

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Analüütilise keemia õppetool

Tanel-Martin Tambek

## **Külmutusekstraktsiooni – uus meetod veeproovide ettevalmistuseks**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad: Koit Herodes, kaasprofessor

Joshua Onyeka Osagu, MSc

Tartu 2021

# INFOLEHT

## Külmutusekstraktsiooni – uus meetod veeproovide ettevalmistuseks

Keemilise analüüsi üheks väljakutseks on järjest madalamate kontsentratsioonide määramise vajadus. Eriti tähtis on see vee puhul, sest seda kasutatakse toidu valmistamiseks, joogiks, hügieeniks jne, mistõttu on vee puhtusele kehtestatud eriti ranged nõuded.

Käesoleva töö eesmärgiks oli välja töötada ja testida uut veeproovide ettevalmistamiseks kasutatavat (*proof of concept*) meetodit. Meetodis on ühendatud vedelik-vedelik ekstraktsioon ning külmutus kontsentreerimine. Seda meetodit testiti neljal erineval pH-l ja kahe erineva ekstraheeriva lahusega. Meetodi mudelsüsteemiks olid antibiootikumid vees.

Töö tulemusena suudeti ekstraktsiooni käigus kontsentreerida kõiki proove. 19-st analüüdist õnnestus määrata 15. Kasutades analüüdile optimaalset pH-d ja ekstraheerivat solventi saadi ühe ekstraktsiooni tsükliga ekstraktis 5-16 kordne kontsentratsioon (algne kontsentratsioon 1 ppb).

Märksõnade loend: Külmutusekstraktsioon, meetodi väljatöötamine, *proof of concept*, LC-MS/MS.

CERCS: P300 analüütiline keemia

## Freeze-extraction – new method for preparation of water samples

One of the challenges of chemical analysis is the constant need for measuring of lower concentrations. It is especially important for water, since it is used in cooking, as a drink and for hygiene, which is why water purity has strict regulations.

The goal of this study was to develop and test (proof of concept) a new method for preparation of water samples. The proposed method may be described as a combination of liquid-liquid extraction and freeze concentration. The method was tested at 4 different pH and with 2 different extraction solvents in a model system of antibiotics in water at 1 ppb concentration level.

As a result of this method, every sample was concentrated during extraction and 15 out of 19 analytes were measured. While using the optimal pH and extraction solvent, a 5-16-fold increase in concentration of extract was observed with one extraction cycle.

Key words: Freeze-extraction, method development, proof of concept, LC-MS/MS.

CERCS: P300 analytical chemistry

# Sisukord

Sissejuhatus .....	4
<b>1. Kirjanduse ülevaade .....</b>	<b>5</b>
<b>1.1 Antibiootikumid .....</b>	<b>5</b>
<b>1.2 Meetodid antibiootikumide sisalduse määramiseks .....</b>	<b>6</b>
1.2.1 Vedelikkromatograafia.....	6
1.2.2 Pöördfaas kromatograafia .....	6
1.2.3 Normaalfaas kromatograafia.....	7
1.2.4 Hüdrofiilse interaktsiooni kromatograafia.....	7
<b>1.3 Vedelikkromatograafia detektorid .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 UV-Vis spektroskoopia.....	8
1.3.2 Massispektromeetria.....	8
<b>1.4 Vedeliku proovide ettevalmistusmeetodid.....</b>	<b>9</b>
1.4.1 Vedelik-vedelik ekstraktsioon.....	9
1.4.2 Tahke faasi ekstraktsioon.....	10
1.4.3 Külmutuskontsentreerimine .....	10
1.4.4 ICECLES .....	11
<b>2 Eksperimentaalne osa .....</b>	<b>13</b>
2.1 Kasutatud seadmed, kemikaalid ja meetodika .....	13
2.2 Kasutatud ained ja lahuste valmistamine.....	15
2.3 Proovide valmistamine .....	19
2.4 Proovide LC-MS analüüs.....	21
<b>3 Tulemused ja arutelu .....</b>	<b>22</b>
3.1 Kvalitatiivne analüüs.....	22
3.2 Kvantitatiivne analüüs.....	22
3.3 Tulemuste analüüs .....	36
3.4 Meetodi edasine arendamine .....	37
<b>Kokkuvõte.....</b>	<b>38</b>
<b>Summary.....</b>	<b>39</b>
<b>Kirjandusviited .....</b>	<b>40</b>
<b>Lisa .....</b>	<b>42</b>

## Sissejuhatus

Üheks olulisemaks keemilise analüüsi väljakutseks on järjest madalamate kontsentratsioonide määramise vajadus. Me õpime aina rohkem tundma oma keskkonda, mis tekitab aina suuremaid vajadusi võimalikult madalate määramispiiride saavutamiseks. Eriti tähtis on see vee puhul. Vesi on asendamatu osa inimese elust ja ühiskonnast. Seda kasutatakse toidu valmistamiseks, joogiks, hügieeniks jne. Selle tõttu on vee puhtusele kehtestatud eriti ranged nõudmised.

Instrumentaalsetest meetoditest kasutatakse veeproovide analüüsiks sageli vedelikkromatograafiat, kuid eriti just vedelikkromatograafiat koos massispektromeetrilise detektoriga (LC-MS). LC-MS on suurepärase instrumentaalne meetod, kuna võimaldab saavutada kõrget selektiivsust ja madalaid avastamispiire, mida vee proovide analüüsil eriti vaja on.

Instrumentaalse meetodi enda tundlikkus (avastamispiir) ei pruugi siiski olla piisav. Tähtis on ka veeproovi analüüsile eelnev ettevalmistus. Ettevalmistuse eesmärgiks on analüütide kontsentreerimine ja/või segavate proovikomponentide eraldamine. Traditsiooniliselt kasutatakse selleks vedelik-vedelik ekstraktsiooni ja tahke faas ekstraktsiooni.

Käesolevas töös pakutakse välja uudne, külmutamisel baseeruv meetod veeproovide ettevalmistamiseks. Bakalaureusetöö eesmärgiks on testida (*proof of concept*) meetodit analüüsides veest ravimijääke. Selleks kombineeritakse veeproovide külmutus kontsentreerimise protsessiga orgaaniline faas, et tõhustada analüütide ekstraheerumist. Analüütide sisalduste määramiseks kasutatakse pöördfaaskromatograafia LC-MS meetodit.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Antibiootikumid

Tänapäeva meditsiini üheks ulatuslikumalt kasutatud tooteks on antibiootikum. Antibiootikum on loodusliku või tehisliku päritoluga antimikroobne ravim, mis oma rollist tänapäeva meditsiinis hoolimata on viimastel aastatel sattunud rünnaku alla. Liigse kasutuse tulemusena on tekkinud resistentsed bakterid, mis ei allu enam antibiootikumide ravile.<sup>[1]</sup>

Esimesed antibiootikumid võeti kasutusele 20. sajandi alguses. 1928. aastal avastatud penitsilliin tõi endaga kaasa antibiootikumide revolutsiooni, mille tulemusena pikenes inimese keskmine eluiga 23 aastat. Uute ravimite ilmumisel defineeris Selman Waksman antibiootikume esimest korda 1930. aastal kui, „mikroobi poolt valmistatud ühend teiste mikroobide hävitamiseks“. <sup>[1]</sup>

Paljud 20. sajandil avastatud antibiootikumid on ka tänapäeval kasutuses, kuid nende efektiivsus on kadumas resistentsete bakterite tekkega. 2018. aastal väljastatud EbioMedicine ajakirjas, on mainitud ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) uuringut, mis tähendas, et Euroopas määratakse antibiootikume ebavajalikult ja liigselt 30% kuni 50%. <sup>[1,2]</sup>

Lähitulevikuks on prognoositud aina rohkemate resistentsete bakterite teke haiglates, farmides ja laborites. Kuigi uute antibiootikumide avastamine on aeglustunud, on siiski veel palju avastamata keskkondi, kust võib leida uusi variante ja antibiootikumide tüüpe. Lisaks on testimisel bakteriaalsete haiguste ravimine bakteriofaagidega, kus on tähendatud antibiootikumide resistentsuse ja bakteriofaagide resistentsuse üksteiselist välistavust.

Siiski selleks, et aeglustada resistentsuse teket, tuleb üle vaadata kohad, kus antibiootikume kõige rohkem kasutatakse – see tähendab haiglad, laborid ja farmid. Et pidurdada resistsete bakterite teket, tuleks vähendada laialdast antibiootikumide ülekasutust kergeste haiguste ravis ja looma söödas ning suurendada vastumeetmeid puhanguteks, sealhulgas ennetavaid meetmeid nagu varajased detekteerimise võimalused. <sup>[1,3-5]</sup>

## 1.2 Meetodid antibiootikumide sisalduse määramiseks

### 1.2.1 Vedelikkromatograafia

Vedelikkromatograafia on kromatograafiline lahutusmeetod, kus analüütide eraldus toimub vedelas faasis oleva eluendi ja tahkes faasis oleva kolonni või plaadi materjali omavaheliste interaktsioonide toimel.<sup>3,4</sup>

Analüüt või analüütide segu lahustatakse mobiilses faasis, mis suunatakse läbi kolonni. Kolonn on üldjuhul täidetud poorsetest sfäärilisetest osakestest koosneva statsionaarse faasiga. kolonni jõudes hakkavad segu komponendid lahutama.<sup>3-5</sup>

Lahutust mõjutab analüütide afiinsus statsionaarse ja mobiilse faasiga. Testitava aine kolonni läbimise kiirus oleneb aine, laengust, polaarsusest, adsorptsioonist, jaotustegurist jne. Mida tugevamini interakteerub analüüt mobiilse faasiga, seda kiirem on elueerumine, st. seda lühem on tema retentsiooniaeg.<sup>3-5</sup>

Analüütide erinevate omaduste tõttu on nende retentsiooniajad erinevad, mistõttu on meil võimalik neid üksteisest lahutatult tuvastada erinevate detektoritega nagu massispektromeeter või UV-Vis spektromeetriga.<sup>3-5</sup>

### 1.2.2 Pöördfaas kromatograafia

Pöördfaas-kromatograafias (RP – *reverse phase*) kasutatakse RPLC-kolonni, kus statsionaarse faasina käituvad silikageeli pinnal paiknevad mittepolaarsed alküül-ahelad.. Mobiilseks faasiks kasutatakse polaarsest veepõhist lahust (tavaliselt metanooli või atsetonitriili segus veega). Segude lahutamiseks võib kasutada isokraatiliselt või gradient-elueerimist. Gradientelueerimisel langetatakse mobiilse faasi polaarsust orgaanilise eluendi komponendi sisalduse suurendamise teel.

Proovis olevad ained jaotuvad vedelikkromatograafis vastavalt polaarsusele. Madala polaarsusega ühendid jaotuvad eelistatult statsionaarsesse faasi, polaarsed ühendid aga jaotuvad mobiilsesse faasi ja liiguvad sellega läbi kolonni elueerudes esimesena. Üldiselt võib öelda, et hüdrofiilsemad ühendid elueeruvad RPLC kolonnist kiiremini.<sup>6-8</sup>

### 1.2.3 Normaalfaas kromatograafia

Normaalfaas-kromatograafias (NP – *normal phase*) kasutatakse NPLC-koloni, kus statsionaarse faasina kasutatakse polaarseid aineid nagu silikageeliga seotud amino-rühmad, mis seovad endaga polaarseid ühendeid. Mobiilises faasis kasutatakse peamiselt orgaanilisi mittepolaarseid ühendeid nagu heksaan ja heptaan. Nagu ka RPLC's jaotuvad analüüdid enamjaolt polaarsuse tõttu – madalama polaarsusega ained elueerivad kiiremini (kuna ei seondu statsionaarse faasiga tugevalt) ja elueeruvad esimesena. Polaarsed ained elueeruvad aeglasemalt nende afiinsuse tõttu statsionaarse faasi suhtes. NPLC meetodil eelis RPLC-ga võrreldes, võimaldades testida paremini analüüte, mis ei lahustu hästi vees. Lisaks on NPLC-ga mugavam lahutada isomeere.<sup>8-10</sup>

### 1.2.4 Hüdrofiilse interaktsiooni kromatograafia

Hüdrofiilse interaktsiooni kromatograafias kasutatakse koloni, kus statsionaarseks faasiks on polaarne ühend (tavapäraselt poorne silikageel). Mobiilseks faasiks on polaarne orgaaniline eluent, mis sisaldab vähesel määral vett.<sup>11</sup>

Elueerimise käigus seondub polaarne veepõhine faas statsionaarse faasiga ning tekib meta-statsionaarne vee kiht. Mobiilne faas on statsionaarsest faasist madalama polaarsusega orgaanilise lahusti ja vee segu.<sup>12</sup>

Proovi komponentide liikumisel läbi süsteemi jaotuvad polaarsed ühendid suuremal määral mobiilsest faasist meta-statsionaarsesse veefaasi, mistõttu nad liiguvad läbi koloni aeglasemalt. Mida polaarsem on ühend, seda aeglasemalt see elueerub ning mida suurem on vähepolaarse orgaanilise solvendi osa eluendis, seda pikemad on retentsiooniajad.<sup>12,13</sup>

Lisaks kasutatakse HILIC meetodis ka erinevate zwitterioonsete, ioonsete ja polaarsete ühenditega modifitseeritud silikageeli kolonne. Vastavate kolonnide kasutamisel jaotuvad ained lisaks polaarsusele ka laengupõhiselt. Mida tugevam on analüüdi ja statsionaarse faasi laengutevaheline interaktsioon, seda pikem on analüüdi retentsiooniaeg.<sup>13</sup>

## 1.3 Vedelikkromatograafia detektorid

### 1.3.1 UV-Vis spektroskoopia

Ultraviolet-nähtava kiirguse spektroskoopia ehk UV-Vis spektroskoopia on kvantitatiivne meetod, mille juures mõõdetakse analüüdi poolt neelatud valguse määra lainepikkuse vahemikus 190-800 nm. Nimetatud lainepikkuse vahemikus olev valgus suunatakse läbi küveti, mis ei neela määratavas lainepikkuses kiirgust (näiteks kvarts). Selleks, et saada neelatud valguse hulk, tehakse kaks mõõtmist. Esimene mõõtmine tehakse tühja või puhast solventi sisaldava küvetiga, mis tagab taustamõõtmise. Seejärel mõõdetakse neeldumus analüüdiga küvetist, mille tulemusel saadakse neeldumisspekter.<sup>14,15</sup>

Spektril olev neeldumise näit sõltub analüüdi kontsentratsioonist vastavalt Lambert-Beeri seadusele  $A_\lambda = \log_{10}(I_0 / I_1) = \epsilon_\lambda \cdot c \cdot d$ , kus  $A_\lambda$  on valguse neeldumus lainepikkusel  $\lambda$ ,  $I_0$  on esialgse valguse intensiivsus antud lainepikkusel,  $I_1$  on proovi läbinud valguse intensiivsus antud lainepikkusel,  $\epsilon_\lambda$  on ainele omane neeldumistegur antud lainepikkusel,  $c$  on neelava aine kontsentratsioon ja  $d$  on optiline teepikkus. Lambert-Beeri seaduse järgi on neeldunud valguse hulga ja analüüdi kontsentratsiooni vahel lineaarne seos. Vastavat valemit kasutades on võimalik arvutada analüüdi kontsentratsioon teades eelnevalt  $\epsilon_\lambda$ , mida on omakorda võimalik leida töstes lineaarselt ja astmeliselt proovi kontsentratsiooni (kalibreerimine).<sup>14-16</sup>

### 1.3.2 Massispektromeetria

Massispektromeetria on analüütiline meetod, mis määrab analüüdi ja analüüdi fragmentide massi laengu suhte ( $m/z$  suhe). Pärast kromatograafilist lahutust liigub analüüt ioniseerivasse raku (näiteks elektropihustus-ionisatsiooni allikas), kus analüüt muudetakse iooniks. Ioon võib olla kas positiivne (katioon) või negatiivne (anioon).<sup>17,18</sup>

Kvadrupool on neljast metallvardast koosnev süsteem, kus vastamisi olevatele varrastele avaldatakse kindlal sagedusel ja pingel alalisvool (DC – *direct current*) ja vahelduvvool (AC – *alternating current*). Kvadrupooli sisenevale osakesele hakkab mõjuma elektriväli, mis paneb osakese võnkuma.<sup>17,18</sup>

Osakese võnkumise trajektoor metallvarraste vahel sõltub selle massist ja laengust (suuremat massi ja väiksemat laengut on raskem mõjutada) Alalisvool mõjutab suure massi või väikese laenguga osakesi ja AC mõjutab peaaesjalikult väikese massi ja suure laenguga osakesi. <sup>17-19</sup>

Vahelduvvool võngub kahe erineva pinge maksimumi vahel. Positiivse potentsiaali puhul stabiliseerib vahelduvvool positiivset iooni ja surub seda varraste vahelisse ruumi, omades aga negatiivset potentsiaali tõmbab see positiivset iooni varda poole. Mida kergem või mida suurema laenguga on ioon, seda kergem on iooni vahelduvvooluga mõjutada. Samuti oleneb ka iooni liikumine vahelduvvoolu sagedusest – liiga kiirel sagedusel ei jõua ioon elektrivälja muutustele reageerida. Kui osakeste massid on liiga suured või nende laengud liiga väikesed, ei allu need AC mõjutustele ning nende filtreerimine toimub DC toimel. <sup>17-19</sup>

Positiivse potentsiaaliga alalisvool fokuseerib positiivseid ioone varraste vahele. Kui osakeste massid on liiga väikesed või laengud liiga suured, ei suuda DC nende trajektoori stabiliseerida ja osakesed alluvad AC mõjutustele, mille tulemusena tõmmatakse need vastu varrast. <sup>17-19</sup>

Negatiivse potentsiaaliga alalisvool destabiliseerib positiivsete ionide trajektoore. Kui osakeste massid on liiga suured või nende laengud liiga väikesed, ei suuda AC nende trajektoori hoida ja osakesed tõmmatakse DC tõttu vastu varrast. <sup>17-19</sup>

Kombineeritud süsteemis, kus on negatiivse ja positiivse potentsiaaliga alalisvoolu kui ka vahelduvvoolu, tõmmatakse liiga suure massi laengu suhtega ioon negatiivse potentsiaaliga DC poolt vastu varrast. Liiga väikese massi laengu suhtega ioon saab AC poolt liiga suure mõjutuse ja selle trajektoor destabiliseerub ning osake tõmmatakse vastu varrast. Ainult osake, mis omab „õiget“ massi laengu suhet, et mitte destabiliseeruda vahelduvvoolu ega negatiivse alalisvoolu poolt, saab läbida kvadрупooli. Muutes pinget, saame muuta  $m/z$  suhet, mida süsteemi läbiv ioon peab omama. <sup>17-19</sup>

## **1.4 Vedeliku proovide ettevalmistusmeetodid.**

### **1.4.1 Vedelik-vedelik ekstraktsioon**

Vedelik-vedelik ekstraktsioon (LLE – liquid-liquid extraction) on ekstraktsiooni meetod, kus analüüti ekstraheeritakse kasutades kahte teineteises mittesegunevat vedelat faasi. Üldjuhul on üheks faasiks polaarne veefaas ja teiseks faasiks mittepolaarne orgaaniline faas. Ekstraheerimine

toimub tavapäraselt jaotuslehttris. Analüüt jaotub faaside vahel vastavalt jaotusomadustele. Jaotumisel olulisteks omadusteks võivad olla lahustuvus vastavas ekstraheerivas solvendis, polaarsus, vesiniksidemete olemasolu, jne. Vedelike vaheline analüütide ülekanne toimub keemilise potentsiaali tõttu (ülekande lõpuks on süsteem madalamal energiatasemel)<sup>20,21</sup>

Sageli on analüüdid veefaasis. Sellisel juhul lisatakse veeproovile veega mittesegunevat ekstraheerivat solventi. Saadud kahe vedela faasiga süsteemi segatakse tüüpiliselt jaotuslehttris ja siis lastakse faasidel taas üksteisest eralduda. Ekstraheerimise lõpus eraldatakse kaks faasi nende tiheduste põhjal, kus alumine, ehk suurema tihedusega faas lastakse jaotuslehttrist välja esimesena.

<sup>20,21</sup>

### **1.4.2 Tahke faasi ekstraktsioon**

Tahke faasi ekstraktsioon (SPE – solid phase extraction) on ekstraktsiooni meetod, kus analüütide segu lahutatakse nende füüsikaliste ja keemiliste omaduste põhjal. Vedelas faasis olev analüütide segu voolutatakse läbi tahke faasi. <sup>22,23</sup>

Analüüdid jaotuvad vastavalt afiinsusele tahke faasi pinna suhtes. Ained, mis on madala afiinsusega läbivad poorse tahke faasi, kuid ained, mis interakteeruvad tahke faasiga tugevamini, jäävad kinni. Tahkesse faasi kinni jäänud ained saab SPE sorbendi pealt sobiva eluendiga välja pesta. Tahke faas ekstraktsiooni süsteem on väga sarnane vedelikkromatograafias kasutatavate kolonnidega.<sup>22,23</sup>

### **1.4.3 Külmutuskontsentreerimine**

Külmutus kontsentreerimine (FC – freeze concentration) on meetod, mille käigus kontsentreeritakse proov seda külmutades. Jäätumise käigus tekib faasiüleminek kõigepealt lokaliseeritud solvendi alades, kus analüüdi kontsentratsioon on madalaim. Jääkristallide tekkel jääb alles kontsentreeritud analüüdiga solvent. <sup>24,25</sup>

Kontsentreerimisele saab kaasa aidata ka suunatud külmutamisega (PFC – progressive freeze concentration) kus proovi külmutatakse tugevalt kindlast suunast (tavaliselt alt), mis surub kontsentradi jää pinnale. Sellist külmutamist jätkatakse soovitud kontsentratsiooni punktini. <sup>26</sup>

Analüütilises keemias on külmutus kontsentreerimine kasutust leidnud võrdlemisi vähe. Selle asemel on meetod leidnud kasutust suurel määral toiduainetetööstuses, kus seda kasutatakse mahla ja alkoholi kontsentreerimiseks.

Külmutuskontsentreerimise tõi keemiasse esimest korda Joseph Shapiro aastal 1961, kontsentreerides lahjasid proovi segusid vastava meetodiga. Shapiro tööd edasi arendades suutis Robert A. Baker kontsentreerida lahuseid algkontsentratsioonidega  $\mu\text{g/mL}$  kuni  $\text{ng/mL}$ . Meetodi edasiarendus seiskus suuremal määral 1970-date alguses.<sup>24,25</sup>

#### **1.4.4 ICECLES**

ICECLES on meetod, mis kombineerib PFC (suunatud külmutuskontsentreerimise) pöörleva sorbeeriva magnetsegajaga. Pöörlev magnetsegaja suunab lahust pidevalt anuma keskmesse, mis tekitab kontsentratsiooni erinevuse anuma äärtes ja põhjas ning laseb puhtamal jää kergemini nendes alades tekkida.<sup>28,29</sup>

Kombineerides sorbeeriva magnetsegaja PFC'ga on põhjast üles suunatud jäätamise tulemuseks peaaegu täielikult puhtad jääkristallid, enim kontsentreeritud lahus on jää pinnal ja analüüt kontsentreerub magnetsegaja pulga sobendil. Vastava meetodite kombinatsiooni kasutamisel on võimalik saavutada madalamaid määramispiire tänu efektiivsemale kontsentreerimisele. Lisaks on meetodi tundlikkuse tõttu võimalik vähendada proovi suurusi ning meetodi olemuse tõttu on see teostatav ohutute vesilahustega.<sup>28,29</sup>

ICECLES meetod on leidnud kasutust erinevates teadustöodes, sealhulgas töös, kus määrati roheline tee koostist, kui ka töös, kus püüti saavutada pestitsiidide analüüsil ülimalt madalaid määramispiire. Testide käigus saavutati näiteks bromobenseenile määramispiir  $0,4 \text{ nM}$ .<sup>26,27</sup>

#### **1.5.3 Külmutusekstraktsioon**

Käesolevas töös pakutakse välja uudne veeproovide ettevalmistuse meetod, mida nimetatakse külmutusekstraktsiooniks. Külmutusekstraktsiooni võib vaadelda kombinatsioonina vedelikvedelikekstraktsioonist (LLE) ja külmutuskontsentreerimisest (FC). Sarnaselt LLE-ga (ja erinevalt FC-st) lisatakse veeproovile ekstraheerivat lahustit, kuid erinevalt LLE-st on see lahus veega segunev (nt metanool). Nagu FCs, külmutatakse külmutusekstraktsiooni meetodis suuremat hulka proovi, et saavutada proovi kontsentreerumine ekstraktsiooni käigus.

Külmutusekstraktsiooni ei piira ekstraheeriva lahusti segunevus veega. Orgaanilise faasi külmumistemperatuur peab olema madalam veefaasi omast ning faaside eraldumine saavutatakse segu hoidmisega allpool vee külmumistemperatuuri, kuid orgaanilise faasi külmumistemperatuurist kõrgemal temperatuuril.

## 2 Eksperimentaalne osa

### 2.1 Kasutatud seadmed, kemikaalid ja meetodika

Analüüsil kasutati Agilent Technologies 6495 Triple Quad LC/MS massispektromeetrit, Agilent Technologies 1290 Infinity seeria vedelikkromatograafi (autosampler, kõrgsurvepump ja kolonni termostaat).

Kromatograafiline analüüs viidi läbi kasutades Waters XBridge Shield RP C-18 kolonni, mille osakeste suurus oli 3,5 µm ja kolonni mõõtmed olid 3 × 150 mm.

Kolonni termostaadi temperatuur elueerimiste käigus oli 30°C ning autosampleri temperatuur oli 4°C.

Massispektromeeter töötas dünaamilise MRM režiimis. Analüütide retentsiooniajad ja registreerimisel kasutatud üleminekud on toodud tabelis 1.

**Tabel 1.** Töös uuritud ravimite retentsiooniajad ja MS-detekteerimisel registreeritud üleminekud.

Ravim	Eellasiooni m/z	Produktioonide m/z	Retentsiooni aeg min
Amoksitsilliin	366	160/113,9	4,2
Asitromütsiin	749,5	591,4/158	21
Bensüülpenitsilliin	335,1	175,9/159,9	2,6
Karbamasepiin	237	194/179	17,5
Tsefuroksiim	425,1	364/336/81,2/71,2	10
Tsiprofloksatsiin	332	314/231	10
Klaritromütsiin	748,5	590/158	21
Diklofenak	296	250/215	15,6
Doksütsükliin	445	428/154	11,1
Enrofloksatsiin	360	342/316	13,4

Florfenikool	357	337/185	14,5
Marbofloksatsiin	363	345/320	11,5
Norfloksatsiin	320	302/276	9,5
Ofloksatsiin	362	318/261	12
Oksütetratsükliin	461	426/337	4
Sulfadimetoksiin	311	156/92	7
Sulfametoksasool	254	156/92	2,6
Tiamulin	494,1	132,1/119,1	20,5
Triklosaan	289/287	37/35	19

Massispektromeeter kasutas AJS ESI (Agilent Jet Stream Electrospray Ionisation) ionisatsiooni allikat.

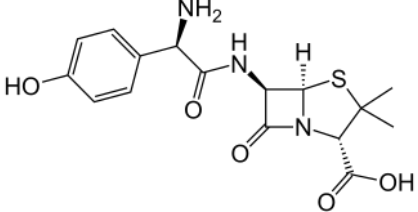
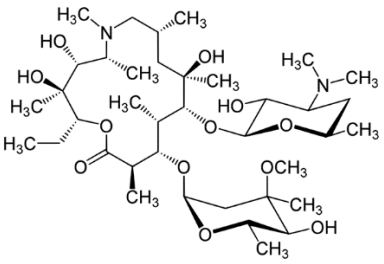
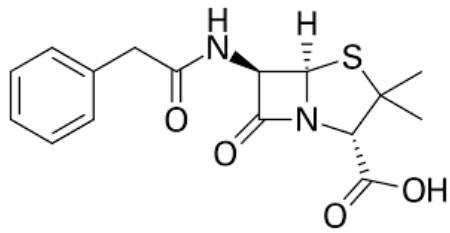
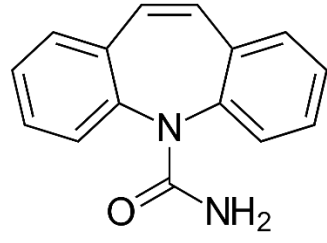
Eluendina kasutati 5 mM HFIP (heksafluoroisopropanool: pH = 9,5) vesilahust ja metanooli (Honeywell, LC-MS grade). Esimesed 6 min hoiti metanooli 2%. Peale seda muutub eluendi komponentide suhe ning 14. minutiks on metanooli sisaldus 55%. Seejärel kiireneb gradiendi muutus ja 19. minutiks jõuab metanool 100%. See eluendi vahekord püsib kuni 25. minutini (6 minutit) peale mida taastub algne vahekord, kus HFIP on 98% ja metanool 2%. See eluendi segu kestab elueerimise lõpuni (10 minutit).

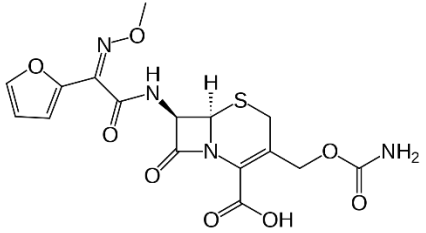
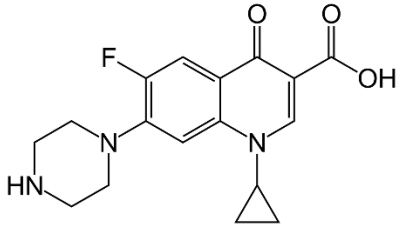
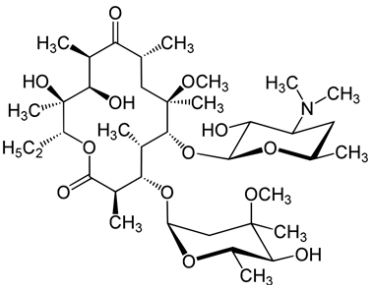
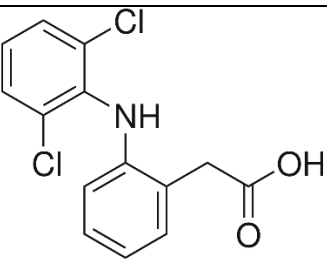
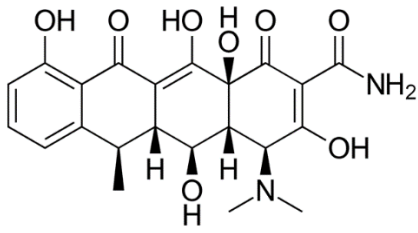
Meetodi kestus on 38 minutit ja eluendi voolukiirus on 0,35 ml/min. Proovi süsti suurus oli 5 µl. Kolonni stabiliseeriti enne teste 40 min.

## 2.2 Kasutatud ained ja lahuste valmistamine

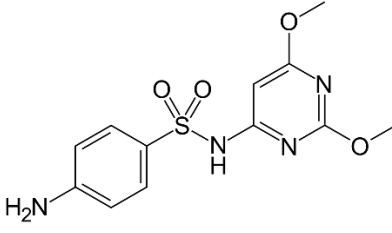
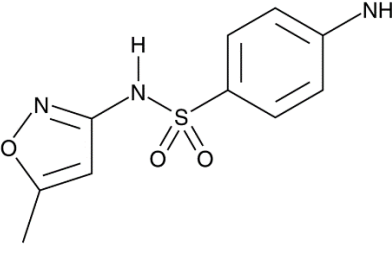
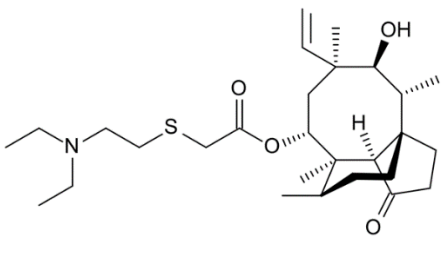
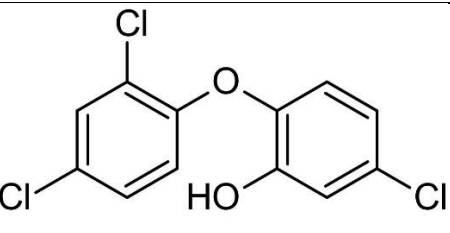
Standardlahuse segu valmistamiseks kasutatud ained, nende molaarmassid ja pKa väärtused on toodud tabelis 2.

**Tabel 2.** Töös uuritud ainete struktuurid, molaarmassid ja pKa väärtused.

Nimetus	Struktuur	Molaarmass	pKa <sup>28</sup>
Amoksitsilliin		365.04 g/mol	tugevaim happeline= 3.23  tugevaim aluseline= 7.43
Asitromütsiin		748.98 g/mol	tugevaim happeline= 12.43  tugevaim aluseline= 9.57
Bensüülpenitsilliin		334.39 g/mol	tugevaim happeline= 3.53  tugevaim aluseline= -2.6
Karbamasepiin		236.26 g/mol	tugevaim happeline= 15.96  tugevaim aluseline= -3.8

Tsefuroksiim		424.38 g/mol	tugevaim happeline= 3.15  tugevaim aluseline= -1.1
Tsiprofloksatsiin		331.34 g/mol	tugevaim happeline= 5.76  tugevaim aluseline= 8.62
Klaritromütsiin		747.95 g/mol	tugevaim happeline= 12.46  tugevaim aluseline= 8.38
Diklofenak		296.14 g/mol	tugevaim happeline= 4  tugevaim aluseline= -2.1
Doksütsükliin		444.44 g/mol	tugevaim happeline= 2.93  tugevaim aluseline= 7.46

Enrofloksatsiin		359.39 g/mol	tugevaim happeline= 5.69  tugevaim aluseline= 6.68
Florfenikool		358.21 g/mol	tugevaim happeline= 8.49  tugevaim aluseline= -3.4
Marbofloksatsiin		362.36 g/mol	tugevaim happeline= 5.38  tugevaim aluseline= 6.16
Norfloksatsiin		319.33	tugevaim happeline= 5.77  tugevaim aluseline= 8.68
Ofloksatsiin		361.37 g/mol	tugevaim happeline= 5.45  tugevaim aluseline= 6.2
Oksütetratsükliin		460.43 g/mol	tugevaim happeline= 2.84  tugevaim aluseline= 7.41

Sulfadimetoksiin		310.33 g/mol	tugevaim happeline= 2.11 tugevaim aluseline= 6.17
Sulfametoksasool		253.28 g/mol	tugevaim happeline= 1.97 tugevaim aluseline= 6.61
Tiamulin		493.74 g/mol	tugevaim happeline= 14.43 tugevaim aluseline= 9.51
Triklosaan		289.54 g/mol	tugevaim happeline= 7.68 tugevaim aluseline= -6.7

Standardsegu jaoks lisati 10 ml solvendi (5 mM HFIP) sisse 10 µl igat analüüti kontsentratsiooniga 1000 ppm. Standardlahuse lõppkontsentratsiooniks jäi ~1000 ppb.

HFIP puhver valmistati vastavalt: 2 liitrile MilliQ veele lisati 1050 µl HFIP kontsentraati ning 5700 µl ammoniumhüdrosiid. Seejärel filtreeriti puhvrit kasutades 0,22 µm poori suurusega Durapore PVDF Membrane filtrit ja vaakumpumpa. Valminud 5 mM puhvri pH oli 9,6. HFIP puhvrit kasutati eluendina vedelikkromatograafias.

Proovis veefaasina kasutatavate lahuste valmistamiseks kasutati: MilliQ vett (Milli-Q IQ 7000, ultrapure grade), sipelghapet (Honeywell, LC-MS grade), amooniumatsetaati (Fluka, LC-MS grade), dinaatriumvesinikfosfaati (Reakhim, 99% pure) ja ammoniumhüdrosiidi.

Käesolevas töös kasutati proovina MilliQ vett, milles lahustati analüüsitavad ained. Kuna võib eeldada, et külmutusekstraheerimise saagis sõltub oluliselt proovi pH-st, siis valmistati neli erineva pH-ga lahust. Lahused valmistati eelnevalt pestud 2,5 l klaaspudelitesse..

### **Proov pH2**

Milli-Q IQ 7000 veesüsteemi mõõtorežiimi kasutades, mõõdeti 2,475 l MilliQ vett, millele lisati 25 ml ~100% sipelghapet. Lahuse pH oli 2,2.

### **Proov pH4**

2,5 liitrile MilliQ veele lisati 35,5 g dinaatriumvesinikfosfaati. Soola lahustumisele kaasa aitamiseks kasutati magnetsegajat. pH reguleeriti 4,1 peale, lisades sellele 12 ml ~100% sipelghapet.

### **Proov pH6**

2,5 liitrile MilliQ veele lisati 3,0095g amooniumatsetaati. Segatud lahuse pH kontrolliti eeldatud vahemikus kalibreeritud pH-meetriga, mille tulemuseks oli 6,3.

### **Proov pH9**

2,5 liitrile MilliQ veele lisati 9,6335 g amooniumatsetaati. Lahuse pH reguleeriti 8,7 peale lisades 2.1 ml ammoniumhüdrosiidi.

## **2.3 Proovide valmistamine**

Külmutusekstraktsiooni proovid valmistati reguleeritud pH-ga vesilahuste segamisel ravimite standardsegu ja orgaanilise solvendiga (ekstraheeriv lahusti). Proovid valmistati eelnevalt põhjalikult pestud 0,5 liitristesse Kellukese limonaadi (PET – polüetüleentereftalaat) pudelitesse. Pudelikujulid valiti nende kuju, soodsa hinna ja kerge kättesaadavuse tõttu. Oluline on ka pudeli vastupidavus vee külmumisel ja keemiline püsivus metanooli ning atsetonitriili suhtes. Pudelikuju

kasutades oli võimalik peale vee faasi jäätamist kergelt kätte saada vedel orgaaniline faas. Pudelitesse lisati 380 ml kindla pH-ga vesilahust, 20 ml vastavat ekstraheerivat orgaanilist solvienti ning 400 µl ravimite standardlahust (~400 ppb), mille tulemuseks oli ~1 ppb kontsentratsiooniga proov. Proovide valmistamiseks kasutatud ained ja ainete hulgad on näha tabelis 3.

**Tabel 3.** Proovide valmistamiseks kasutatavad ained vastavalt proovi numbrile.

Proovi nr	Puhver	Orgaanile solvent	Standard lahus ml
1 (tühiproov)	380 ml lahust pH 2,15	20 ml Atsetonitriil	0
2	380 ml lahust pH 2,15	20 ml Atsetonitriil	0,4
3	380 ml lahust pH 2,15	20 ml Atsetonitriil	0,4
4	380 ml lahust pH 2,15	20 ml Metanool	0,4
5	380 ml lahust pH 2,15	20 ml Metanool	0,4
6 (tühiproov)	380 ml lahust pH 2,15	20 ml Metanool	0
7 (tühiproov)	380 ml lahust pH 8,8	20 ml Atsetonitriil	0
8	380 ml lahust pH 8,8	20 ml Atsetonitriil	0,4
9	380 ml lahust pH 8,8	20 ml Atsetonitriil	0,4
10	380 ml lahust pH 8,8	20 ml Metanool	0,4
11	380 ml lahust pH 8,8	20 ml Metanool	0,4
12 (tühiproov)	380 ml lahust pH 8,8	20 ml Metanool	0
13 (tühiproov)	380 ml lahust pH 5,7	20 ml Atsetonitriil	0
14	380 ml lahust pH 5,7	20 ml Atsetonitriil	0,4
15	380 ml lahust H 5,7	20 ml Atsetonitriil	0,4
16	380 ml lahust pH 5,7	20 ml Metanool	0,4
17	380 ml lahust pH 5,7	20 ml Metanool	0,4

18 (tühiproov)	380 ml lahust pH 5,7	20 ml Metanool	0
19 (tühiproov)	380 ml lahust pH 3,85	20 ml Atsetonitriil	0
20	380 ml lahust pH 3,85	20 ml Atsetonitriil	0,4
21	380 ml lahust pH 3,85	20 ml Atsetonitriil	0,4
22	380 ml lahust pH 3,85	20 ml Metanool	0,4
23	380 ml lahust pH 3,85	20 ml Metanool	0,4
24 (tühiproov)	380 ml lahust pH 3,85	20 ml Metanool	0

Peale proovide valmistamist, võeti igast proovipudelist 1 ml LC-MS analüüsiks ja viidi proovid külmikuruumi (temperatuur  $(-17\pm 3)^{\circ}\text{C}$ ). Proovide külmutamise käigus toimub teoreetiliselt kolm erinevat protsessi: vedelik-vedelik ekstraktsioon veefaasi ja eralduva orgaanilise faasi vahel, tahke faasi ekstraktsioon poorse jää ja vedela faasi vahel ning (puhta) vee eelis jäätumine. Proovi jahtudes hakkab veefaas jäätuma esimesena lokaliseeritud alades, kus analüüdi ja orgaanilise faasi kontsentratsioon on madalaim.

## 2.4 Proovide LC-MS analüüs

Iga proovipudeli sisu analüüsiti kolmel korral:

1. Igast pudelist võeti 1 ml enne külmutamist.
2. Jää pealt eraldati dekanteerimise teel ekstraheeriv lahusti, keskmiselt 2-4 ml millest võeti testimiseks 1 ml.
3. Pärast jää sulamist (1 ml).

Võetud proovihulgad filtreeriti läbi 0,22  $\mu\text{m}$  poorisuurusega CHROMAFIL Xtra RC-20/25 süstalfiltrite ning seejärel analüüsiti LC-MS meetodil.

## 3 Tulemused ja arutelu

### 3.1 Kvalitatiivne analüüs

Töös kasutati kunstlike proovide valmistamiseks standardsegu 19 erineva analüüdiga (17 antibiootikumi, 1 põletikuvastane ja 1 krambivastane ravim). Samadest ainetest valmistati ka kalibreerimislahused. Töös ei õnnestunud kõigile analüütidele saada lineaarseid kalibreerimisgraafikuid. Samuti olid mõnel juhul probleemiks analüütide piikide kujud ja varieeruv retentsiooniaeg. Selle tõttu ei olnud võimalik läbi viia nelja analüüdi kvantitatiivset määramist ja järgnevas kvantitatiivses analüüsis ei vaadelda amoksitsilliini, doksütsükliini, tsefuroksiimi ja norfloksatsiini tulemusi.

Vastupidiselt eelnevalt nimetatud ainetele, võis testide tulemustest näha üldjuhul kenasid piike järgmistele ainetele: bensüülpenitsilliin, sulfametoksasool, oksütetratsükliin, sulfadimetoksiin, tsiprofloksatsiin, marbofloksatsiin, ofloksatsiin, enrofloksatsiin, diklofenak, karbamasepiin, tiamulin. Nende analüütide retentsiooniaegu ja piike on võimalik näha Lisa 1 alt. Vastavad ained on kasutuses kvantitatiivses analüüsis. Samuti on näha eelnimetatud ainete piigid iga proovi külmutuseelse ja orgaanilise faasi testi kromatogrammide võrdlustes (välja arvatud tühiproovid). (Vt. Lisa 1).

Lisaks osalevad kvantitatiivses analüüsis ka florfenikool, triklosaan, klaritromütsiin, asitromütsiin, mille piigid olid teistega võrreldes küll madala intensiivsusega, kuid millele siiski sai teha kvantitatiivset analüüsi.

### 3.2 Kvantitatiivne analüüs

**Bensüülpenitsilliini** baasiks kasutatav külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid 1 ppb ümbrusesse pH-del 6,3 ja 8,6, kuid tõusid 2 kuni 3,5-ni vastavalt pH-del 4,1 ja 2,2. Selle järgi võib arvata, et bensüülpenitsilliin lahustub paremini happelisemas keskkonnas ja on seetõttu suuremas koguses proovides, mille pH on madalam.

Orgaanilise faasi kontsentreerunud proovides oli näha mitmeid erinevusi. pH 2 juures ei olnud signaali proovides, mille ekstraheerivaks lahustiks oli atsetonitril, kuid andsid numbriliselt suurima signaali proovides, kus ekstraheerivaks lahustiks oli metanool. Kõige suurema

protsendilise kasvu andsid testis pH 6 juures, kus keskmine signaali tugevus kasvas 4,86 korda. Selle pH juures suudeti orgaanilisest faasist määrata keskmiselt 22% kuid maksimaalselt kuni 28% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 14,88%, pH 4 – 7,05%, pH 6 – 22,36% ja pH 8 – 16,52%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 2,85 korda. Suurused arvatati tabel 4 põhjal.

**Tabel 4.** Bensüülpenitsilliini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis. Nr – proovi number, Kirjeldus – proovi tüübi kirjeldus, C(prefrz) – külmutuseelse proovi kontsentratsioon, C(org) – orgaanilise faasi kontsentratsioon, C(Org, theor) – orgaanilise faasi kontsentratsiooni teoreetiline maksimum, C(melt) – sulatatud ekstrakti kontsentratsioon, % - orgaanilise kontsentratsiooni protsent teoreetilisest kontsentratsioonist, Jaotussuhe – orgaanilise faasi kontsentratsiooni ja külmutuseelse proovi kontsentratsioonide jagatis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	Sample	3.72	0.00	74.44	3.09	0	0.00
3	Sample	3.61	0.00	72.18	5.56	0	0.00
4	Sample	3.39	9.98	67.73	3.32	15	2.95
5	Sample	3.30	9.93	66.07	3.39	15	3.00
6	Blank	0.00	0.01	0.00	0.00		
7	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	Sample	1.09	4.07	21.70	0.97	19	3.75
9	Sample	1.03	1.95	20.52	0.94	10	1.90
10	Sample	1.08	4.84	21.64	0.98	22	4.47
11	Sample	1.05	3.25	20.97	0.88	15	3.10
12	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
13	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
14	Sample	1.08	4.86	21.66	1.07	22	4.49
15	Sample	1.12	6.34	22.45	1.11	28	5.65
16	Sample	1.04	4.63	20.72	1.12	22	4.47
17	Sample	1.09	3.59	21.89	1.03	16	3.28
18	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
19	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
20	Sample	1.93	3.02	38.57	2.47	8	1.57
21	Sample	1.90	1.86	38.01	2.51	5	0.98
22	Sample	1.97	3.11	39.30	2.51	8	1.58
23	Sample	2.05	3.11	40.99	2.51	8	1.52
24	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
						average	2,85

**Sulfametoksasool** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid kõik 1 ppb ümbrusesse. Orgaanilise faasi proovid olid samuti üpris ühtlased. Taaskord ei olnud pH 2 juures signaali proovides, mille ekstraheerivaks lahustiks oli atsetonitriil ja selletõttu jäävad need proovid arvutustest välja. Sarnaselt bensüülpenitsilliinile annab suurima signaali kasvu pH 6 paiknev proov,

kus keskmine signaali kasv oli 3,87 korda ning maksimaalne kasv oli 5,24 korda. Vastava pH juures suudeti orgaanilisest faasist määrata keskmiselt 19,36% ning maksimaalselt 26,2% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 10,16%, pH 4 – 7,5%, pH 6 – 19,36% ja pH 8 – 18,61%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasis 2,70 korda. Suurused arvutati tabel 5 põhjal.

**Tabel 5.** Sulfametoksasooli arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.05	0.05	1.00	0.00		
2	Sample	1.00	0.18	20.02	0.67	1	0.18
3	Sample	0.96	0.15	19.13	0.93	1	0.16
4	Sample	0.98	2.12	19.56	0.86	11	2.16
5	Sample	1.02	1.94	20.42	0.86	10	1.90
6	Blank	0.05	0.05	1.00	0.05		
7	Blank	0.06	0.11	1.18	0.06		
8	Sample	1.09	4.95	21.78	1.20	23	4.54
9	Sample	1.05	4.12	21.07	1.28	20	3.92
10	Sample	1.05	3.97	21.06	1.22	19	3.77
11	Sample	1.11	2.94	22.14	1.16	13	2.65
12	Blank	0.10	0.27	2.01	0.14		
13	Blank	0.05	0.05	0.99	0.05		
14	Sample	1.04	3.85	20.85	1.09	18	3.69
15	Sample	1.08	5.63	21.51	1.19	26	5.24
16	Sample	1.05	3.95	20.97	1.18	19	3.77
17	Sample	1.08	3.01	21.58	1.10	14	2.79
18	Blank	0.05	0.06	1.01	0.05		
19	Blank	0.05	0.06	1.02	0.05		
20	Sample	1.10	2.20	22.09	1.10	10	1.99
21	Sample	1.07	0.38	21.35	1.05	2	0.35
22	Sample	1.08	1.95	21.61	1.15	9	1.80
23	Sample	1.07	1.98	21.39	1.11	9	1.85
24	Blank	0.05	0.06	1.02	0.00		
						average	2.70

**Oksütetratsükliini** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid keskmiselt 0,83 ppb ümbrusesse. Kõige madalamad baasjooned esinesid pH 8,6 juures, kus keskmiseks kontsentratsiooniks oli 0,7 ppb.

Orgaanilise faasi proovides oli taaskord näha signaali puudulikust pH 2 asuvate proovide juures mille ekstraheerivaks lahustiks oli atsetonitriil. Samuti andis taaskord kõige suurema protsendilise kasvu pH 6 juures olevad proovid, kus keskmine signaali tugevus kasvas 4,35 korda. Vastava pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 21,77% ja maksimaalselt 25,67% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 13,71%, pH 4 – 11,54%,

pH 6 – 21,77% ja pH 8 – 14,10%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 2,89 korda. Suurused arvutati tabel 6 põhjal.

**Tabel 6.** Oksütetratsükliini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, teor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.06	0.06	1.16	0.00		
2	Sample	0.88	0.11	17.56	0.99	1	0.13
3	Sample	0.90	0.73	17.91	1.45	4	0.82
4	Sample	0.86	2.36	17.21	0.90	14	2.75
5	Sample	0.88	2.40	17.52	0.92	14	2.74
6	Blank	0.06	0.06	1.19	0.06		
7	Blank	0.06	0.06	1.16	0.06		
8	Sample	0.71	2.84	14.13	0.44	20	4.02
9	Sample	0.70	0.70	13.98	0.45	5	1.00
10	Sample	0.70	2.53	13.91	0.48	18	3.64
11	Sample	0.72	1.88	14.34	0.49	13	2.63
12	Blank	0.06	0.06	1.16	0.06		
13	Blank	0.06	0.06	1.16	0.06		
14	Sample	0.79	3.38	15.81	0.75	21	4.28
15	Sample	0.80	4.11	16.00	0.82	26	5.13
16	Sample	0.75	3.39	15.05	0.68	23	4.50
17	Sample	0.78	2.73	15.60	0.73	18	3.50
18	Blank	0.00	0.06	0.00	0.06		
19	Blank	0.06	0.13	1.17	0.07		
20	Sample	0.97	2.63	19.36	0.87	14	2.71
21	Sample	0.97	0.06	19.40	0.94	0	0.06
22	Sample	1.00	2.95	19.93	0.91	15	2.96
23	Sample	0.97	3.40	19.39	0.90	18	3.51
24	Blank	0.07	0.06	1.36	0.00		
						average	2,89

**Sulfadimetoksiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid üldjuhul keskmiselt 1 ppb ümbrusesse. Samas oli proov nr. 9 kontsentratsiooniks 1,87 ppb ja proov nr. 4 kontsentratsiooniks 1,51 ppb.

Ka seekord puudus orgaanilise faasi proovides signaali pH 2 proovides, mille ekstraheerivaks lahustiks oli atsetonitriil. Lisaks puudub täielikult signaal pH 4 proovides. Kõige suurem protsendiline kasv tuli seekord pH 8,6 juures olevatelt proovidelt, kus keskmine signaali tugevus kasvas 5,15 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 25,77% ja maksimaalselt 37,97% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on

vastavalt: pH 2 – 14,85%, pH 4 – 0%, pH 6 – 20,38% ja pH 8 – 25,77%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 3,9 korda. Suurused arvatati tabel 7 põhjal.

**Tabel 7.** Sulfadimetoksiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.32	1.74	6.31	0.00		
2	Sample	1.39	0.00	27.89	3.37	0	0
3	Sample	1.12	0.00	22.30	2.35	0	0
4	Sample	1.51	4.64	30.21	1.95	15	3.07
5	Sample	1.23	3.54	24.68	1.54	14	2.86
6	Blank	0.35	2.02	7.02	0.61		
7	Blank	0.14	0.38	2.89	0.53		
8	Sample	1.31	9.92	26.12	1.88	38	7.59
9	Sample	1.88	7.28	37.52	3.74	19	3.88
10	Sample	1.18	6.71	23.67	1.86	28	5.67
11	Sample	1.00	3.48	20.09	1.22	17	3.47
12	Blank	0.08	0.18	1.65	0.10		
13	Blank	0.06	0.00	1.14	0.06		
14	Sample	1.07	4.46	21.45	1.15	21	4.15
15	Sample	1.09	5.15	21.88	1.22	24	4.71
16	Sample	1.00	4.41	19.96	1.25	22	4.42
17	Sample	1.09	3.31	21.86	1.15	15	3.03
18	Blank	0.06	0.07	1.16	0.06		
19	Blank	0.06	0.06	1.16	0.06		
20	Sample	1.03	0.00	20.57	1.16	0	0
21	Sample	1.04	0.00	20.80	1.12	0	0
22	Sample	0.98	0.00	19.65	1.15	0	0
23	Sample	0.98	0.00	19.52	1.13	0	0
24	Blank	0.06	0.06	1.15	0.00		
average							3,90

**Tsiprofloksatsiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid keskmiselt 1 ppb ümbrusesse välja arvatud pH 4 proovid, kus signaal praktiliselt puudub.

Tsiprofloksatsiin puudus orgaanilise faasi proovides, mille pH oli 4. Samas vastuoluliselt eelnevalt toodud ainetele oli tsiprofloksatsiin signaal kõige tugevam pH 2 proovides, mille ekstraheeriv lahus oli atsetonitriil. Vastavalt andis ka kõige suurem protsendilise kasvu pH 2. Sellel pH-l tehtud testide keskmine signaali tugevus kasvas 8,5 korda. Vastava pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 42,48% ja maksimaalselt 68,61% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 42,48%, pH 4 – 3,74%, pH 6 – 25,5% ja pH 8 – 18,91%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 5,35 korda. Suurused arvatati tabel 8 põhjal.

**Tabel 8.** Tsiprofloksatsiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.13	0.12	2.57	0.00		
2	Sample	0.98	13.49	19.67	1.30	69	13.72
3	Sample	1.03	13.63	20.68	1.81	66	13.18
4	Sample	0.91	3.27	18.17	0.90	18	3.60
5	Sample	0.95	3.32	19.09	0.98	17	3.48
6	Blank	0.11	0.12	2.29	0.11		
7	Blank	0.17	0.11	3.46	0.12		
8	Sample	1.06	6.28	21.14	1.12	30	5.94
9	Sample	1.06	1.74	21.15	1.13	8	1.65
10	Sample	1.05	4.66	21.08	1.26	22	4.42
11	Sample	1.08	3.36	21.53	1.00	16	3.12
12	Blank	0.13	0.11	2.56	0.11		
13	Blank	0.15	0.11	3.10	0.11		
14	Sample	0.94	4.62	18.71	0.92	25	4.94
15	Sample	0.86	6.03	17.29	1.02	35	6.98
16	Sample	0.86	4.30	17.11	0.99	25	5.02
17	Sample	0.92	3.19	18.47	0.89	17	3.46
18	Blank	0.11	0.12	2.21	0.11		
19	Blank	0.11	0.11	2.16	0.11		
20	Sample	0.11	0.11	2.16	0.11	5	1.00
21	Sample	0.11	0.11	2.15	0.11	5	1.00
22	Sample	0.11	0.00	2.15	0.11	0	0.00
23	Sample	0.11	0.11	2.17	0.11	5	0.99
24	Blank	0.11	0.11	2.15	0.00		
						average	5,35

**Marbofloksatsiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid samuti keskmiselt 1 ppb ümbrusesse, kuid taaskord ei olnud pH 4 proovides signaali.

Samuti puudus ka orgaanilise faasi proovides, mille pH oli 4, signaal. Nagu ka tsiprofloksatsiinis, on marbofloksatsiini signaal kõige tugevam pH 2 proovides, mille ekstraheeriv lahus oli atsetonitril. Kõige suurem protsendiline kasv toimus pH 2 juures. Testide keskmine signaali tugevus kasvas 6,71 korda pH 2 juures. Samuti määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 33,55% ja maksimaalselt 52,30% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 33,55%, pH 4 – 0%, pH 6 – 21,11% ja pH 8 – 16,81%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 4,40 korda. Suurused arvutati tabel 9 põhjal.

**Tabel 9.** Marbofloksatsiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.10	0.10	1.97	0.00		
2	Sample	0.91	9.48	18.13	1.28	52	10.46
3	Sample	0.98	9.70	19.54	1.67	50	9.92
4	Sample	0.87	2.93	17.47	0.95	17	3.36

5	Sample	0.89	2.77	17.88	0.99	16	3.10
6	Blank	0.10	0.10	1.95	0.10		
7	Blank	0.10	0.10	1.97	0.10		
8	Sample	1.03	5.36	20.58	1.10	26	5.21
9	Sample	1.02	1.69	20.42	1.14	8	1.66
10	Sample	1.03	3.95	20.65	1.22	19	3.83
11	Sample	1.05	2.89	20.96	1.06	14	2.75
12	Blank	0.10	0.10	1.97	0.10		
13	Blank	0.10	0.10	1.94	0.10		
14	Sample	0.96	3.85	19.24	1.01	20	4.00
15	Sample	0.93	5.31	18.51	1.05	29	5.74
16	Sample	0.95	3.95	19.03	1.06	21	4.15
17	Sample	0.97	2.90	19.36	0.92	15	3.00
18	Blank	0.10	0.10	1.97	0.10		
19	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
20	Sample	0.00	0.10	0.00	0.10	-	-
21	Sample	0.00	0.10	0.00	0.00	-	-
22	Sample	0.00	0.10	0.00	0.00	-	-
23	Sample	0.00	0.00	0.00	0.00	-	-
24	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
						average	4,40

**Ofloksatsiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid, nagu ka marbofloksatsiinil, keskmiselt 1 ppb ümbrusesse välja arvatud pH 4, proovid millel puudus signaal.

Taaskord puudus signaal orgaanilise faasi proovides, mille pH oli 4. Nagu ka eelnevatel kahel ainel, on ofloksatsiini signaal kõige tugevam pH 2 proovides, kus ekstraheerivaks lahuseks oli atsetonitriil. pH 2 andis ka kõige suurem protsendilise kasvu. Sellel pH-l tehtud testide keskmine signaali tugevus kasvas 6,75 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 33,73% ja maksimaalselt 52,91% teoreetilisest maksimumist. pH--de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 33,73%, pH 4 – ~0%, pH 6 – 22,43% ja pH 8 – 18,79%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 4,61 korda. Suurused arvatati tabel 10 põhjal.

**Tabel 10.** Ofloksatsiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.06	0.06	1.12	0.00		
2	Sample	0.90	9.52	18.00	1.28	53	10.58
3	Sample	0.94	9.63	18.79	1.72	51	10.25
4	Sample	0.88	2.80	17.62	0.97	16	3.18
5	Sample	0.93	2.75	18.51	0.99	15	2.97
6	Blank	0.06	0.06	1.14	0.06		

7	Blank	0.06	0.05	1.13	0.06			
8	Sample	0.94	5.23	18.77	1.06	28	5.57	
9	Sample	0.98	2.13	19.55	1.01	11	2.18	
10	Sample	0.95	4.02	19.03	1.13	21	4.22	
11	Sample	0.91	2.79	18.21	1.00	15	3.06	
12	Blank	0.06	0.06	1.18	0.05			
13	Blank	0.06	0.06	1.12	0.05			
14	Sample	0.91	3.85	18.21	0.91	21	4.23	
15	Sample	0.86	5.14	17.19	1.01	30	5.97	
16	Sample	0.84	3.87	16.87	0.98	23	4.59	
17	Sample	0.88	2.76	17.52	0.91	16	3.15	
18	Blank	0.05	0.06	1.09	0.05			
19	Blank	0.05	0.05	1.00	0.05			
20	Sample	0.05	0.06	1.07	0.05	5	1.06	
21	Sample	0.05	0.08	1.06	0.05	7	1.47	
22	Sample	0.05	0.06	1.06	0.05	5	1.07	
23	Sample	0.05	0.06	1.06	0.05	5	1.06	
24	Blank	0.05	0.05	1.01	0.00			
							average	4,61

**Enrofloksatsiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid üldjuhul 0,8 ppb ümbrusesse, kuid pH 4 proovid jäid 0,31 ppb ümbrusesse.

Taaskord oli signaal kõige tugevam pH 2 proovides, kus ekstraheerivaks lahuseks oli atsetonitriil, kuid ka pH 8 ja pH 6 signaalid olid tugevad. Siiski andis pH 2 kõige suurem protsendilise kasvu, kus testide keskmine signaali tugevus kasvas 7,46 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 37,32% ja maksimaalselt 59,57% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 37,32%, pH 4 – 10,56%, pH 6 – 24,12% ja pH 8 – 20,29%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 4,61 korda. Suurused arvatati tabel 11 põhjal.

**Tabel 11.** Enrofloksatsiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, teor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.08	0.08	1.56	0.00		
2	Sample	0.81	9.67	16.25	1.09	60	11.91
3	Sample	0.85	10.15	17.04	1.51	60	11.91
4	Sample	0.79	2.35	15.71	0.80	15	2.99
5	Sample	0.82	2.49	16.33	0.86	15	3.05
6	Blank	0.08	0.09	1.58	0.08		
7	Blank	0.08	0.08	1.58	0.08		
8	Sample	0.86	4.83	17.14	1.01	28	5.64
9	Sample	0.88	2.96	17.63	0.99	17	3.36
10	Sample	0.87	3.72	17.47	1.07	21	4.26
11	Sample	0.87	2.60	17.48	0.96	15	2.97

12	Blank	0.08	0.08	1.57	0.08			
13	Blank	0.08	0.08	1.60	0.08			
14	Sample	0.82	3.57	16.38	0.90	22	4.36	
15	Sample	0.73	5.04	14.57	0.96	35	6.92	
16	Sample	0.76	3.37	15.11	0.87	22	4.46	
17	Sample	0.73	2.60	14.62	0.82	18	3.55	
18	Blank	0.08	0.09	1.57	0.08			
19	Blank	0.00	0.08	0.00	0.08			
20	Sample	0.32	0.62	6.44	0.36	10	1.92	
21	Sample	0.31	0.85	6.26	0.36	14	2.73	
22	Sample	0.31	0.60	6.22	0.35	10	1.94	
23	Sample	0.31	0.58	6.24	0.34	9	1.86	
24	Blank	0.0771	0.0788	1.5424	0.0000			
							average	4,61

**Florfenikool** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid 1 ppb lähedusse, kuid pH 4 proovid jäid keskmiselt 1,53 ppb ümbrusesse.

Signaalide tugevus jaotus taaskord pH 2 proovides, kus ekstraheerivaks lahuseks oli atsetonitriil, kuid suurim signaal tuli pH 8,6 ühelt atsetonitriili kasutanud proovilt. Proov nr 9 (pH 8,6) andis ümardatult 20 kordse signaali, mis tähendaks florofenikooli 100% ekstraktsiooni jää faasist. Kõrval olev samade parameetritega testi signaaliks oli ümardatult 21% teoreetilisest maksimumist. Sel puhul võib tegu olla kas vähetõenäolise perfektse külmutusega või mõõtmisveaga. Oletades, et tegemist on mõõteveaga jätan 9. proovi arvutustest välja. pH 2 kõige suurema saagisega, kus testide keskmine signaali tugevus kasvas 6,38 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 31,91% ja maksimaalselt 52,25% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 31,91%, pH 4 – 14,59%, pH 6 – 18,47% ja pH 8 – 18,17%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 5,19 korda koos ja 4,19 ilma eelnimetatud proovita. Suurused arvutati tabel 12 põhjal.

**Tabel 12.** Florfenikooli arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, teor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.29	0.25	5.75	0.00		
2	Sample	1.02	10.70	20.48	1.44	52	10.45
3	Sample	0.94	9.30	18.81	1.76	49	9.88
4	Sample	0.97	2.58	19.47	1.09	13	2.65
5	Sample	1.09	2.78	21.86	1.16	13	2.54
6	Blank	0.21	0.16	4.21	0.16		
7	Blank	0.20	0.21	3.95	0.18		
8	Sample	1.10	5.10	21.94	1.10	23	4.65
9	Sample	0.98	19.72	19.61	1.74	101	20.10
10	Sample	1.02	3.55	20.32	1.14	17	3.49
11	Sample	0.94	2.60	18.82	0.77	14	2.76

12	Blank	0.16	0.14	3.29	0.20			
13	Blank	0.19	0.16	3.79	0.16			
14	Sample	0.97	3.74	19.42	1.04	19	3.85	
15	Sample	0.99	5.03	19.88	1.08	25	5.06	
16	Sample	1.02	3.43	20.38	1.06	17	3.37	
17	Sample	1.11	2.77	22.17	0.98	12	2.50	
18	Blank	0.18	0.16	3.63	0.18			
19	Blank	0.15	0.17	2.93	0.00			
20	Sample	1.53	4.59	30.63	1.86	15	3.00	
21	Sample	1.64	4.19	32.87	1.72	13	2.55	
22	Sample	1.52	4.84	30.49	1.83	16	3.18	
23	Sample	1.56	4.60	31.26	1.70	15	2.95	
24	Blank	0.18	0.17	3.62	0.00			
							average	4,19

**Diklofenak** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonides puudusid signaalid. See võis tulla diklofenaki heterogeensusest valmistatud proovis. Samuti oli töö käigus raskusi diklofenaki lahuse valmistamisega aine halva lahustuvuse tõttu.

Külmutuseelsete proovide signaalide puudumise tõttu oli võimatu teha arvutusi, kuid oli siiski näha diklofenaki signaali suurenemist orgaanilise faasi kontsentraadis. Suurimad arvatud kontsentratsioonid olid taaskord pH 2 testides, kus oli kasutusel atsetonitril ning proovis nr 9. Oletades, et diklofenaki algne kontsentratsioon oleks olnud 1 ppb, oli keskmine signaali kasv 3-5 kord (va. erandid nagu proov nr 9 ja pH 2 atsetonitrili testid) välja arvatud pH 4, kus keskmine kontsentratsioon oli 0,4 ppb. Suurused arvutati tabel 13 põhjal.

**Tabel 13.** Diklofenaki arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	Sample	0.00	11.48	0.00	0.33	-	-
3	Sample	0.00	12.56	0.00	0.86	-	-
4	Sample	0.00	1.74	0.00	0.00	-	-
5	Sample	0.00	1.69	0.00	0.00	-	-
6	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
7	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	Sample	0.06	5.36	1.29	0.36	416	83.10
9	Sample	0.08	17.92	1.62	0.96	1109	221.85
10	Sample	0.12	3.74	2.42	0.46	155	30.93
11	Sample	0.12	2.34	2.48	0.28	94	18.88
12	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
13	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
14	Sample	0.04	3.70	0.86	0.21	432	86.33
15	Sample	0.04	5.72	0.89	0.33	646	129.13
16	Sample	0.06	3.79	1.22	0.33	310	61.98
17	Sample	0.00	2.38	0.00	0.21	-	-
18	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
19	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		

20	Sample	0.00	0.66	0.00	0.00	-	-	
21	Sample	0.00	0.23	0.00	0.00	-	-	
22	Sample	0.00	0.43	0.00	0.00	-	-	
23	Sample	0.00	0.45	0.00	0.00	-	-	
24	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00			
							average	68.39

**Karbamasepiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid kõik 1 ppb ümbrusesse. Taaskord oli signaal kõige tugevam pH 2 proovides, kus ekstraheerivaks lahuseks oli atsetonitriil, ja proovis nr 9. Jällegi oli proov nr 9 signaal 20 kordne ning ületas 100% teoreetilisest maksimumist. Selle tõttu jätan proov nr 9 tulemused arvutustest välja. Seetõttu andis pH 2 kõige suurem protsendilise kasvu, kus testide keskmine signaali tugevus kasvas 5,98 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 29,92% ja maksimaalselt 45,02% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 29,92%, pH 4 – 14,49%, pH 6 – 21,85% ja pH 8 – 21,02%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 4,37 korda. Suurused arvutati tabel 14 põhjal.

**Tabel 14.** Karbamasepiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe	
1	Blank	0.05	0.05	1.06	0.00			
2	Sample	1.09	8.87	21.74	1.45	41	8.17	
3	Sample	1.07	9.62	21.36	1.95	45	9.00	
4	Sample	1.03	3.58	20.66	1.14	17	3.47	
5	Sample	1.04	3.44	20.83	1.14	16	3.30	
6	Blank	0.05	0.06	1.06	0.06			
7	Blank	0.05	0.06	1.05	0.05			
8	Sample	1.07	6.00	21.45	1.22	28	5.59	
9	Sample	1.08	23.22	21.65	1.85	107	21.44	
10	Sample	1.06	4.32	21.21	1.28	20	4.07	
11	Sample	1.09	3.21	21.78	1.16	15	2.95	
12	Blank	0.05	0.05	1.06	0.05			
13	Blank	0.05	0.05	1.06	0.05			
14	Sample	1.08	4.51	21.56	1.15	21	4.18	
15	Sample	1.08	6.31	21.61	1.19	29	5.84	
16	Sample	1.04	4.41	20.80	1.21	21	4.24	
17	Sample	1.03	3.30	20.50	1.10	16	3.22	
18	Blank	0.05	0.06	1.07	0.05			
19	Blank	0.05	0.06	1.05	0.05			
20	Sample	0.89	2.62	17.88	0.95	15	2.93	
21	Sample	0.89	2.44	17.73	0.98	14	2.75	
22	Sample	0.88	2.67	17.63	0.98	15	3.03	
23	Sample	0.90	2.60	18.01	0.96	14	2.88	
24	Blank	0.05	0.05	1.05	0.00			
							average	4,37

**Triklosaan** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonides puudusid, sarnaselt diklofenakiga, signaalid. Nagu ka diklofenakis, võis see tulla proovi ebahütlasest segunemisest. Triklosaan ja diklofenak on ka mõnelmääral ehituselt sarnased ühendid.

Külmutuseelsete proovide signaalide puudumise tõttu oli taaskord võimatu teha arvutusi. Siiski oli võimalik näha signaali suurenemist orgaanilise faasi kontsentraadis. Nagu ka diklofenakis, olid suurimad arvutatud kontsentratsioonid pH 2 testides ja proovis nr 9. Orgaanilise faasi proovide keskmine kontsentratsioon oli 2-3 ppb (va. erandid nagu proov nr 9 ja pH 2 atsetonitriili testid). Suurused arvutati tabel 15 põhjal.

**Tabel 15.** Triklosaani arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.05	0.47	0.94	0.00		
2	Sample	0.14	12.79	2.85	0.90	448	89.69
3	Sample	0.08	13.23	1.58	1.51	837	167.42
4	Sample	0.11	1.54	2.15	0.27	72	14.35
5	Sample	0.07	1.49	1.44	0.31	103	20.65
6	Blank	0.07	0.15	1.45	0.09		
7	Blank	0.06	0.07	1.14	0.06		
8	Sample	0.30	6.04	6.06	0.55	100	19.96
9	Sample	0.36	30.84	7.11	1.11	434	86.74
10	Sample	0.30	2.89	5.97	0.60	48	9.67
11	Sample	0.35	2.06	7.03	0.68	29	5.87
12	Blank	0.05	0.00	1.06	0.00		
13	Blank	0.07	0.06	1.49	0.00		
14	Sample	0.13	3.28	2.51	0.30	131	26.16
15	Sample	0.10	5.95	2.05	0.34	290	58.01
16	Sample	0.08	1.95	1.67	0.33	117	23.38
17	Sample	0.07	1.26	1.33	0.24	95	19.01
18	Blank	0.07	0.11	1.45	0.00		
19	Blank	0.06	0.06	1.24	0.07		
20	Sample	0.09	2.15	1.79	0.27	120	24.07
21	Sample	0.07	2.86	1.43	0.23	200	39.96
22	Sample	0.06	0.97	1.26	0.26	77	15.41
23	Sample	0.08	0.99	1.67	0.30	59	11.84
24	Blank	0.08	0.06	1.68	0.00		
						average	36,36

**Tiamulin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid olid kaootilised, olles vahemikus 3-8 ppb. Külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jaotusid järgnevalt: pH 2 – ~8 ppb, pH 4 – ~3,6 ppb, pH 6 – ~6,2 ppb, pH 8 – ~4,3 ppb. Signaal oli kõige tugevam pH 2 proovides, kus ekstraheerivaks lahuseks oli atsetonitriil, pH 8,6 proovides ja proovis nr 9, mille ekstraheeritud % tuli 270% milletõttu seda ei arvestata. Sellest tulenevalt andis pH 8,6 kõige suurem protsendilise kasvu, kus testide keskmine signaali tugevus kasvas 7,45 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist

keskmiselt 37,23% ja maksimaalselt 54,80% teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 36,22%, pH 4 – 18,24%, pH 6 – 27,70% ja pH 8 – 37,23%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 5,87 korda. Suurused arutati tabel 16 põhjal.

**Tabel 16.** Tiamulini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	Sample	8.70	97.29	173.92	8.90	56	11,19
3	Sample	8.82	98.10	176.46	13.17	56	11,12
4	Sample	7.59	25.29	151.78	6.41	17	3,33
5	Sample	7.93	26.47	158.54	7.16	17	3,34
6	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
7	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	Sample	4.38	48.03	87.65	5.02	55	10,96
9	Sample	4.02	216.95	80.33	11.08	270	54,01
10	Sample	4.29	31.39	85.80	4.80	37	7,32
11	Sample	4.93	20.02	98.67	5.57	20	4,06
12	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
13	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
14	Sample	6.42	35.66	128.47	6.62	28	5,55
15	Sample	6.40	47.39	127.93	6.84	37	7,41
16	Sample	5.88	31.94	117.58	6.33	27	5,43
17	Sample	6.49	24.43	129.86	5.66	19	3,76
18	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
19	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
20	Sample	3.74	13.88	74.88	4.67	19	3,71
21	Sample	3.94	12.57	78.82	4.78	16	3,19
22	Sample	3.69	13.74	73.85	4.52	19	3,72
23	Sample	3.36	13.34	67.13	4.30	20	3,98
24	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
						average	5,87

**Asitromütsiin** külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid kõik 4,8 ppb ümbrusesse. Signaal oli kõige tugevam pH 6 proovides ning proovis nr 9. Võrreldes varasemalt väljatoodud ainetega, on proovil nr 9 asitromütsiini signaal madalam ja aksepteeritav arvutusteks. pH 8,6 andis kõige suurem protsendilise kasvu, kus testide keskmine signaali tugevus kasvas 8,04 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 40,22% ja maksimaalselt 80,37% teoreetilisest maksimumist. Iga pH suurimad signaalid tulevad proovidest, mis valmistati atsetonitriiliga. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 26,18%, pH 4 – 17,15%, pH 6 – 34,72% ja pH 8 – 40,22%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 5,91 korda. Suurused arutati tabel 17 põhjal.

**Tabel 17.** Asitromütsiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.00	0.03	0.00	0.00		
2	Sample	4.36	42.98	87.24	0.00	49	9.85
3	Sample	4.60	49.56	92.00	6.38	54	10.77
4	Sample	3.85	0.00	77.06	1.31	0	0.00
5	Sample	4.41	1.41	88.12	0.88	2	0.32
6	Blank	0.00	1.21	0.00	0.15		
7	Blank	0.00	4.23	0.00	0.00		
8	Sample	4.53	21.12	90.55	10.66	23	4.67
9	Sample	4.62	74.30	92.44	18.21	80	16.07
10	Sample	4.62	48.14	92.50	10.04	52	10.41
11	Sample	5.61	5.77	112.15	1.92	5	1.03
12	Blank	0.00	1.55	0.00	1.19		
13	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
14	Sample	5.48	54.69	109.65	12.62	50	9.98
15	Sample	5.61	80.44	112.10	13.65	72	14.35
16	Sample	4.76	9.45	95.15	3.54	10	1.99
17	Sample	5.81	8.48	116.16	10.06	7	1.46
18	Blank	0.00	8.07	0.00	0.35		
19	Blank	0.00	4.66	0.00	0.00		
20	Sample	4.48	12.65	89.63	9.91	14	2.82
21	Sample	5.40	46.79	107.99	12.59	43	8.67
22	Sample	4.79	10.68	95.82	0.88	11	2.23
23	Sample	4.40	0.00	88.09	1.09	0	0
24	Blank	0.00	4.36	0.00	0.00		
						average	5,91

**Klaritromütsiin** on märgatavalt sarnane asitromütsiiniga. Külmutuseelsete proovide kontsentratsioonid jäid kõik 3,6-4,2 ppb vahemikku. Signaal oli kõige tugevam pH 8,6 proovides. pH 8,6 andis kõige suurem protsendilise kasvu, kus testide keskmine signaali tugevus kasvas 10,14 korda. Selle pH juures määrati orgaanilisest faasist keskmiselt 50,70% ja maksimaalselt 92,54 % teoreetilisest maksimumist. pH-de keskmine kontsentratsiooni % on vastavalt: pH 2 – 26,68%, pH 4 – 11,77%, pH 6 – 30,93% ja pH 8 – 50,70%. Üle kõigi proovide oli keskmine signaali kasv orgaanilise faasi ekstraktis 6 korda. Suurused arutati tabel 18 põhjal.

**Tabel 18.** Klaritromütsiini arvutuste tabel. Rohelisega on märgitud suurim saagis.

Nr	Kirjeldus	C(prefrz), ppb	C(org), ppb	C(org, theor), ppb	C(melt), ppb	%	Jaotussuhe
1	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	Sample	3.45	13.67	68.99	2.87	20	3.96
3	Sample	3.46	30.34	69.26	3.84	44	8.76
4	Sample	3.08	13.28	61.64	1.93	22	4.31
5	Sample	3.27	14.10	65.36	2.16	22	4.31
6	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
7	Blank	0.00	0.21	0.00	0.00		
8	Sample	3.63	19.10	72.64	7.63	26	5.26
9	Sample	3.21	59.36	64.15	12.64	93	18.51
10	Sample	3.42	36.17	68.41	7.10	53	10.57
11	Sample	3.85	23.98	77.06	8.39	31	6.22

12	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
13	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
14	Sample	4.13	39.52	82.63	9.23	48	9.57
15	Sample	4.21	20.35	84.18	9.50	24	4.84
16	Sample	3.85	36.70	76.92	9.35	48	9.54
17	Sample	4.10	3.27	81.98	8.00	4	0.80
18	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
19	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
20	Sample	3.60	8.99	72.05	7.08	12	2.50
21	Sample	4.43	10.72	88.54	8.66	12	2.42
22	Sample	3.93	9.00	78.67	7.98	11	2.29
23	Sample	3.63	8.01	72.50	2.92	11	2.21
24	Blank	0.00	0.00	0.00	0.00		
						average	6,00

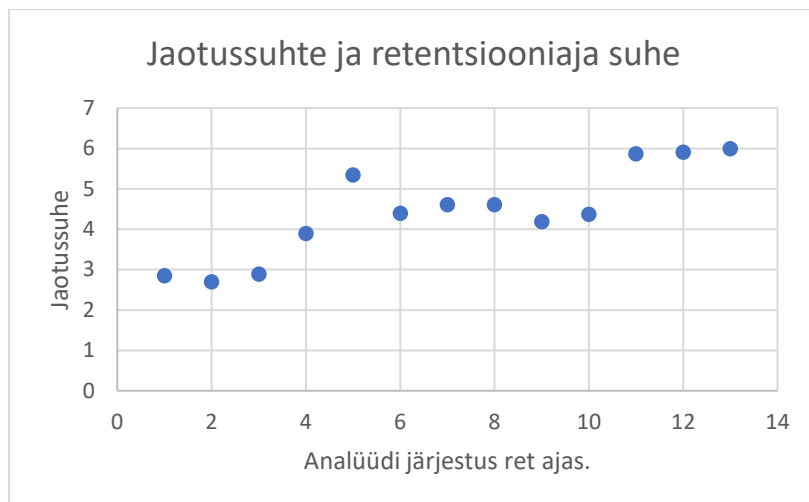
### 3.3 Tulemuste analüüs

Külmutusekstraktsiooni kasutades kontsentreerus kõigist proovidest analüüt ekstraktsiooni käigus orgaanilisse faasi suure enamuse kasutatud tingimuste korral. Jaotussuhe külmutusele eelneva proovi ja ekstakti vahel oli keskmiselt 4-6 korda. Parimad jaotussuhted vastasid suurel määral pH 2-le, kuid tähendati ka mõned ained, kus selleks alaks oli pH 8 ja 6. Keskmiselt oli saagise suuruseks 15-30% teoreetilisest maksimumist, kuid kui kasutati ainele sobivamat pH-d või ekstraktsiooni solventi, tõusis keskmine saagis 25-80%-ni. Kõrgemad saagised ja jaotussuhted saavutati samade pH-de juures.

Ekstraktsiooni käigus ei saadud kätte kogu orgaanilist faasi, kuna osa sellest oli kinni jää maatriksis. See oli põhjustatud kiirest külmutusest, kus toatemperatuuril olev proov viidi külmakambrisse, kus temperatuur oli  $-17^{\circ}\text{C}$ . Nendes tingimustes on pudeli jahtumine kiire kogu pinna ulatuses. Seega tekivad jääkristallide tekkeks vajalikud kristallisatsioonitsentrid kõikjal pudeli pinna lähedal. Selle tulemusena tekib hulgaliselt jääkristalle, mille vahele püütakse kinni ka orgaanilise solventi tilgakesi. Selleks, et suuremat hulka orgaanilist lahustit kätte saada peaks jää tekkima monoliitsena ja jäätumise protsess võiks alata pudeli põhjast.

Külmutusekstraktsiooni efektiivsus peaks sõltuma ekstraheeritava aine polaarsusest – madalama polaarsusega ained peaks jaotuma orgaanilisse faasi suuremal määral kui polaarsed. Selle hüpoteesi kontrollimiseks reastati käesoleva töö analüüdid nende LC-MS analüüsi retentsiooniaegade järjekorras. Kuna kasutati pöördfaaskromatograafiat, siis vastab see järjekord ainete polaarsuste vähenemisele. Jooniselt 1 on näha, et madalama polaarsusega ainete jaotussuhted on tõepoolest suuremad. Kirjeldatud lähenemine ei ole siiski range, sest ainete polaarsus sõltub keskkonna pH-st.

**Joonis 1.** Jaotussuhte sõltuvus aine retentsiooni järjekorrast



Teatavaid trende leiti ka ainete polaarsuse (väljendatuna retentsioonija kaudu) ja sobivaima külmutusekstraktsiooni pH vahel. Leiti, et esimesena elueerunud analüütide (bensüülpenitsilliin, sulfametoksasool, oksütetratsükliin) määramiseks sobib kõige paremini pH 6 koos atsetonitriiliga. Retentsioonija pikenedes muutusid sobivaimateks pH 8 ja 2. pH 8 sobis kõige paremini sulfadimetoksiini ja florfenikooliga. pH 2 sobis ekstraktsiooniks pikima retentsioonijaga ühenditele nagu tsiprofloksatsiin, marbofloksatsiin, ofloksatsiin, enrofloksatsiin, diklofenak, karbamasepiin, triklosaan, tiamuliin, asitromütsiin ja klaritromütsiin. Kõigis proovides oli märgata atsetonitriili mõnevõrra suuremat võimekust analüütide ekstraheerida võrreldes metanooliga.

### 3.4 Meetodi edasine arendamine

Külmutusekstraktsiooni arenduse järgmine suurem eesmärk on ekstraheeriva orgaanilise lahusti täielikum eraldumine jääst. Selleks tuleb leida tingimused, mille juures külmutamisel tekib jää monoliitse tükina mitte kristallide seguna. Selleks on plaanis kasutada aeglast külmutamist ja suunatud külmutamist eelistatult pudeli alt. Külmutamise aeglustamiseks asetatakse pudel külmikusse vahtplastist ümbrises. Külmutamise alustamiseks pudeli alt asetatakse vahtplastist ümbris pudeli peale jättes põhja vabaks.

Kui orgaanilise faasi eraldamine on lahendatud, siis saab ekstraktsiooni saagise suurendamiseks kasutada korduvat ekstraheerimist. Samuti on võimalik erinevate analüütide võimalikult täielikuks ekstraheerimiseks kasutada mitut tsüklit, kusjuures tsüklite vahel muudetakse proovi pH-d.

## Kokkuvõte

Keemilise analüüsi üheks olulisemaks väljakutseks on järjest madalamate kontsentratsioonide määramise vajadus. Eriti tähtis on see vee puhul, mis on asendamatu osa inimese elust ja ühiskonnast.

Käesoleva uuringu eesmärgiks oli välja töötada uus meetod veeproovide ettevalmistamiseks, millega oleks võimalik määrata madalaid kontsentratsioone. Selleks pakuti välja ja testiti külmutusekstraheerimiseks nimetatud meetodit. Meetodis kombineeriti vedelik-vedelik ekstraktsioon ja külmutuskontsentreerimine. Antud meetodi korral lisatakse veeproovile veega segunev ekstraheeriv solvent ja ekstrakt eraldatakse vee külmutamise teel. Külmutusekstraktsiooni testimise mudelsüsteemina kasutati 19 ravimi vesilahust 1 ppb kontsentratsioonitasemel. Ekstraheeriva solvendina testiti atsetonitriili ja metanooli. Lisaks testiti meetodi toimimist nelja erineva pH juures. Analüütide kontsentratsioonid proovides ja ekstraktides määrati LC-MS meetodil.

Külmutusekstraktsioonil kontsentreerus kõigis proovides analüüt orgaanilisse faasi, st külmunud proovi pealt eraldatud orgaanilises faasis oli analüüdi kontsentratsioon kõrgem kui esialgses lahuses. Kui arvestada igale analüüdile kõige paremini sobiva pH ja ekstraktsiooni solvendiga, siis kõigi ainete korral tuvastati ekstraktis 5-16 korda kõrgem kontsentratsioon kui algses proovis. Hinnanguliselt ekstraheerus orgaanilisse faasi 25-80% analüüdist.

Kokkuvõttes võib öelda, et külmutusekstraktsioon on sobiv jääkidena esinevate analüütide ekstraheerimiseks veest. Enne meetodi rakendamist tuleks seda siiski täiustada. Ennekõike tuleks püüda leida tingimused, mille juures külmumisel tekiks monoliitne jäätükk. Selleks on plaanis jahutamist aeglustada ja suunata.

# Summary

## **Freeze-extraction – new method for preparation of water samples**

One of the challenges of chemical analysis is the constant need for measuring of lower concentrations. It is especially important for water, which is an irreplaceable part of human life and society.

The goal of this study was to develop a new method for preparation of water samples, that can perform analysis of low concentrations. The proposed and tested method was named freeze-extraction. The proposed method may be described as a combination of liquid-liquid extraction and freeze concentration. In the method, a water-miscible extraction solvent is added to the water sample and the extract is separated by the freezing of water phase. The model system for freeze-extraction consisted of 19 pharmaceuticals in aqueous solutions at 1 ppb concentration. Methanol and acetonitrile were tested as the extraction solvents. The method was also tested at 4 different pH. The concentration of analytes in samples and extracts was measured using a LC-MS method.

With the use of freeze-extraction, a notable increase in concentration was measured in each sample's extracted organic phase in comparison to the initial solution. Considering the best conditions (pH and extraction solvent) for each analyte, 5-16-fold increase in concentration was observed for every sample. An estimation suggests that organic phase contained 25-80% of the analyte after single extraction cycle.

In conclusion, it can be said that freeze-extraction is suitable for extraction of analyte at residue level from water. Still the method should be improved before implementation. Above all, efforts should be made to find the conditions under which freezing would produce a monolithic piece of ice. For this, it is planned to slow down and direct freezing.

## Kirjandusviited

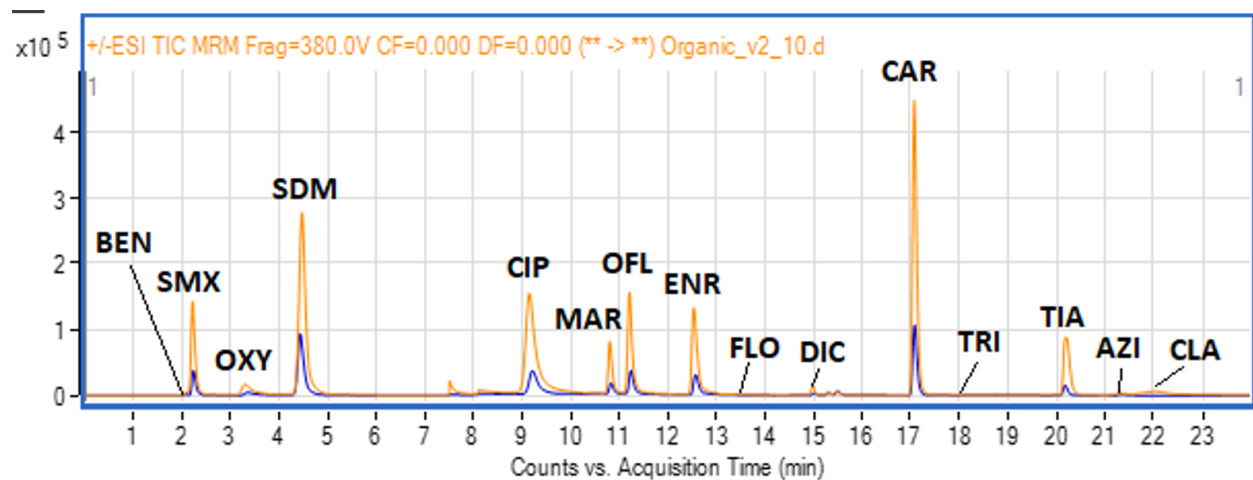
- (1) Hutchings, M. I.; Truman, A. W.; Wilkinson, B. Antibiotics: Past, Present and Future. *Curr. Opin. Microbiol.* **2019**, *51*, 72–80. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2019.10.008>.
- (2) Antibiotics in the 21st Century: Are We Really Safe? *EBioMedicine* **2018**, *38*, 1–2. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.12.014>.
- (3) Liquid chromatography [http://hiq.linde-gas.com/en/analytical\\_methods/liquid\\_chromatography/index.html](http://hiq.linde-gas.com/en/analytical_methods/liquid_chromatography/index.html) (accessed 2021 -07 -18).
- (4) Sadiq, N. W.; Beauchemin, D. Chapter 4 - Liquid Chromatography. In *Sample Introduction Systems in ICPMS and ICPOES*; Beauchemin, D., Ed.; Elsevier: Amsterdam, 2020; pp 213–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-59482-2.00004-X>.
- (5) Liquid\_Chromatography.Pdf.
- (6) Molnár, I.; Horváth, C. Reverse-Phase Chromatography of Polar Biological Substances: Separation of Catechol Compounds by High-Performance Liquid Chromatography. *Clin. Chem.* **1976**, *22* (9), 1497–1502.
- (7) Principle of Reversed-Phase Chromatography HPLC/UPLC (with Animation) | Analytical Chemistry | PharmaXChange.info <https://pharmaxchange.info/2012/12/principle-of-reversed-phase-chromatography-hplcuplec-with-animation/> (accessed 2021 -07 -29).
- (8) Chromatographic Columns [https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical\\_Chemistry/Supplemental\\_Modules\\_\(Analytical\\_Chemistry\)/Instrumental\\_Analysis/Chromatography/Chromatographic\\_Columns](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Analytical_Chemistry/Supplemental_Modules_(Analytical_Chemistry)/Instrumental_Analysis/Chromatography/Chromatographic_Columns) (accessed 2021 -07 -29).
- (9) Cooper, W. T. Normal-Phase Liquid Chromatography. In *Encyclopedia of Analytical Chemistry*; American Cancer Society, 2006. <https://doi.org/10.1002/9780470027318.a5913>.
- (10) Coupling normal phase liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry: strategies and applications - Analytical Methods (RSC Publishing) DOI:10.1039/C6AY01419D [https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ay/c6ay01419d?casa\\_token=DZLS-duOkfQAAAAA:3Kr\\_5wDbYxOPKcDlfDaYjNpWn9qKggeOfupGC9\\_EYPubIXgPj6S2AXBdHmKLWjJlM6bW897IUz1AWA](https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ay/c6ay01419d?casa_token=DZLS-duOkfQAAAAA:3Kr_5wDbYxOPKcDlfDaYjNpWn9qKggeOfupGC9_EYPubIXgPj6S2AXBdHmKLWjJlM6bW897IUz1AWA) (accessed 2021 -07 -29).
- (11) Heaton, J. C.; Smith, N. W.; McCalley, D. V. Retention Characteristics of Some Antibiotic and Anti-Retroviral Compounds in Hydrophilic Interaction Chromatography Using Isocratic Elution, and Gradient Elution with Repeatable Partial Equilibration. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1045*, 141–151. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.08.051>.
- (12) Jovanović, M.; Stojanović, B. J. Thorough Investigation of the Retention Mechanisms and Retention Behavior of Amides and Sulfonamides on Amino Column in Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2013**, *1301*, 27–37. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2013.05.034>.
- (13) Jandera, P. Stationary and Mobile Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography: A Review. *Anal. Chim. Acta* **2011**, *692* (1–2), 1–25. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.02.047>.
- (14) Perkampus, H.-H. Analytical Applications of UV-VIS Spectroscopy. In *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*; Perkampus, H.-H., Ed.; Springer Lab Manuals; Springer: Berlin, Heidelberg, 1992; pp 26–80. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-77477-5_4).

- (15) Yadav, L. D. S. Ultraviolet (UV) and Visible Spectroscopy. In *Organic Spectroscopy*; Springer Netherlands: Dordrecht, 2005; pp 7–51. [https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2575-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2575-4_2).
- (16) Lambert-Beer's law - WikiLectures [https://www.wikilectures.eu/w/Lambert-Beer%27s\\_law](https://www.wikilectures.eu/w/Lambert-Beer%27s_law) (accessed 2021 -07 -18).
- (17) Olshina, M. A.; Sharon, M. Mass Spectrometry: A Technique of Many Faces. *Q. Rev. Biophys.* **2016**, *49*, e18. <https://doi.org/10.1017/S0033583516000160>.
- (18) Pitt, J. J. Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin. Biochem. Rev.* **2009**, *30* (1), 19–34.
- (19) Waters Corporation. *Fundamentals of MS (4 of 7) - Quadrupoles*.
- (20) 2.3: LIQUID-LIQUID EXTRACTION  
[https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic\\_Chemistry/Book%3A\\_How\\_to\\_be\\_a\\_Successful\\_Organic\\_Chemist\\_\(Sandtorv\)/02%3A\\_COMMON\\_ORGANIC\\_CHEMISTRY\\_LABORATORY\\_TECHNIQUES/2.03%3A\\_LIQUID-LIQUID\\_EXTRACTION](https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_How_to_be_a_Successful_Organic_Chemist_(Sandtorv)/02%3A_COMMON_ORGANIC_CHEMISTRY_LABORATORY_TECHNIQUES/2.03%3A_LIQUID-LIQUID_EXTRACTION) (accessed 2021 -08 -14).
- (21) Cantwell, F. F.; Losier, M. Chapter 11 Liquid—Liquid Extraction. In *Comprehensive Analytical Chemistry; Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory*; Elsevier, 2002; Vol. 37, pp 297–340. [https://doi.org/10.1016/S0166-526X\(02\)80048-4](https://doi.org/10.1016/S0166-526X(02)80048-4).
- (22) Poole, C. F. New Trends in Solid-Phase Extraction. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2003**, *22* (6), 362–373. [https://doi.org/10.1016/S0165-9936\(03\)00605-8](https://doi.org/10.1016/S0165-9936(03)00605-8).
- (23) Simpson, N. J. K. *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*; CRC Press, 2000.
- (24) Miyawaki, O.; Gunathilake, M.; Omote, C.; Koyanagi, T.; Sasaki, T.; Take, H.; Matsuda, A.; Ishisaki, K.; Miwa, S.; Kitano, S. Progressive Freeze-Concentration of Apple Juice and Its Application to Produce a New Type Apple Wine. *J. Food Eng.* **2016**, *171*, 153–158. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.10.022>.
- (25) Shapiro, J. Freezing-Out, a Safe Technique for Concentration of Dilute Solutions. *Science* **1961**, *133* (3470), 2063–2064. <https://doi.org/10.1126/science.133.3470.2063>.
- (26) Maslamani, N.; Manandhar, E.; Geremia, D. K.; Logue, B. A. ICE Concentration Linked with Extractive Stirrer (ICECLES). *Anal. Chim. Acta* **2016**, *941*, 41–48. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2016.09.003>.
- (27) Alluhayb, A. H.; Logue, B. A. The Analysis of Aroma/Flavor Compounds in Green Tea Using Ice Concentration Linked with Extractive Stirrer. *J. Chromatogr. A* **2017**, *1518*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2017.08.049>.
- (28) Browsing Drugs | DrugBank Online <https://go.drugbank.com/drugs> (accessed 2021 -08 -16).

# Lisa

**Lisa 1.** Tüüpiline kromatogrammide võrdlus proov nr 10 korra. Kollasega on märgitud orgaanilise faasi (ekstrakti) proovi tulemused, sinisega on märgitud külmutuseelse proovi tulemused.

BEN – bensüülpenitsilliin, SMX – sulfametoksasool, OXY – oksütetratsükliin, SDM – sulfadimetoksiin, CIP – tsiprofloksatsiin, MAR – marbofloksatsiin, OFL – ofloksatsiin, ENR – enrofloksatsiin, FLO – florfenikool, DIC – diklofenak, CAR – karbamasepiin, TRI – triklosaan, TIA – tiamulin, AZI – asitromüsiin, CLA – klaritromüsiin.



## **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Tanel-Martin Tambek,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose „Külmutusekstraktsiooni – uus meetod veeproovide ettevalmistuseks“, mille juhendajad on Koit Herodes ja Joshua Onyeka Osagu, reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguste kehtivuse lõppemiseni.
2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsensiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, alates 16.08.2024 kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

*Tanel-Martin Tambek*

**16.08.2021**