29	153,6
7	14,08	6864	1154	5,95	278,7	14,04	3959	987	4,01	187,5
6	14,06	4212	830	5,07	237,4	14,06	3510	653	5,38	251,6
6	14,04	6548	1405	4,66	218,0	14,06	6658	1246	5,35	250,2
6	14,09	5248	1019	5,15	241,0	14,04	6634	1278	5,19	242,9
5	14,08	5634	1032	5,46	255,6	14,08	4140	876	4,73	221,1
5	14,13	5690	1056	5,39	252,3	14,06	3195	805	3,97	185,4
5	14,09	5863	1133	5,18	242,2	14,04	4238	922	4,60	215,0
4	14,06	4099	778	5,27	246,6	14,03	3539	754	4,70	219,7
4	14,09	6885	1482	4,65	217,3	14,04	4187	879	4,76	222,9
4	14,03	6490	1329	4,88	228,5	14,08	1874	463	4,05	189,3
3	14,06	1959	355	5,52	258,5	14,08	1896	608	3,12	145,4

## Vedlegg

3	14,08	6124	860	7,12	333,9	14,04	2394	509	4,70	219,9
3	14,06	6160	1198	5,14	240,6	14,08	2729	656	4,16	194,5
2	14,01	6364	1196	5,32	249,1	14,11	3324	815	4,08	190,6
2	14,08	5697	1568	3,63	169,7	14,08	2359	476	4,96	231,9
2	14,08	7340	1097	6,69	313,6	14,06	1858	468	3,97	185,6
1	14,08	8906	1449	6,15	287,9	14,06	4145	928	4,47	208,8
1	14,06	6286	975	6,45	302,0	14,06	4133	866	4,77	223,3
1	14,08	7873	1495	5,27	246,6	14,08	6929	1401	4,95	231,5
0	14,09	4824	986	4,89	229,0	14,04	3705	789	4,70	219,8
0	14,09	8594	2090	4,11	192,2	14,04	3432	923	3,72	173,7
0	14,06	7098	1258	5,64	264,1	14,08	3067	723	4,24	198,4

**Tabell 19: ketoprofen UV forsøk**

Resultat					referanser					
Dag	RT	Areal	IS Areal	Respons	Konsentrasjon	RT	Areal	IS Areal	Respons	Konsentrasjon
11	7,75	140,2	3372,4	0,04	1,9					
11	7,72	146,9	3058,2	0,05	2,3	7,32	3728,3	890,2	4,19	250
11	7,75	108,5	3475,9	0,03	1,3	7,29	4587,1	928,2	4,94	295,1
10	7,72	81,2	2135,4	0,04	1,7	7,32	4348,8	868,3	5,01	299
10	7,75	72,2	2166,6	0,03	1,5	7,27	4802,6	957,7	5,02	299,4
10	7,75	86,9	2656,5	0,03	1,4	7,27	7555,8	1658,2	4,56	272
9	7,72	122,9	3254,9	0,04	1,7	7,44	144,0	39,2	3,68	219,4
9	7,72	130,8	3768,3	0,04	1,5	7,32	4302,3	1209,6	3,56	212,2
9	7,75	111,6	2523,5	0,04	2,1	7,32	5632,5	836,3	6,74	402,3
8	7,72	127,7	3208,0	0,04	1,8	7,29	4155,1	1152,9	3,60	215
8	7,72	108,6	2424,7	0,05	2,1	7,29	7128,9	2035,4	3,50	208,9
8	7,72	95,5	3065,8	0,03	1,3	7,27	5899,2	1423,2	4,15	247,4
7	7,75	98,1	3288,5	0,03	1,2	7,32	6714,3	901,6	7,45	444,9
7	7,75	114,6	3010,6	0,04	1,7	7,24	12106,7	1885,7	6,42	383,5
7	7,77	115,5	2524,2	0,05	2,2	7,24	4467,9	1098,0	4,07	242,9
6	7,72	81,7	1547,8	0,05	2,6	7,29	3851,2	654,5	5,88	351,4
6	7,72	89,0	2490,5	0,04	1,6	7,24	5645,7	1748,7	3,23	192,6
6	7,72	100,5	1389,9	0,07	3,8	7,29	6681,3	1544,6	4,33	258,2
5	7,7	19,9	1854,5	0,01	0,1	7,29	4183,2	655,5	6,38	381,2
5	7,75	29,8	2506,6	0,01	0,2	7,29	4053,0	738,6	5,49	327,7
5	7,7	26,6	2306,4	0,01	0,2	7,27	4257,2	1041,9	4,09	243,9
4	7,75	37,3	1895,7	0,02	0,6	7,24	3585,3	932,2	3,85	229,5
4	7,72	25,7	2865,8	0,01		7,29	4265,3	821,7	5,19	309,9
4	7,7	19,2	1843,5	0,01	0,1	7,24	3107,7	1028,7	3,02	180,2
3	7,75	24,2	2661,6	0,01	0	7,32	1817,0	586,9	3,10	184,6
3	7,72	28,9	1710,2	0,02	0,5	7,27	2220,1	585,8	3,79	226,1
3	7,7	27,2	2927,5	0,01	0	7,32	2625,3	703,1	3,73	222,8
2	7,72	19,1	2046,4	0,01	0	7,32	2410,8	623,4	3,87	230,8
2	7,75	31,5	2733,0	0,01	0,2	7,32	2004,5	500,7	4,00	238,9
2	7,75	25,6	2458,4	0,01	0,1	7,32	1654,8	444,3	3,72	222,2
1	7,75	29,4	2240,6	0,01	0,2	7,32	3720,0	1117,7	3,33	198,5
1	7,75	23,7	2302,1	0,01	0,1	7,32	3468,3	952,0	3,64	217,4
1	7,75	46,5	2919,9	0,02	0,4	7,32	4020,3	867,5	4,63	276,7

## Vedlegg

0	7,32	4782,6	1894,5	2,52	150,5	7,32	3093,3	972,8	3,18	189,6
0	7,32	10184,3	3095,1	3,29	196,3	7,29	2694,9	949,2	2,84	169,3
0	7,32	6758,0	2149,9	3,14	187,5	7,29	2100,6	797,4	2,63	157

**Tabell 20: diklofenak UV forsøk**

Resultater						Referanser				
Dag	RT	Areal	IS Areal	Respons	Konsentrasjon	RT	Areal	IS Areal	Respons	konsentrasjon
14	13,41	86,4	788,8	0,11	5,4	13,32	1009,6	255,0	3,96	292,5
14	13,41	59,1	561,4	0,11	5,1	13,32	2054,3	476,3	4,31	319
14	13,42	26,6	324,1	0,08	3,4	13,34	1671,3	401,0	4,17	308,1
13	13,37	70,7	577,4	0,12	6,4	13,26	2254,4	616,0	3,66	270,2
13	13,44	83,3	590,5	0,14	7,8	13,29	1532,5	382,2	4,01	296,3
13	13,49	60,6	600,3	0,10	4,8	13,34	1945,1	482,7	4,03	297,8
12	13,46	92,8	415,8	0,22	13,9	13,32	1207,0	262,5	4,60	340,3
12	13,39	121,1	788,4	0,15	8,7	13,36	522,8	140,1	3,73	275,5
12	13,42	79,3	546,6	0,15	8,1	13,34	464,8	135,2	3,44	253,7
11	13,47	112,9	400,0	0,28	18,3					
11	13,49	134,3	581,9	0,23	14,5	13,49	1272,3	241,9	5,26	389,6
11	13,47	146,7	424,6	0,35	23	13,46	1695,0	327,8	5,17	383
10	13,44	110,8	424,9	0,26	16,7	13,46	1443,2	310,7	4,65	343,7
10	13,51	183,4	651,7	0,28	18,3	13,32	1409,2	264,3	5,33	394,9
10	13,49	128,0	483,0	0,27	17	13,34	2851,6	708,4	4,03	297,5
9	13,56	237,3	556,6	0,43	29,1	13,54	37,5	8,6	4,35	321,8
9	13,49	228,8	545,5	0,42	28,6	13,47	1856,3	370,9	5,00	370,5
9	13,51	183,6	437,7	0,42	28,6	13,47	1409,6	334,2	4,22	311,9
8	13,51	327,5	620,3	0,53	36,6	13,42	1126,0	245,2	4,59	339,7
8	13,51	285,5	495,0	0,58	40,3	13,41	2431,5	492,1	4,94	365,8
8	13,51	272,8	469,2	0,58	40,6	13,34	2640,0	394,5	6,69	496,5
7	13,57	578,1	605,6	0,96	68,5	13,39	1288,5	251,4	5,13	379,6
7	13,59	111,8	118,4	0,94	67,7	13,29	3128,6	656,1	4,77	352,9
7	13,57	170,5	193,5	0,88	63	13,36	993,4	190,6	5,21	386,1
6	13,54	203,0	249,6	0,81	57,9	13,39	446,6	81,9	5,45	403,9
6	13,47	447,8	587,0	0,76	54,2	13,32	359,8	72,7	4,95	366,6
6	13,51	264,8	303,4	0,87	62,4	13,37	1746,6	359,5	4,86	359,7
5	13,51	496,2	409,7	1,21	87,6	13,42	928,2	171,1	5,42	401,8
5	13,6	428,6	315,5	1,36	98,6	13,39	966,3	137,5	7,03	521,4
5	13,49	401,3	302,2	1,33	96,3	13,36	1606,9	255,5	6,29	466,3
4	13,57	201,1	100,0	2,01	147,4	13,34	607,2	111,2	5,46	404,6
4	13,52	750,1	335,3	2,24	164,1	13,37	1221,6	247,9	4,93	364,8

## Vedlegg

4	13,52	571,8	343,0	1,67	121,6	13,37	257,6	37,3	6,91	512,4
3	13,52	110,3	34,2	3,23	237,8	13,44	486,9	69,9	6,96	516,5
3	13,44	661,0	244,7	2,70	198,7	13,39	556,8	92,3	6,03	447,1
3	13,51	903,4	434,2	2,08	152,5	13,41	742,9	149,9	4,96	366,9
2	13,56	1383,5	380,5	3,64	268,5	13,44	635,1	188,9	3,36	248
2	13,56	1004,6	400,0	2,51	184,6	13,41	493,5	91,2	5,41	400,9
2	13,52	1351,2	490,8	2,75	202,6	13,42	346,7	61,6	5,63	417,4
1	13,54	1372,7	354,8	3,87	285,8	13,42	729,2	168,8	4,32	319,4
1	13,62	412,2	138,7	2,97	218,9	13,39	1046,0	216,4	4,83	357,8
1	13,54	1588,2	405,4	3,92	289,5	13,39	2662,1	436,1	6,10	452,6
0	13,57	1297,2	348,7	3,72	274,8	13,42	782,1	130,7	5,98	443,6
0	13,52	4689,6	1015,8	4,62	341,6	13,39	612,1	112,0	5,47	405
0	13,56	2427,2	644,0	3,77	278,4	13,37	476,5	88,0	5,41	400,9

**Tabell 21: naproxen UV forsøk**

Dag	Resultat					Referanser				
	RT	Areal	IS Areal	Respons	Konsentrasjon	RT	Areal	IS Areal	Respons	konsentrasjon
14	7,54	58,40	2222,5	0,026		7,49	3630,2	543,5	6,68	231,5
14	7,54	61,11	1286,4	0,048	0	7,49	4886,7	680,5	7,18	249
14	7,54	38,70	1082,1	0,036		7,49	5114,6	607,2	8,42	292,4
13	7,54	90,14	1406,1	0,064	0,6	7,46	5806,5	778,3	7,46	258,8
13	7,57	98,92	1613,0	0,061	0,5	7,49	4303,9	643,0	6,69	232
13	7,54	70,71	1294,0	0,055	0,3	7,49	4803,6	721,6	6,66	230,8
12	7,54	98,34	1318,0	0,075	1	7,49	3812,0	459,2	8,30	288,1
12	7,49	117,02	1676,8	0,07	0,8	7,49	2325,3	469,1	4,96	171,4
12	7,49	125,89	1493,0	0,084	1,3	7,49	1834,4	208,4	8,80	305,6
11	7,54	178,29	804,7	0,222	6,1					
11	7,49	140,64	1589,3	0,088	1,5	7,49	4940,8	733,9	6,73	233,4
11	7,51	162,76	1530,1	0,106	2,1	7,46	5114,1	646,9	7,91	274,3
10	7,51	190,53	1305,7	0,146	3,5	7,49	3665,4	552,0	6,64	230,2
10	7,51	248,10	1398,6	0,177	4,6	7,46	4569,9	624,4	7,32	253,9
10	7,51	265,35	1534,4	0,173	4,4	7,46	7932,4	1096,5	7,23	250,9
9	7,51	418,21	1336,0	0,313	9,3	7,57	138,5	21,7	6,39	221,4
9	7,49	477,69	1924,7	0,248	7	7,49	5028,3	615,9	8,16	283,3
9	7,51	387,77	1472,4	0,263	7,6	7,49	5499,7	834,1	6,59	228,5
8	7,51	676,68	1833,9	0,369	11,3	7,46	5000,6	742,3	6,74	233,5
8	7,51	542,73	1336,6	0,406	12,6	7,49	7514,1	1199,0	6,27	217,1
8	7,51	611,23	1226,1	0,499	15,8	7,46	6553,3	974,5	6,73	233,1
7	7,54	956,44	1484,9	0,644	20,9	7,51	6662,1	904,1	7,37	255,6
7	7,51	639,94	938,4	0,682	22,2	7,46	11522,0	1837,8	6,27	217,2
7	7,54	606,62	892,0	0,68	22,1	7,46	4958,2	638,9	7,76	269,3
6	7,51	720,23	841,7	0,856	28,3	7,49	2742,6	420,3	6,53	226,2
6	7,51	1040,16	1176,7	0,884	29,2	7,46	4354,3	781,0	5,58	193
6	7,51	910,09	967,7	0,94	31,2	7,49	6172,7	960,3	6,43	222,8
5	7,51	1485,37	1112,2	1,336	45	7,49	3220,4	498,6	6,46	223,8
5	7,51	1479,05	1239,1	1,194	40,1	7,49	3273,0	290,6	11,26	391,5
5	7,51	1429,73	1060,2	1,348	45,5	7,44	4369,3	498,1	8,77	304,5
4	7,54	1143,67	625,4	1,829	62,2	7,46	2821,5	484,7	5,82	201,6

## Vedlegg

---

4	7,51	1869,88	942,3	1,984	67,7	7,49	4650,1	527,2	8,82	306,3
4	7,49	1932,40	1181,6	1,635	55,5	7,44	2640,3	394,8	6,69	231,9
3	7,51	2545,87	957,6	2,659	91,2	7,49	2114,1	324,3	6,52	225,9
3	7,49	2408,63	611,8	3,937	135,8	7,46	2381,6	314,7	7,57	262,6
3	7,49	2868,63	1061,5	2,702	92,7	7,49	3003,5	345,2	8,70	302,1
2	7,51	4425,14	1373,2	3,223	110,9	7,51	3290,8	477,2	6,90	239,1
2	7,51	4307,27	1358,4	3,171	109,1	7,51	2286,6	383,4	5,96	206,6
2	7,51	4051,54	1171,2	3,459	119,1	7,51	1922,8	277,1	6,94	240,6
1	7,49	5999,85	1078,2	5,565	192,6	7,49	4166,1	695,8	5,99	207,4
1	7,51	5404,40	972,2	5,559	192,4	7,49	3978,6	491,2	8,10	281,1
1	7,51	6905,96	1331,2	5,188	179,5	7,49	5492,7	922,4	5,96	206,2
0	7,49	5161,02	875,1	5,898	204,2	7,49	4088,1	553,1	7,39	256,4
0	7,51	9753,61	1733,2	5,627	194,8	7,49	3477,1	610,1	5,70	197,3
0	7,51	6655,94	1248,5	5,331	184,5	7,46	2816,8	525,0	5,37	185,7