

TARTU ÜLIKOOL

Loodus- ja täppisteaduste valdkond

Keemia instituut

Fred Rainer Ränisoo

**Aminorühmi sisaldavate antibiootikumide LC-MS analüüsi  
parandamine derivatiseerimise teel**

Bakalaureusetöö (6 EAP)

Keemia

Juhendajad: Koit Herodes, PhD

Ernesto de Jesus Zapata Flores, MSc

Tartu 2019

# Sisukord

Kasutatud lühendid .....	4
Sissejuhatus.....	5
1. Kirjanduse ülevaade .....	6
1.1 Antibiootikumid .....	6
1.1.1 Tsiprofloksatsiin ja norfloksatsiin.....	6
1.1.2 Sulfadimetoksiin ja sulfametoksasool.....	7
1.1.3 Validamütsiin.....	8
1.2 Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia .....	9
1.3 Massispektromeetria.....	10
1.3.1 Elektropihustus-ionisatsioon.....	11
1.3.2 Tandem-massispektromeetria .....	12
1.4 Derivatiseerimine .....	12
1.4.1 Dietüül-etoksümetüüleen malonaat .....	13
2. Eksperimentaalne osa .....	15
2.1 Aparatuur ja kemikaalid .....	15
2.2 Lahuste valmistamine.....	15
2.3 Derivatiseerimismetoodika.....	16
2.4 Analüüsimetoodika.....	17
3. Tulemused ja arutelu .....	18
3.1 Reaktsioonimehhanism .....	18
3.2 Sulfadimetoksiini derivatiseerimine.....	18
3.3 Sulfametoksasooli derivatiseerimine.....	23
3.4 Tsiprofloksatsiini derivatiseerimine.....	26
3.5 Norfloksatsiini derivatiseerimine .....	30
3.6 Validamütsiin A derivatiseerimine.....	33
Kokkuvõte.....	37
Summary in English.....	38
Kasutatud kirjandus .....	39
Lisad.....	45

## **Aminorühmi sisaldavate antibiootikumide LC-MS analüüsi parandamine derivatiseerimise teel**

Antibiootikumi resistentsuse süvenemise tõttu on maailmas üha olulisemaks muutumas nende sisalduste määramine keskkonnas. Sisalduste täpseks määramiseks on vaja võimalikult lihtsaid, aga efektiivseid meetodikaid. Käesolevas töös uuriti tsiprofloksatsiini, norfloksatsiini, sulfadimetoksiini, sulfametoksasooli ning validamütsiin A derivatiseerimise mõju LC-ESI-MS analüüsile. Derivatiseerimiseks kasutati dietüül-etoksümetüleen malonaati (DEEMM).

Derivatiseeritud kõik uuritud ravimid peale validamütsiin A. Kasutatud tingimustes olid reaktsiooniajad küllalt pikad (8-28 h), seega derivatiseerimise tingimused vajavad täiendavat optimeerimist. Tulemustest selgus, et derivatiseerimine pikendab ravimite retentsiooniaegu ja parandab nende määramise tundlikkust massispektromeetrilisel analüüsil.

Märksõnad: antibiootikumid, LC-ESI-MS, derivatiseerimine, DEEMM

CERCS kood: P300

## **Improving LC-MS analysis of antibiotics that contain amino groups by using pre-column derivatization**

Due to rapid development of antibiotic resistance, it is becoming more and more important to develop methods that can efficiently measure the abundance of antibiotics in environmental samples. The aim of this thesis was to derivatize ciprofloxacin, norfloxacin, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole and Validamycin A and test its impact to their LC-ESI-MS analysis. Diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) was used as derivatization reagent.

All the tested pharmaceuticals with exception of validamycin A gave derivatization products. Under used derivatization conditions reaction times were rather long (8-28 h) but can be shortened by optimization of reaction conditions. Derivatization improved chromatographic retention and detection sensitivity for the drugs.

Keywords: antibiotics, LC-ESI-MS, derivatization, DEEMM

CERC Code: P300

## Kasutatud lühendid

HPLC	Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia
LC-MS	Vedelikkromatograafia-massispektromeetria
GC-MS	Gaasikromatograafia-massispektromeetria
m/z	Massi ja laengu suhe
TIC	Total Ion Chromatogram
EIC	Extracted Ion Chromatogram
ESI	Elektropihustusionisatsioon
MS/MS	Tandem-massispektromeetria
DEEMM	Dietüül-etoksümetüleen malonaat
MeCN	Atsetonitriil

## Sissejuhatus

Vedelikkromatograafia-massispektromeetrilisel (LC-MS) analüüsil on oluline ainete kõrge kromatograafiline lahutuvus ja detekteeritavus, mis võimaldavad teostada täpset kvalitatiivset ja kvantitatiivset analüüsi. Sageli on ainete piikide lahutuvus molekulide sarnaste omaduste tõttu problemaatiline, kuna nad väljuvad kolonnist samaaegselt. Samuti on pöördfaaskromatograafilisel analüüsil probleemiks molekulide polaarsus, mille tõttu väljuvad nad kolonnist liiga kiiresti. Üks võimalik meetod kromatograafilise lahutuvuse ja ka detekteeritavuse (LC-MS puhul ionisatsiooniefektiivsuse) parandamiseks on molekulide derivatiseerimine ehk probleemsete funktsionaalsete rühmade asendamine sobivamatega.

Ainete tuvastamine ja täpsete koguste määramine on eriti olulised ravimite puhul, kuna nende sisaldused bioloogilistes maatriksites ja keskkonnaproovides on väga madalad. Seetõttu peavad nende analüüsimiseks kasutatavad meetodikad olema võimalikult kõrge selektiivsuse ja tundlikkusega. Lisaks avaldavad ravimid olulist mõju keskkonnale ja tervisele. Näiteks on üha süvenevaks probleemiks kujunemas antibiootikumiresistentsus, mida põhjustab muuhulgas ka ravimijääkide laialdane levimine keskkonda. Selle tõttu muutub üha olulisemaks ravimijääkide sisalduste määramine keskkonnaproovides, näiteks põhja-, pinna- ja reovees.

Käesoleva töö eesmärgiks on derivatiseerida mõningaid primaarseid ja sekundaarseid aminorühmi sisaldavaid antibiootikume, eesmärgiga parandada nende kromatograafilist lahutuvust ja detekteeritavust LC-MS analüüsil. Derivatiseeriva reagentina kasutatakse Dietüül-etoksümetüleen malonaati (DEEMM), mida on varasemalt kasutatud aminohapete derivatiseerimisel [1,2], kuid mitte ravimite puhul.

# 1. Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Antibiootikumid

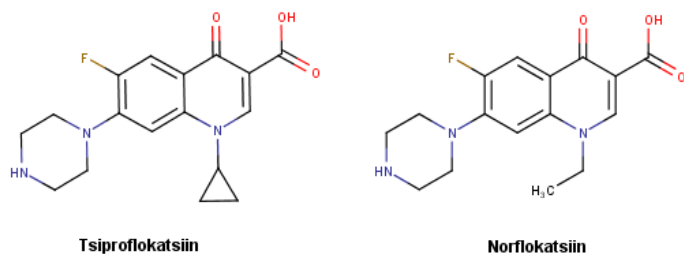
Antibiootikumide järjest kasvava tarbimise tõttu on maailmas tõsiseks probleemiks kujunemas antibiootikumide resistentsus. Ületarbimine põhjustab bakteritel immuunsuse teket vastavate antibiootikumide vastu, mille tulemusena kaotavad nad oma ravitoime. Uute ravimite tootmine on aga kulukas ja aeganõudev protsess ning uute antibiootikumide tootmine muutub kasvava resistentsuse tõttu järjest keerulisemaks. Seetõttu ähvardavad hetkel maailmast likvideeritud bakteriaalsed haigused muutuda taas igapäevaseks nähtuseks, põhjustades suremuse tõusu ja avaldades koormust riikide tervishoiule ja majandusele. [3]

Kiire resistentsuse tekke põhjuseks on ravimijääkide levimine loodusesse. Inimtarbimise tulemusena satuvad ravimijäägid reoveesetitesse, mida kasutatakse sageli väetisena põllumajanduses. Lisaks kasutatakse antibiootikume laialdaselt põllumajanduses kariloomade peal ning taimekaitsevahenditena. Selle tulemusel satuvad ravimijäägid pinnasesse ja põhjavette. Põhjavee kaudu levivad nad omakorda suurematesse veekogudesse, kus nad satuvad veeorganismidesse. Toidu kaudu jõuavad ravimijäägid lõpuks ka inimese organismi. [4]

Süveneva probleemi tõttu on maailmas üha olulisemaks teemaks kujunemas ravimijääkide analüüsimine ja nende sisalduste määramine keskkonnas. Kõige suuremat ohtu keskkonnale kujutavad kauapüsivad ravimid, mis on väga stabiilsed ja lagunevad looduses alles mitme aasta jooksul. Kauapüsivate antibiootikumide hulka kuuluvad näiteks fluorokinoloonid, sulfoonamiidid ja tetratsükliinid.

### 1.1.1 Tsiprofloksatsiin ja norfloksatsiin

Tsiprofloksatsiin ja norfloksatsiin on fluorokinoloonide rühma kuuluvad bakteritsiidsed antibiootikumid, mida kasutatakse mitmete bakteriaalsete infektsioonide, seal hulgas naha, luu ja liigeste, hingamisteede, põskkoopa, kuseteede ning lisaks ka kõhulahtisuse ja gonorröa ravimiseks [5,6]. Hoolimata tõsistest kõrvalmõjudest on tsiprofloksatsiin ja norfloksatsiin ühed enim tarvitatavad kinoloonid maailmas [7]. Tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini struktuurid on toodud joonisel 1.



## Joonis 1. Tsiprofloksatsiin ja norfloksatsiin

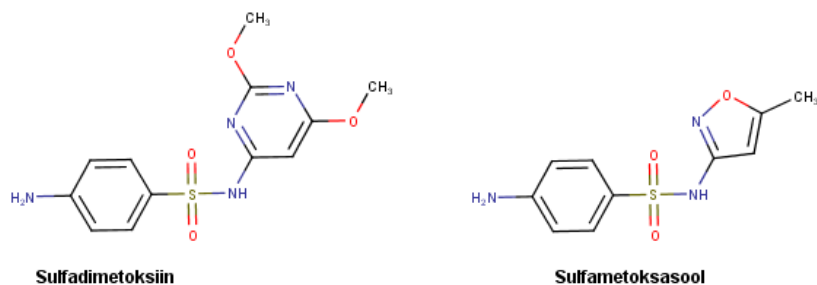
Tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini analüüsimine HPLC meetodil on laialdaselt levinud. Detektoritena on kasutatud nii UV- [8,9], fluorestsentsdetektorit [8] kui ka massispektromeetria [10,11]. Lisaks HPLC-le on kasutatud ka spektrofotomeetrilisi meetodeid [12], fluorestsentsmeetodit [13] ja kapillaarelektroforeesi [14].

Tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini sisaldust on suudetud efektiivselt määrata nii bioloogilistes maatriksites [9,10,15] kui ka mitmetes keskkonnaproovides, sealhulgas põhja- ja pinnavees [11] ning reovees [16,17].

Tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini derivatiseerimise mõju HPLC analüüsile on suhteliselt vähe uuritud. Bioloogilistes maatriksites sisalduse määramisel on derivatiseerimiseks kasutatud 4-kloro-7-nitrobensofuraani (vt Lisa 8) [18,19]. Reovees määramisel on derivatiseerimiseks kasutatud fluorestsamiini (vt Lisa 8) [20]. Tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini derivatiseerimist DEEMM-ga ei ole varasemalt uuritud.

### 1.1.2 Sulfadimetoksiin ja sulfametoksasool

Sulfadimetoksiin ja sulfametoksasool on sulfoonamiidide rühma kuuluvad bakteritsiidsed antibiootikumid, mida kasutatakse mitmete bakteriaalsete infektsioonide, nende hulgas ka hingamisteede, kõrva, kuseteede ning lisaks ka bronhiidi ja shigelloosi ravimiseks. Kui sulfametoksasooli kasutatakse põhiliselt koos trimetopriimiga kombinatoorse antibiootikumina inimhaiguste ravimiseks, siis sulfadimetoksiin leiab laialdast kasutust veterinaarias koerte, kasside ja kariloomade haiguste ravimisel [21,22]. Sulfadimetoksiini ja sulfametoksasooli struktuurid on näidatud joonisel 2.



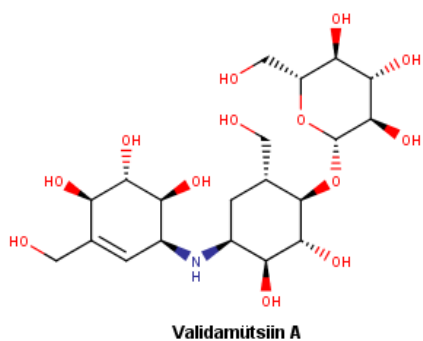
## Joonis 2. Sulfadimetoksiin ja sulfametoksasool

Sulfadimetoksiini, sulfametoksasooli ja teiste sulfoonamiidide sisaldusi erinevates keskkonnaproovides on väga laialdaselt uuritud. Kõige levinumaks analüüsimeetodiks on LC-MS meetod [23,24], lisaks on kasutatud ka spektrofotomeetrilisi meetodeid [25], kapillaarelektroforeesi [26] ja muid meetodeid [27–29]. Ravimite sisaldusi on efektiivselt määratud loomses toidus [30,31], pinna- ja merevees [25,32] ning ka reoveesetetes [33].

Sulfadimetoksiini ja sulfametoksasooli HPLC analüüsi tundlikkuse parandamiseks on kasutatud pärast kolonni derivatiseerimist [34]. Lisaks on kasutatud enne kolonni derivatiseerimist fluorestsamiiniga [35]. Sulfadimetoksiini ja sulfametoksasooli derivatiseerimist DEEMM-ga ei ole varasemalt uuritud.

### 1.1.3 Validamütsiin

Validamütsiin on aminoglükosiidide rühma kuuluv bakteritsiidne antibiootikum, mida kasutatakse põhiliselt põllumajanduses fungitsiidina taimede kaitseks. Näiteks kasutatakse validamütsiini riisipõldudel riisimädaniku ärahoidmiseks [36]. Validamütsiin A struktuur on toodud joonisel 3.



## Joonis 3. Validamütsiin A

Validamütsiini on põhiliselt analüüsitud LC-MS meetodil [37–39], lisaks sellele on välja töötatud ka muid meetodeid [40,41]. Validamütsiini kui fungitsiidi sisaldust on efektiivselt määratud eelkõige põllumajandussaadustes nagu näiteks riisis [37] ning puu- ja köögiviljades [38,39].

Aminoglükosiidide LC-analüüsil on kasutatud enne kolonni derivatiseerimist fenüülsotsüanaadiga (vt Lisa 8) [42] ning 7-fluoro-4-nitrobensofuraani (vt Lisa 8) [43]. Validamütsiini derivatiseerimist DEEMM-ga ei ole varasemalt uuritud.

## 1.2 Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia

Kõrgefektiivne vedelikkromatograafia (HPLC) on vedelikkromatograafia alaliik, kus mobiilne faas ehk eluent surutakse läbi statsionaarse faasi kõrge rõhu mõjul. HPLC-s jäävad statsionaarse faasi osakesed suurusjärku vaid mõni mikromeeter ning paiknevad tihedalt pakituna kitsas kolonnis, mis tagab väga kõrge lahutuvuse efektiivsuse. Lisaks võimaldab HPLC erinevalt gaasikromatograafiast (GC) analüüsida ka mittelenduvaid aineid. Oma kõrge efektiivsuse ja laia kasutusala tõttu on HPLC tänapäeval üks enimkasutatavaid analüüsimeetodeid. [44]

Polaarsuse alusel jaguneb HPLC omakorda normaal- ja pöördfaaskromatograafiaks. Normaalfaaskromatograafias on statsionaarne faas polaarsete omadustega ning eluendiks on mittepolaarne vedelik (heksaan, kloroform). Pöördfaaskromatograafias on statsionaarne faas mittepolaarsete omadustega ning eluendiks on enamasti vesi-orgaanika segu (atsetonitriil, metanool), mille polaarsust varieeritakse orgaanilise komponendi sisalduse muutmisega. Kuna suurem osa orgaanilisi molekule lahustuvad hästi vesi-orgaanika segus, on pöördfaaskromatograafia laialdaselt levinum analüüsi meetod. Normaalfaaskromatograafia leiab kasutust vaid väga mittepolaarsete ja lahustumatute ainete korral. [45,46]

Pöördfaaskromatograafias on statsionaarse faasina kasutusel enamasti mittepolaarsed süsivesinikahelad, mis on keemiliselt seotud poorsete silikageeli osakeste külge. Levinumad statsionaarsed faasid pöördfaaskromatograafias on oktadetsüülsilaan (C18) ning oktüülsilaan (C8). Kolonnide puhul on esmatähtis kõrge efektiivsus. Mida väiksema läbimõõduga on kolonn, seda suurem on efektiivsus ja seda väiksem on ka proovi kulu. Levinumad HPLC kolonnid jäävad pikkusevahemikku 100-150 mm, on sisemise diameetriga 4,6 mm ning osakeste suurusega 5 µm. LC-MS analüüsil kasutatakse mõnikord ka väiksema läbimõõduga kolonne. [44–46]

Pöördfaaskromatograafias on eluendina kasutusel enamasti vesi-orgaanika segu. Kui elueerimise käigus eluendi koostis ei muutu, on tegemist isokraatilise elueerimisega. Isokraatiliselt elueerimist kasutatakse tavaliselt lihtsamate proovide analüüsimiseks. Komplekssete proovide puhul on aga sageli probleemiks asjaolu, et osad komponendid elueeruvad väga kiiresti ning teised väga aeglaselt, mis muudab analüüside kestuse ebavajalikult pikaks. Selle vältimiseks kasutatakse pöördfaaskromatograafias sageli gradientelueerimist: orgaanilise komponendi sisaldust eluendis suurendatakse kromatografeerimise käigus. Gradientelueerimine aitab vältida piikide liigset laienemist ning parandada lahutuvust. [44,45]

Komponentide signaali registreerimiseks on HPLC-s kasutusel mitmed detektorid. Detektorite puhul on oluline nende kõrge tundlikkus (madal avastamispiir), lai lineaarne ala ning hea korratavus. Levinumateks detektoriteks HPLC analüüsil on UV-Vis detektor, fluorestsentsdetektor ning massispektromeetria. [46]

### **1.3 Massispektromeetria**

Massispektromeetria (MS) on analüüsimeetod, mida kasutatakse ainete identifitseerimiseks, nende struktuuride määramiseks ja ainete koguste määramiseks proovides. Massispektromeetrias proovi komponendid aurustatakse ja ioniseeritakse ning eraldatakse seejärel üksteisest nende massi ja laengu suhte järgi massianalüsaatorite abil. Eraldatud komponentide ionide hulk muudetakse detektoris elektriliseks signaaliks, mille tulemusena registreeritakse massispektrid. Massispektromeetria iseloomustab väga lai kasutusala: ta võimaldab tuvastada nii atomaarseid kui ka molekulaarseid aineid. Lisaks on massispektromeetria omane kõrge tundlikkus ja väga madalad avastamispiirid. Suure analüütilise võimsuse tõttu on massispektromeetria tänapäeval üks laialdaselt kasutatavamaid analüüsimeetodeid. [46]

Massispektromeetria kasutatakse tänapäeval enamasti koos kromatograafilise analüüsiga, kus proovi komponendid esmalt eraldatakse üksteisest kromatograafis ning detekteeritakse seejärel massispektromeetrias. Levinumad kombineeritud analüüsimeetodid tänapäeval on GC-MS ja LC-MS meetodid. Komponentide eraldamine enne nende detekteerimist tõstab oluliselt selektiivsust, mistõttu võimaldavad LC-MS ja GC-MS analüüsida kompleksseid segusid. Kombineeritud meetodite puhul on samuti eeliseks, et ainete täielik kromatograafiline lahutuvus ei ole oluline. LC-MS ja GC-MS meetodid võimaldavad analüüsil saadud mass-kromatogrammil (*TIC- Total Ion Chromatogram*) teostada otsingut kindla massi ja laengu suhetega ionide leidmiseks (*EIC-*

*Extracted Ion Chromatogram*). Kombineeritud meetodid võimaldavad uuritavatele ainetele efektiivselt teostada nii kvalitatiiivset (ainete identifitseerimine) kui ka kvantitatiivset (ainete sisalduse määramine) analüüsi. [46]

### **1.3.1 Elektropihustus-ionisatsioon**

Elektropihustusionisatsioon (ESI) on massispektrometrias kasutatav ioniseerimismeetod, mida kasutatakse vedelfaasilistest proovidest ionide tekitamiseks. Kuna ESI võimaldab ioone eraldada otse vedelast faasist, kasutatakse seda põhiliselt koos vedelikkromatograafilise (LC) analüüsiga.

ESI puhul toimub rakendatud elektrivälja toimele molekulaarsete ionide eraldumine eluendist. Uuritav lahustatakse peenikesse metallkapillaari. Kapillaari ja vastaselektroodi vahele rakendatakse potentsiaalide vahe (sõltuvalt eluendist vahemikus 3–6 kV). Pinge rakendamine tekitab elektrivälja, mille toimele lahuses olevad ionid kogunevad vedeliku pinnale kapillaari otsas. Selle tulemusena hakkab vedelikutilk välja venima, kuni rebib end lõpuks kapillaarist lahti. Pinna küllastumisel hakkavad ionide vahel mõjuma elektrostaatilisest tõukejõud. Kui tõukejõud ületavad vedelikutilga pindpinevusjõu, rebivad ionid end vedelikust lahti ja moodustuvad väiksemad, suurema laengu ja ruumala suhtega tilgakesed. Tilga ruumala vähenemisel tõukejõud suurenevad, mistõttu jagunevad tekkinud tilgakesed omakorda väiksemateks tilgakesteks, mille tulemusel ionid eralduvad järk-järgult eluendist, moodustades järjest suurema laengu osakaaluga tilgakesi. Viimaste eluendijääkide eraldamiseks suunatakse tilgakesed läbi kuumast gaasist, kus eluent aurustub ning järele jäävad vaid eraldatud gaasifaasilised molekulaarsed ionid. [47]

ESI juures on eelkõige oluline eluendi kerge lenduvus, mis võimaldab solvateerimata ionide teket [47]. Kuna ESI-le eelneb tavaliselt vedelikkromatograafiline lahutamine, kasutatakse nii ESI kui LC puhul ühesuguseid eluente. LC puhul on enimkasutatavamateks eluendideks vesi, metanool ja atsetonitriil, mida kasutatakse vesi-orgaanika seguna, mis on sobilik ka ESI jaoks.

ESI eristub elektronionisatsioonist (EI) selle poolest, et ioniseerimise käigus ei anta tekkivatele ionidele suurt energiahulka, mistõttu ei toimu molekulide olulist fragmenteerumist [47]. Seetõttu on ESI meetod küllaltki kõrge tundlikkusega ning võimaldab uuritavate molekulide efektiivset detekteerimist nende molekulmassi järgi. Kuna molekulide struktuuri on võimalik määrata nendest tekkivate fragmentide põhjal, ei sobi ESI üksi hästi molekulide struktuuride analüüsimiseks. Selle

parandamiseks kasutatakse ESI meetodit sageli koos tandem-massispektromeetria meetodiga (ESI-MS/MS).

ESI puhul on oluline tema võime genereerida mitmelaengulisi ioone. Molekuli mitmelaengulisus suurendab detektori tundlikkust ning alandab molekuli massi ja laengu suhet, mis võimaldab ESI puhul kasutada madala nominaalmassi ülempiiriga massianalüsaatoreid [47]. Selle tõttu sobib ESI suure molekulmassiga ainete, näiteks valkude, polümeeride ja teiste suuremate biomolekulide, analüüsimiseks.

### **1.3.2 Tandem-massispektromeetria**

Tandem-massispektromeetria (MS/MS) on oma olemuselt mitmeastmeline massispektromeetria analüüs, mida kasutatakse molekulide struktuuride kindlaks tegemiseks. Tandem-massispektromeetrias eraldatakse esimeses astmes eellasioon, mida soovitakse edasi uurida, ning teostatakse sellele fragmentatsioon. Tekkinud fragmentatsioonide seast eraldatakse omakorda kindla massi ja laengu suhtega ioon, mis detekteeritakse või fragmenteeritakse omakorda edasi. Analüüsi aste ( $MS^n$ ) näitab, mitu korda on tekkivaid ioone üksteisest eraldatud.[47]

### **1.4 Derivatiseerimine**

Derivatiseerimine on keemiline meetod, mille käigus molekulis olev funktsionaalne rühm asendatakse teisega, eesmärgiga muuta selle molekuli füüsikalisi ja/või keemilisi omadusi. Molekuli omaduste muutmine võib olla tähtis nii keemilise sünteesi seisukohalt (et süntees kulgeks ettenähtud suunas) kui ka keemilise analüüsi seisukohalt (tekkiv derivaat on paremate analüütiliste omadustega). Derivatiseerimise puhul on eelkõige oluline reaktsiooni täielik toimumine, reaktsiooni ühesuunalisus ja spetsiifilisus ning tekkiva derivaadi stabiilsus.

HPLC analüüsil kasutatakse ainete derivatiseerimist tihti nende kromatograafilise lahutuvuse ja/või detekteeritavuse parandamiseks. Probleemseteks aineteks HPLC analüüsil on näiteks polaarseid funktsionaalseid rühmi (-OH, -NH<sub>2</sub>, -COOH jt) sisaldavad molekulid, mis pöördfaaskoloni läbides kipuvad kolonni seintele adsorbeeruma, põhjustades kromatogrammil piikide sabatamist ja madalamaid signaali väärtusi. Veel on probleemseteks aineteks ka sarnase struktuuriga ja isomeersed ained, mille retentsiooniajad kipuvad olema väga lähedased, mistõttu kasutatakse nende derivatiseerimist piikide lahutuvuse suurendamiseks. Lisaks kasutatakse

derivatiseerimist ka ebapüsivate analüütide stabiilsuse suurendamiseks eluendi ja temperatuuri suhtes. [48]

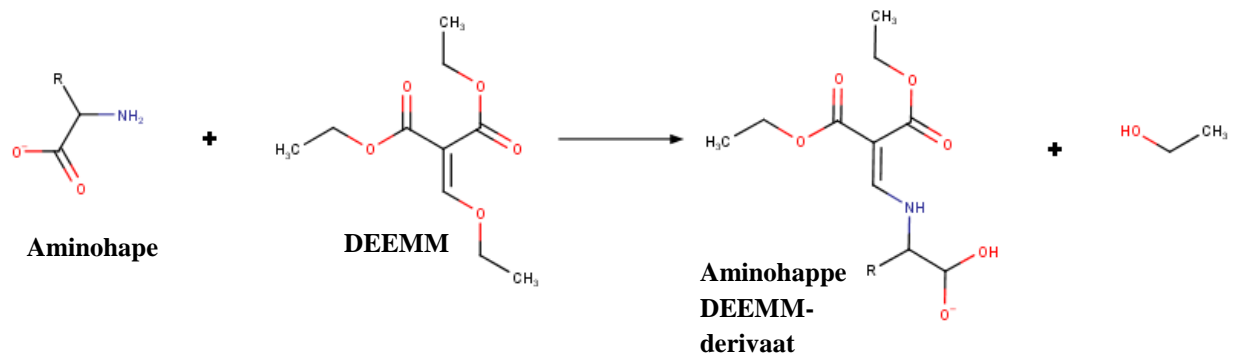
Sõltuvalt vajadusest kasutatakse HPLC analüüsil kaht tüüpi derivatiseerimist: enne kolonni ja pärast kolonni derivatiseerimist. Enne kolonni derivatiseerimise puhul on eesmärgiks nii analüüdi kromatograafilise käitumise kui ka detekteeritavuse parandamine. Kui soovitakse ainult detekteeritavust parandada, kasutatakse pärast kolonni derivatiseerimist. Enne kolonni derivatiseerimine on kahest meetodist eelistatum, kuna ei nõua keerulisemat aparatuuri ning võimaldab laiemat ja mugavamat kasutamist. [48]

#### **1.4.1 Dietüül-etoksümetüülen malonaat**

Dietüül-etoksümetüülen malonaat (DEEMM) on derivatiseeriv reagent, mida kasutatakse aminorühmi sisaldavate biomolekulide keemiliste analüüside parandamiseks LC-MS meetodil.

DEEMM-iga derivatiseerimine on eriti levinud aminohapete puhul. Aminohapete analüüsimiseks LC-MS meetodil on Tartu Ülikoolis välja töötatud meetodid, milles kasutatakse mitmeid derivatiseerimisreagente, seal hulgas ka DEEMM-i. Meetodid põhinevad aminohappe aminorühma reageerimisel reagentiga, moodustades derivaadi, mille retentsiooniaeg pöördfaas LC-kolonnis on pikem. Samuti on derivaat paremini ioniseeruv massispektromeetris. Seega paraneb derivatiseerimise tulemusena analüüsi selektiivsus ja tundlikkus. [1,2,49]

Kromatograafilise lahutuvuse seisukohalt on kõige efektiivsemaks reagentiks just DEEMM, mis suudab lahutada 25 erinevat aminohapet ning võimaldab töötada väga laias kontsentratsioonivahemikus [2]. Samuti sobib DEEMM kõige paremini reagentiks komplekssete maatriksite korral [1,2]. Võrreldes kõige tundlikumat analüüsi võimaldavate derivatiseerivate reagentidega, on DEEMM-i kasutamisel täheldatud veidi kõrgemat avastamis- ja määramispiiri [2]. DEEMM-i reaktsioon aminohapetega aluselises keskkonnas on toodud joonisel 4.



#### Joonis 4. Aminohappe reaktsioon DEEMM-ga (pH = 9)

Oma efektiivsuse tõttu aminohapete analüüsil kasutatakse DEEMM-i ka käesolevas töös primaarseid ja sekundaarseid aminorühmi sisaldavate antibiootikumide derivatiseerimiseks.

## 2. Eksperimentaalne osa

### 2.1 Aparatuur ja kemikaalid

Töös uuriti tabelis 1 nimetatud viie ravimi derivatiseerumist.

**Tabel 1. Uuritavad ravimid**

Nimetus	Tootja(d)	Puhtus	Säilitustemperatuur
Tsiprofloksatsiin	Sigma-Aldrich	≥ 98,0 %	2-8 °C
Norfloksatsiin	Sigma-Aldrich	≥ 98,0 %	2-8 °C
Sulfadimetoksiin	Sigma-Aldrich	≥ 98,5 %	2-8 °C
Sulfametoksasool	Sigma-Aldrich,	≥ 98,0 %	2-8 °C
	Hoffmann-La Roche	teadmata	
Validamütsiin A	Sigma-Aldrich,	≥ 74,1 %	2-8 °C

Derivatiseeriva reagentina kasutati spetsiaalset LC-MS analüüsil derivatiseerimiseks mõeldud DEEMM-i puhtusega ≥ 98,5 % (Sigma-Aldrich).

Ülejäänud kasutatavad kemikaalid: metanool, kontsentreeritud soolhape, boorhape, kaaliumhüdroksiid, sipelghape, atsetonitriil, MilliQ vesi.

LC-MS mõõtmiseks kasutati Agilent 1100 seeria HPLC vedelikkromatograafi, mille detektoriks oliioonlõks-massispektromeeter Agilent XCT. Massispektromeetrilisel analüüsil kasutati positiivsete ioonide režiimi ning ionisatsiooniallikana elektropihustusionisatsiooni.

Ainete kaalumiseks kasutati 0,1 mg lahutusvõimega (nn neljakohalise täpsusega) analüütilist kaalu LA-230S (Sartorius).

Lahuste valmistamisel kasutati ruumalade mõõtmiseks automaatpipette.

### 2.2 Lahuste valmistamine

Solvendi lahuse (0,1 M HCl / 30% MeOH) valmistamiseks lisati 500 ml kolbi 4,165 ml kontsentreeritud HCl (38%) lahust, 150 ml metanooli ning täideti MilliQ veega märgini.

Tsiprofloksatsiini ja norfloksatsiini standardlahused valmistati tahketest analüütilistest standarditest. Standardite kaalumiseks kasutati neljakohalist analüütilist kaalu. Standardlahuste valmistamiseks kasutati solvendina 0,1 M HCl / 30% metanooli lahust. Standardlahused valmistati kontsentratsioonivahemikus 5-7 mg/g. Kõik standardlahused säilitati temperatuuril 2-8 °C.

Töölahused valmistati standardlahuste lahjendamise teel. Lahjendamiseks kasutati MilliQ vett. Töölahused valmistati kontsentratsiooniga ligikaudu 0,059 mg/g. Derivatiseerides väheneb analüüdi kontsentratsioon lahuses ligikaudu 5,9 korda. Seega olid analüüdi kontsentratsioonid lõplikes mõõdetavates lahustes järgus 10 ppm.

Sulfadimetoksiini, sulfametoksasooli ja validamütsiini A standardlahused valmistati tahketest analüütilistest standarditest. Standardite kaalumiseks kasutati neljakohalist analüütilist kaalu. Standardlahuste valmistamiseks kasutati solvendina 0,1 M HCl / 30% metanooli lahust. Standardlahused valmistati kontsentratsiooniga 0,3-0,6 mg/g. Kõik standardlahused säilitati temperatuuril 2-8 °C. Valmistatud standardlahuseid ei lahjendatud MilliQ veega, vaid kasutati otse töölahustena. Derivatiseerides väheneb analüüdi kontsentratsioon lahuses ligikaudu 5,9 korda. Seega on analüüdi kontsentratsioonid lõplikes mõõdetavates lahustes järgus 50-100 ppm.

1:50 DEEMM-i lahuse valmistamiseks lisati 25 ml kolbi 0,5 ml DEEMM-i ning täideti metanooliga märgini.

Boraatpuhverlahused valmistati, lisades tahkele boorhappele ( $H_3BO_3$ ) lahjendatud KOH lahust kuni aluselise keskkonna (pH = 9) saavutamiseni. Lahuse pH mõõtmiseks kasutati eelnevalt kalibreeritud klaaselektroodiga pH-meetrit. Vajaliku boorhappe koguse kaalumiseks kasutati neljakohalist analüütilist kaalu. Boraatpuhverlahused valmistati kontsentratsiooniga 0,75 M.

Analüüsiks vajaliku eluendi (0,1 % sipelghappe) lahuse valmistamiseks lisati 1 liitrisse mõõtsilindrisse 1 ml sipelghapet ning täideti MilliQ veega märgini.

### **2.3 Derivatiseerimismetoodika**

Derivatiseerimiseks lisati 250 µl värskest valmistatud töölahusele 375 µl DEEMM-i lahust (1:50 metanoolis) ning 875 µl 0,75 M boraatpuhtrit. Derivatiseerimisreaktsiooni toimumist oodati kuni üks minut. Derivatiseeritud lahused filtreeriti, kasutades süstalfiltrit poori suurusega 0,45 µm. Derivatiseerimisreaktsiooni alghetk ehk DEEMM-i lisamise aeg fikseeriti kellaaajaliselt minuti

täpsusega. Samuti fikseeriti analüüside teostamise kellaajad, et oleks teada, kui kaua on derivatiseerimisreaktsioon saanud toimuda enne lahuste analüüsimise algust.

Derivatiseerimata lahuste valmistamiseks lisati 250 µl värskest valmistatud töölahusele 375 µl puhast metanooli ning 875 µl 0,75 M boraatpuhvrit. Derivatiseerimata lahused filtreeriti, kasutades süstalfiltrit poori suurusega 0,45 µm.

Foonilahuste valmistamiseks lisati 250 µl 0,1 M HCl / 30% metanooli lahusele 375 µl DEEMM-i lahust (1:50 metanoolis) ning 875 µl 0,75 M boraatpuhvrit. Foonilahused filtreeriti, kasutades süstalfiltrit poori suurusega 0,45 µm.

## 2.4 Analüüsimetoodika

### HPLC parameetrid:

Kolonnina kasutati HPLC pöördfaaskoloni Zorbax Eclipse XDB C18 (labori koodiga XDB-C18-01), mõõtmetega 4,6 x 150 mm ja osakeste suurusega 5 µm. Kasutatud eluendi komponendid: (A) 0,1 % metaanhape, (B) atsetonitriil (MeCN). Elueerimisel kasutatud gradiendiprogramm on toodud tabelis 2. Proovi süsti suurus oli 5 µl.

**Tabel 2. Kasutatud gradiendiprogramm (eluendi voolukiirus 0,9 ml/min)**

Aeg (min)	MeCN (%)
0.00	10
1.00	10
12.00	100
18.00	100
22.00	10

### MS parameetrid:

Pihustusgaasi rõhk oli 50 psi (340 kPa), kuivatusgaasi voolukiirus oli 12 l/min ja temperatuur 350°C. MS/MS analüüsil olid fragmentatsioonipotentsiaalid analüütidel erinevad: sulfadimetoksiini puhul 1,2 V, validamütsiin A puhul 0,8 V, tsiprofloksatsiini, norfloksatsiini ja sulfametoksasooli puhul 1,0 V.

### 3. Tulemused ja arutelu

#### 3.1 Reaktsioonimehhanism

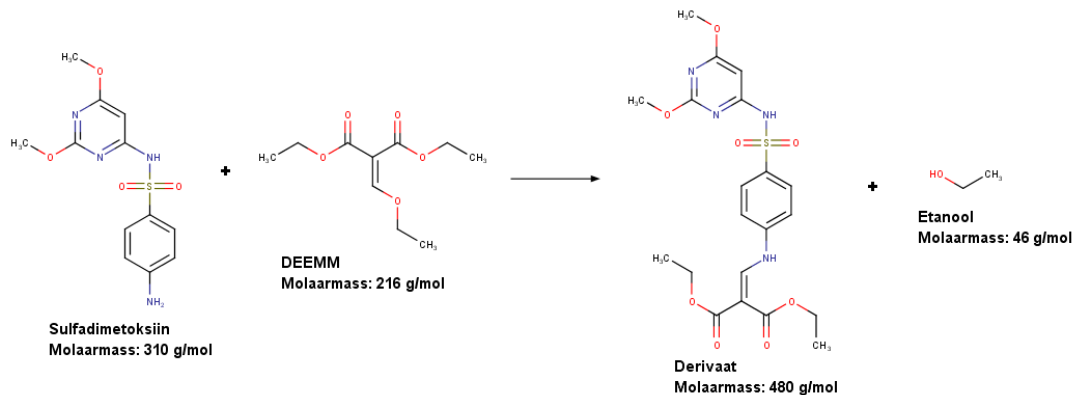
Derivatiseerumine viiakse läbi aluselises keskkonnas ( $\text{pH} = 9$ ), kus reaktsioonis osalev aminorühm on deprotoneeritud olekus. Derivatiseerumisel toimub nukleofiilne asendusreaktsioon, kus nukleofiilseks rühmaks on elektronpaariga varustatud aminorühma lämmastik. Elektrofiilseks tsentriks on karbokatsioon, mis tekib DEEMM-i molekulis etoksürühma lahkumisel. Reaktsiooni tulemusena tekib derivaat ning eraldub etanooli molekul. Kromatograafilisel analüüsil on eluendiks 0,1 % sipelghape, mis loob mobiilses faasis happelise keskkonna. Selle tõttu võivad nii tekkinud derivaadi kui ka derivatiseerumata jäänud ravimi molekulid kolonnist läbi liikudes protoneeruda, mis on nende ESI allikas ioniseerumise aluseks.

Nii ioniseeritud kui ka ioniseerimata molekulid liiguvad edasi massispektromeetrisse, kus toimub elektropihustusionisatsioonil tekitatud molekulaarioonide detekteerimine. Lisaks tavalisele massispektromeetrialet kasutatakse ka tandem-massispektromeetrialet, eraldades eellasioonina derivaadist tekkinud protoneeritud molekulaariooni ning uurides selle fragmentatsiooni. Peamiseks tekkivaks fragmendiks on fragmentioon, kust on eraldunud üks DEEMM-i molekulis olev etoksürühm. Lahkuv etoksürühm on tugevalt aluseline, mistõttu liidab ta endaga protoneeritud aminorühma küljes oleva vesiniku. Tulemusena eraldub fragmentatsioonil etanooli molekul ning tekkiva fragmendi massi ja laengu suhe on 46 võrra väiksem algse derivaadi massi ja laengu suhtest.

Lisaks protoneerumisele võivad derivatiseeritud ravimitest tekkida ioonid ka metalliioonide liitumise teel, näiteks kaaliumlisandioon  $[\text{M}+\text{K}]^+$  või naatriumlisandioon  $[\text{M}+\text{Na}]^+$ , mis suurendavad molekulaariooni massi ja laengu suhet vastavalt 39 ja 23 võrra.

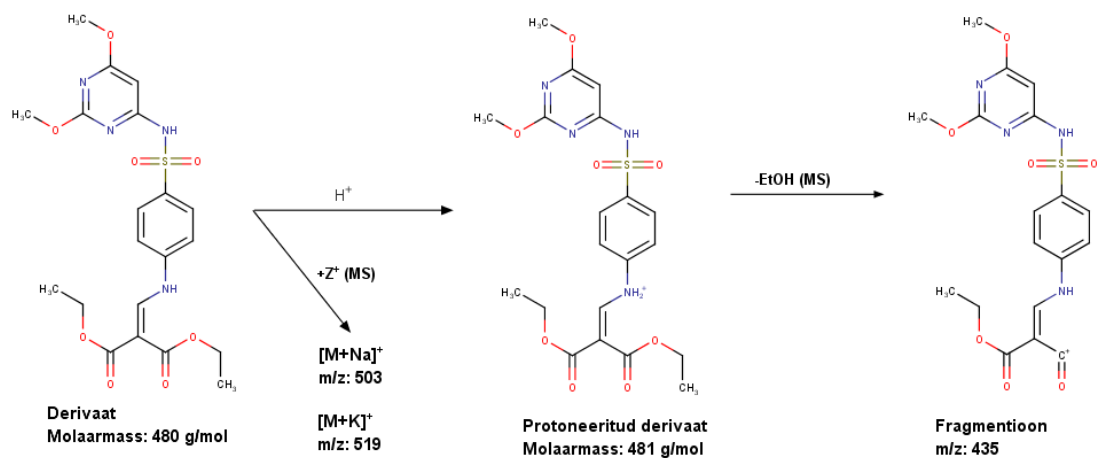
#### 3.2 Sulfadimetoksiini derivatiseerimine

Sulfadimetoksiini puhul on reageerivaks funktsionaalseks rühmaks aromaatses tuuma küljes paiknev primaarne aminorühm, mis reaktsioonikeskkonnas ( $\text{pH} = 9$ ) on deprotoneeritud olekus. Sulfadimetoksiin (molekulmassiga 310 g/mol) reageerib DEEMM-ga (molekulmass 216 g/mol). Reaktsiooni käigus moodustub derivaat (molekulmassiga 480 g/mol) ja eraldub etanool (46 g/mol). Sulfadimetoksiini derivatisatsioonireaktsioon on toodud joonisel 5.



### Joonis 5. Sulfadimetoksiini derivatiseerimisreaktsioon

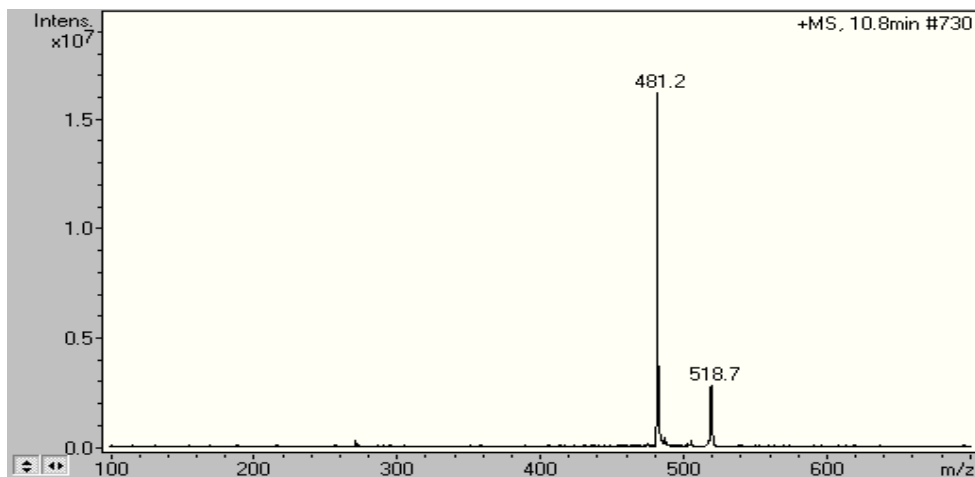
Tekkinud derivaadi ja derivatiseerumata jäänud ravimi molekulid protoneeruvad mobiilses faasis (massi ja laengu suhted vastavalt 481 g/mol ja 311 g/mol). Massispektromeetris loovutab derivaadi molekulaarioon fragmentatsioonil etanooli molekuli, moodustades fragmendi massi ja laengu suhtega 435. Kaaliumi- ja naatriumiaduktide massi ja laengu suhted on vastavalt 519 ning 503. Sulfadimetoksiini ioniseerimise ja fragmenteerumise protsess on näidatud joonisel 6.



### Joonis 6. Sulfadimetoksiini ioniseerumine ja fragmentatsioon

Töölahused derivatiseeriti ning analüüsid teostati ligikaudu 40 minutit pärast derivatiseerimise algust. Esmalt mõõdeti derivatiseeritud lahust ning teostati sellele tandem-massispektromeetriline analüüs. Seejärel mõõdeti derivatiseerimata lahust ehk lahust, kuhu ei olnud lisatud derivatiseerivat reagenti.

Derivatiseeritud lahuse mass-kromatogrammil esineb piik retentsiooniajaga 8,3 min, millele vastab massispektris molekulaarioon massi ja laengu suhtega 311. See vastab kromatograafilisel analüüsil protoneeritud ja derivatiseerumata jäänud sulfadimetoksiini molekulmassile (311 g/mol). Lisaks ravimi piigile esineb ka teine, intensiivsem piik retentsiooniajaga 10,8 min. Sellele piigile vastab massispektris molekulaarioon massi ja laengu suhtega 481. See vastab kromatograafilisel analüüsil protoneerunud derivaadi molekulmassile (481 g/mol). Lisaks esineb ka piik massi ja laengu suhtega 519, mille puhul on tegemist kaaliumlisandiooniga. Sulfadimetoksiini derivaadi massispekter on toodud joonisel 7.



### Joonis 7. Sulfadimetoksiini derivaadi massispekter

Derivaadi ioonile teostatud MS/MS analüüsil (481->435) ei esine eeldatavat fragmenti massi ja laengu suhtega 435. Seetõttu võib tekkinud derivaadi molekul olla teistsuguse struktuuriga kui algselt eeldati. Samas võib aga fragmentatsiooni energia olla antud derivaadi fragmenteerimiseks liiga madal. Selle kontrollimiseks suurendatakse järgneval mõõtmisel fragmentatsioonipotentsiaali 1,0 V pealt 1,2 V peale.

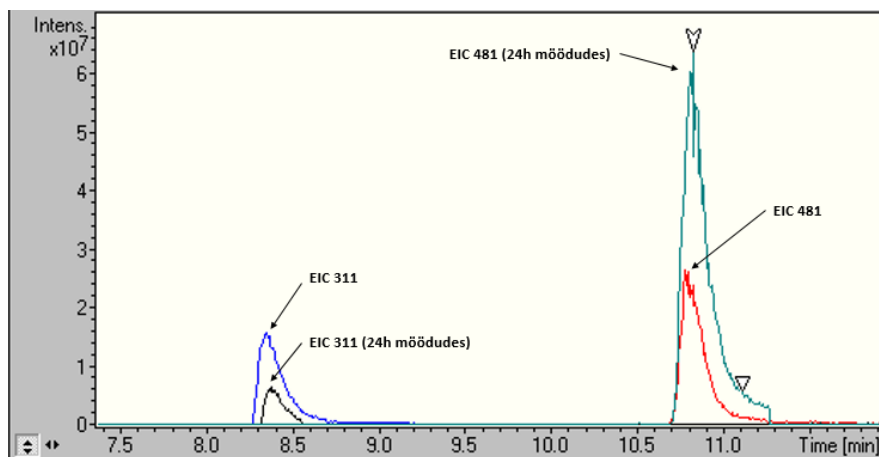
Derivatiseerumata lahuse analüüsil esineb mass-kromatogrammil samuti ravimile vastav piik retentsiooniajaga 8,3 min ( $m/z$  311). Derivaadile omast piiki ( $m/z$  481) lahuses ei leidu. Järelikult võib üsnagi kindlalt väita, et derivatiseerimisel tekkiva produkti puhul on tõepoolest tegemist derivaadi molekuliga.

Järelikult derivatiseerimisreaktsioon toimub eeldatava mehhanismi alusel ning retentsiooniaeg derivatiseerimisel pikeneb. Kuna aga DEEMM-i hulk lahuses on suurem ravimi hulgast ning

lahuses esineb endiselt ka mittederivatiseerunud ravimit, ei ole derivatiseerimune momentaalne, vaid võtab eeldatust rohkem aega. Seetõttu mõõdeti sama lahust järgmisel päeval uuesti ehk ligikaudu 24 tundi peale derivatiseerimise algust ning saadud tulemusi võrreldi eelmise päeva omadega.

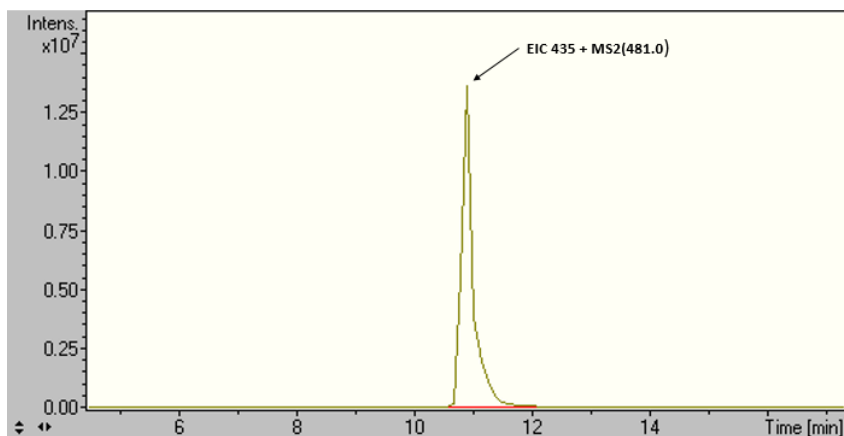
Derivatiseerumata lahuste võrdlusel on ravimile vastava piigi (m/z 311) intensiivsus 24 tunni möödudes veidi vähenenud. Seega võib sulfadimetoksiin uuritavas lahuses aja jooksul laguneda. Produktile vastavat piiki (m/z 481) ei esine ka 24 tunni möödudes.

Derivatiseeritud lahuses on 24 tunni möödudes ravimile vastava piigi (m/z 311) intensiivsus oluliselt vähenenud. Samas on derivaadile vastava piigi (m/z 481) intensiivsus oluliselt suurenenud. Lisaks on tekkiva derivaadi piigi intensiivsus oluliselt suurem algsest ravimi piigi intensiivsusest. Signaalide erinevus on näidatud joonisel 8.

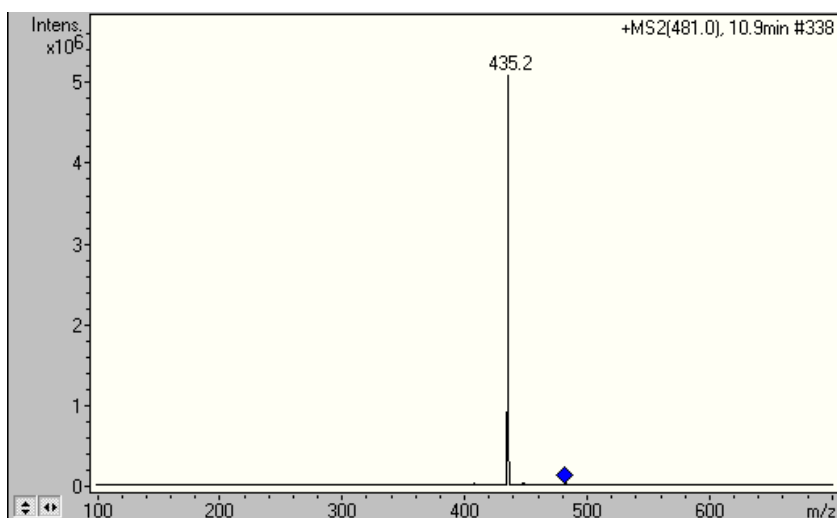


**Joonis 8. Sulfadimetoksiini derivatiseeritud lahuste masskromatogrammide võrdlus**

Derivaadile teostatud kõrgema fragmentatsioonienergiaga MS/MS analüüs (481->435) näitab intensiivset ja sümmeetrilist piiki, mille retentsiooniaeg vastab küllaltki täpselt derivaadi omale (10,9 min). MS/MS analüüsi masskromatogramm ja massispekter on välja toodud joonistel 9 ja 10.



**Joonis 9. Sulfadimetoksiini MS/MS analüüs**



**Joonis 10. Sulfadimetoksiini MS/MS massispekter**

Saadud tulemustest võib järeldada, et uuritav sulfadimetoksiin tõepoolest derivatiseerub ja fragmenteerub eeldatava mehhanismi alusel.

Kokkuvõtteks võib järeldada, et kasutatud derivatiseerimismetoodika toimib sulfadimetoksiini puhul. Derivatiseerimine suurendab retentsiooniaega 8,3 minutilt 10,9 minutile, mis parandab analüüsi selektiivsust. Samuti annab derivaat võrreldes ravimiga massispektromeetris oluliselt kõrgema signaali. Seetõttu võimaldab derivatiseerimine väga väikeste ravimi kontsentratsioonide puhul parandada analüüsi tundlikkust. Derivatiseerimine ei ole aga momentaalne, mistõttu saavutatakse suur signaalide erinevus alles 24 tundi pärast reagenti lisamist. Lisaks ei tehtud kindlaks, kui palju aega kulub kogu ravimi ära derivatiseerimiseks ning kas tekkiv derivaat pikema aja möödumisel lagunema ei hakka. Seetõttu on antud tulemuste põhjal optimaalseks

sulfadimetoksiini LC-MS analüüsi teostamise ajaks 24 tundi peale derivatiseerimisreagenti lisamist.

### **3.3 Sulfametoksasooli derivatiseerimine**

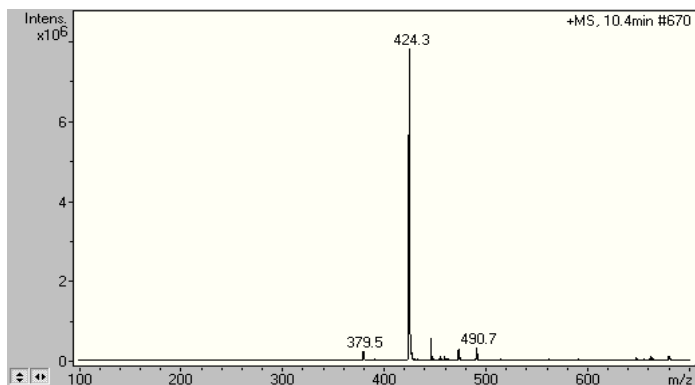
Sulfametoksasoolis on sarnaselt sulfadimetoksiinile reageerivaks funktsionaalseks rühmaks aromaatses tuuma küljes paiknev primaarne aminorühm, mis reaktsioonikeskkonnas (pH = 9) on deprotoneeritud olekus. Sulfametoksasool (molekulmassiga 253 g/mol) reageerib DEEMM-ga (molekulmass 216 g/mol). Reaktsioonil moodustub derivaat (molekulmassiga 423 g/mol) ja eraldub etanool (46 g/mol). (vt Lisa 1)

Tekkinud derivaadi ja derivatiseerumata jäänud ravimi molekulid protoneeruvad mobiilses faasis (massi ja laengu suhted vastavalt 424 g/mol ja 254 g/mol). Massispektromeetris loovutab derivaadi molekulaarioon fragmentatsioonil teise etanooli molekuli, moodustades fragmendi massi ja laengu suhtega 435. Kaaliumi- ja naatriumiaduktide massi ja laengu suhted on vastavalt 519 ning 503. (vt Lisa 2)

#### **Sulfametoksasool (Sigma-Aldrich)**

Töölahused derivatiseeriti ning analüüsid teostati ligikaudu kolm ja pool tundi peale derivatiseerumise algust (DEEMM-i lisamist). Esimesena mõõdeti derivatiseeritud lahust ning teostati sellele tandem-massispektromeetria analüüs. Teisena mõõdeti derivatiseerumata lahust ehk lahust, kuhu ei lisatud derivatiseeruvat reagenti.

Derivatiseeritud lahuse masskromatogrammil esineb piik retentsioonijaga 7,7 min, millele vastab massispektril molekulaarioon massi ja laengu suhtega 254. See vastab derivatiseerumata jäänud ja mobiilses faasis protoneerunud sulfametoksasooli molekulmassile (254 g/mol). Lisaks ravimi piigile esineb ka teine, intensiivsem piik retentsioonijaga 10,5 min. Sellele vastab massispektril molekulaarioon massi ja laengu suhtega 424. See vastab derivatiseerimisel tekkinud ja mobiilses faasis protoneerunud derivaadi molekulmassile (424 g/mol). Lisaks esineb väiksemal määral ioone massi ja laengu suhetega 380 ja 491. Reaktsioonil tekkinud derivaadi massispekter on toodud joonisel 11.



### Joonis 11. Sulfametoksasooli (Sigma-Aldrich) derivaadi massispekter

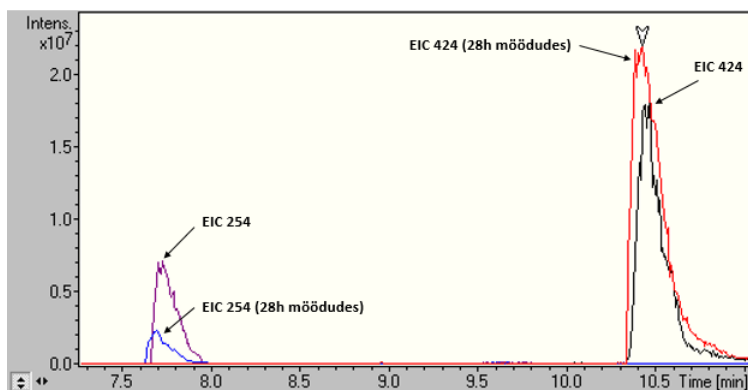
Derivaadi molekulaarioonile teostatud MS/MS analüüsil (424->378) esineb intensiivne ja sümmeetriline piik, mille retentsiooniaeg vastab täpselt derivaadi omale (10,5 min). Järelikult võib üsnagi kindlalt väita, et produkt molekulmassiga 424 g/mol on tõepoolest reaktsiooni käigus tekkinud derivaat.

Derivatiseerimata lahuse analüüsil esineb masskromatogrammil samuti ravimile omane piik retentsiooniajaga 7,7 min ( $m/z$  254). See piik on ka suurema intensiivsusega derivatiseeritud lahuse kromatogrammil olevast ravimi piigist. Järelikult derivatiseerumise käigus ravimile omase piigi intensiivsus väheneb. Derivaadi molekulile vastavat piiki ( $m/z$  424) lahuses ei leidu.

Järelikult derivatiseerimisreaktsioon toimub eeldatava mehhanismi alusel ning retentsiooniaeg derivatiseerumisel pikeneb. Kuna aga DEEMM-i hulk lahuses on suurem ravimi hulgest ning lahuses esineb endiselt ka mittederivatiseerunud ravimit, ei ole derivatiseerumine momentaalne, vaid võtab eeldatust rohkem aega. Seetõttu mõõdeti sama lahust järgmisel päeval uuesti ehk ligikaudu 28 tundi peale derivatiseerimist ning saadud tulemusi võrreldi eelnevatega.

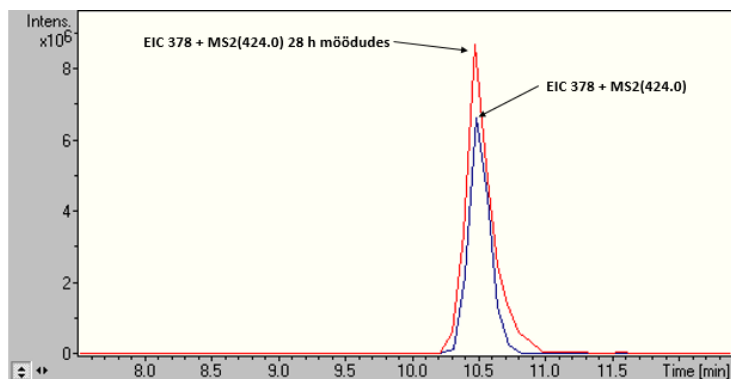
Derivatiseerumata lahuste võrdlemisel on ravimi piigi ( $m/z$  254) piigi intensiivsus 28 tunni möödudes veidi vähenenud. Seega võib sulfametoksasool uuritavas lahuses aja jooksul laguneda. Derivaadile omast piiki ( $m/z$  424) ei esine ka 28 tundi hiljem.

Derivatiseeritud lahuste võrdlemisel on ravimi piigi ( $m/z$  254) intensiivsus 28 tunni möödudes oluliselt vähenenud. Derivaadi piigi ( $m/z$  424) intensiivsus on aga tõusnud. Lisaks on tekkiva derivaadi piigi intensiivsus oluliselt suurem algsest ravimi piigi intensiivsusest. Signaalide erinevus on välja toodud joonisel 12.



**Joonis 12. Sulfametoksasooli (Sigma-Aldrich) derivatiseeritud lahuste võrdlus**

Derivaadi molekulaarioonile teostatud MS/MS analüüside (424->378) võrdlemisel on ka fragmentioonile massi ja laengu suhtega 378 vastava piigi intensiivsus 28 tunni möödudes tõusnud. MS/MS analüüsi signaalide erinevust kirjeldab joonis 13.



**Joonis 13. Sulfametoksasooli (Sigma-Aldrich) MS/MS analüüside võrdlus**

### Sulfametoksasool (Hoffmann-La Roche)

Töölahused derivatiseeriti ning lahustele teostatud analüüsid toimusid ligikaudu kuus tundi peale derivatiseerimise algust. Esimesena mõõdeti derivatiseeritud lahust ning teostati sellele tandem-massispektromeetria analüüs. Teisena mõõdeti derivatiseerimata lahust ehk lahust, kuhu ei lisatud derivatiseerivat reagenti.

Sarnaselt sulfametoksasooliga (Sigma-Aldrich) esinevad ka sulfametoksasooli (Hoffmann-La Roche) puhul ravimile omased piigid retentsiooniajaga 7,6 min ja derivaadile omased piigid retentsiooniajaga 10,4 min. Samuti teostati ka sulfametoksasooli (Hoffmann-La Roche) lahustele

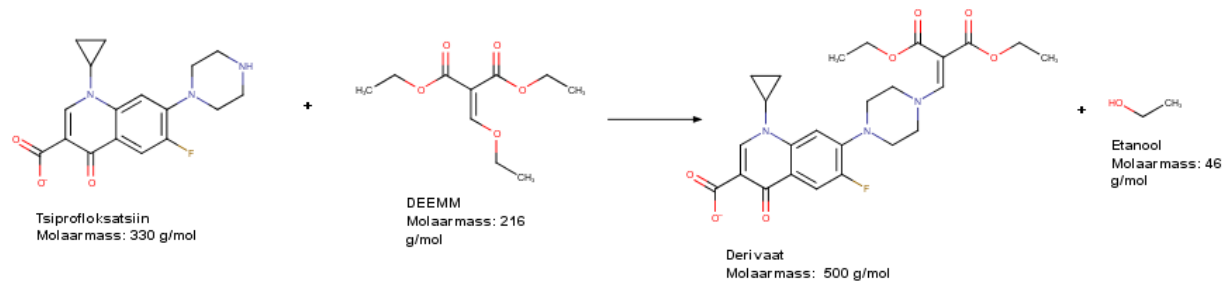
kordusmõõtmise järgmisel päeval ehk ligikaudu 30 tundi peale derivatiseerumise algust. Sarnaselt sulfametoksasooliga (Sigma-Aldrich) on ka sulfametoksasooli (Hoffmann-La Roche) puhul 30 tunni möödudes ravimi piigi intensiivsus vähenenud ja derivaadi oma tõusnud. (vt Lisa 5)

Derivaadi molekulaarioonile teostatud MS/MS analüüside (424->378) võrdlemisel on ka fragmentioonile massi ja laengu suhtega 378 vastava piigi intensiivsus 30 tunni möödudes tõusnud. (vt Lisa 6 ja Lisa 7)

Kokkuvõtteks võib järeldada, et rakendatud derivatiseerimismetoodika toimib sulfametoksasooli puhul. Derivatiseerumine ning fragmentatsioon toimuvad eeldatud mehhanismi alusel. Derivatiseerimine suurendab retentsiooniaega 7,7 minutilt 10,5 minutile, mis parandab analüüsi selektiivsust ja täpsust. Samuti annab derivaat võrreldes ravimiga massispektrometris oluliselt kõrgema signaali. Seetõttu võimaldab derivatiseerimine väga väikeste ravimi kontsentratsioonide puhul parandada analüüsi tundlikkust. Derivatiseerimine ei ole aga momentaalne, mistõttu saavutatakse suur signaalide erinevus alles 28-30 tundi pärast reagenti lisamist. Lisaks ei tehtud kindlaks, kui palju aega kulub kogu ravimi ära derivatiseerimiseks ning kas tekkinud derivaat pikema aja möödumisel lagunema ei hakka. Seetõttu on antud tulemuste põhjal optimaalseks sulfametoksasooli LC-MS analüüsi teostamise ajaks 28-30 tundi peale derivatiseerimisreagenti lisamist.

### **3.4 Tsiprofloksatsiini derivatiseerimine**

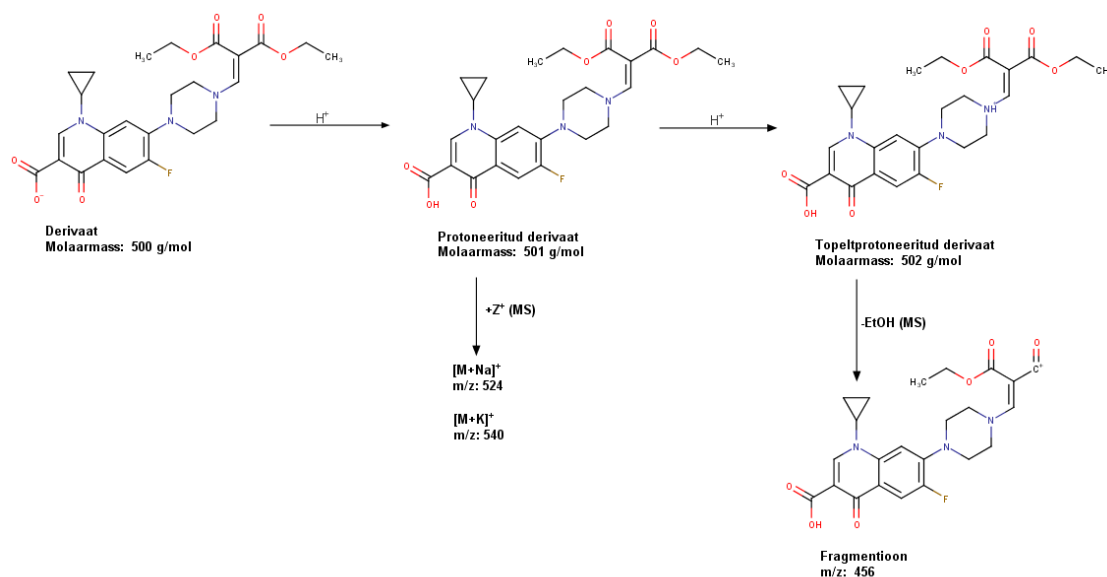
Tsiprofloksatsiini (molekulmass 331 g/mol) puhul on reageerivaks funktsionaalseks rühmaks piperatsinüülse tsükli küljes paiknev sekundaarne aminorühm, mis reaktsioonikeskkonnas (pH = 9) on deprotoneeritud olekus. Tertsiaarsed aminorühmad steeriliste takistuste tõttu reaktsioonist osa ei võta. Lisaks aminorühmadele sisaldab tsiprofloksatsiini molekul karboksüülrühma, mis on samuti deprotoneeritud olekus. Seetõttu on tsiprofloksatsiini molekulmass uuritavas lahuses 1g/mol võrra väiksem mitteioonse vormi molekulmassist. Tsiprofloksatsiin (molekulmass 330 g/mol) reageerib DEEMM-ga (molekulmass 216 g/mol). Reaktsiooni käigus moodustub derivaat (molekulmassiga 500 g/mol) ja eraldub etanool (46 g/mol). Tsiprofloksatsiini derivatiseerimisreaktsioon on välja toodud joonisel 14.



## Joonis 14. Tsiprofloksatsiini derivatiseerimisreaktsioon

Tekkinud derivaadi ja derivatiseerumata jäänud ravimi molekulid protoneeruvad happelises mobiilses faasis. Tsiprofloksatsiini puhul protoneeruvad nii karboksüül- kui ka aminorühm ja tekib ioon molekulmassiga 332 g/mol. Kromatograafilise lahutamise tingimustel (eluendi pH ~ 2) ja ESI allikas derivatiseeritud molekul protoneerub omandades positiivse laengu.

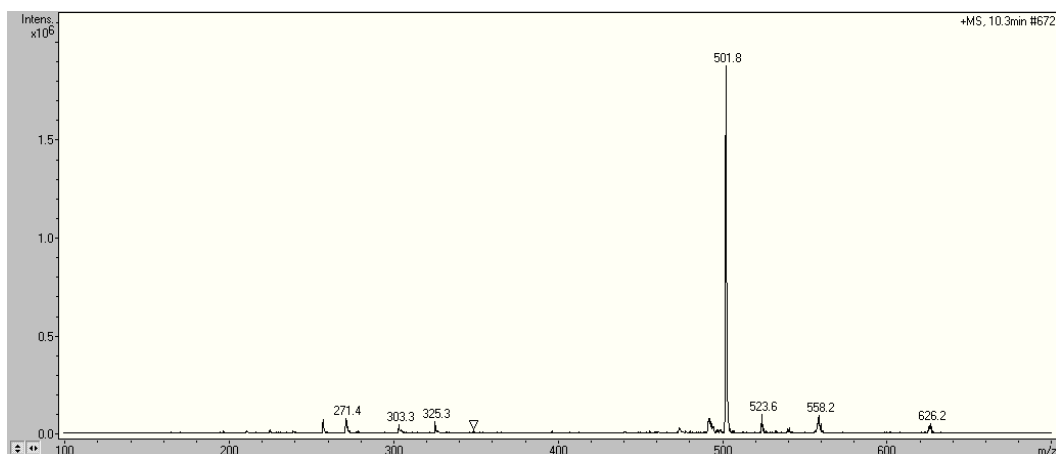
Massispektrometris loovutab protoneeritud derivaadi molekulaarioon (massi ja laengu suhtega 502) etanooli molekuli ja moodustub fragmentioon massi ja laengu suhtega 456. Moodustuda võivad ka naatriumi- ja kaaliumilisandioonid massi ja laengu suhetega vastavalt 524 ja 540. Tsiprofloksatsiini ioniseerimist ja fragmenteerumist kirjeldab joonis 15.



## Joonis 15. Tsiprofloksatsiini ioniseerimine ja fragmentatsioon

Tsiprofloksatsiiniga teostati kokku 3 erinevat mõõtmist erinevatel ajahetkedel peale derivatiseerimise algust. Mõõtmised teostati nii derivatiseeritud kui derivatiseerimata lahustega.

Esimene analüüs teostati ligikaudu 9 tundi peale DEEMM-i lisamist töölahusesse. Analüüsil saadud masskromatogrammil esineb piik retentsioonijaga 5,9 min, millele vastab massispektrometris ioon massi ja laengu suhtega 332. See vastab derivatiseerumata jäänud ja protoneerunud tsiprofloksatsiini molekulmassile (332 g/mol). Lisaks esineb kromatogrammil teine, intensiivsem piik retentsioonijaga 10,4 min, millele vastab massispektris ioon massi ja laengu suhtega 502. See vastab derivatiseerimisreaktsioonil tekkinud ja protoneerunud derivaadi molekulmassile (502 g/mol). Lisaks esineb väiksemal määral muid ioone, mille puhul on tõenäoliselt tegemist erinevate derivaadi fragmentidega. Tekkinud derivaadi massispekter on välja toodud joonisel 16.

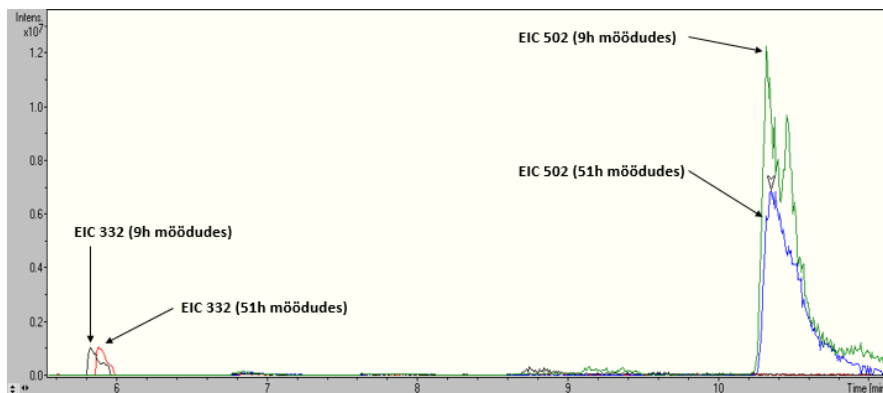


### Joonis 16. Tsiprofloksatsiini derivaadi massispekter.

Derivatiseerumata lahuse kromatogrammil esineb samuti ravimile omane piik 5,9 min juures ( $m/z$  332). Reaktsioonil tekkiva derivaadi piiki ( $m/z$  502) lahuses ei esine. Seega võib üsna kindlalt väita, et derivatiseeritud lahuses oleva iooni puhul massi ja laengu suhtega 502 on tõepoolest tegemist derivaadi molekuliga.

Kuna DEEMM-i hulk lahuses on suurem ravimi hulgast ning lahuses esineb endiselt derivatiseerumata jäänud ravimit, ei ole derivatiseerimisreaktsioon momentaalne. Seetõttu teostati lahustega teine mõõtmine kaks päeva hiljem ehk ligikaudu 51 tundi peale derivatiseerumise algust ning võrreldi saadud tulemusi eelnevatega.

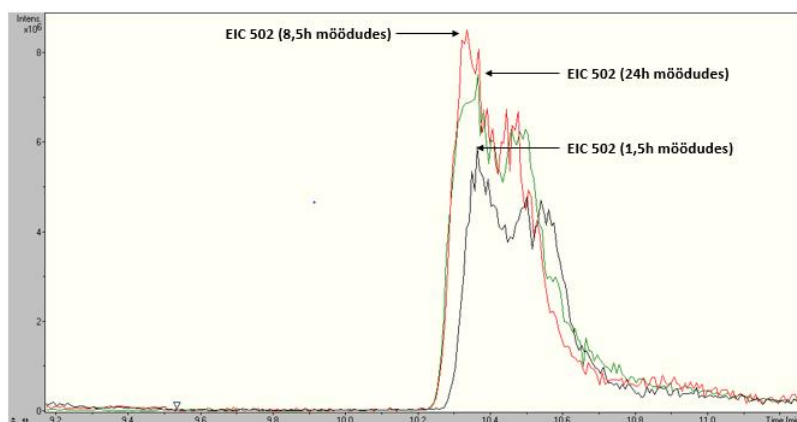
Tulemusest selgus, et 51 tundi peale derivatiseerumise algust on derivaadile omane piik ( $m/z$  502) väiksema intensiivsusega kui ta oli 9 tundi peale derivatiseerumise algust. Ravimile omased piigid ( $m/z$  302) olid aga võrdselt intensiivsustega. Selle põhjuseks võib olla derivaadi lagunemine või massispektromeetri tundlikkuse erinevus erinevatel päevadel. Signaalide erinevus on välja toodud joonisel 17.



**Joonis 17. Tsiprofloksatsiini masskromatogrammide võrdlus (9 h ja 51 h)**

Järgmise sammuna määrati optimaalne ajahetk, mil derivaadi kontsentratsioon lahuses on kõige kõrgem. Selleks valmistati värske derivatiseeritud lahus ning teostati sellele 24 tunni pikkune analüüs, mõõtes lahust ligikaudu iga tunni aja tagant, eesmärgiga uurida derivaadile vastava piigi intensiivsuse muutust ajas.

Mõõtmisest selgus, et derivaadile vastava piigi ( $m/z$  502) intensiivsus saavutab maksimumi 8,5 tundi peale derivatiseerimise algust ning hakkab seejärel langema (joonis 18).



**Joonis 18. Tsiprofloksatsiini 24 tunnise analüüsi masskromatogrammide võrdlus**

Järelikult on tsiprofloksatsiini optimaalseks LC-MS analüüsi teostamise ajaks 8,5 tundi peale derivatiseeriva reagenti lisamist lahusesse.

Kokkuvõtteks võib järeldada, et kasutatud derivatiseerimismetoodika toimib tsiprofloksatsiini puhul. Derivatiseerimine suurendab retentsiooniaega 5,9 minutilt 10,4 minutile, mis parandab analüüsi selektiivsust ja täpsust. Samuti annab derivaat võrreldes ravimiga massispektromeetris oluliselt kõrgema signaali. Seetõttu võimaldab derivatiseerimine väga väikeste ravimi kontsentratsioonide puhul parandada analüüsi tundlikkust. Derivatiseerimine ei ole aga momentaalne, vaid võtab aega. Kasutades antud metoodikat tsiprofloksatsiini analüüsimiseks, on optimaalseks LC-MS analüüsi teostamise ajaks 8,5 tundi peale derivatiseerimisreagenti lisamist lahusesse.

### **3.5 Norfloksatsiini derivatiseerimine**

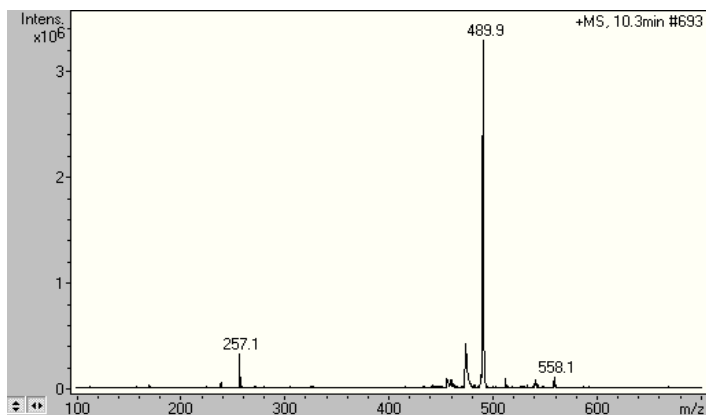
Norfloksatsiini (molekulmass 319 g/mol) puhul on sarnaselt tsiprofloksatsiiniga reageerivaks funktsionaalrühmaks piperatsinüülse tsükli küljes paiknev sekundaarne aminorühm, mis reaktsioonikeskkonnas (pH = 9) on deprotoneeritud olekus. Tertsiaarsed aminorühmad steeriliste takistuste tõttu reaktsioonist osa ei võta. Lisaks aminorühmadele sisaldab norfloksatsiini molekul karboksüülrühma, mis on samuti deprotoneeritud olekus. Seetõttu on norfloksatsiini molekulmass uuritavas lahuses 1g/mol võrra väiksem neutraalse vormi molekulmassist. Tsiprofloksatsiin (molekulmass 318 g/mol) reageerib DEEMM-ga (molekulmass 216 g/mol). Reaktsiooni käigus moodustub derivaat (anioon molekulmassiga 488 g/mol) ja eraldub etanool (46 g/mol). (vt lisa 3)

Tekkinud derivaadi ja derivatiseerumata jäänud ravimi molekulid protoneeruvad happelises mobiilses faasis. Norfloksatsiini puhul protoneeruvad nii karboksüül- kui ka aminorühm ja tekib ioon molekulmassiga 320 g/mol. Derivaadi korral protoneerub nii karboksüülrühm kui ka reaktsioonil moodustunud tertsiaarne aminorühm.

Massispektromeetris loovutab protoneeritud derivaadi molekulaarioon (massi ja laengu suhtega 490) etanooli molekuli ja moodustub fragmentioon massi ja laengu suhtega 444. Moodustuda võivad ka naatriumi- ja kaaliumilisandioonid massi ja laengu suhetega vastavalt 512 ja 528. (vt lisa 4)

Sarnaselt tsiprofloksatsiinile teostati ka norfloksatsiiniga kokku 3 mõõtmist erinevatel ajahetkedel pärast DEEMM-i lisamist lahusesse. Mõõtmised teostati nii derivatiseeritud kui ka derivatiseerimata lahustega.

Esimene mõõtmine teostati ligikaudu 11,5 tundi peale derivatiseerimise algust. Analüüsil saadud masskromatogrammil esineb piik retentsiooniajaga 5,8 min, millele vastab massispektris ioon massi ja laengu suhtega 320. See vastab derivatiseerumata jäänud ja protoneerunud norfloksatsiini molekulmassile (319 g/mol). Lisaks esineb ka teine, intensiivsem ja suhteliselt lai piik retentsiooniajaga 10-10,2 min, millele vastab massispektris ioon massi ja laengu suhtega 490. See vastab derivatiseerimisel tekkinud ja protoneerunud derivaadi molekulmassile (489 g/mol). Lisaks esineb vähemal määral muid molekulaarioone, mille puhul on tõenäoliselt tegemist reaktsiooni kõrvalproduktide või erinevate derivaadi fragmentidega. Derivaadi massispekter on välja toodud joonisel 19.

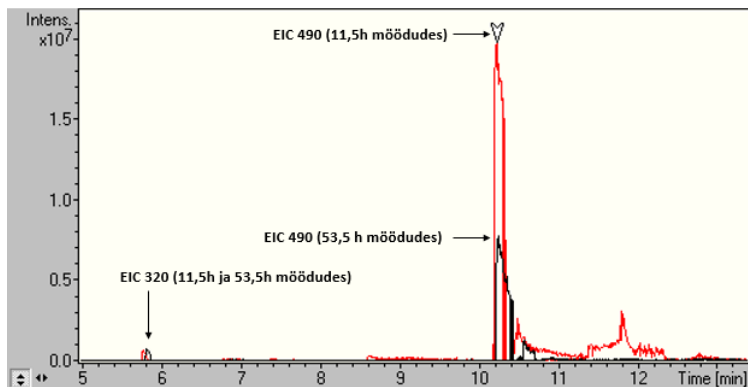


### Joonis 19. Norfloksatsiini derivaadi massispekter

Derivatiseerimata lahuse masskromatogrammil esineb samuti ravimile vastav piik retentsiooniajaga 5,8 min ( $m/z$  320). Derivaadile vastavat piiki ( $m/z$  490) lahuses ei leidu. Seega võib üsna kindlalt väita, et ioon massi ja laengu suhtega 490 on tõepoolest reaktsiooni käigus tekkinud derivaat.

Kuna DEEMM-i hulk lahuses on suurem ravimi hulgast ja lahuses esines endiselt derivatiseerumata jäänud ravimit, ei ole derivatiseerimine momentaalne. Seega mõõdeti sama lahust uuesti kaks päeva hiljem ehk ligikaudu 53,5 tundi peale derivatiseerimise algust ja võrreldi saadud tulemusi eelnevatega.

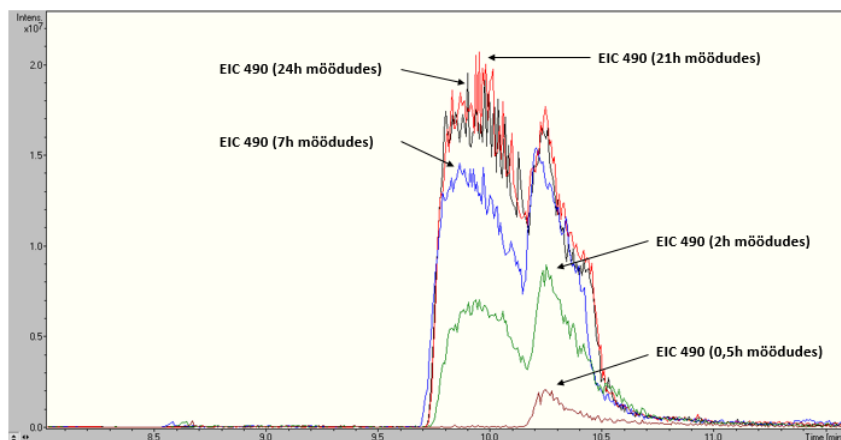
Tulemustest selgus, et 53,5 tunni möödudes on derivaadile omase piigi (EIC 490) intensiivsus oluliselt väiksem kui seda oli 11,5 tunni möödudes. Ravimile vastavad piigid (EIC 320) on aga praktiliselt võrdselt intensiivsustega. Signaalide erinevus võib olla tingitud derivaadi lagunemisest või massispektromeetri tundlikkuse erinevusest erinevatel päevadel (joonis 20).



**Joonis 20. Norfloksatsiini masskromatogrammide võrdlus (11,5 h ja 53,5 h)**

Eeldades, et reaktsioonil tekkinud derivaat võib laguneda aja jooksul, otsustati järgmise sammuna määrata optimaalne ajahetk peale derivatiseerimist, millal derivaadi kontsentratsioon lahuses on kõige kõrgem. Selleks valmistati värske derivatiseeritud lahus ja teostati sellele 24 tunni pikkune analüüs, mõõtes lahust ligikaudu iga tunni aja tagant, eesmärgiga uurida derivaadile vastava piigi (m/z 490) intensiivsuse muutust ajas.

Mõõtmisel selgus, et derivaadi piigi intensiivsus saavutab maksimaalse väärtuse 21 tundi peale derivatiseerumise algust ning on peale seda pisut langenud. Järelikult on optimaalseks norfloksatsiini analüüsi teostamise ajaks 21 tundi peale derivatiseerumise algust. Signaali muutust ajas kirjeldab joonis 21.

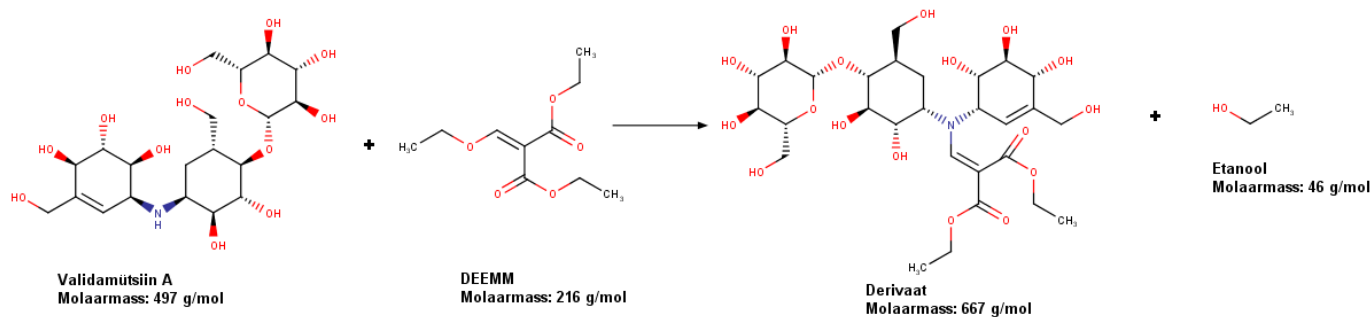


**Joonis 21. Norfloksatsiini 24 tunnise analüüsi masskromatogrammide võrdlus**

Kokkuvõtteks võib järeldada, et rakendatud derivatiseerimismetoodika toimib norfloksatsiini puhul. Derivatiseerimine suurendab retentsiooniaega 5,8 minutilt 10-10,2 minutile, mis parandab analüüsi selektiivsust ja täpsust. Samuti annab derivaat võrreldes ravimiga massispektromeetris oluliselt kõrgema signaali. Seetõttu võimaldab derivatiseerimine väga väikeste ravimi kontsentratsioonide puhul parandada analüüsi tundlikkust. Sarnaselt tsiprofloksatsiinile ei ole derivatiseerimine momentaalne, vaid võtab aega. Kasutades antud metoodikat norfloksatsiini analüüsimiseks, on optimaalseks analüüsi teostamise ajaks 21 tundi peale derivatiseerimisreagenti lisamist lahusesse.

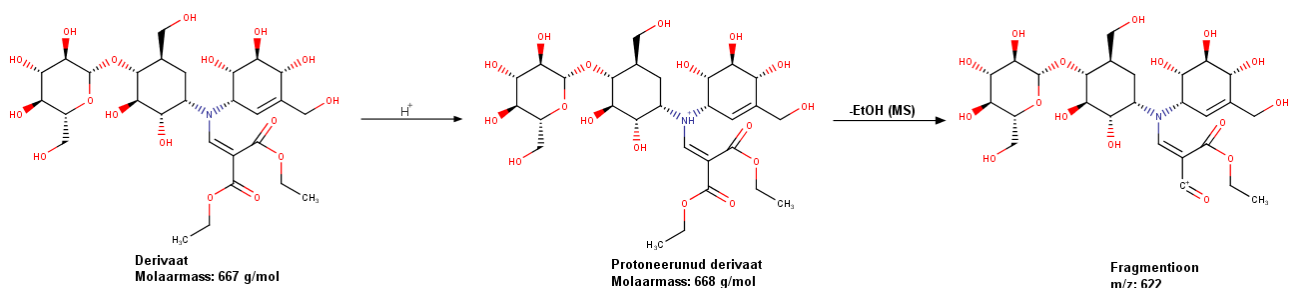
### 3.6 Validamütsiin A derivatiseerimine

Validamütsiin A (molekulmass 497 g/mol) puhul on tegemist väga polarse molekuliga, mis sisaldab lisaks sekundaarsele aminorühmale ka kokku kümme hüdrosüülrühma. Aluselises keskkonnas (pH = 9) aminorühm deprotoneerub vähemalt osaliselt. Mehhanismi alusel on derivatiseerimisreaktsioonil reageerivaks funktsionaalseks rühmaks sekundaarne aminorühm. Validamütsiin võiks reageerida DEEMM-ga, moodustades derivaadi ja eraldades etanooli. Validamütsiin A võimalik derivatiseerimisreaktsioon on välja toodud joonisel 22.



## Joonis 22. Validamütsiin A derivatiseerimisreaktsioon

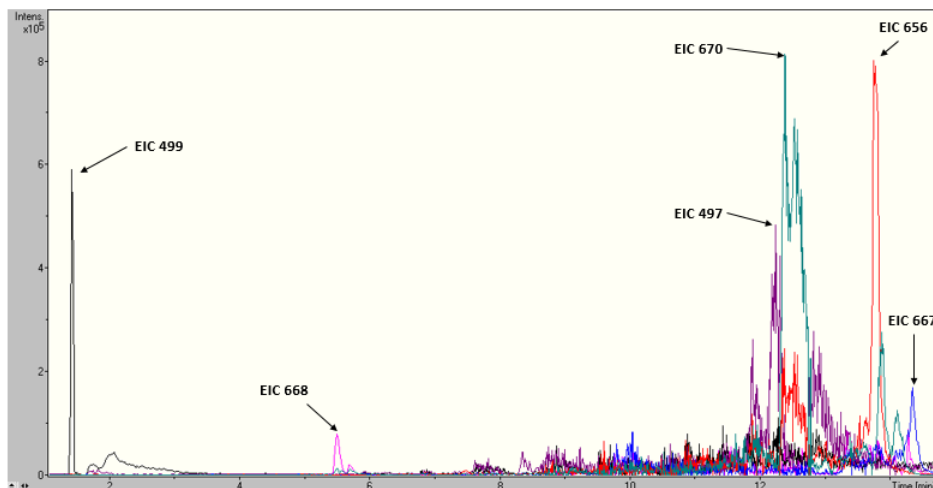
Derivatiseerimata jäänud ravim ning tekkinud derivaat protoneeruvad happelises eluendis. Protoneeritud derivaadi massi ja laengu suhe oleks 668. Massispektromeetris fragmenteerudes loovutab derivaadiioon etanooli molekuli, moodustades fragmendi massi ja laengu suhtega 622. Ioniseerumine ja fragmenteerumine on välja toodud joonisel 23.



## Joonis 23. Validamütsiin A ioniseerumine ja fragmentatsioon

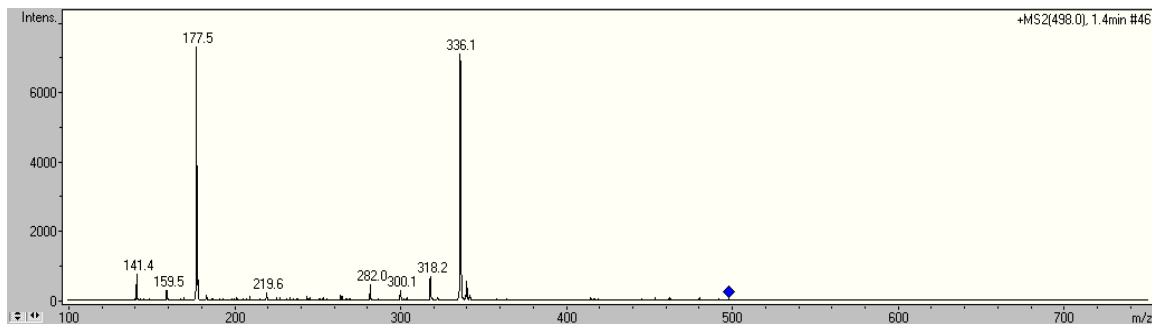
Töölahused derivatiseeriti ning analüüsid teostati ligikaudu 9 tundi peale derivatiseerimise algust. Esmalt mõõdeti derivatiseeritud lahust ning seejärel derivatiseerimata lahust. Derivatiseeritud lahusele teostati tandem-massispektromeetria analüüs.

Derivatiseeritud lahuse masskromatogrammil esineb mitmeid erinevate retentsiooniaegadega ja intensiivsustega piike, mis kõik vastavad erinevate massi ja laengu suhetega ionidele massispektris. Derivatiseeritud lahuse masskromatogramm on toodud joonisel 24.



### Joonis 24. Validamütsiin A masskromatogramm

Esimene intensiivsem piik, retentsiooniajaga 1,4 min, vastab ioonile massi ja laengu suhtega 499. Kuna retentsiooniaeg on väga lühike, võib olla tegemist ülimalt polaarsete derivatiseerumata jäänud validamütsiini molekulidega. Uurides piigile vastavat massispektrit, võib näha fragmentioone massi ja laengu suhetega 336, 178 ja 141. Need ioonid vastavad täpselt tüüpilise validamütsiini massispektris leiduvatele fragmentioonidele. Järelikult võib üsna kindlalt väita, et molekulaariooni  $m/z$  499 puhul on tõepoolest tegemist validamütsiiniga (eeldatust ühe ühiku võrra suurem massi ja laengu suhe vajab täiendavat uurimist). Validamütsiin A massispekter on välja toodud joonisel 25.



### Joonis 25. Validamütsiin A massispekter

Lisaks derivatiseerumata jäänud validamütsiinile ( $m/z$  499) eksisteerib ka piik retentsiooniajaga 5,6 min, millele vastab massispektris molekulaarioon massi ja laengusuhtega 668. Selle puhul on tõenäoliselt tegemist derivaadi molekuliga. Piigi intensiivsus on aga palju väiksem võrreldes

ravimi (m/z 499) omaga. Järelikult on derivatiseerimisreaktsioon eeldatud mehhanismi alusel mõnevõrra toimunud, kuid derivaati on tekkinud vähe või ei ole selle ionisatsiooniefektiivsus suurem derivatiseerimata molekuli omast.

Lisaks validamütsiinile ning tekkinud derivaadile esineb veel mitmeid piike pikemate retentsiooniaegade juures. Esinevad piigid, mille moodustavad ained ionide massi ja laengu suhtega 497, 667, 670 ja 656. Tegemist on tõenäoliselt reaktsiooni kõrvalproduktidega.

Lahusele teostatud MS/MS analüüs ei suutnud tuvastada eeldatava massi ja laengu suhtega fragmenti (m/z 622), mistõttu tuleb tõdeda, et derivatiseerimisreaktsioon ei kulgenud eeldatava mehhanismi alusel.

Kokkuvõtteks võib järeldada, et rakendatud derivatiseerimismetoodika ei toimi validamütsiin A puhul. Derivatiseerimine suurendab küll ravimi retentsiooniaega 1,4 minutilt 5,6 minutile, kuid tekkiva derivaadi kogus on palju väiksem algsest ravimi kogusest, mistõttu antud metoodika ei võimalda suurendada analüüsi tundlikkust. Lisaks ei kulge reaktsioon praktiliselt üldse eeldatud mehhanismi järgi ning tekib palju erinevaid kõrvalprodukte, mis muudab kromatogrammi interpreteerimise keerulisemaks.

## Kokkuvõte

Käesoleva töö eesmärgiks oli derivatiseerida mõningaid primaarseid ja sekundaarseid aminorühmi sisaldavaid antibiootikume ning kindlaks teha, kuidas mõjutab derivatiseerimine nende retentsiooniaega ja signaali intensiivsust LC-MS analüüsil. Uuritavateks antibiootikumideks olid tsiprofloksatsiin, norfloksatsiin, sulfadimetoksiin, sulfametoksasool ja validamütsiin A.

Ravimite derivatiseerimiseks kasutati reagentina dietüül-etoksümetüleen malonaati (DEEMM). Derivatiseerimine viidi läbi aluselises keskkonnas (pH = 9). Lahuste analüüsimiseks kasutati HPLC-ESI-MS instrumenti. Kasutati gradientelueerimist 0,1 % sipelghappe ja atsetonitriiliga. Reaktsioonil tekkinud derivaatidele teostati ka tandem-massispektromeetrilised (MS/MS) analüüsid.

Uuritud ainetest ei toiminud derivatiseerimismetoodika ainult validamütsiin A puhul, kus lisaks derivaadile tekkis reaktsioonil mitmeid kõrvalprodukte. Derivatiseerimine õnnestus ja kulges eeldatud mehhanismi järgi nelja ravimi puhul: tsiprofloksatsiin, norfloksatsiin, sulfadimetoksiin ja sulfametoksasool. Kõigi nelja ravimi analüüsil esinesid masskromatogrammidel nii ravimile kui ka derivaadile omased piigid. MRM analüüsid näitasid mehhanismi järgi eeldatud fragmentiooni teket, mis kinnitab reaktsioonil tekkinud derivaadi olemasolu lahuses.

Kõikide ravimite retentsiooniajad derivatiseerimisel pikenesid. Tsiprofloksatsiini, norfloksatsiini, sulfadimetoksiini ja sulfametoksasooli puhul andsid derivaadi molekulid massispektromeetris oluliselt intensiivsema signaali kui derivatiseerimata ravim. Selgitati välja, et reaktsioonil tekkivad derivaadid ei ole ajas püsivad. Kõigi ravimite jaoks määrati aeg, mil derivaadi signaal on kõige intensiivsem. Sulfadimetoksiini puhul on optimaalseks reaktsiooniajaks 24 h, sulfametoksasoolil 28-30 h, tsiprofloksatsiinil 8,5 h ja norfloksatsiinil 21 h peale derivatiseeriva reagenti lisamist lahusesse.

## Summary in English

### **Improving LC-MS analysis for antibiotics that contain amino groups by using pre-column derivatization**

The aim of the following thesis was to derivatize some antibiotics that contain either primary or secondary amino groups and check if derivatization improves their chromatographic separation and MS detection. A total of five antibiotics were analyzed: ciprofloxacin, norfloxacin, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole and validamycin A.

Diethyl ethoxymethylenemalonate (DEEMM) was used as a derivatization reagent. The derivatization was performed in basic conditions (pH = 9). To analyze derivatized solutions, HPLC-ESI-MS instrument was used. In chromatographic analysis gradient elution was used with 0.1% formic acid and acetonitrile. In MS, a tandem mass spectrometry (MS/MS) was performed on derivatives of the drugs.

Four out of the five drugs were derivatized successfully using this method: ciprofloxacin, norfloxacin, sulfadimethoxine and sulfamethoxazole. Peaks for the analyzed drugs and their derivatives were detected in the chromatograms. In MS/MS analysis presumed fragment ions were detected which proves that the derivatization reaction followed the presumed mechanism.

For all four drugs, derivatization increased the retention times and the derivative molecules provided a much higher signal in MS than the underivatized drugs. Therefore, the derivatization method increases the sensitivity of analysis. However, degradation of the derivative molecules and decrease of the signal in time was detected. Therefore, optimal times of derivatization reaction were determined for the drugs: 8,5 h for ciprofloxacin, 21 h for norfloxacin, 24 h for sulfadimethoxine and 28-30 h for sulfamethoxazole.

## Kasutatud kirjandus

- (1) Oldekop, M.-L.; Herodes, K.; Rebane, R. Study of the Matrix Effects and Sample Dilution Influence on the LC–ESI–MS/MS Analysis Using Four Derivatization Reagents. *J. Chromatogr. B* **2014**, *967*, 147–155.
- (2) Rebane, R.; Oldekop, M.-L.; Herodes, K. Comparison of Amino Acid Derivatization Reagents for LC–ESI–MS Analysis. Introducing a Novel Phosphazene-Based Derivatization Reagent. *J. Chromatogr. B* **2012**, *904*, 99–106.
- (3) Ventola, C. L. The Antibiotic Resistance Crisis: Part 1: Causes and Threats. *P T Peer-Rev. J. Formul. Manag.* **2015**, *40* (4), 277–283.
- (4) Lillenberg, M.; Haiba, E.; Nei, L. Ravimijäädid Looduskeskkonnas. *Eesti Lood.* **2012**, *6* (7).
- (5) Durbin, K. *Ciprofloxacin*; <https://www.drugs.com/ciprofloxacin.html> viimati uuendatud 13.12.2018.
- (6) Ponen, S. *Norfloxacin*; <https://www.healthnavigator.org.nz/medicines/n/norfloxacin/> viimati uuendatud 08.05.2019.
- (7) Booker, N.; Pavliv, D. *Some Antibiotics are Riskier than Others: What You Should Know about Quinolones*; <http://www.center4research.org/antibiotics-riskier-others-know-quinolones/> viimati vaadatud 26.05.2019.
- (8) Conkle, J. L.; Lattao, C. V.; White, J. R.; Cook, R. L. Pharmaceutical Analysis for Environmental Samples: Individual and Simultaneous Determination of Ciprofloxacin, Ofloxacin and Norfloxacin Using an HPLC with Fluorescence and UV Detection with a Wetland Soil Matrix. *Anal. Lett.* **2009**, *42* (18), 2937–2950.
- (9) Samanidou, V. F.; Demetriou, C. E.; Papadoyannis, I. N. Direct Determination of Four Fluoroquinolones, Enoxacin, Norfloxacin, Ofloxacin, and Ciprofloxacin, in Pharmaceuticals and Blood Serum by HPLC. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, *375* (5), 623–629.
- (10) Matta, M. K.; Chockalingam, A.; Gandhi, A.; Stewart, S.; Xu, L.; Shea, K.; Patel, V.; Rouse, R. LC-MS/MS Based Quantitation of Ciprofloxacin and Its Application to Antimicrobial Resistance Study in Balb/c Mouse Plasma, Urine, Bladder and Kidneys. *Anal. Methods* **2018**, *10* (10), 1237–1246.
- (11) Batt, A. L.; Aga, D. S. Simultaneous Analysis of Multiple Classes of Antibiotics by Ion Trap LC/MS/MS for Assessing Surface Water and Groundwater Contamination. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (9), 2940–2947.

- (12) Aslan, S. S.; Demir, B. Kinetic Spectrophotometric Determination of Ciprofloxacin in a Pharmaceutical Preparation. *J. AOAC Int.* **2010**, *93* (2), 510–515.
- (13) Espinosa-Mansilla, A.; Peña, A. M. de la; Gómez, D. G.; Salinas, F. HPLC Determination of Enoxacin, Ciprofloxacin, Norfloxacin and Ofloxacin with Photoinduced Fluorimetric (PIF) Detection and Multiemission Scanning. *J. Chromatogr. B* **2005**, *822* (1–2), 185–193.
- (14) Solangi, A. R.; Memon, S. Q.; Mallah, A.; Memon, N.; Khuhawar, M. Y.; Bhangar, M. I. Development and Implication of a Capillary Electrophoresis Methodology for Ciprofloxacin, Paracetamol and Diclofenac Sodium in Pharmaceutical Formulations and Simultaneously in Human Urine Samples. *Pak. J. Pharm. Sci.* **2011**, *24* (4), 539–544.
- (15) Rezaee Moghadam, N.; Arefhosseini, S. R.; Javadi, A.; Lotfipur, F.; Ansarin, M.; Tamizi, E.; Nemati, M. Determination of Enrofloxacin and Ciprofloxacin Residues in Five Different Kinds of Chicken Tissues by Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Coupled with HPLC. *Iran. J. Pharm. Res. IJPR* **2018**, *17* (4), 1182–1190.
- (16) Bueno, M. J. M.; Agüera, A.; Gómez, M. J.; Hernando, M. D.; García-Reyes, J. F.; Fernandez-Alba, A. R. Application of Liquid Chromatography/Quadrupole-Linear Ion Trap Mass Spectrometry and Time-of-Flight Mass Spectrometry to the Determination of Pharmaceuticals and Related Contaminants in Wastewater. *Anal. Chem.* **2007**, *79* (24), 9372–9384.
- (17) Golet, E. M.; Alder, A. C.; Hartmann, A.; Ternes, T. A.; Giger, W. Trace Determination of Fluoroquinolone Antibacterial Agents in Urban Wastewater by Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Anal. Chem.* **2001**, *73* (15), 3632–3638.
- (18) Ulu, S. T. Determination of Ciprofloxacin in Human Plasma and Urine by Precolumn Derivatization High Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection. *Chin. J. Chem.* **2011**, *29* (6), 1256–1260.
- (19) Ulu, S. T. High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Norfloxacin in Pharmaceutical Preparation after Pre-Column Derivatization. *Rev. Chim.* **2012**, *63* (2), 127–130.
- (20) Ašperger, D.; Tišler, V.; Zrnčić, M.; Mutavdžić Pavlović, D.; Babić, S.; Horvat, A. J. M.; Kaštelan-Macan, M. HPLC–DAD–FLD Determination of Veterinary Pharmaceuticals in

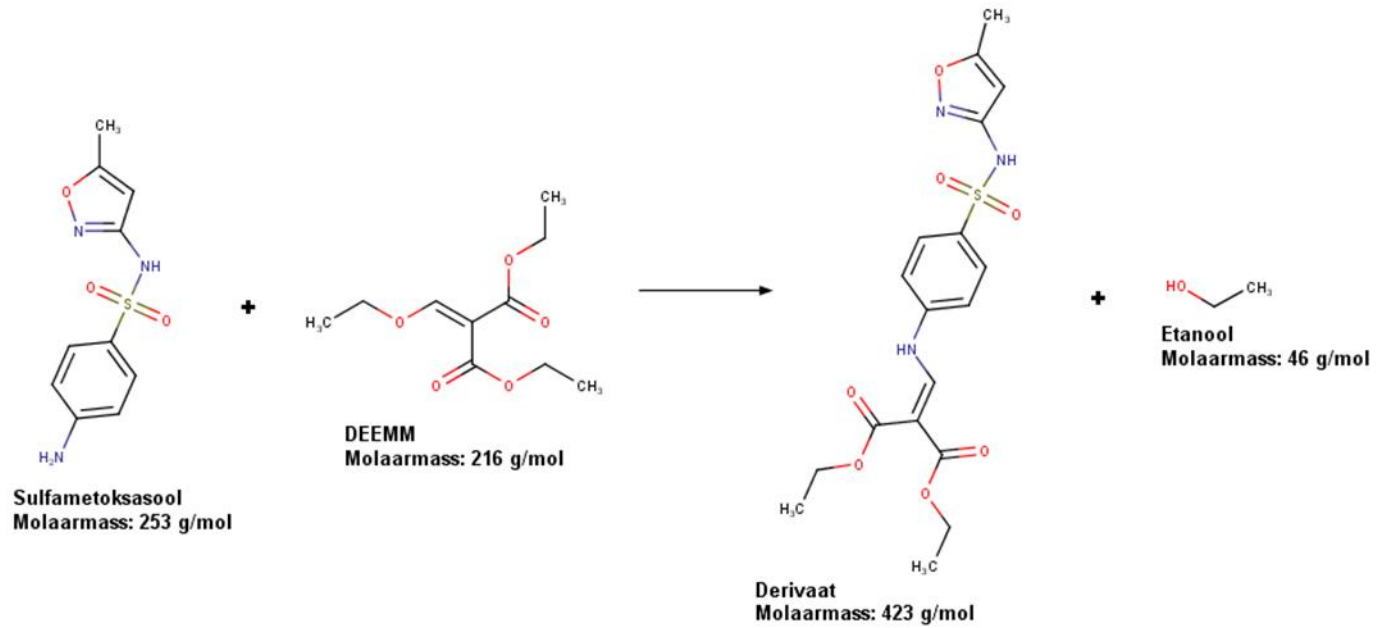
- Pharmaceutical Industry Wastewater with Precolumn Derivatization Using Fluorescamine. *Chromatographia* **2014**, 77 (15–16), 1059–1066.
- (21) *Sulfadimethoxine 107g powder*; <https://www.drugs.com/vet/sulfadimethoxine-107g-powder.html> viimati uuendatud 30.04.2019.
- (22) Multum, C. *Sulfamethoxazole and trimethoprim*; <https://www.drugs.com/mtm/sulfamethoxazole-and-trimethoprim.html> viimati uuendatud 08.03.2019.
- (23) Jank, L.; Martins, M. T.; Arsand, J. B.; Ferrão, M. F.; Hoff, R. B.; Barreto, F.; Pizzolato, T. M. An LC–ESI–MS/MS Method for Residues of Fluoroquinolones, Sulfonamides, Tetracyclines and Trimethoprim in Feedingstuffs: Validation and Surveillance. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, 35 (10), 1975–1989.
- (24) Dubreil-Chéneau, E.; Pirotais, Y.; Verdon, E.; Hurtaud-Pessel, D. Confirmation of 13 Sulfonamides in Honey by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry for Monitoring Plans: Validation According to European Union Decision 2002/657/EC. *J. Chromatogr. A* **2014**, 1339, 128–136.
- (25) Errayess, S. A.; Lahcen, A. A.; Idrissi, L.; Marcoaldi, C.; Chiavarini, S.; Amine, A. A Sensitive Method for the Determination of Sulfonamides in Seawater Samples by Solid Phase Extraction and UV–Visible Spectrophotometry. *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* **2017**, 181, 276–285.
- (26) Soto-Chinchilla, J. J.; García-Campaña, A. M.; Gámiz-Gracia, L. Analytical Methods for Multiresidue Determination of Sulfonamides and Trimethoprim in Meat and Ground Water Samples by CE-MS and CE-MS/MS. *ELECTROPHORESIS* **2007**, 28 (22), 4164–4172.
- (27) Zhang, Y.; Zhou, W.-E.; Li, S.-H.; Ren, Z.-Q.; Li, W.-Q.; Zhou, Y.; Feng, X.-S.; Wu, W.-J.; Zhang, F. A Simple, Accurate, Time-Saving and Green Method for the Determination of 15 Sulfonamides and Metabolites in Serum Samples by Ultra-High Performance Supercritical Fluid Chromatography. *J. Chromatogr. A* **2016**, 1432, 132–139.
- (28) Sun, H.; Chen, P.; Li, L.; Cheng, P. A Novel Chemiluminescence Quenching Method for Determination of Sulfonamides in Pharmaceutical and Biological Fluid Based on Luminol–Ag(III) Complex Reaction in Alkaline Solution. *Drug Test. Anal.* **2011**, 3 (5), 300–305.

- (29) Rodríguez, N.; Ortiz, M. C.; Sarabia, L. A.; Herrero, A. A Multivariate Multianalyte Screening Method for Sulfonamides in Milk Based on Front-Face Fluorescence Spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **2010**, *657* (2), 136–146.
- (30) Nunes, K. S. D.; Assalin, M. R.; Vallim, J. H.; Jonsson, C. M.; Queiroz, S. C. N.; Reyes, F. G. R. Multiresidue Method for Quantification of Sulfonamides and Trimethoprim in Tilapia Fillet by Liquid Chromatography Coupled to Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry Using QuEChERS for Sample Preparation. *J. Anal. Methods Chem.* **2018**, *2018*, 1–10.
- (31) Yu, H.; Tao, Y.; Chen, D.; Wang, Y.; Huang, L.; Peng, D.; Dai, M.; Liu, Z.; Wang, X.; Yuan, Z. Development of a High Performance Liquid Chromatography Method and a Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Method with the Pressurized Liquid Extraction for the Quantification and Confirmation of Sulfonamides in the Foods of Animal Origin. *J. Chromatogr. B* **2011**, *879* (25), 2653–2662.
- (32) García-Galán, M. J.; Garrido, T.; Fraile, J.; Ginebreda, A.; Díaz-Cruz, M. S.; Barceló, D. Application of Fully Automated Online Solid Phase Extraction-Liquid Chromatography-Electrospray-Tandem Mass Spectrometry for the Determination of Sulfonamides and Their Acetylated Metabolites in Groundwater. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *399* (2), 795–806.
- (33) Lillenberg, M.; Yurchenko, S.; Kipper, K.; Herodes, K.; Pihl, V.; Sepp, K.; Löhmus, R.; Nei, L. Simultaneous Determination of Fluoroquinolones, Sulfonamides and Tetracyclines in Sewage Sludge by Pressurized Liquid Extraction and Liquid Chromatography Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2009**, *1216* (32), 5949–5954.
- (34) Gehring, T. A.; Griffin, B.; Williams, R.; Geiseker, C.; Rushing, L. G.; Siitonen, P. H. Multiresidue Determination of Sulfonamides in Edible Catfish, Shrimp and Salmon Tissues by High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Derivatization and Fluorescence Detection. *J. Chromatogr. B* **2006**, *840* (2), 132–138.
- (35) Patyra, E.; Przeniosło-Siwczyńska, M.; Kwiatek, K. Determination of Sulfonamides in Feeds by High-Performance Liquid Chromatography after Fluorescamine Precolumn Derivatization. *Molecules* **2019**, *24* (3), 452.
- (36) *Validamycin A*; <https://www.goldbio.com/product/1948/validamycin-a> viimati vaadatud 27.05.2019.
- (37) Zhang, H.; Wang, C.; Li, H.; Nie, Y.; Fang, L.; Chen, Z. Simultaneous Determination of Kasugamycin and Validamycin-A Residues in Cereals by Consecutive Solid-Phase

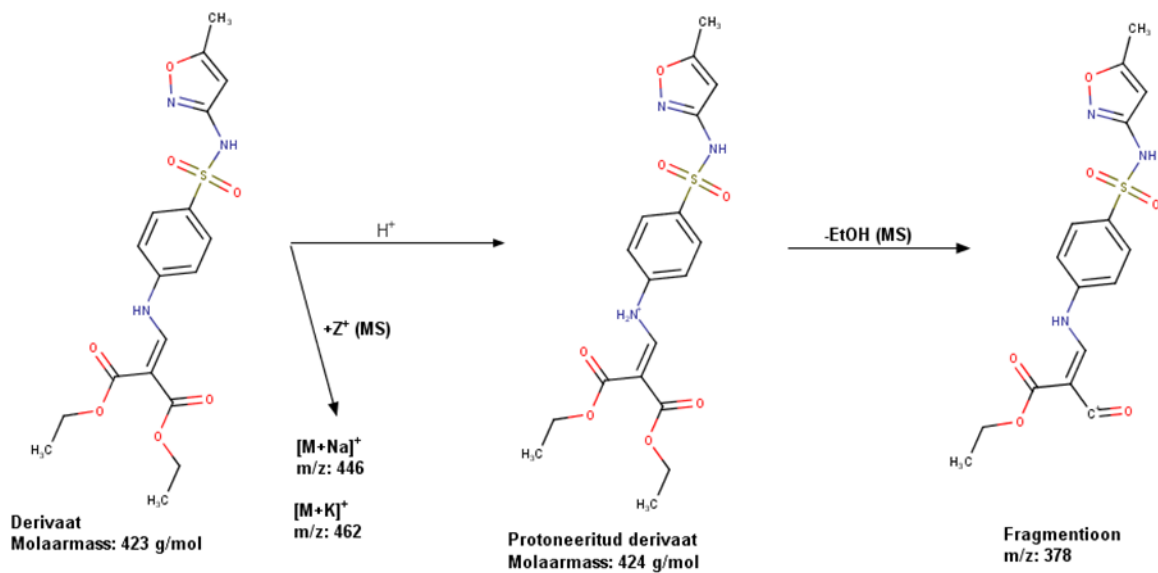
- Extraction Combined with Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Addit. Contam. Part A* **2018**, 35 (3), 487–497.
- (38) Wang, C.; Li, H.; Wang, N.; Li, H.; Fang, L.; Dong, Z.; Du, H.; Guan, S.; Zhu, Q.; Chen, Z.; et al. Simultaneous Analysis of Kasugamycin and Validamycin-A in Fruits and Vegetables Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry and Consecutive Solid-Phase Extraction. *Anal. Methods* **2017**, 9 (4), 634–642.
- (39) Wang, C.; Zhang, Z.; Shen, Y.; Tian, Z.; Xu, D.; Han, C. Determination of Validamycin A in Agricultural Food Samples by Solid-Phase Extraction Combined with Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionisation–Tandem Mass Spectrometry. *Food Chem.* **2015**, 169, 150–155.
- (40) Li, W.; Feng, J.; Liu, Y.; Jiang, J.; Zheng, X.; Zhou, W.-W. Novel Spectrophotometric Approach for Determination of Validamycin A in Fermentation of *Streptomyces Hygroscopicus*. *J. Biosci. Bioeng.* **2016**, 122 (6), 736–739.
- (41) He, J.; Chen, S.-W.; Ruan, L.-F.; Cao, L.-L.; Yao, J.; Yu, Z.-N. Determination of the Fungicide Validamycin A by Capillary Zone Electrophoresis with Indirect UV Detection. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, 51 (26), 7523–7527.
- (42) Turnipseed, S. B.; Clark, S. B.; Karbiwnyk, C. M.; Andersen, W. C.; Miller, K. E.; Madson, M. R. Analysis of Aminoglycoside Residues in Bovine Milk by Liquid Chromatography Electrospray Ion Trap Mass Spectrometry after Derivatization with Phenyl Isocyanate. *J. Chromatogr. B* **2009**, 877 (14–15), 1487–1493.
- (43) Al-Majed, A. A. A New LC Method for Determination of Some Aminoglycoside Antibiotics in Dosage Forms and Human Plasma Using 7-Fluoro-4-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazole as a Fluorogenic Pre-Column Label. *Chromatographia* **2008**, 68 (11–12), 927–934.
- (44) Harris, D. C. *Quantitative Chemical Analysis*, 7th ed.; Macmillian Learning: New York, 2007, pp. 556-565.
- (45) Christian, G. D. *Analytical Chemistry*, 6th ed.; Brennan, D., Murphy, K., Rigby, S., Smith, B., Swain, E., Eds.; John Wiley And Sons Ltd: New York, 2004, pp. 604-617.
- (46) Skoog, D. A.; West, D. M.; Holler, F. J.; Crouch, S. R. *Fundamentals of Analytical Chemistry*, 9th ed.; Cengage Learning: Hampshire, United Kingdom, 2014, pp. 802-921.
- (47) Hoffmann, E. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*; Wiley: Chichester, 2007, pp. 85-210

- (48) *Derivatization Reagents For Selective Response and Detection in Complex Matrices*; <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/migrationresource4/Derivatization%20Rgts%20brochure.pdf> viimati vaadatud 27.05.2019.
- (49) Oldekop, M.-L.; Rebane, R.; Herodes, K. Dependence of Matrix Effect on Ionization Polarity during LC–ESI–MS Analysis of Derivatized Amino Acids in Some Natural Samples. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2017**, 23 (5), 245–253.

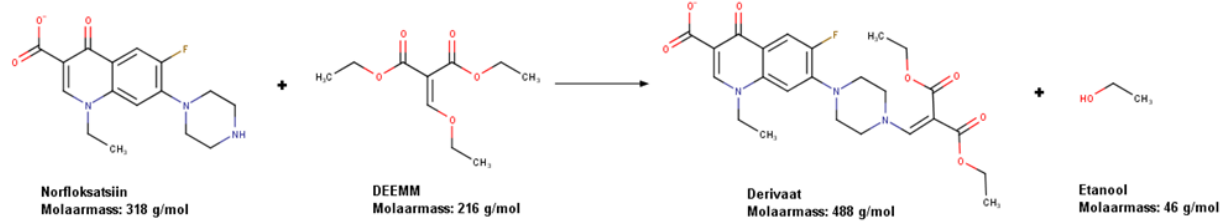
## Lisad



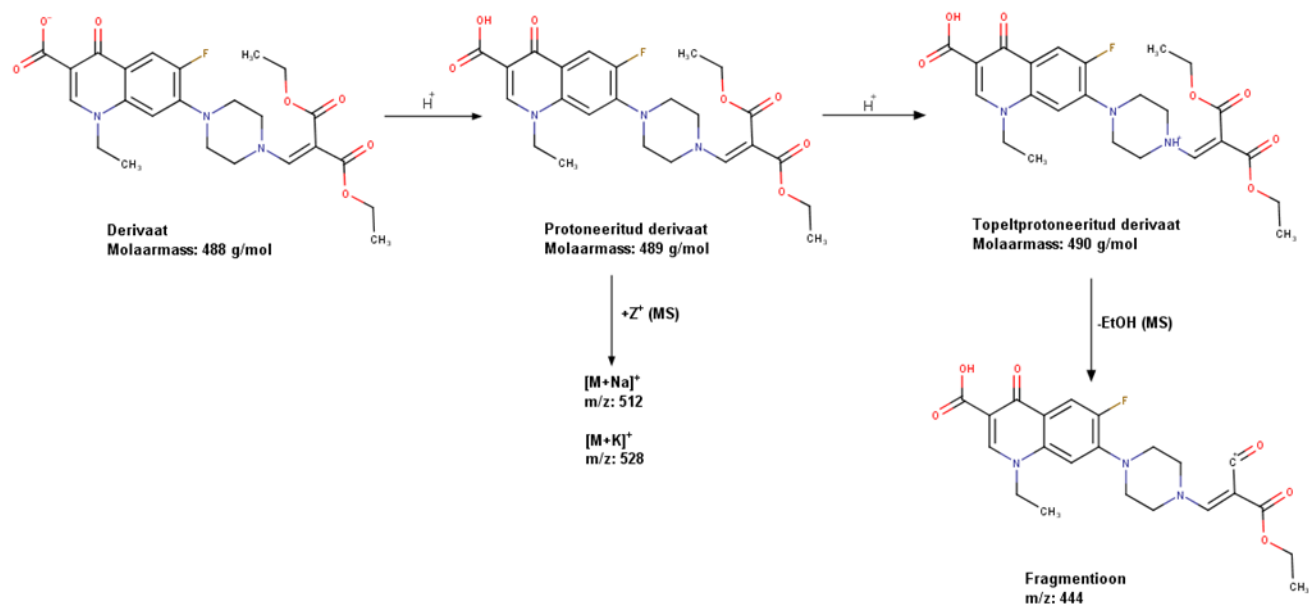
## Lisa 1. Sulfametoksasooli derivatiseerimisreaktsioon



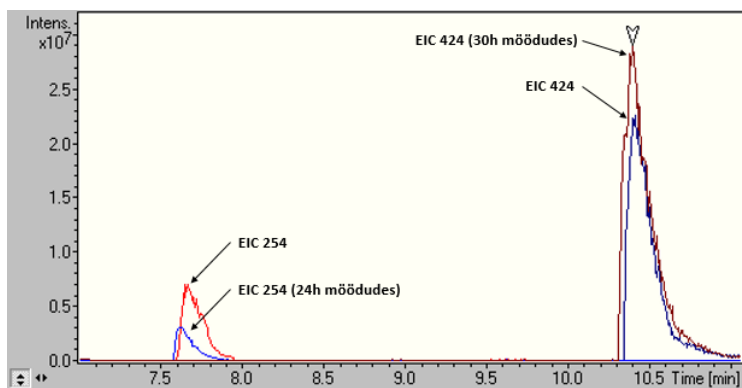
## Lisa 2. Sulfametoksasooli ioniseerimine ja fragmentatsioon



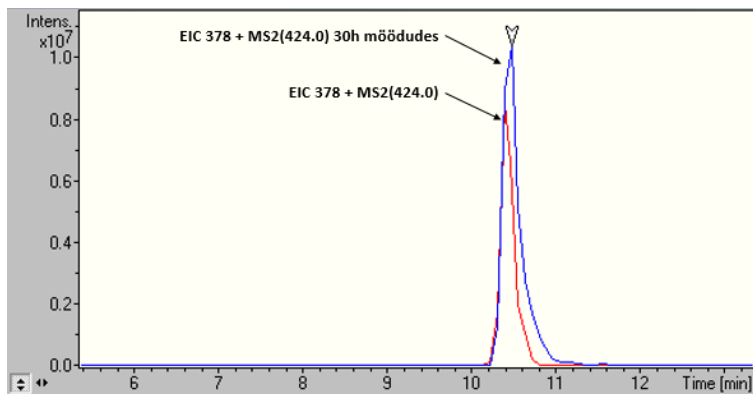
### Lisa 3. Norfloksatsiini derivatiseerimisreaktsioon



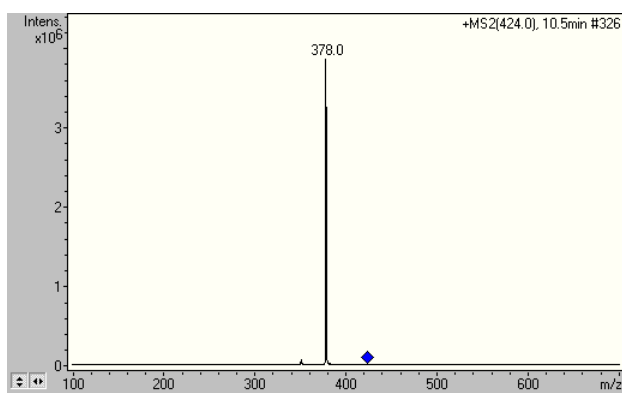
### Lisa 4. Norfloksatsiini ioniseerimine ja fragmentatsioon



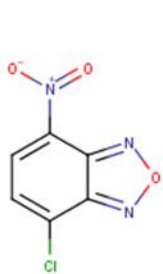
### Lisa 5. Sulfametoksasooli (Hoffmann-La Roche) derivatiseeritud lahuste võrdlus



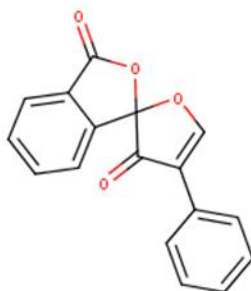
**Lisa 6. Sulfametoksasooli (Hoffmann-La Roche) MS/MS analüüside võrdlus**



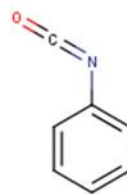
**Lisa 7. Sulfametoksasooli (Hoffmann-La Roche) MS/MS massispekter**



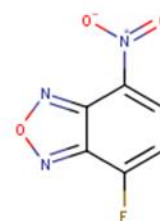
**4-kloro-4-nitrobensofurasaan**



**Fluorestsamiin**



**Feniüülsotsüanaat**



**4-fluoro-4-nitrobensofurasaan**

**Lisa 8. Muude ainete struktuurid**

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

Mina, Fred Rainer Ränisoo,

*(autori nimi)*

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

### **Aminorühmi sisaldavate antibiootikumide LC-MS analüüsi parandamine derivatiseerimise teel**

*(lõputöö pealkiri)*

mille juhendajateks on Koit Herodes ja Ernesto de Jesus Zapata Flores,  
*(juhendaja nimi)*

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga 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, 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.