

**Masteroppgave i farmasi våren 2009, utført ved UiS og UiB**

Det teknisk-naturvitenskapelige fakultet

Antibiotika og antibakterielle substans

Ciprofloxacin og triclosan i jord og husdyrgjødsel

**Laila Elmoussaoui**

**20.05.2009**





## **Forord**

Denne oppgaven er utført ved Universitetet i Stavanger på det Teknisk-Naturvitenskapelige Fakultet høst 2008 og på Universitetet i Bergen.

Jeg vil først og fremst rette en stor takk til veilederen min Tor Hemmingsen, professor ved Institutt for Matematikk og Naturvitenskap ved Universitetet i Stavanger, for god veiledning underveis og konstruktive tilbakemeldinger på det skriftlige arbeidet.

Jeg vil også takke Trine Eggen, forsker ved Bioforsk på Klepp, som har fulgt opp prosjektet med stort engasjement, og vært ivrig pådriver for arbeidet.

En stor takk til Viktor Hormazabal for prosedyre av ciprofloxacin analysen.

Jeg vil takke Dr. Monica Möder for å ha tatt seg tid til å ta imot meg ved Zentrum Für Umweltforschung (UFZ) og arbeidet med å komme frem til de rette metodene.

Jeg vil også takke Yitzak Drozdik i Bioforsk for deltagelse i laboratoriarbeidet på Bioforsk.

En stor takk går til min samboer Børge Østrem for støtte og hjelp jeg har fått underveis.

Stavanger, mai 2009

Laila Elmoussaoui

# Innhold

Forord .....	I
Innhold.....	II
Liste over figurer .....	IV
Liste over tabeller.....	V
Sammendrag .....	VI
Abstract.....	VII
Ordforklaring og forkortelser.....	VIII
1 Innledning .....	1
1.1 Problemstilling og hensikt.....	1
1.2 Organisering av den videre fremstilling.....	1
2 Teori .....	2
2.1 Legemidler i miljøet.....	2
2.2 Bioakkumulering i miljøet.....	3
2.3 Triclosan.....	3
2.4 Ciprofloxacin .....	5
2.5 Jord.....	5
2.6 Husdyrgjødsel.....	6
2.7 Nedbrytning .....	7
2.8 Fordelingskoeffisient .....	8
2.9 Fastfase ekstraksjon .....	8
2.10 Kromatografi .....	9
2.11 Gasskromatografi.....	10
2.12 Massespektrometri .....	11
2.13 HPLC .....	12

2.14	Fluorescensdetektor .....	13
3	Eksperimental .....	14
3.1	Forskningsformål og valg av metode.....	14
3.2	Prøvetaking og prøveopparbeiding .....	14
3.3	Tørrestoff og glødetap bestemmelse.....	15
3.4	Materiale.....	16
3.5	Ekstraksjon og analysemetode av ciprofloxacin .....	17
3.6	Gjennomføring av nedbrytningsforsøk av triclosan og ciprofloxacin i husdyrgjødsel .....	22
3.7	Ekstraksjon og analysemetode for triclosan.....	24
4	Resultater .....	28
4.1	Standardløsninger og standardkurve ciprofloxacin .....	28
4.2	HPLC analyseresultat.....	29
4.3	Analyseresultater av triclosan fra nedbrytningsforsøket.....	41
4.4	Gassmåling, Glødetap og tørrestoff analyse .....	48
5	Diskusjon .....	50
5.1	Ciprofloxacin analyse .....	50
5.2	pH forsøk ved ciprofloxacin analyse .....	51
5.3	Metodeutvikling - ekstraksjon av triclosan i UFZ.....	53
5.4	Nedbrytningsforsøk – triclosan .....	54
5.5	Tidligere utført arbeid .....	57
5.6	Videre arbeid .....	58
6	Konklusjon.....	59
7	Referanser .....	60

## Liste over figurer

Figur 1: Eksponeringsrute av legemidler i miljøet.....	2
Figur 2: Struktur av triclosan .....	4
Figur 3: Struktur av ciprofloxacin ( <i>Limited</i> , 20.11.2008) .....	5
Figur 4: Agilent 6890 A gasskromatograf (DataApex, 14.04.2009).....	11
Figur 5: Rekonstruert skisse av fluorescensdetektor Lindsay (1992, s.87) .....	13
Figur 6: Steril sprøytefilter fra Life Sciences ® Porestørrelse på 0,22 µm, Nylonmembran.....	16
Figur 7: Prøveglass 32x22,6 mm à 2 ml.....	22
Figur 8: Standardkurve for ciprofloxacin .....	28
Figur 9: Husdyrgjødsel tilsatt ciprofloxacin uten opprensing .....	30
Figur 10: Jordprøve tilsatt ciprofloxacin uten opprensing. Ingen pH justering .....	31
Figur 11: Ciprofloxacin uten matriks pH 0,9 uten opprensing .....	31
Figur 12: Analyse av ciprofloxacin med jord som matriks og opprensing med justert pH til pH 2 i elueringsmiddelet. Toppen kommer etter 2,3 minutter.....	32
Figur 13: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 2,2 med opprensing gjennom silikagel.....	33
Figur 14: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 2,2 uten opprensing (silikagel) .....	33
Figur 15: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 4,7 (med silikagel).....	34
Figur 16: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 4,7 uten opprensing .....	34
Figur 17: Analyse av ciprofloxacin med pH 9,5 med opprensing .....	35
Figur 18: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 10,5 med opprensing .....	35
Figur 19: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 10,5 (uten opprensing).....	36
Figur 20: Analyse av ciprofloxacin uten matriks og uten opprensing med pH 11 .....	36
Figur 21: Analyse av ciprofloxacin med pH 11 med opprensing uten matriks tilsatt kun aceton tilslutt .....	37
Figur 22: Analyse ciprofloxacin med jordprøve med opprensing med pH 11 .....	37
Figur 23: Deteksjon ved analyse av ciprofloxacin med husdyrgjødsel, silikagel brukes for opprensing og pH verdien er justert til pH 11. ....	38
Figur 24: Analyse av ciprofloxacin med pH 9,5 med opprensing tilsatt 25 ml aceton med pH 12 i slutten .....	38
Figur 25: Oversikt over % gjenvinning av ciprofloxacin ved ulike pH område .....	39
Figur 26: Deteksjon av triclosan i GC-MSD (Ionestrøm: 287 and 289 m/z) .....	43
Figur 27: Analyserte ekstrakter av triclosan (tre paralleller) fra anaerob nedbrytningsforsøket .....	46
Figur 28: Analyserte ekstrakter (paralleller) fra Aerob nedbrytningsforsøk av triclosan .....	46
Figur 29: Faseskille mellom aceton og n-heksan.....	51
Figur 30: Illustrasjon av anaerob og aerob nedbrytning (gjennomsnittet av to paralleller er tatt med på hvert punkt). Startkonsentrasjonene er beregnet til å være 20 µg/ml.....	55

## Liste over tabeller

Tabell 1 Løsninger til ciprofloxacin standardkurve .....	17
Tabell 2: Ciprofloxacin ekstrakter til analyse .....	18
Tabell 3: Innstilling og parameteroppsett for HPLC Agilent 1100.....	19
Tabell 4: Mengde tilsatt substanser i husdyrgjødsel .....	23
Tabell 5: Innstillinger og parameter for Agilent 6890 A gasskromatografi .....	27
Tabell 6: Resultater fra analyse av ciprofloxacin på HPLC med Fluorescensdetektor, uten pH innstilling (Retensjonstiden for ciprofloxacin er 2,2-2,5 ) .....	29
Tabell 7: Oversikt over ciprofloxacin analyse ved ulike pH .....	40
Tabell 8: Resultater analyse av ciprofloxacin ved ulike pH fortynnet 1:1000 i n-heksan) .....	41
Tabell 9: Deteksjon av triclosan som standard .....	42
Tabell 10: Resultater fra analysen av husdyrgjødsel og jord som kontrolltest .....	42
Tabell 11: Resultater fra anaerobe nedbrytning av triclosan målt i GC-MS- instrument. Resultatet er gitt i µg/g T.S., gjennomsnitt og standardavvik for 3 paralleller er vist.....	44
Tabell 12: Resultater fra Aerobe nedbrytning av triclosan målt i GC-MS instrument. Resultatet er gitt i µg/g T.S., gjennomsnitt og standardavvik for 3 paralleller er vist.	45
Tabell 13: pH måling av husdyrgjødsel i nedbrytningsforsøket .....	47
Tabell 14: Temperatur måling i husdyrgjødsel i nedbrytningsforsøk .....	47
Tabell 15: Mål av glødetap( %)og tørrstoff (%)i anaerob nedbrytningsforsøket og estimert TOC (%).....	48
Tabell 16: Måling av glødetap og tørrstoff fra nedbrytningsforsøket i aerobt miljø og estimert TOC (%).....	49
Tabell 17: Gassmåling fra husdyrgjødsel fra nedbrytningsforsøket dag 2 og 3 .....	49

## Sammendrag

Hensikten med oppgaven var å oppnå økt innsikt i, og å øke forståelse for hvordan triclosan og ciprofloxacin oppfører seg i miljøet, samt å undersøke om en eventuell kontaminering av disse substansene eksisterte i ulike typer matriks.

Problemstillingen i denne oppgaven er: *Å etablere analysemetode for triclosan og ciprofloxacin og å anvende metoden til å bestemme nedbrytningsraten under anaerobe samt aerobe forhold.*

Analysemetodene som brukes for henholdsvis triclosan og ciprofloxacin er gasskromatografi med massespektrometri med selektiv ionmonitorering (GC-MS SIM) og høytrykk væskkromatografi (HPLC) med fluorescensdetektor.

Forsøket med triclosan gav gode resultater når man benyttet heksan som ekstraksjonsmiddel og GC-MS instrument med innstilling på selektiv ion monitorering (SIM). Metodeutvikling og opparbeiding av ciprofloxacin analysen gav flere interessante utfordringer. Husdyrgjødsel var lettere å ekstrahere enn jord som matriks. Men jord som matriks med pH justering til 2 og opprensing på silikagel gav bedre resultater enn husdyrgjødsel med samme prosedyre. Jord som matriks førte til vanskeligheter under forsøket, dette på grunn av dens innhold av andre polare komponenter som førte til interferens. Analyse på HPLC instrument med fluorescensdetektor ble dermed vanskeligere. Ulik pH i elueringsmiddelet ved opprensing med silikagel viste forskjeller i gjenvinning av ciprofloxacin, hvor pH-verdi på 0,9 og 11,0 gav høyest prosentvis gjenvinning.

### Nøkkelord:

Triclosan, ciprofloxacin, gasskromatografi, massespektroskopi, fluorescensdetektor, HPLC, nedbrytningsforsøk.



## **Abstract**

The goal of this thesis was to get a better understanding of how triclosan and ciprofloxacin behave in the environment, and also to see if a contamination of these substances exists in a variety of matrixes.

The objective for this thesis is: *to establish an analyses method for triclosan and ciprofloxacin and to use the methods to determine the decomposition rate under anaerobe and aerobe conditions.*

The method of analysis that is used for respectively triclosan and ciprofloxacin is Gas chromatography-mass spectrometry with selective ion monitor (GC-MS-SIM) and High-performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector.

The experiment with triclosan showed good results when hexane was used as the extraction solution and GC-MS instrument with selective ion monitoring to detect the substance. Method development for ciprofloxacin analyses presented several interesting challenges. Manure as a matrix was easier to work with then soil, but soil with a pH of 2, and a cleanup with silica gel, yielded better results. Soil as a matrix led to difficulties under the test, this was because of the soils contents of other polar components that interfere with the analysis. This made analyses with the HPLC instrument with fluorescence detector difficult. Variance in pH in the eluation solution when cleanup with silica gel was carried out, gave differences in reclamation appease, where a low pH of 0.9 and a high pH of 11.0 gave the highest percentage of reclamation.

Keywords: Triclosan, ciprofloxacin, gas chromatography, mass-spectrometry fluorescence detector, HPLC, decomposition experiment.

## Ordforklaring og forkortelser

Ord og forkortelser	Forklaring
Sorpsjon	Fellesbetegnelse for absorpsjon og adsorpsjon
Bioakkumulering	Oppkonsentrering og lagring av stoffer i organismer
Økoskygge	Økologi = interaksjonen mellom organismer og miljøet. Effekt utover hvor medikamentet skal virke
LU	Luminescence units (fluorescens)
DP	dichlorofenoxy fenol
RT	Retensjonstid
Polysiloxan	Silisumhydridholdige polysiloksaner. Inneholder hydrogen til silisium forbindelser. Er bestanddelen i silikon og mange andre produkter.
PMT	Fotomultiplikator er en lysforsterkende elektronrør.
ppm	Parts per million (en milliondel) $\text{cm}^3/\text{m}^3$
Amfotær	Stoffer som kan foreligge både på syre og base form
Interferens	Er en situasjon der to eller flere bølger er på samme sted til samme tid.
Persistent	Tungt nedbrytbart
Matriks	Brukes her om jord og husdyrgjødsel.
Emisjon	Utsendelse av energi, er konstant. Atomer avgir energi
Eksitasjon	Variere, atomer mottar energi
T.S.	Tørr stoff

# 1 Innledning

## 1.1 Problemstilling og hensikt

Masteroppgaven skrives som et ledd i Masterutdannelsen i Farmasi ved Universitetet i Bergen. Arbeidet med etablering av analysemetoden utføres ved Universitetet i Stavanger og Institutt for Analytisk Kjemi, Helmholtz-Centre for Environmental Research- UFZ i Leipzig, mens nedbrytningsforsøk av de to valgte teststoffene i husdyrgjødsel gjennomføres ved Bioforsk Vest Særheim. Teoretisk forankring baserer seg på litteratur innenfor analytisk kjemi og farmasi

Formålet med oppgaven er å etablere analysemetoder for to antibakterielle forbindelser, triclosan og ciprofloxacin, samt anvende metodene til å bestemme nedbrytningsraten av stoffene under aerobe og anaerobe forhold. Det foretas en vurdering på hvilke problemer matriks kan føre med seg. Øket kunnskap og forståelse for egenskapene til triclosan og ciprofloxacin i jord og husdyrgjødsel er et delmål i oppgaven.

Både triclosan og ciprofloxacin er stoffer som er påvist i avløpsvann og slam. I avløpsrensaneanlegg er det både aerobe (tilgang på oksygen) og anaerobe (uten tilgang på oksygen) rensetrinn, og det er derfor viktig å ha kunnskap om disse stoffenes skjebne under ulike oksygenivå.

## 1.2 Organisering av den videre fremstilling

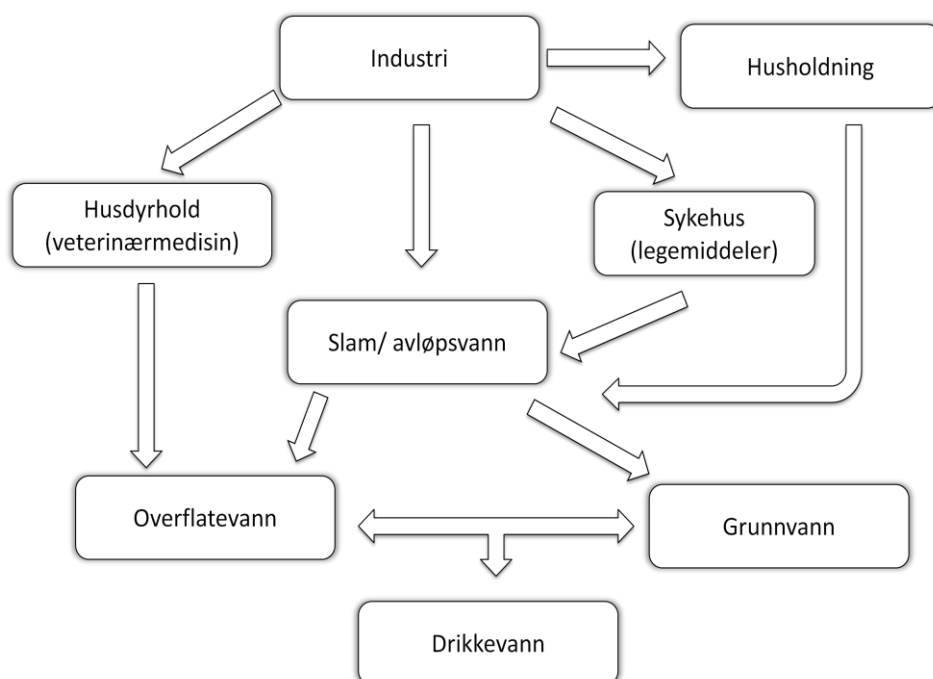
Rapporten tar utgangspunkt i problemstillingen som er presentert innledningsvis. I kapittel 2 beskrives teorier som ligger til grunn for oppgaven. De ulike metodene som er aktuelle til å løse problemstillingen introduseres også her. Kapittel 3 omhandler eksperimental del, der det blir gjort rede for fremgangsmåten av analysedelen. I kapittel 4 blir resultatene fremstilt, mens kapittel 5 tar for seg en diskusjonsdel. Mulige videreføringer av arbeidet blir også skissert under kapittel 5. I det siste kapittelet blir sammenhenger mellom problemstillingen, den teori som ligger til grunn og datamaterialet som er samlet inn diskutert. En konklusjon etterfølges i kapittel 6. Figurer som mangler kildehenvisning er egenprodusert.

## 2 Teori

### 2.1 Legemidler i miljøet

Farmasøytiske aktive komponenter er kompliserte molekyler med ulike virkninger i kroppen hos mennesker og dyr. De er produsert på grunn av deres biologiske aktivitet. Deres molekylvekt ligger mellom 300 til 1000 gram per mol. De har som oftest en funksjonellgruppe som enten er en base, en syre eller begge deler (Kummerer, 2004).

Antibiotika med et stort antimikrobielt spekter har en større målsoner<sup>1</sup> enn legemidler med smalere spekter. Disse vil også påvirke økoskyggen i større grad. Legemidler med stor økoskygge og bredt antimikrobielt spekter gir en rekke flere mikrobielle bivirkninger, slik som resistensutvikling og påvirkning av normalfloraen, enn midler med liten økoskygge. Kinoloner og tetracykliner er eksempler på midler med stor økoskygge, penicillinet derimot har liten økoskygge. Man vet ikke hvor midlene havner i næringskjeden. Disse omstendighetene gjør at man prøver å avgrense bruken av kinoloner. I Figur 1 er det laget en oversikt over en tenkelig eksponeringsrute av legemidler i miljøet. Sikkerheten ved langtidsbruk er ennå ikke kartlagt (Vilberg, 2007).



Figur 1: Eksponeringsrute av legemidler i miljøet

<sup>1</sup> Infeksjonsområde

## 2.2 Bioakkumulering i miljøet

Bioakkumulering er opphoping av en kjemisk substans i en organisme, til en konsentrasjon som er større enn det som befinner seg utenfor organismen. Organismer som tar opp de uønskede stoffene fra omgivelsen utsettes for bioakkumulering. Ulike fysiske og kjemiske faktorer må vurderes i forhold til om en kjemisk forbindelse er i stand til å bli akkumulert. Vannløslige molekyler vil skilles ut via urinen, mens de fettløselige molekyler blir tatt opp og oppkonsentreres i organismens fettvev. Så lenge stoffene lokaliserer seg utenfor organismen, vil den toksiske reaksjonen utebli. Det er derfor nødvendig å kjenne til stoffets bioakkumuleringspotensiale i miljøsammenheng. Oktanol/vannfordelingskoeffisienten forteller om fettløsligheten til stoffet, og om hvorvidt avløpsvann, jord, husdyrgjødsel og planter inneholder komponenter som vil løses i den organiske fasen (Kummerer, 2004).

## 2.3 Triclosan

Triclosan er et antibakterielt middel og brukes som et konserveringsmiddel i kosmetiske produkter. Triclosan er mer kjent som Irgasan DP 300. Vi finner triclosan i tannkrem, hudkrem, deodoranter, såper og en lang rekke andre hygieniske produkter. Bruken av triclosan har i de senere årene økt. En bekymring om triclosan er dens toksiske effekt hos enkelte tangarter i havet og resistensutvikling mot antibiotika hos enkelte bakterie arter (Singer et al., 2002)

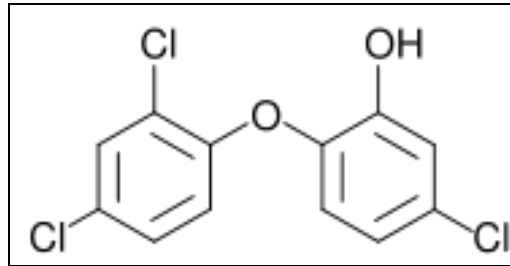
Triclosan er giftig i vandige miljø, og er tungt nedbrytbart, spesielt i anerob miljø. I anaerob nedbrytning er triclosan et mer stabilt molekyl. Halveringstiden til triclosan i jord ligger mellom 17 til 35 dager, dens løselighet i vann er 12 mg/l (Andreu et al., 16.02.2007).

Triclosan har en fenolgruppe<sup>2</sup> (se Figur 2) og en pKa på 8,1. pH-verdi spiller en viktig rolle ovenfor triclosans karaktertrekk. Ved høy pH vil triclosan være i ioneform (dissosiert). Ved lav pH vil triclosan være upolar og mer fettløselig og ha en høyre grad av bioakkumulering (Sternbeck et al., 2007). Ved pH 8,1 foreligger triclosan som 50 % ionisert og 50 % ikke ionisert. Triclosan har en  $\log K_{ow}$  på 5,4 (Singer et al.,

---

<sup>2</sup> Karbolsyre C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>OH

2002). Dette betyr at triclosan løses i organisk substans og kan bindes relativt godt til organiske forbindelser, slik som husdyrgjødsel og jord.



**Figur 2: Struktur av triclosan**

Triclosan er oppdaget i lave konsentrasjoner i slamsystemet. Når konsentrasjonen gradvis øker, vil mikroorganismene som lever i dette miljøet tilpasse seg denne endringen og dermed blir resistensutviklingen et problem (Federle et al., 2001).

## 2.4 Ciprofloxacin

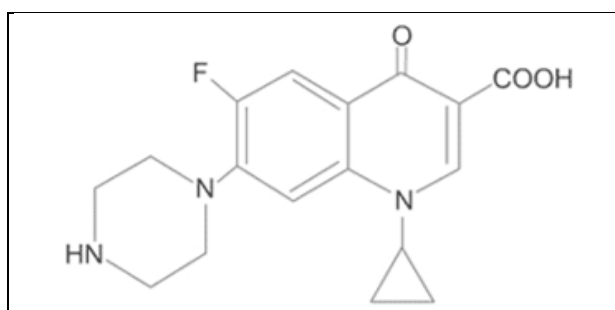
Ciprofloxacin vist i Figur 3 tilhører gruppen fluorokinoloner og er bakteriedrepende.

Ciprofloxacin er en av de mest brukte kinoloner i dag, og virker ved å hemme DNA-gyrase hos bakterier. Gyrase er et viktig enzym for syntesen av nukleinsyre.

Ciprofloxacin er effektiv mot aerobe, gram positive og gram negative bakterier.

Ciprofloxacin brytes sakte ned i naturen, det er derfor viktig å begrense bruken av ciprofloxacin og andre kinoloner. Ciprofloxacin har en  $\log K_{ow}$  på 1,7 (Hlavinek et al., 2007).

Nedbrytningsraten til ciprofloxacin i jord og slam synes ikke å være undersøkt. I artikkelen av (Kummerer et al., 2000) ble konsentrasjonen av enkelte antibiotika i avløpsvann fra fire ulike sykehus undersøkt, blant annet konsentrasjonen av ciprofloxacin. Etter observasjonen ble det oppdaget at kinolonet ciprofloxacin er blant de mest giftige substansene, med 50 % veksthemming i en konsentrasjon av 80  $\mu\text{g/L}$ . Ciprofloxacin kan være meget giftig for vannlevende organismer og er tungt nedbrytbart, men har ikke potensial for bioakkumulering.



Figur 3: Struktur av ciprofloxacin (Limited, 20.11.2008)

## 2.5 Jord

Jord består av uorganiske mineralpartikler, disse er som regel sand, silt og leire. Det organiske materiale i jord kommer fra døde og omsatte plante og dyrerester. Luft og vann fyller de små porer som ikke er pakket med de faste elementene i jord (Sparks, 2003).

I følge dr. M. Möder ([monika.moeder@ufz.de](mailto:monika.moeder@ufz.de), 15.oktober 2008) er glukosamin og galaktosamin noen av aminosukker som kan være tilstede i jordblandinger. Sopp som vokser i jord kan være årsaken til glukosamindannelsen. Andre substanser som kan være i jord er ulike typer sukker og syrer. En del av komponentene i jord er polare og kan skape interferens for deteksjon av ciprofloxacin ved bruk av fluorescensdetektor, det er av denne grunn viktig å foreta en opprensning for å fjerne disse forstyrrende elementene før en analyse foretas.

## 2.6 Husdyrgjødsel

I dette forsøket ble organisk husdyrgjødsel fra Klepp benyttet. Organisk husdyrgjødsel kan stamme fra dyr eller planter, eller være en blanding av disse to (Bøckman, 1991). Husdyrgjødslet som brukes i denne analysen kommer fra dyr, mer spesifisert storfe.

Husdyrgjødsel kommer i forskjellige slag; fast, væske eller en blanding av disse. Innholdet av næringsstoff i husdyrgjødsel varierer betydelig, mest mellom dyreslag. Ulik fôring og behandling av dyr gir også variert næringsstoff i gjødsel. Husdyrgjødsel inneholder ulike næringsstoffer slik som fosfat, kalium, nitrogen og ammonium. Man finner også enkelte makronæringsstoffer i husdyrgjødsel slik som svovel, kalsium og magnesium. Mikronæringsstoffer som jern, klor, sink, kobber og mangan har også betydning som plantenæringsstoffer (Tveitnes, 1993). Tørrstoff i bløtgjødsel ligger på om lag 10 % (se Tabell 15 og Tabell 16)

Andre komponenter i husdyrgjødsel er ulike fettsyrer, aminosyrer og sukker (Personlig meddelelse fra Dr. M. Möder ([monika.moeder@ufz.de](mailto:monika.moeder@ufz.de), 15.oktober 2008)). Disse substansene kan forårsake problemer ved deteksjon av antibiotika som er innsatt i husdyrgjødsel, dette fordi disse substansene er polare slik som ciprofloxacin, det blir dermed vanskelig å skille disse fra hverandre. En opprensningsmetode er et viktig trinn i analysemetoden.



## 2.7 Nedbrytning

Det finnes mange ulike typer uønskede substanser i miljøet. Antibiotika er et eksempel på en slik substans. Disse substansene har ulik nedbrytningshastighet, og enkelte har svært lang nedbrytningstid. De forblir i miljøet med potensialet til å påvirke økosystemet. Forbindelser med lang halveringstid kalles ofte persistent. Mikroorganismer spiller en viktig rolle i nedbrytningsprosessen i miljøet. Mikrobiell nedbrytning skjer hurtigere i kloakksystemer enn i overflatevann, på grunn av det høye bakterieinnholdet i kloakksystemet (Kummerer, 2004).

Nedbrytning er en viktig prosess når man jobber med jord og grunnvannsforurensning. Mange antibiotika typer er følsomme for enzymatiske reaksjoner, slik som oksidasjon og hydrolyse. Temperatur og stoffets kjemiske sammensetting er viktige faktorer som er av betydning for grad av nedbrytning og nedbrytningshastighet. Fluorokinoloner gjennomgår ikke hydrolyse og er heller ikke sensitiv for temperaturøkning, ultraviolet lys (UV) vil dermed bryte ned kinoloner (Kummerer, 2004). Sollys er av betydning i nedbrytningsprosesser, spesielt i overflatevann. I matriks som jord og husdyrgjødsel vil fotokjemisk nedbrytning ikke finne sted eller være begrenset ettersom sollyset ikke kommer til. Fotokjemisk nedbrytning vil i så fall forgå i overflaten (Kummerer, 2004). Prøver av husdyrgjødsel må derfor etter prøvetaking og inntil analyse oppbevares kaldt (<4 °C) og mørkt.

Ved aerob nedbrytning er det oksygen til stede. Aerob nedbrytning utføres av insekter, meitemark, sopp og aerobe bakterier i den organiske fasen. Oksygentilførsel i omgivelser med lite oksygen vil stimulere den aerobe nedbrytningen. Det vil med dette være naturlig å ha en raskere nedbrytning enn i anaerob miljø. Anaerob nedbrytning er nedbrytning uten bruk av oksygen som elektron akseptor og foregår i miljø uten oksygen tilstedet, slik som husdyrgjødsel eller vannmettet jord. Anaerobe bakterie står som regel bak denne prosessen. I denne nedbrytningsformen blir kun deler av substansen brutt ned. Sluttproduktene er ikke CO<sub>2</sub> og vann, slik som det er i aerob nedbrytning, men organiske forbindelser som eddiksyre og melkesyre.

## 2.8 Fordelingskoeffisient

Fordelingskoeffisient angir hvordan et stoff fordeler seg mellom n-oktanol og vann. Dette gir et bilde på stoffets evne til å bioakkumulere. Fordelingskoeffisienten angis vanligvis logaritmisk som  $\log K_{ow}$ , men kan også angis som  $K_{ow}$ .

Fordelingskoeffisienten,  $K_{ow}$  brukes for å vurdere stoffets evne til å bioakkumulere eller overføres til faser med høyt organisk innhold, for eksempel slam. Ligning 1 uttrykker fordelingsevnen av en forbindelse mellom en lipofil organisk fase og en vandig fase (Kummerer, 2004). En komponent regnes som hydrofil dersom  $\log K_{ow}$  er mindre enn 1, og lipofil dersom  $\log K_{ow}$  er større enn 3. Dersom  $\log K_{ow}$  skulle ligge mellom 1 og 2, defineres substansen som en intermediat hydrofil (Verliefde et al., 2006).

$$K_{ow} = \text{Konsentrasjon i oktanolfasen} / \text{konsentrasjon i vannfasen} \quad (1)$$

Egenskaper en overflate har til å feste til seg til substanser fra løsningen rundt kan kalkuleres ved å anvende fordelingskoeffisienten  $K_d$ . Ligning (2) beskriver spredningen mellom konsentrasjonen av substansen som er sorbert  $C_s$ , (mmol/kg) og konsentrasjonen i væskefase (mmol/kg) ved likevekt. Fordelingskoeffisienten er ofte pH-avhengig (Kummerer, 2004)

$$K_d = \text{kjemisk substans sorbert} / \text{kjemisk substans i løsningen ved likevekt} \quad (2)$$

## 2.9 Fastfase ekstraksjon

I forsøk der prøveopparbeiding er et viktig trinn, er fastfaseekstraksjon (SPE) en teknikk som er mye benyttet. SPE har flere fordeler, slik som tidsbesparelse, nytting og kostnadseffektiv. Prøveløsninger ageres på en fastfase ekstraksjonskolonne. SPE brukes for å separere komponenter av interesse fra urenheter i en prøve. Materialet i ekstraksjonskolonnen vil forsinke urenheter i prøven. Analytten elueres så ut av kolonnen ved assistanse av en mobilfase, og samles opp for videre analyse på for eksempel væskrokromatograf (HPLC) eller gaskromatograf (GC) koblet til en detektor (Skoog et al., 1996).

Normal fastfase ekstraksjon består av en upolar mobil fase, som for eksempel n-heksan eller noe mer polar blanding av n-heksan og aceton. Den stasjonære fasen i normal fastfase kromatografi er som regel polar, som for eksempel silikagel ( $\text{SiO}_2$ )<sub>x</sub>. Analytten er som regel polar eller middels polar. Den minst polare komponenten elueres først og den polare sist (Rønning, 2006). Det er viktig å velge riktig mobilfase til prøven som skal analyseres. Dersom polariteten til analytten er lik polariteten til den stasjonære fasen, vil elueringstiden være lang. Er derimot polariteten til analytten svært ulik polariteten til den stasjonære fasen, vil dette føre til en alt for kort retensjons tid. Elueringshastighet er som oftest optimal på 1 ml per minutt. Gjenvinning av analytten er best når løsningen forblir i kontakt med silikagelen i tuben i 20 sekunder til 2 minutt (Supelco, 01.02.2009). Langsom eluering er en fordel slik at de uønskede komponentene får tid til å absorberes på silikafasen.

Løsninger som brukes i fastfase ekstraksjon har et bredt pH omfang. Silika baserte pakking har oftest en stabil pH omfang som ligger mellom 2 til 7,5, slik som i HPLC kolonne. Dersom pH-verdien ligger under eller over dette området, kan dette føre til problemer. Silikagelen kan selv bli oppløst. I fastfase ekstraksjon er løsningen i kontakt med sorbenten kun i korte perioder av gangen og kolonnen er beregnet til engangsbruk, dette betyr at man kan bruke hvilke som helst pH for å optimalisere retensjon eller eluering av analytten. Enkelte kolonnematerial tåler mer enn andre. I normal fastfase ekstraksjon, er pH-verdier vanligvis ikke et tema, ettersom løsningen i denne prosedyren som oftest upolar organisk løsning (Supelco, 1998).

## **2.10 Kromatografi**

Navnet kromatografi brukes om prosesser for separasjon, identifikasjon og bestemmelse av to eller flere kjemiske substanser som er basert på at stoffene sprer seg ulikt mellom to faser, en mobil og en stasjonær. Der de kjemiske substansene blir eluert ut gjennom en stasjonær fase ved hjelp av en mobil fase, som er enten i gass eller i væske fase. Den stasjonære fasen er derimot i væske eller i fastfase.

Gasskromatografi, væskrokromatografi og tynnskikt-kromatografi hører til under kromatografiske prosesser (Grahl-Nielsen and Frøystein, 2007).

## 2.11 Gasskromatografi

Gasskromatografi er en kromatografisk prosess innen kjemiske analyser som fører til separasjon og deteksjon av gasser og flyktige komponenter i løsninger, overveiende organiske løsninger. Hvilke som helst substans, organisk eller uorganisk, som har et damptrykk på minst 60 torr kan bli eluert fra en GC kolonne Et gasskromatografisk (GC) - instrument består av følgende komponenter (Skoog et al., 1996):

- I. En injeksjonsport eller en ventil hvor prøven sprøytes inn
- II. En sylinder med bæregass under trykk<sup>3</sup>
- III. En ovn med termostat.
- IV. En separasjonskolonne som prøven vandrer gjennom ved hjelp av bæregassen
- V. En detektor.
- VI. Omformer av signaler fra detektoren.

Kapillarkolonner av kvartsglass blir mye brukt i GC. Dens indre diameter er på 0,1-0,5 millimeter og har en lengde mellom 10-50 meter. Polysiloxan blir også mye benyttet som stasjonærfase og ligger som en hinne inne i kapillarrøret (Grahnl-Nielsen and Frøystein, 2007).

Ekstraktet injiseres i injektoren, før den vandrer gjennom kolonnen. Analytten fraktes gjennom det kromatografiske systemet ved hjelp av bæregassen. Mobilfasens påvirker ikke analytten som analyseres, dens eneste funksjon er å frakte analytten gjennom kolonnen. Molekylvekt, kokepunkt, stoffets fettløselige egenskaper, kolonnens temperatur, bæregassens fart og type kolonnematerial bestemmer hastigheten gjennom kolonnen. Et dataprogram kontrollerer temperaturen på injeksjonsporten, kolonnen og detektoren. Kolonnetemperaturen forandres i løpet av en analyse, dette for at det skal innhentes en rimelig atskillelse mellom flyktige og mindre flyktige elementer. Detektoren registrerer mengde stoff som analyseres. En Pc registrerer tidspunktet for når komponenten treffer detektoren. Med dette kan man si at detektoren ikke identifiserer prøvens innhold. For å identifisere komponenten som analyseres kreves det at man vet hva ekstraktet inneholder sånn omtrent, slik at en kan

---

<sup>3</sup> Bæregassen er gjerne helium eller nitrogen

parallellisere tidspunktet for substansenes som analyseres med et bibliotek av referanseprøver som er analysert under de samme omstendigheter (Skoog et al., 1996). Et GC- instrument kombinert med en detektor som er i stand til å identifisere komponentene, som for eksempel massespektrometri kan benyttes. Figur 4 viser ”Agilent 6890 A” gasskromatografi som ble benyttet i UFZ (Leipzig).



Figur 4: Agilent 6890 A gasskromatograf (DataApex, 14.04.2009)

## 2.12 Massespektrometri

Massespektrometri er et analytisk instrument som gir oss informasjon om den kjemiske strukturen til substansen som blir analysert, bare små mengder av substansen kreves. Den gir oss både kvalitativ og kvantitativ informasjon om atomets og molekylets sammensetting av organiske og uorganiske materiell.

Massespektrometri omformer molekyler til ioner i et ioniseringskammer. Ionene må være i gassfase. En liten prøve av en substans blir introdusert i et høyvakuum kammer, hvor det fordamper, og blir så bombardert med høyenergiske elektroner.

Fragmenter av molekyler fremtrer og blir akselerert ut av ionekilden og inn i masseseparatoren, her skilles ioner etter forholdet mellom masse og ladning.

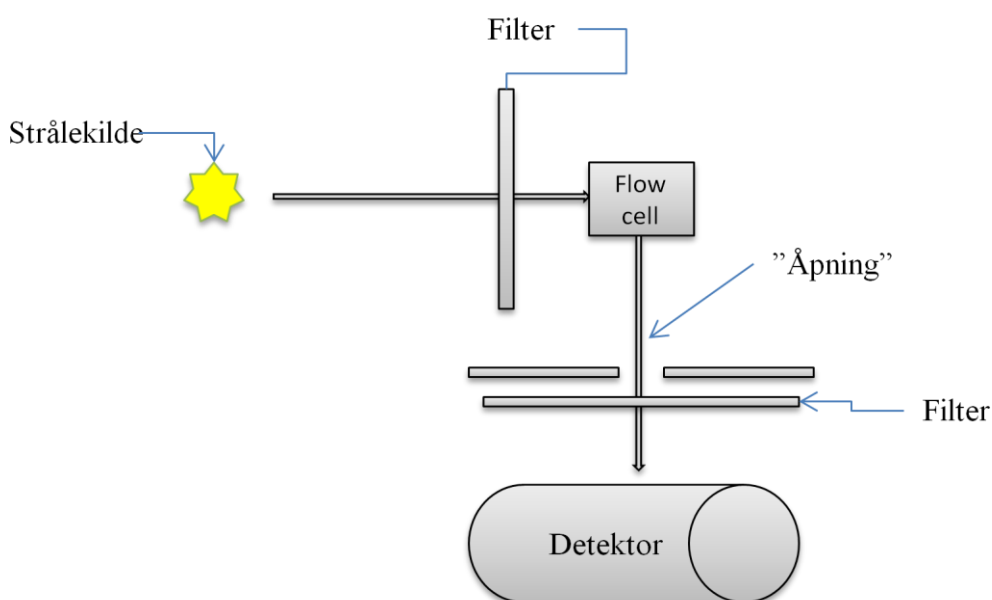
Analysen er rask og sensitiv. Massespektrometerdetektor kan brukes som en universal eller som en høyt selektiv detektor (SIM-mode), og kan med dette vise identiteten til hver eluerte komponent. Kostnadene er derimot høyere enn andre detektorer (Lindsay, 1992).

## 2.13 HPLC

Høytrykksvæskrokromatografi (HPLC- High Performance Liquid Chromatography) er en kolonnekromatografi, som brukes mye i analytisk kjemi til separasjon av ulike komponenter. HPLC utføres ved å pumpe inn en mobilfase under trykk på opp til 40 megapascal (MPa), som tilsvarer 400 atmosfærer trykk (atm). Prøven injiseres og substansene sprer seg ulikt mellom mobil- og stasjonærfasen. Komponentene vil dermed skilles fra hverandre og til slutt gå gjennom en detektor. Kort retensjonstid, høy sensitivitet, høy selektivitet og små mengde prøvemateriell er et resultat av smal kolonne og små partikler som benyttes i HPLC. HPLC deles inn i to undergrupper; normalfase kromatografi og reversfase kromatografi. I normalfase kromatografi benyttes ofte en silika pakket kolonne, som på overflaten har kovalent bundet upolar organisk gruppe. En upolar mobil fase slik som n-heksan benyttes. Den mest brukte kolonnetypen er basert på omvendtfase kromatografi med kjemisk bundet stasjonærfase. I omvendt fase kromatografi er stasjonærfasen upolar mens mobilfasen er polar, slik som vann, metanol eller acetonitrill, eller en blanding av disse (Lindsay, 1992).

## 2.14 Fluorescensdetektor

Fluorescerende substanser kan detekteres med fluorescensdetektor, skissert i Figur 5. Fluorescerende molekyler er som oftest polyaromatiske hydrokarboner. Sensitiviteten er høy, i enkelte tilfeller høyere enn i ultrafiolette detektor (UV). Dens høye sensitivitet medfører at man får mindre forstyrrelse fra andre komponenter slik som løsningsmidler og forurensninger. Noen stoffer slik som polisykliske hydrokarboner (PAH) som finnes i lave konsentrasjoner i luft, kan være vanskelig å detektere ved bruk av andre detektorer enn fluorescensdetektor. Ulike molekyler tar opp energi i form av lys av en bestemt bølgelengde, eksitasjon absorpsjon, og avgir energi på en annen bølgelengde, emisjon. På denne måten selekteres komponentene fra hverandre. Fluorescenslys sendes i alle retninger, men er detektert i en 90 graders vinkel (Lindsay, 1992)



Figur 5: Rekonstruert skisse av fluorescensdetektor Lindsay (1992, s.87)

## **3 Eksperimental**

### **3.1 Forskningsformål og valg av metode**

Det er svært viktig å kunne delta i forskning når muligheten tillater dette. Spesielt når det kommer til viktige emner som engasjerer samfunnet. Legemidler som miljøgifter er et stort tema, og formålet med oppgaven er å kunne tilføye ny kunnskap til det som allerede eksisterer av informasjon.

I metodevalget faller det naturlig i å bruke de metodene som er blitt benyttet i tidligere forskning av dette tema. Gasskromatografi med massespektrometridetektor (GC-MS) er derfor et naturlig valg ved analyse av triclosan. I analysen av ciprofloxacin benyttes høytrykksvæskekromatografi (HPLC). Ut fra tidligere forskning slik som vist i artikkelen av (Kot-Wasik et al., 2007) er fluorescensdetektor blitt benyttet ved ciprofloxacin analyse og MS detektor ved undersøkelse av andre farmasøytiske substanser.

### **3.2 Prøvetaking og prøveopparbeiding**

Riktig prøvetaking er en svært viktig faktor for å sikre best mulig kvalitet på analyseresultatene. Jord og husdyrgjødsel hører under fast og halvfast materialer. Prøvene som samles for videre bearbeiding er sammensatt av flere komponenter og faser, og er ofte ikke homogene. Det er av den grunn viktig å bearbeide prøvene i prøvetakingsprosedyren. Tørking, oppkutting og knusing fører til bedre homogenitet i prøvene (Rønning, 2006). Flere faktorer må ta hensyn til ved prøvetaking. Utstyret må være rent og ikke avgi fra seg stoffer som kan påvirke resultatene. Glassbeholdere med teflon forsegling er å foretrekke frem for plast og aluminium når man jobber med organiske stoffer, dette for å redusere absorpsjon av stoffene til prøvebeholdere. Prøvene må ikke oppbevares i sammen med andre prøver eller stoffer som kan føre til krysskontaminering, dette gjelder også når man jobber med prøvene i avtrekkskap. Avtrekkskapet som benyttes skal være ren og fri for luftstrøm. Ved oppbevaring skal prøvene forvares i mørkt kjølerom, dette for å redusere faren for mikrobiologisk og/eller fotokjemisk nedbrytning. Enkelte substanser slik som ciprofloxacin er følsom for lys (Kummerer, 2004), for å redusere eller eliminere den fotokjemiske reaksjonen er det derfor viktig at sollys ikke kommer inn i rommet. Nøyaktig måling er viktig i



alle ledd under forsøkene, dette for å få korrekte resultater. Pippete med justerbar volum (0,2-1 ml) ble benyttet. Mange av de oppmålte løsninger ble også veid.

### 3.3 Tørrstoff og glødetap bestemmelse

Tørrstoff angir mengde tørt materiale i en prøve i sedimentet. Mengde organisk materialet i sedimentet vises i glødetap. I sediment der det foregår normal nedbrytning av organisk material er glødetapet på om lag 10 %. Glødetapet kan være høyre i enkelte tilfeller, for eksempel i anaerob miljø der oksygentilførsel er begrenset. Mengde organisk stoff i sediment kan også måles ved å måle innhold av total organisk karbon (TOC). Dette kan gjøres på forskjellige måter. TOC er om lag halvparten av glødetapet (Krogstad, 1992). Ligning for utregning av tørrstoff og glødetap er vist her:

$$\text{Tørrstoff i \%} = \frac{m_3 - m_1}{m_2} \times 100 \quad (3)$$

$$\text{Glødetap i \%} = \frac{m_3 - m_4}{m_3 - m_1} \times 100 \quad (4)$$

- $m_1$  er masse, i gram, av digel.
- $m_2$  er masse, i gram, av husdyrgjødsel før tørking
- $m_3$  er masse, i gram, av digel med husdyrgjødsel, etter seks timer i tørkeskapet ved 105 °C.
- $m_4$  er masse, i gram av digel og husdyrgjødsel etter glødetap.

Prosedyre for å bestemme glødetap og tørrstoff:

- Circa 10 gram husdyrgjødsel veies inn i digeler.
- Diglene settes til tørking i tørkeskap på 105 grader i 6 timer (vannet fordamper).
- Prøvene med digel veies. Skriv tallet med tre desimalers nøyaktighet.
- Glødetapet måles. Sett prøvene i en glødeovn på 550 grader i 3 timer.
- Glødetapet bestemmes på samme måte som tørrstoffet, ved at prøvene med digel veies, massetapet måles.
- Ved hjelp av ligning (3) regnes tørrstoffet og ligning (4) glødetapet.

Analyse av glødetap benyttes ofte som et indirekte mål på innhold av organisk karbon. Glødetap gir imidlertid høyere verdier enn ved direkte analyse av organisk karbon. Overestimering ved glødetapsanalyse skyldes at en ved forbrenning mister en del krystallvann (salter) og muligens også noe uorganisk karbon (karbonater og bikarbonater), en korreksjonsfaktor på 2 er vanlig å bruke.

### 3.4 Materiale

Jord og husdyrgjødsel kommer fra Bioforsk Vest Særheim i Klepp. Husdyrgjødslet er fra storfe. Ciprofloxacin og triclosan ble kjøpt fra Sigma-Aldrich. Ciprofloxacin (Fluka, renhet >98,0 % HPLC). Triclosan også kalt Irgasan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether, Fluka, renhet > 97,0 % HPLC), ble levert av Sigma-Aldrich Norway.

Costar Spin-X centrifugal filter 0,22  $\mu\text{m}$  porestørrelse, nylonmembran anbefalt av Viktor Hormazabal ved Norges Veterinærhøyskolen i Oslo. Figur 6 viser sterilt sprøytefilter fra Leife Science® som ble brukt under metodebearbeiding på Universitetet i Stavanger. I metodeutvikling i Leipzig ble det samme filtret benyttet, bare i 0,45  $\mu\text{m}$ .



Figur 6: Steril sprøytefilter fra Life Sciences® Porestørrelse på 0,22  $\mu\text{m}$ , Nylonmembran.

### 3.5 Ekstraksjon og analysemetode av ciprofloxacin

En standardkurv for ciprofloxacin ble først laget. Ciprofloxacin blir så tilsatt i jord og husdyrgjødsel, deretter ekstrahert før ekstraktene blir analysert. Punktene under viser detaljer over ekstraksjon og analysemetoden.

- Ciprofloxacin stamløsning blir laget ved å veie 100,8 mg ciprofloxacin tilsatt milliQ-vann og 1 M HCl til pH 2,6. Dette gir en standard løsning på 0,496 mg/ml. Flere fortyninger (se Tabell 1) lages fra standarden og standardkurv fremstilles (se Figur 8)

Tabell 1 Løsninger til ciprofloxacin standardkurve

<i>Konsentrasjon i ng/ml</i>
0,0
35,8
58,4
302
499,2

- 1,9738 gram ciprofloxacin à 0,496 mg/ml tilsettes inntil 110,02 ml løsning A (0,01 M HCl og acetonitrill 60:40). Dette gir en konsentrasjon på 8,898 µg/ml
- 0,2 ml ciprofloxacin à 0,496 mg/ ml tilsettes inntil 3 ml løsning A 0,01 M HCl og acetonitrill 60:40). Dette gir en løsning med en konsentrasjon på 33,33µg/ ml.
- 0,5 gram tørket husdyrgjødsel og jord veies hver for seg (Husdyrgjødslet tørkes på en varm plate som holder 50 grader).
- Vei 0,5 gram jord og husdyrgjødsel hver for seg til prøve nr 1, 2,5 og 6 (se Tabell 2 ). Tilsett 0,5 ml ciprofloxacin etter tabell 2
- Tilsett så 0,5 ml 1 M HCl, 3,5 ml acetonitrill og 0,5 ml løsning A (0,01 M HCl og acetonitrill 60:40).
- Homogeniser ekstraktene med matriks i en Ultra-torrax homogenisator i 1-2 timer.
- Foreta en opprensing med silikagel og eluer med n-heksan/ aceton blanding (65:35) etter Tabell 2.
- Sentrifuger i 10 min ved 4500 omdreininger per minutt (rpm)
- Aceton og n-heksan i prøvene som har gjennomgått opprensning dampes vekk med nitrogenass til man sitter igjen med 0,2 ml supernatant.

- Filtrer gjennom sterilt sprøytefilter fra Life Sciences med porestørrelse på 0,2 µm, nylonmembran.
- Til 200 µl supernatant tilsett 400 µl 0,1 % maursyre i vann.
- Analyser prøvene på HPLC instrument koblet til fluorescensdetektor, detaljert innstillinger om instrument er vist i Tabell 3.
- Alle løsningene oppbevares i kjøleskap ved 4 grader °C frem til de blir analysert.

Tabell 2: Ciprofloxacin ekstrakter til analyse

Ekstrakt	Ciprofloxacin à 0,5 ml	Opprensing med silikagel	Prøve nr.
0,5022 gram jord	à 33,33 µg/ml	Ja	1
0,5005 gram husdyrgjødsel	à 33,33 µg/ml	Ja	2
Prøve uten matriks	à 33,33 µg/ml	Ja	3
Prøve uten matriks	à 33,33 µg/ml	Nei	4
0,5014 gram husdyrgjødsel	à 8,9 µg/ml	Nei	5
0,6042 gram jord	à 8,9 µg/ml	Nei	6
Blank prøve uten matriks	0	Nei	7
0,5346 gram jord	0	Ja	8
0,5174 gram	0	Ja	9

**Tabell 3: Innstilling og parameteroppsett for HPLC Agilent 1100**

Kolonne	ACE C8: ACE-112-1546 Lengdemål: 4,6x150 mm Partikkel størrelse: 3 µm
Detektor	Fluorescens, med PMT (fotomultiplier detektor)
Mobilfase	Løsning A: 100 %: Acetonitrill og 0,1 % maursyre i vann (50:50)
Injeksjonsvolum:	5 µL (Kanylen vaskes mellom hver injeksjon med metanol)
Emisjon (Em)	450 nm
Eksitasjon (Ex)	280 nm
Gjennomstrømming (Flow)	0,7 ml / min
Stopp tid	Etter 10 min
Maks Trykk (P)	300 bar

### **Ekstraksjon og analysemetode for ciprofloxacin i ulike pH**

Analyse av ciprofloxacin i ulike pH er delt inn i flere punkter (I, II, III og IV). Nedenfor beskrives detaljert prosedyre for fremstillingen før ekstraktene analyseres på HPLC med fluorescensdetektor som beskrevet i Tabell 3

Del I:

- 6 kolber merkes med:
  - pH 4,7 (2 kolber)
  - pH 10,5 (2 kolber)
  - pH 2,2 (2 kolber)
- Til alle kolbene tilsettes:
  - 2 ml av ciprofloxacin à 0,2678 mg/ml
  - 0,5 ml 1 M saltsyre
  - 3,5 ml acetonitrill

- 0,5 ml løsning A (0,01 M HCl og acetonitrill 60:40).
  - Mellom 3,5-7,5 ml aceton/ n-heksan (med justert pH med 1M saltsyre eller ammoniakk 25 %)
- La løsningen stå i omtrent 2 timer. Et klart faseskille kan ses mellom den polare og den upolare delen.
  - 0,4 ml fra den upolare fasen analyseres (dette for å se om det finnes noe ciprofloxacin her).
  - 0,4 ml fra den polare fasen (aceton) blir analysert.
  - Tilsett 1 gram silikagel til alle tre kolbene, rør og la dette stå i 1-2 timer.
  - 0,4 ml fra den polare fasen analyseres.
  - HPLC med fluorescensdetektor benyttes.

## Del II

- 4 målekolber blir veid.
- Tilsett til alle målekolbene:
  - 0,5 ml 1 M HCl
  - 2-7 ml n-heksan/ aceton (65:35)
  - 3,5 ml acetonitrill
  - 0,5 ml ciprofloxacin à 0,9µg/ml
  - 1-2 gram silikagel
  - 0,5 ml løsning A (0,01 M HCl og acetonitrill 60:40).
- Juster pH verdien med 1 M HCl eller 25 % ammoniakk til pH:
  - 0,9
  - 2,8
  - 3,9
  - 4,35
- Rør av og til, la løsningen stå i 1 time.
- 0,2 ml supernatant blir analysert på HPLC med fluorescensdetektor

### Del III:

- Vei en kolbe og tilsett:
  - 1 ml ciprofloxacin à 9 µg/ml
  - 0,5 ml 1 M saltsyre
  - 3,5 ml acetonitrill
  - 0,5 ml løsning A (0,01 M HCl og acetonitrill 60:40).
- 10 gram silikagel fylles i 10 ml sprøyter (tettet med bomull)
- 20 ml blanding av n-heksan og aceton med pH 9,5 brukes som elueringsmiddel
- Eluer (rens) løsningen gjennom silikagelen med en hastighet på 1ml/ min.
- 0,4 ml av løsningen som er eluert analyseres på HPLC med fluorescensdetektor.
- Resten av prøven elueres en gang til på den samme silikagelen, men denne gangen med kun aceton à 25 ml som elueringsmiddel med pH 12
- Noe av løsningen blir dampet vekk med nitrogengass (dette for å oppkonsentrere prøven)
- 0,4 ml av prøven har i prøveglass avbildet på Figur 7.
- Ekstraktene analyseres på HPLC med fluorescensdetektor (se Figur 17 og Figur 24).

### Del IV:

- 0,3065 gram ciprofloxacin à 0,496 mg/ml tilsettes inntil 3,52 ml løsning A 0,01 M HCl og acetonitrill 60:40). Dette gir en konsentrasjon på 43,55 µg/ml.
- 0,5 gram tørket husdyrgjødsel og jord veies hver for seg (Husdyrgjødslet tørkes på en varm plate som holder 50 grader).
  - 0,5023 gram jord med ciprofloxacin innsetting og opprensing med silikagel.
  - 0,5321 gram husdyrgjødsel med ciprofloxacin innsetting og opprensing med silikagel.
  - Ciprofloxacin innsetting og opprensing med silikagel (uten matriks).
  - Ciprofloxacin innsetting uten opprensing (uten matriks)

- Tilsettes 0,5 ml ciprofloxacin à 43,55 µg/ml, 0,5 ml 1 M HCl, 3,5 ml acetonitrill og 0,5 ml løsning A (0,01 M HCl og acetonitrill 60:40).
- Homogeniser med en Ultra-torrex.
- Sentrifuger i 10 min ved 4500 omdreininger per minutt (rpm)
- Foreta en opprensing med silikagel og eluer med n-heksan/ aceton blanding (50:40) pH 10,5. (Dette punktet gjøres kun på noen av prøvene).
- Filtrer gjennom sterilt sprøytefilter fra Life Sciences med porestørrelse på 0,2 µm, nylonmembran
- Til 200 µl supernatant tilsett 400 µl 0,1 % maursyre i vann
- Analyser prøvene på HPLC med fluorosensdetektor.



Figur 7: Prøveglass 32x22,6 mm à 2 ml

### 3.6 Gjennomføring av nedbrytningsforsøk av triclosan og ciprofloxacin i husdyrgjødsel

For å få mer kunnskap om nedbrytning av triclosan og ciprofloxacin i aerobe og anaerobe rensetrinn i avløpsrenseanlegg, ble det gjennomført et nedbrytningsforsøk. Avløpsslam har allerede en viss bakgrunnskonsentrasjon av disse stoffene og det ble derfor valgt å bruke husdyrgjødsel som prøvematriks.

Husdyrgjødsel veid inn og fordelt mellom to glassbeholdere à 2 liter. Den ene beholderen er aerob mens den andre er anaerob. Ciprofloxacin og triclosan ”Spiking” av testforbindelser til husdyrgjødsel (”spiking” = kunstig tilsetning av stoffer) etter



Tabell 4. Det blir tatt ut prøver fra disse to glassbeholdere med husdyrgjødsel omtrent en gang i uken.

- 266,8 mg ciprofloxacin løses i 400 ml destillert vann, 0,1 M HCL tilsettes  $\Rightarrow$  0,67 mg/ml ciprofloxacin løsning.
- 4 gram triclosan løses i 100 ml metanol  $\Rightarrow$  40 mg/ml.
- To glassbeholdere à 2 liter merkes med tett lokk, den ene med aerob og den andre med anaerob.
- 2,00 kg friskvekt husdyrgjødsel veies opp i den aerobe beholder.
- omtrent 3 kg husdyrgjødsel has over i en bøtte, som så kobles til en slange med nitrogengass, dette for å fjerne mest mulig av oksygenet fra matriksen. Deretter fylles 2,00 kg friskvekt av denne matriksen over i den anaerobe beholderen.
- 20 mg ciprofloxacin og triclosan tilsette per kg husdyrgjødsel som vist i Tabell 4.
- Et ekstra sett prøvebeholdere lages og settes umiddelbart kalt i kjølerom (til analyse av startsprøver)
- I den aerobe beholderen, à 2 kg husdyrgjødsel, plasseres en akvariestein i nedre del av beholderen. Gjennom teflonslangen som føres gjennom et hull i lokket blir massen luftet ved bruk av en akvariepumpe.
- Anaerob beholder à 2 kg husdyrgjødsel har ingen lufting.
- Glassbeholdere sto skjermet for sollys.
- Nedbrytningsforsøket blir klargjort i romtemperatur (22-24 °C)
- Prøver tas ut etter 8,17,29 og 45 inkuberings dager, 3 paralleller tas ut hver gang.
- Prøvene oppbevares mørkt og under 4 °C før analysering.
- Gasser, pH, tørrstoff, glødetap og temperatur måles underveis i forsøket.

Tabell 4: Mengde tilsatt substanser i husdyrgjødsel

<i>Beholder</i>	<i>Ciprofloxacin à 0,67 mg/ ml</i>	<i>Triclosan 40 mg/ ml</i>
Aerob	60 ml (20 mg/ kg)	1 ml (20 mg/ kg)
Anaerob	60 ml (20 mg/ kg)	1 ml (20 mg/ kg)

### 3.7 Ekstraksjon og analysemetode for triclosan

I del I blir det laget løsninger til å fremstille en standardkurve. Løsningen blir sendt til UFZ i Leipzig for analyse i GC/MS med innstilling på selektert ion monitorering Del II er en videre bearbeiding av nedbrytningsforsøket omtalt i kapittel 3.6. Uttak av prøvene blir videre bearbeidet til ekstrakter som så sendes til UFZ for videre analyse. Del III er opparbeiding av jord og husdyrgjødsel med kjent mengde tilsatt triclosan. Ekstraktene sendes videre til UFZ for analyse. Enkelte av ekstraksjonen er ikke tilsatt noe triclosan er beregnet som blindprøver. Det IV er analysedelen i UFZ, her blir de sendte prøvene behandlet videre før de analyseres på GC/MS med innstilling på selektiv ion monitorering.

#### I. Standardkurve:

- Triclosan stamløsning lages: 0,4 mg/ml i metanol. Tilbred flere fortyninger fra stamløsningen til en standardkurv, prøvene sendes til Leipzig for videre analyse. Konsentrasjonen som sendes til UFZ til å fremstille en standardkurve har følgende konsentrasjoner:

0,29 µg/ml

0,68 µg/ml

1,02 µg/ml

3,3 µg/ml

#### II. Prøveopparbeiding av husdyrgjødsel (på UiS) til analyse av nedbrytningsekstrakter:

- Prøvene tatt fra nedbrytningsforsøket av triclosan og ciprofloxacine blir videre bearbeidet.
- Sett prøvene til tørking i avtrekkskap (over natten). NB! Alle må merkes
- Finknus gjødsel med morter og pestill
- 0,5± gram av hver prøve veies.
- n-heksan tilsettes og ekstraktene sett til risting i rotoshaker apparat i 1-2 timer.
- Filtrer prøvene med steril sprøytefilter fra Life Sciences® med porestørrelse på 0,2 µm, nylonmembran.
- Bruk nitrogengass til å dampe vekk overskuddet av n-heksan.

- Man sitter igjen med 0,2 ml løsning som fylles opp i prøveglass som vist i Figur 7.
- Prøvene sendes ned til Tyskland for videre analyse.

### **III. Prøveopparbeiding av husdyrgjødsel og jord (på UiS) til analyse av ekstrakter som kontrolltest:**

- Hent nytt matriks og tørk disse hver for seg (jord og husdyrgjødsel). Husdyrgjødselen tørkes på en varm plate som holder 50 grader. 10gram matriks veies hver for seg.
- Lag en acetonsuspensjon i hver matriks og tilsett 0,2 ml à 0,4 mg/ml triclosan (stamløsning)
- Aceton dampes bort, matriksen dekkes med aluminiumsfolie med hull i, for å unngå kontaminasjon)
- Vei inn 0,5g (med 4 siffrers nøyaktighet) av hver komponent i to omganger (to paralleller)
- Tilsett 10 ml n-heksan til hver prøve.
- 0,5g av hver matriks uten tilsetning av substans veies (blind -prøve). Tilsett omtrent 10 ml heksan.
- Sett prøvene til risting i rotoshake apparat i 1-2 timer.
- Sentrifuger i 10 minutter på 4500 omdreininger per minutt (rpm)
- Prøvene filtreres ved å bruke sterile sprøytefilter fra Life Sciences ® porestørrelse på 0,2 µm nylonmembran.
- Heksan dampes bort ved å bruke av nitrogen gass.
- 200 µl av hver løsning (n-heksan) måles og overføres over i prøveflasker (32x22,6 mm).
- Prøvene sendes ned til Tyskland for videre analyse.

#### IV. Derivitisering av ekstraktene i UFZ:

- Alle prøvene ble satt til avdamping. n-heksan ble dampet vekk.
- 1 ml aceton løsning ble tilsatt og blandes med triclosan og behandlet med 100  $\mu\text{L}$  10 % vandig kaliumkarbonatløsning etterfulgt av 100  $\mu\text{L}$  5 % pentafluorobenzylbromide (PFBBr) i aceton, prøvene ble tilsatt (PFBBr) for derivivering.
- Løsningen ble så holdt ved 60 °C for 1 time.
- 1 ml av n-heksan og 0,5 ml av dobbel destillert vann ble tilsatt for å fjerne overflødig reagens.
- Deretter ble heksanfasen separert og tørket med natriumsulfat, filtrert og konsentrert tilsluttvolum på 200  $\mu\text{L}$ .
- 2  $\mu\text{L}$  1,2,3,4-tetrachlorobenzene ble tilsatt til alle prøvene (ved hjelp av en sprøyte) dette for å kontrollere at GC/MS instrumentet fungerte tilfredsstillende.
- Tabell 5 viser detaljer over analyseinstrumentet og innstillinger som er benyttet i analysen.

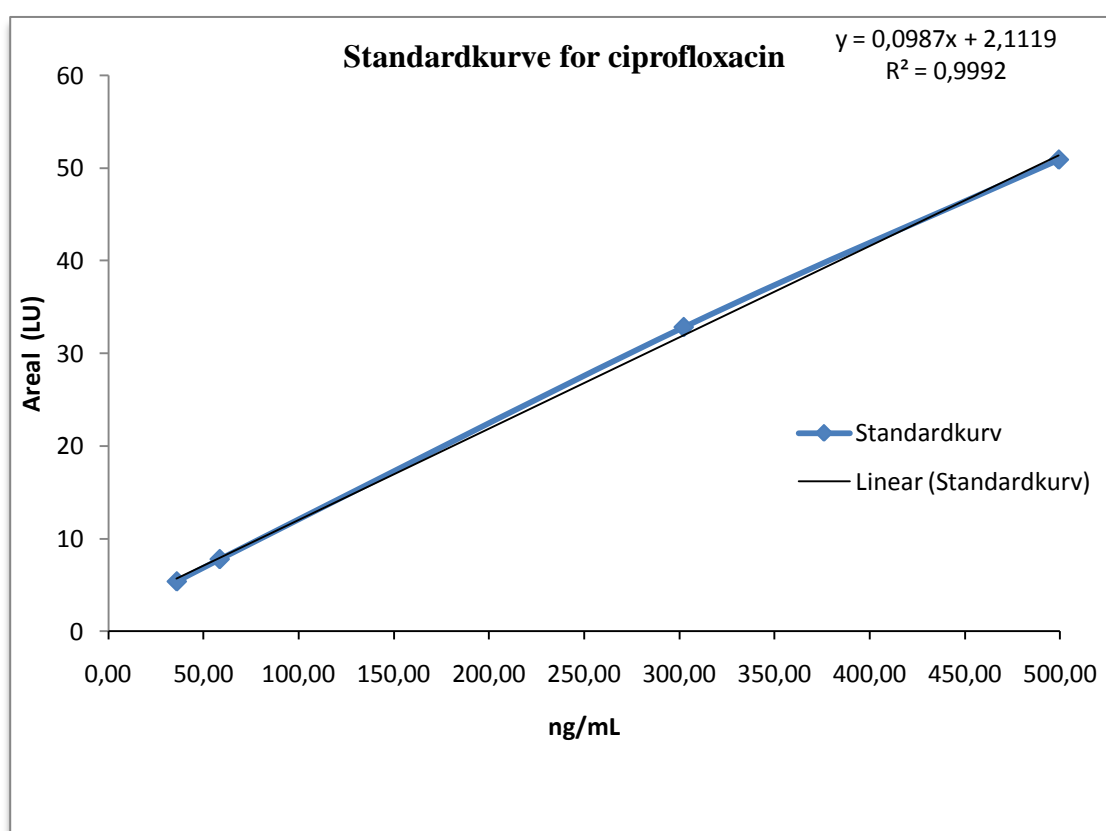
Tabell 5: Innstillinger og parameter for Agilent 6890 A gasskromatografi

<b>Detektor</b>	<b>Massespektrometerdetektor (MSD) 5973 (fra Agilent Technologies, San Jose, USA).</b>
<b>Injeksjon</b>	1 µL av prøven ble injisert ved hjelp av en teknikk ”pulsed splitless” Med en temperatur på 280 °C og trykk på 172 kPa. (”puls” tid 1½ minutt)
<b>Injektor er koblet til</b>	Forkolonne: 2,5 m x 0,32 mm I.D. HP-5MS kapilær kolonne: (30 m x 0,25 mm I.D., 0,25 µm film tykk, J&W Scientific Inc., Folsom, USA)
<b>Bæregass</b>	Helium med gasshastighet på 1 ml /min
<b>GC ovn temperatur program</b>	50 °C (holdes i 1 minutt), økes så med 10 kelvin (K) per minutt til 280 °C (holdes i 13 minutter)
<b>MS parameter Negativ Kjemisk Ionisering (NCI).</b>	Grensesnitttemperatur: 280 °C kildetemperatur: 150 C Kvadropol temperatur: 100 °C Oppløsnings forsinkelse 11 min
<b>Optimal gjennomstrømming av metan (ragent gass)</b>	4 ml/min (justeres med octafluoronaphthalene)
<b>Spenning (multiplum)</b>	2200 volt (V)
GCMS ble innstilt på selektert ion monitorering (SIM)	Ionestrøm: 287 and 289 m/z m = ionets masse, z = ionets ladning

## 4 Resultater

### 4.1 Standardløsninger og standardkurve ciprofloxacin

Ukjent mengde konsentrasjon i en løsning avdekkes ved bruk av standardkurv. 3 – 5 prøver med kjent konsentrasjon må analyseres. Standardkurve for ciprofloxacin hvor absorbans er plottet mot konsentrasjon er vist i Figur 8. Null konsentrasjoner skal som regel gi null areal (LU), men dette er ikke alltid tilfelle. Standardkurven er fremstilt etter prosedyren nevnt i kapittel 3.6 ciprofloxacin ved hjelp av HPLC med fluorescensdetektor.



Figur 8: Standardkurve for ciprofloxacin

## 4.2 HPLC analyseresultat

I analyse av ciprofloxacin ble HPLC med fluorescensdetektor benyttet som måleinstrument. Ekstrakter fra husdyrgjødsel og jord ble bearbeidet etter prosedyre beskrevet under kapittel 3.6 ekstraksjon og analysemetode av ciprofloxacin.

Retensjonstiden for ciprofloxacin er ventet til å ligge på rundt 2,4 minutter. Jord og husdyrgjødsel ble tilsatt og ekstrahert i noen av analysene. Noen av prøvene som ble analysert ble rensert med silikagel. En blanding av aceton og n-heksan benyttes som elueringsmiddel.

Det ble detektert flere topper fra analysene av jord og husdyrgjødsel uten tilsatt ciprofloxacin. Disse ekstraktene ble så rensert gjennom silikagel og analysert igjen. Ingen topper ble detektert etter opprensing i ciprofloxacin deteksjonsområdet.

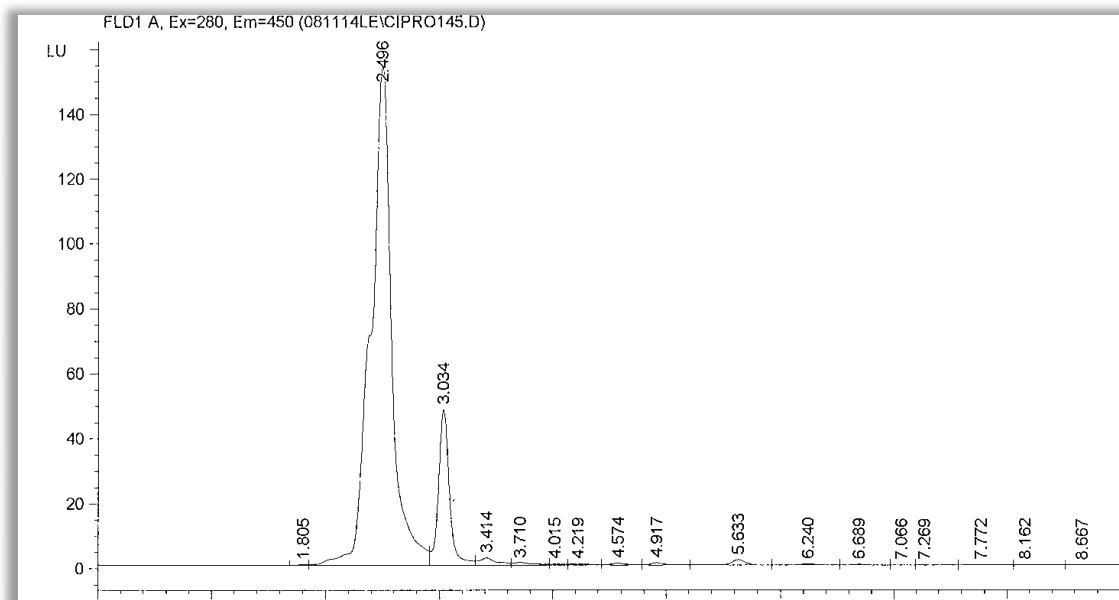
Tabell 6 viser resultater fra ulike ekstrakter av ciprofloxacin. I prøve nr 5 og 6 ble matriks og ciprofloxacin tilsatt. Detektert topp ble alt for høy i forhold til tilsatt ciprofloxacin. Dette betyr at ulike komponenter i jord og husdyrgjødsel overskygger for ciprofloxacin og har samme retensjonstid.

Tabell 6: Resultater fra analyse av ciprofloxacin på HPLC med Fluorescensdetektor, uten pH innstilling (Retensjonstiden for ciprofloxacin er 2,2-2,5 )

Prøve nr.	Teoretisk konsentrasjon $\mu\text{g/ml}$	Reelle konsentrasjon Utregnet fra standardkurve $\mu\text{g/ml}$	Prosent gjenvinning	Deteksjons topp (LU)
1	1,36	0,346	25,4	36,24
2	1,39	0,338	24,3	35,5
3	1,53	0,320	21	33,86
4	2,13	2,180	102,7	218
5	0,24	I.S.T. <sup>4</sup>	-----	-----
6	0,27	I.S.T.	-----	-----
7	0	0	4,98	0,03

<sup>4</sup>I.S.T. = Ikke separerte topper

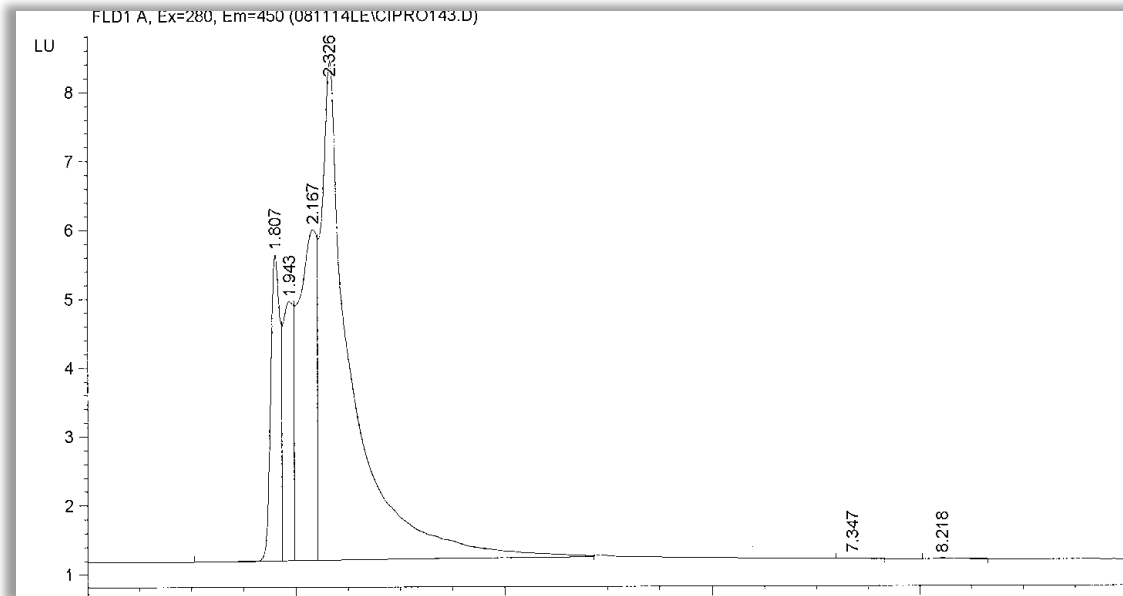
Figur 9 viser analyse av husdyrgjødsel tilsatt ciprofloxacin 0,24 µg/ ml (prøve nr 5). Ingen pH justering ble foretatt. Som vist i figuren er resultatene ikke lesbare. Dette på grunn av uønskede komponenter i ekstraktet av husdyrgjødslet som skygger over ciprofloxacin avlesning. Retensjonstiden viser komponenter etter 2,4 og 3,0 minutter.



Figur 9: Husdyrgjødsel tilsatt ciprofloxacin uten opprensing

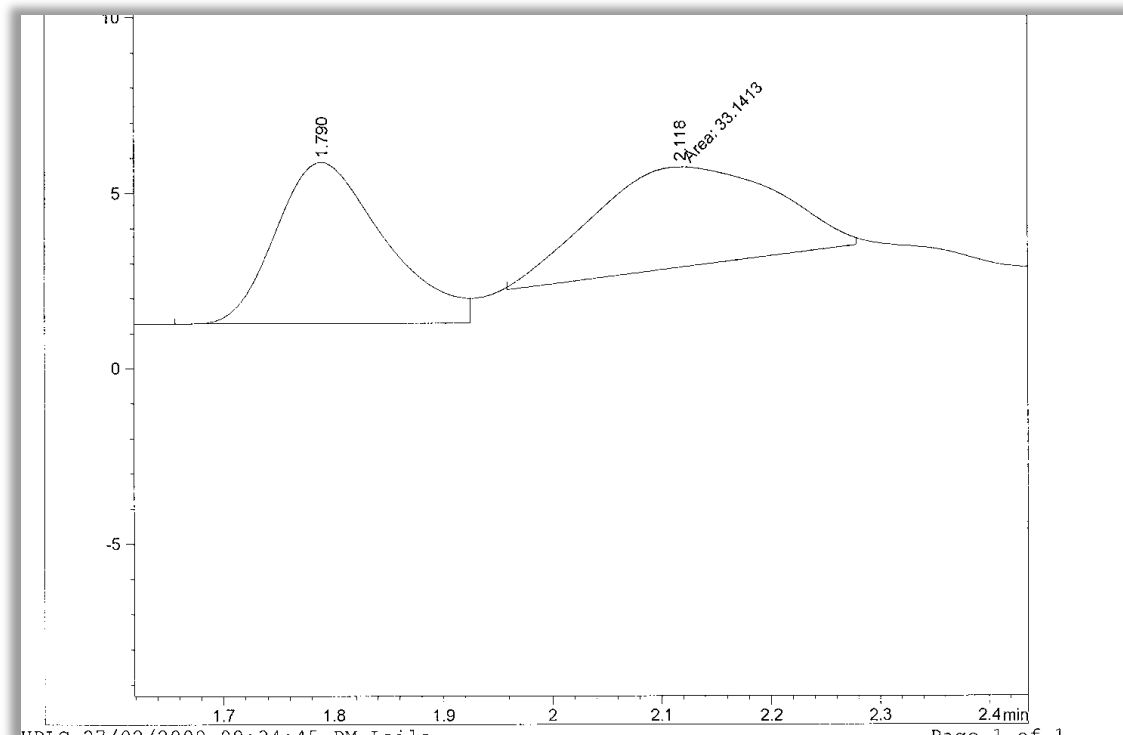
I Figur 10 er ekstrakt fra jord analysert, og ciprofloxacin konsentrasjonen er på 0,27 µg/ ml (prøve nr 6), denne analysen har ikke separerte topper. Retensjonstiden er mellom 1,8-2,3. Dette tyder på at en opprensing må foretas. Innstilling av pH verdien er ikke utført.



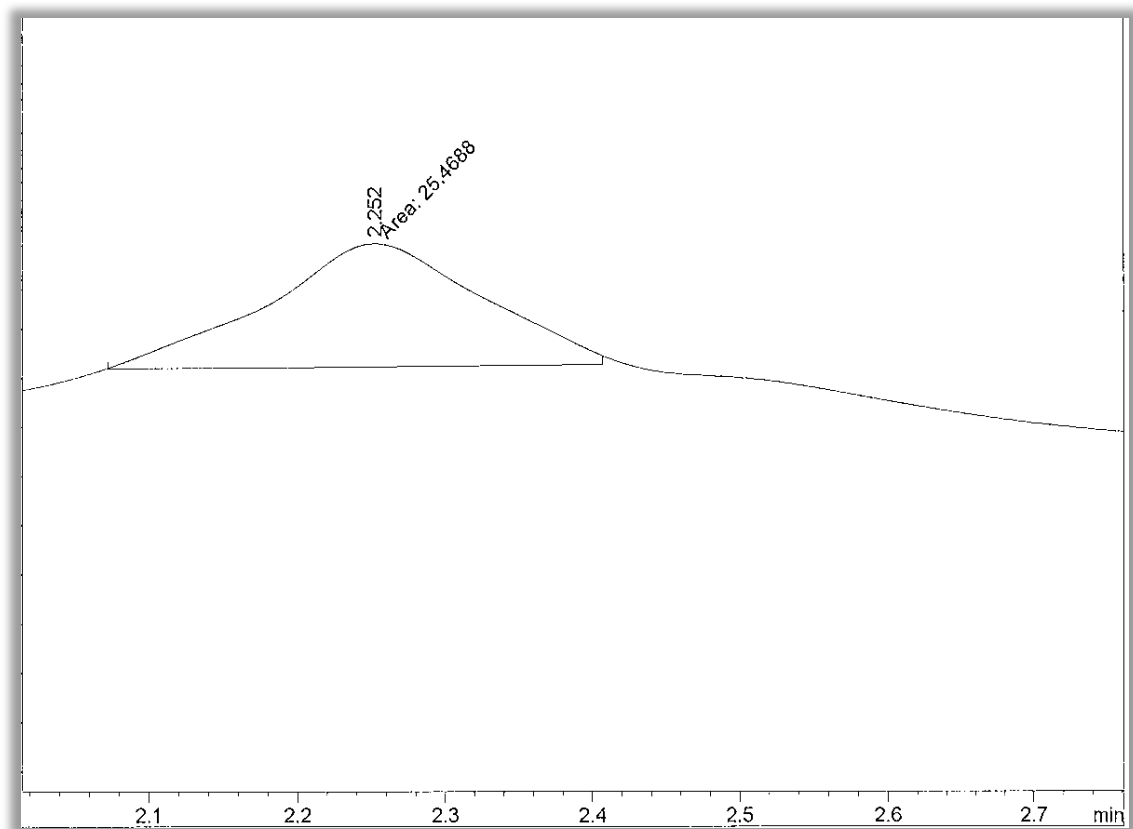


**Figur 10: Jordprøve tilsatt ciprofloxacin uten opprensing. Ingen pH justering**

I Figur 11 er ciprofloxacin analysert etter prosedyre kapittel 3.8 del II. fulgt. pH verdien er justert til 0,9. Ingen matriks (jord eller husdyrgjødsel) er brukt i ekstraktet.



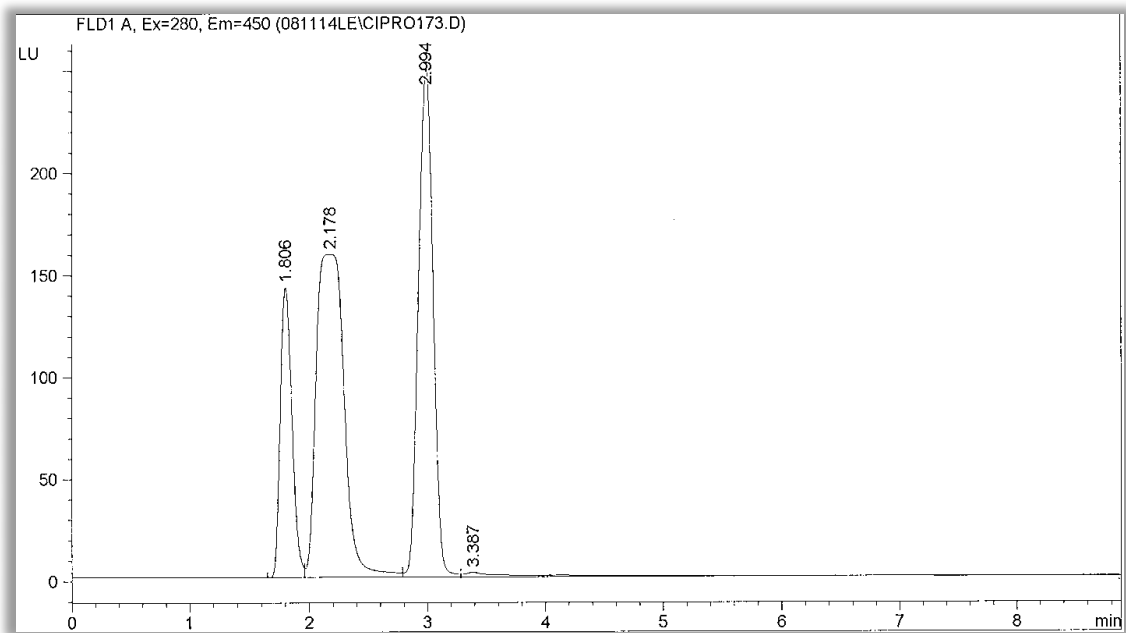
**Figur 11: Ciprofloxacin uten matriks pH 0,9 uten opprensing**



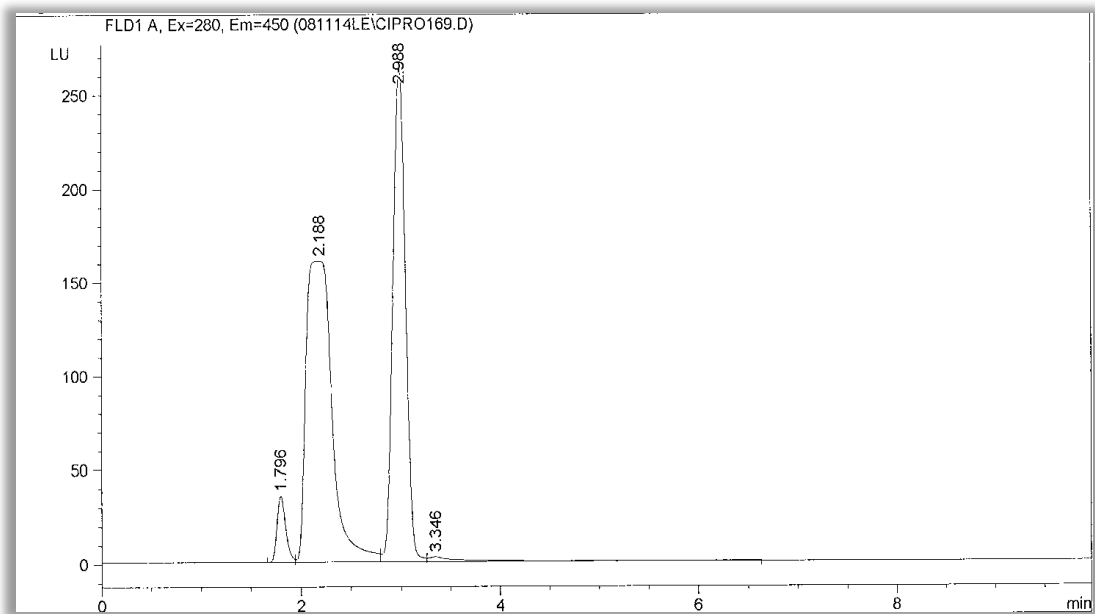
**Figur 12: Analyse av ciprofloxacin med jord som matriks og opprensing med justert pH til pH 2 i elueringsmiddelet. Toppen kommer etter 2,3 minutter.**

Figur 12 viser detektert komponent for ciprofloxacin. Figuren er forstørret i forhold til de andre. Jord er benyttet som matriks og en opprensing er foretatt med silikagel.

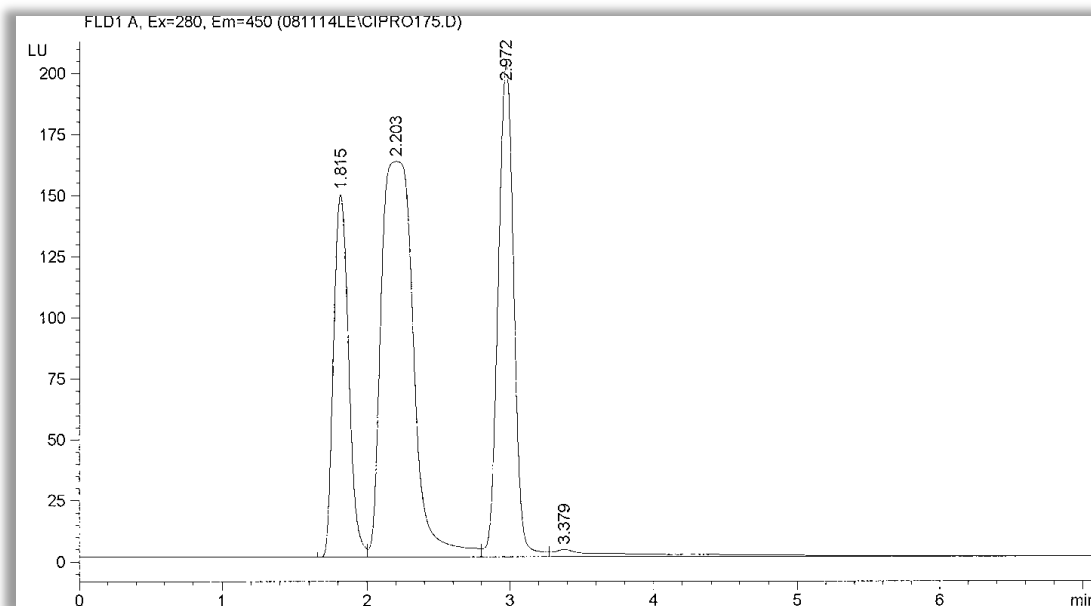
I Figur 13 ble verken jord eller husdyrgjødsel brukt. Ciprofloxacin tilsatt acetonitrill, saltsyre og løsning A etter prosedyren i kapittel 3.7. pH verdien er justert til 2,2, løsningen ble så rensed gjennom silikagel og analysert på HPLC med fluorescensdetektor. I Figur 14 ble samme prosedyre fulgt, men opprensing med silikagel ble ikke foretatt.



Figur 13: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 2,2 med opprensing gjennom silikagel

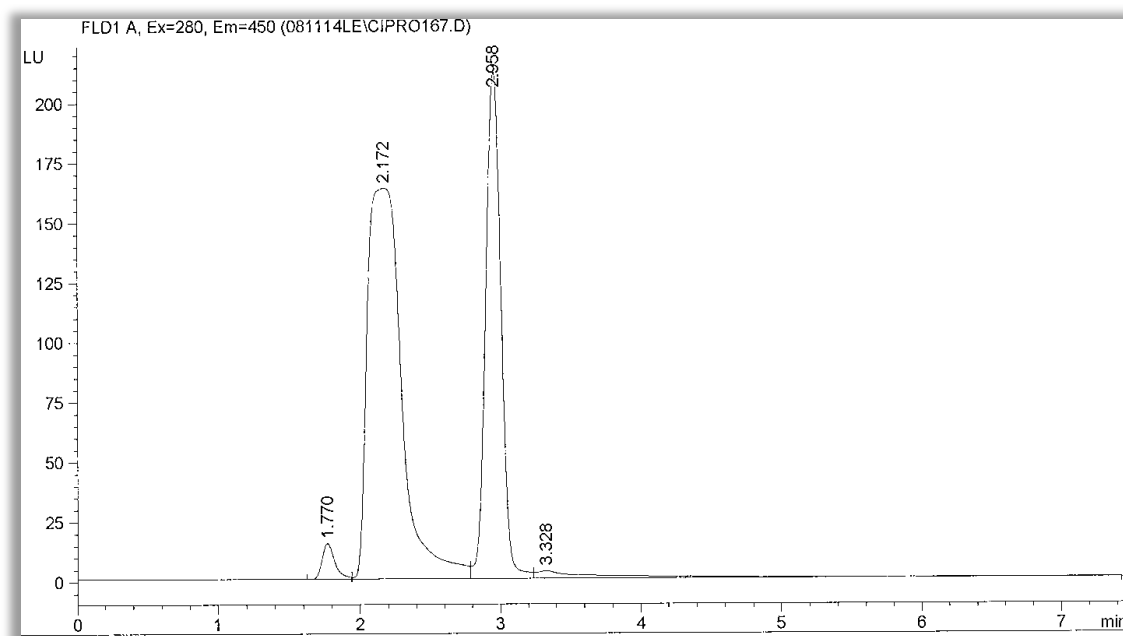


Figur 14: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 2,2 uten opprensing (silikagel)



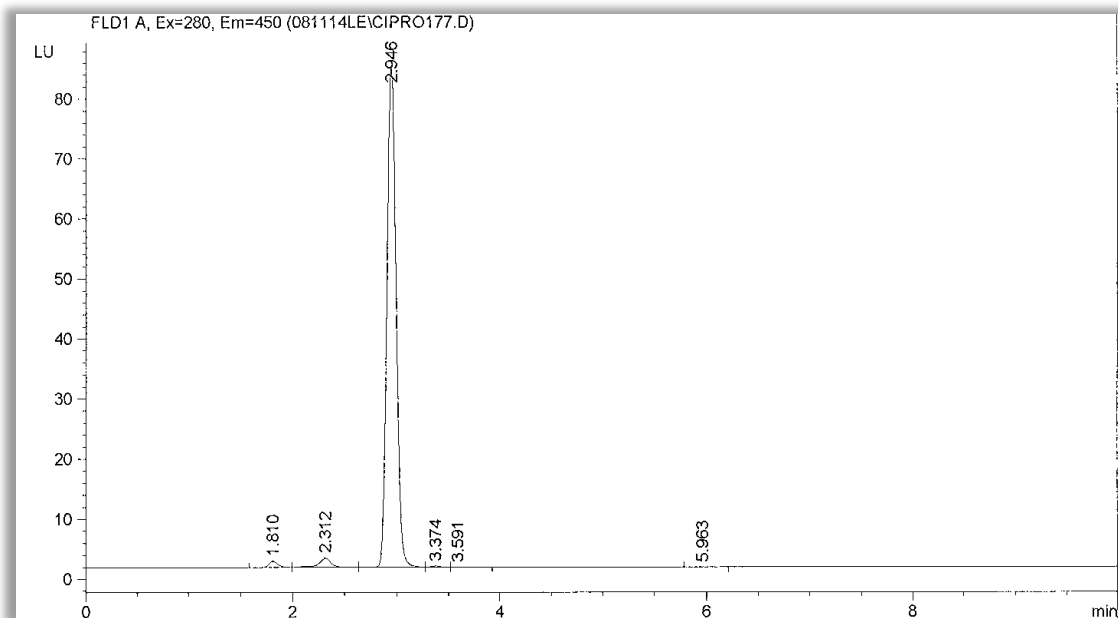
**Figur 15: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 4,7 (med silikagel)**

I Figur 15 og Figur 16 er pH verdien på aceton /n-heksan justert til 4,7. I Figur 15 er silikagel benyttet til å foreta en opprensing. I Figur 16 derimot er ikke løsningen renset. Ingen matriks ble brukt i disse ekstraktene.



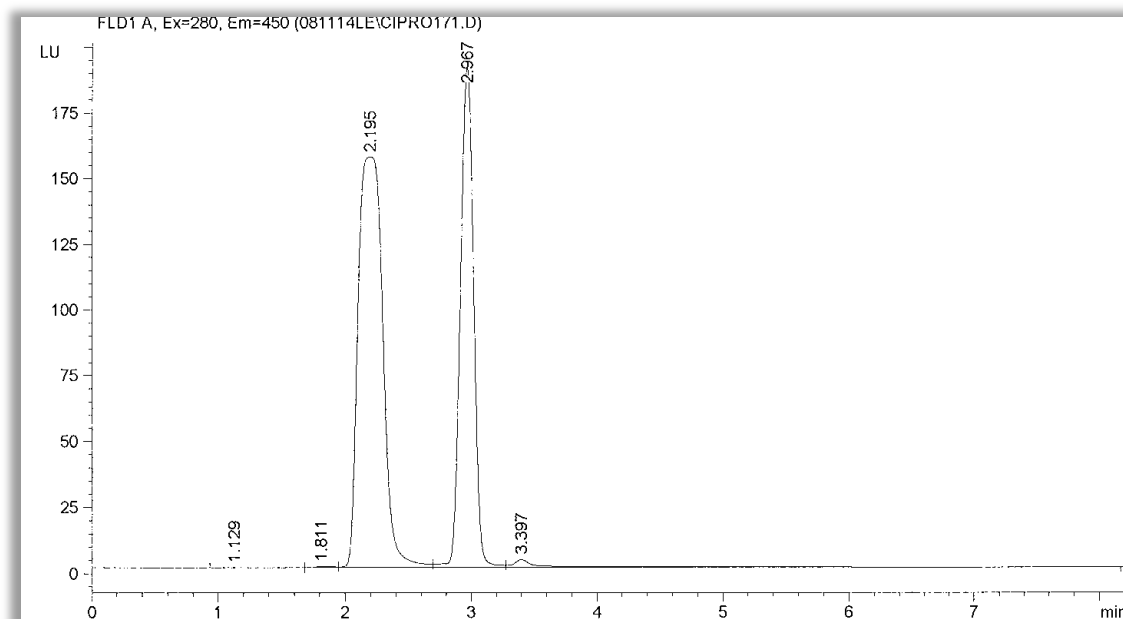
**Figur 16: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 4,7 uten opprensing**

Figur 17 viser analyse av ciprofloxacin med opprensing på silikagel, RT på 2,3 minutter. % gjenvinning er på 55, noe som kan tyde på at ciprofloxacin sitter igjen på silikagelen, pH verdien er justert til 9,5.



Figur 17: Analyse av ciprofloxacin med pH 9,5 med opprensing

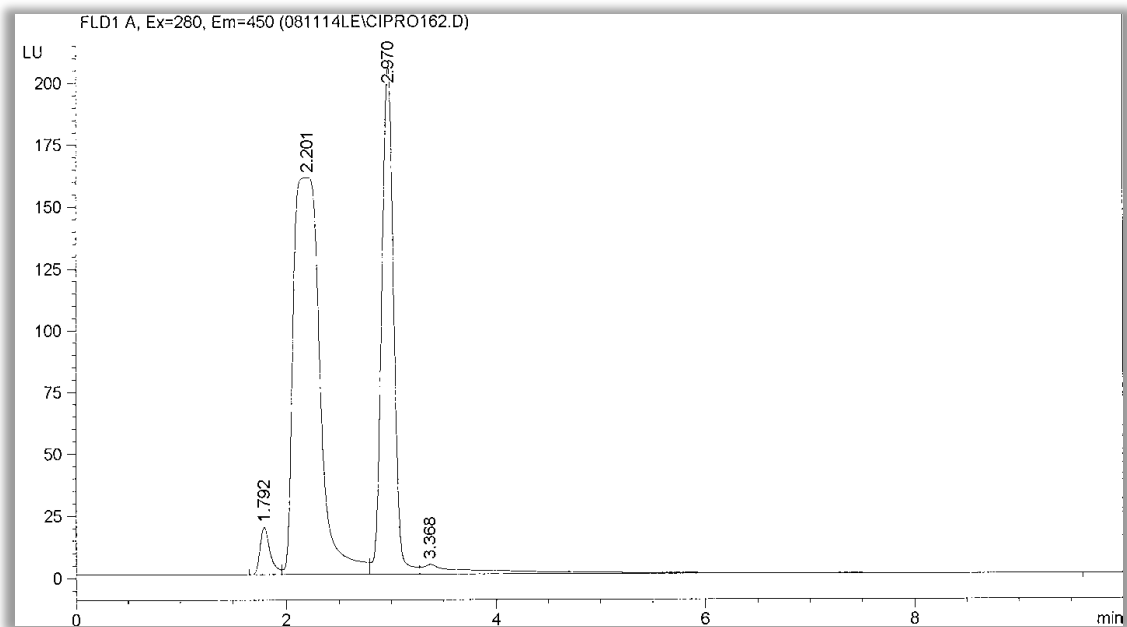
Figur 18 viser analyse av ciprofloxacin med pH justering på 10,5. Ciprofloxacin løsningen blir rensert med silikagel. RT er på 2,2 og gjenvinning er 42 %.



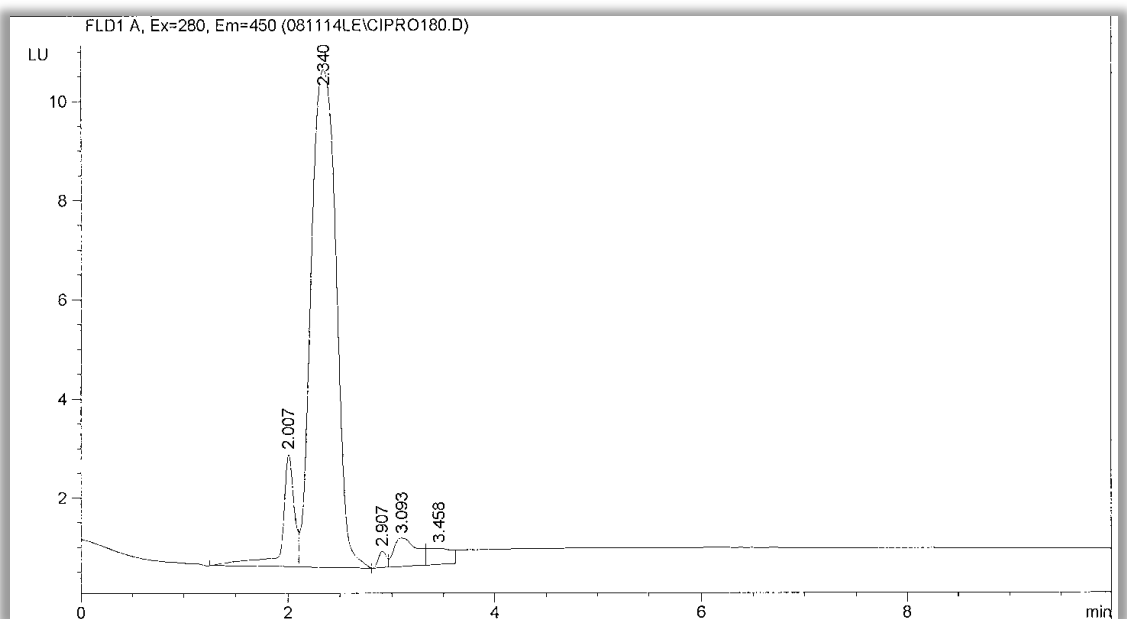
Figur 18: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 10,5 med opprensing

Figur 19 viser detektert komponent for ciprofloxacin uten opprensing med pH verdi på 10,5 og RT på 2,2. Gjenvinning av ciprofloxacin ble på 55 %. Figur 19 viser et dårlig separert topp for ciprofloxacin ved RT på 2,3. pH verdien er justert opp til 11. Ingen opprensing er foretatt på denne prøven. Prosentgjenvinning på 99.

Husdyrgjødsel eller jord er ikke med i ekstraktet

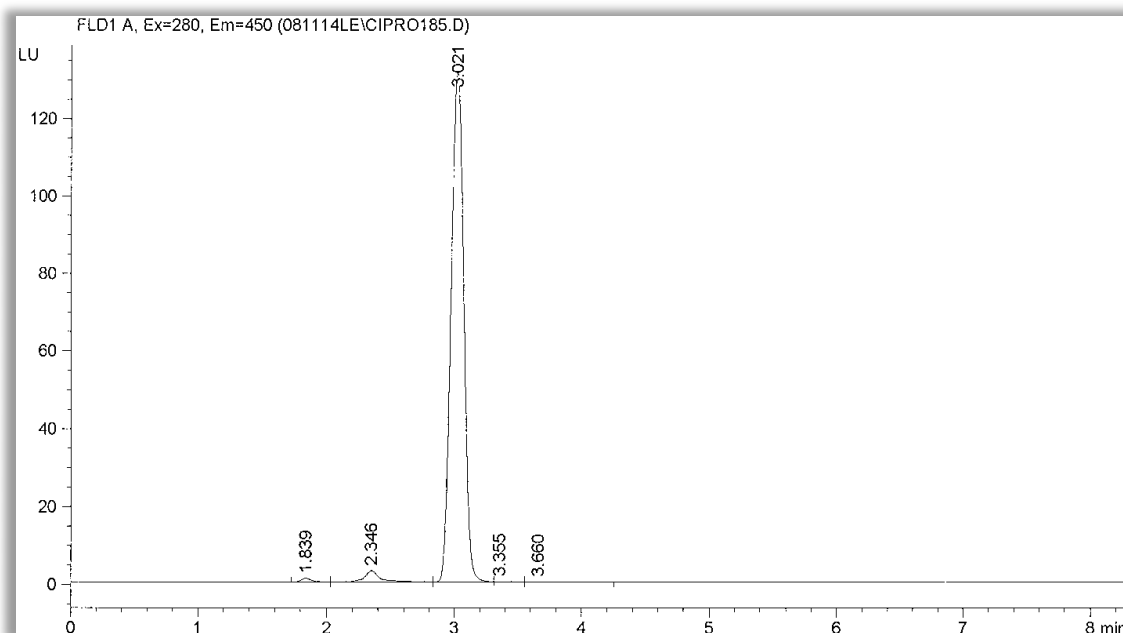


Figur 19: Analyse av ciprofloxacin uten matriks med pH 10,5 (uten opprensing)

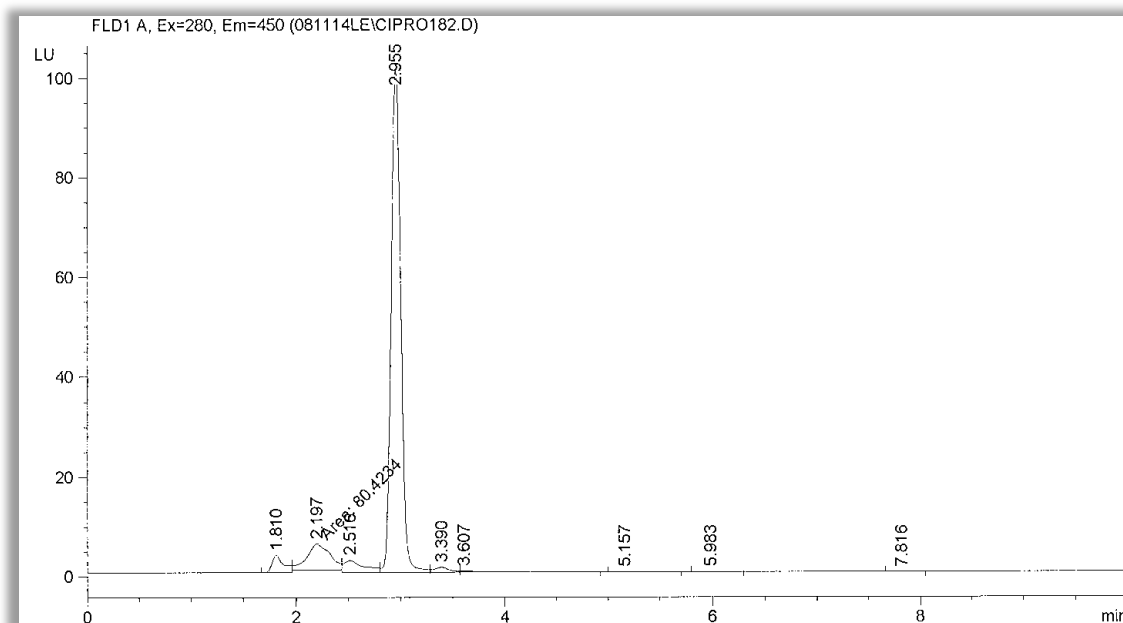


Figur 20: Analyse av ciprofloxacin uten matriks og uten opprensing med pH 11

Figur 21 viser detektert topp for ciprofloxacin med pH justering til 11. Ingen matriks er i ekstraktet. En silikagel opprensing er brukt. Elueringsmiddelet i slutfasen er kun aceton med pH 11.



Figur 21: Analyse av ciprofloxacin med pH 11 med opprensing uten matriks tilsatt kun aceton tilsatt

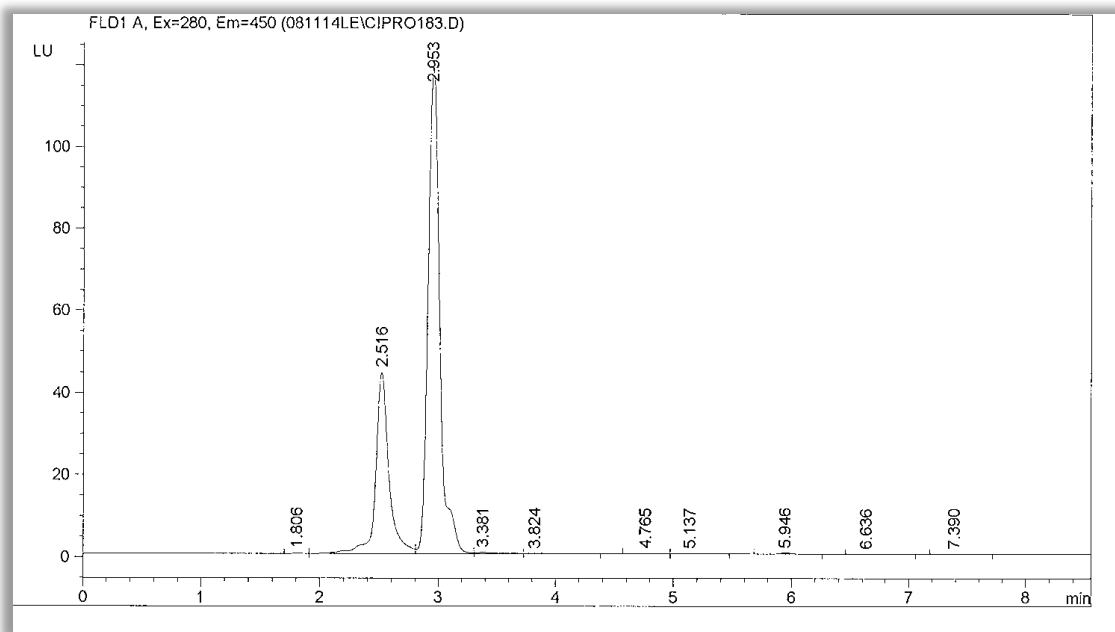


Figur 22: Analyse ciprofloxacin med jordprøve med opprensing med pH 11

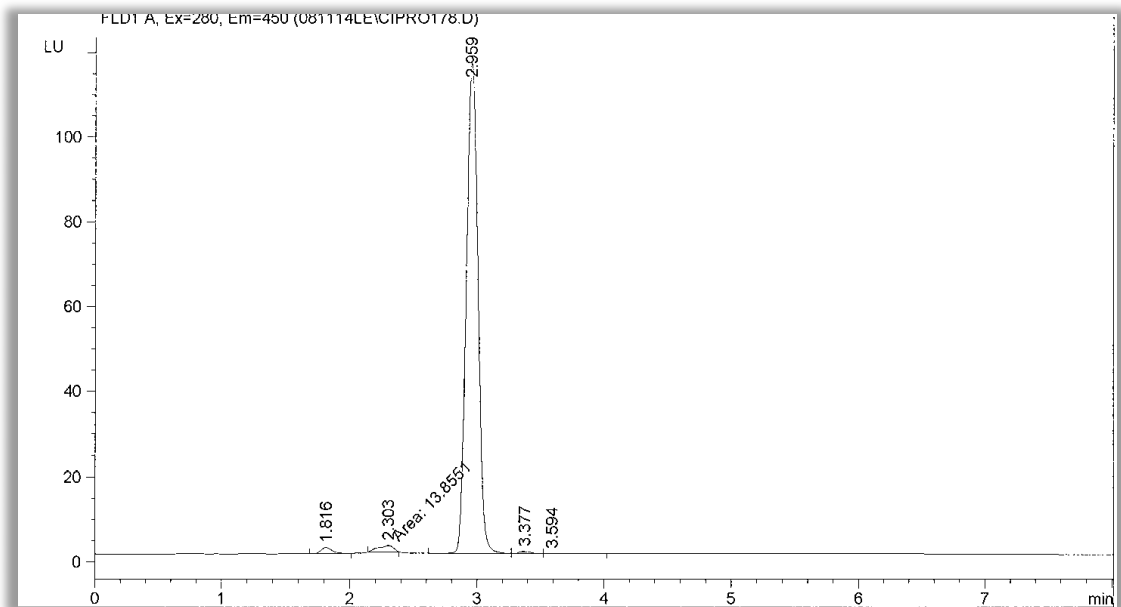
Figur 22 viser ciprofloxacin komponent med jord i ekstraktet ved RT på 2,2. pH verdien er justert opp til 11. Silikagel er benyttet til opprensing. Gjenvinning på 98 %.

Figur 23 viser detektert topp for ciprofloxacin med husdyrgjødsel. Detektert topp er

for høy i forhold til innsatt mengde ciprofloxacin. Komponenter fra husdyrgjødsel gir utslag. P H verdien er justert opp til 11.



**Figur 23: Deteksjon ved analyse av ciprofloxacin med husdyrgjødsel, silikagel brukes for opprensing og pH verdien er justert til pH 11.**

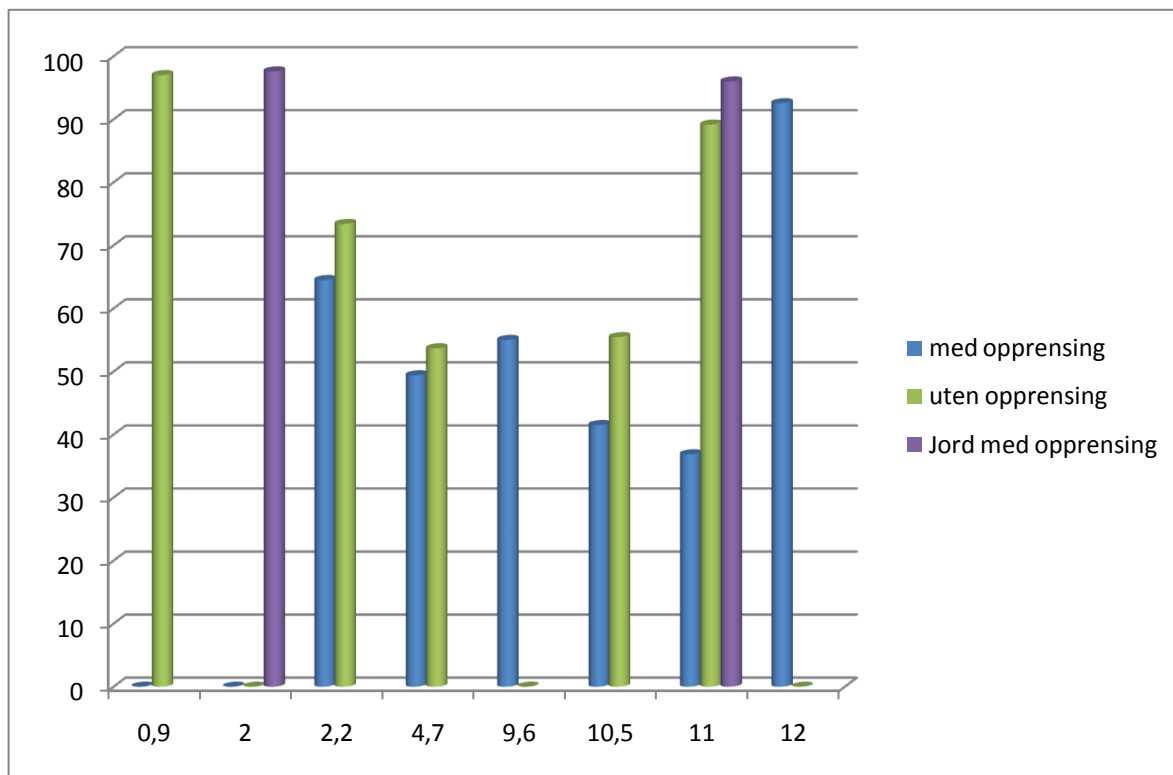


**Figur 24: Analyse av ciprofloxacin med pH 9,5 med opprensing tilsatt 25 ml aceton med pH 12 i slutten**

Figur 24 viser detektert komponent av ciprofloxacin rensset med silikagel der pH verdien for elueringsmiddelet er på 9,5 til å begynne med. Ekstraktet blir eluert med 25 ml aceton ved pH 12 i slutten.



Figur 25 viser en oversikt over prosentgjenvinning av ekstreter der silikagel er benyttet til opprensing av matriks, ekstrakter der jord er benyttet som matriks, og ekstrakter som ikke er blitt renset. Lave pH-verdier og høye pH-verdier gir gode resultater.



Figur 25: Oversikt over % gjenvinning av ciprofloxacin ved ulike pH-områder

Tabell 7 viser en oversikt etter pH-forsøket. Her er alle prøvene filtrert. Prosedyren fra kapittel 3.6 blir fulgt. I kun 3 av prøvene ble matriks tilsatt, jord og husdyrgjødsel.

Tabell 7: Oversikt over ciprofloxacin analyse ved ulike pH

pH	Opprensing med silikagel	Teoretisk konsentrasjon ng/ml	Reel konsentrasjon ng/ml	% gjenvinning	Matriks	Figur
0,9	Nei	324x10 <sup>3</sup>	314 x10 <sup>3</sup>	97		11
2	Ja	25x10 <sup>3</sup>	24 x10 <sup>3</sup>	95	Jord	12
2,2	Ja	386x10 <sup>5</sup>	249 x10 <sup>5</sup>	65		13
2,2	Nei	386x10 <sup>5</sup>	283 x10 <sup>5</sup>	73		14
4,7	Ja	521x10 <sup>5</sup>	257 x10 <sup>5</sup>	49		15
4,7	Nei	522x10 <sup>5</sup>	280 x10 <sup>5</sup>	54		16
9,5	Ja	220	121	55		17
10,5	Ja	511x10 <sup>5</sup>	212 x10 <sup>5</sup>	42		18
10,5	Nei	511x10 <sup>5</sup>	284 x10 <sup>3</sup>	55		19
11	Nei	168x10 <sup>4</sup>	167 x10 <sup>4</sup>	99		20
11	Ja	34x10 <sup>4</sup>	25 x10 <sup>4</sup>	74	<sup>5</sup>	21
11	Ja	8x10 <sup>5</sup>	789 x10 <sup>3</sup>	98	Jord	22
11	Ja	92x10 <sup>4</sup>	I.S.T	-----	Husdyrgjødsel	23
9,5-12	Ja	126	119ng/ml	93	<sup>6</sup>	24

<sup>5</sup> Den samme prøven som har en konsentrasjon på 0,68 elueres en gang til med 20 ml aceton ved nøytral pH (dermed fortynnes den)

<sup>6</sup> Videre arbeid med ekstrakt prøven med pH 9,5, videre eluert med aceton 25 ml med pH 12.

Tabell 8: Resultater analyse av ciprofloxacin ved ulike pH fortynnet 1:1000 i n-heksan)

pH	Teoretisk konsentrasjon (Tilsatt) µg/ml	komponent detektert ved RT: 2,1-2,5	Konsentrasjon utregnet etter analyse i µg/ml	Figur
0,9	0,32	33,14	0,314	10
2,8	0,1	0	0	-----
3,9	0,1	0	0	-----
4,35	0,1	0	0	-----

Tabell 8 viser resultater av ciprofloxacin prøver med ulike pH-verdi, som ble detektert med HPLC med fluorescensdetektor. Konsentrasjonen av ciprofloxacin for de fleste prøvene fra denne tabellen ble ikke detektert. Prøven med pH-verdi 0,9 gir derimot deteksjon av analysen.

Ved opprensing med silikagel, ble det benyttet aceton/ n-heksan som elueringsmiddel. Disse to løsningsmidlene er ikke blandbare med hverandre, dette førte til faseskille. Det ble tatt prøver fra den upolare fasen (n-heksan). Det ble ikke detektert noe topp for ciprofloxacin. All ciprofloxacin som ble detektert ligger i den polare fasen (aceton).

I nedbrytningsforsøket ble både triclosan og ciprofloxacin tilsatt. Dette fordi det var meningen at nedbrytningsraten for ciprofloxacin også skulle foretas. Men ettersom metodeutviklingen for ciprofloxacin tok lenger tid enn forventet, ble dette ikke gjort.

### 4.3 Analyseresultater av triclosan fra nedbrytningsforsøket

Husdyrgjødsel fra nedbrytningsforsøket ble ekstrahert med n-heksan etter prosedyren beskrevet i kapittel 3.7 på UiS og videre analysert ved UFZ i Leipzig av dr. Monika Møder. GC-MS med innstilling på selektiv ion monitorering ble benyttet som analyseinstrument. Alle ekstraktene som ble sendt til Leipzig ble fortynnet i 1 ml n-heksan 1:1000. Startkonsentrasjon i ekstraktene er 20 µg/ gram T.S..

Nedbrytningsforsøket er delt i to deler, der den ene er aerob nedbryting og den andre er anaerob nedbryting.

### Analyseresultater av triclosan analysert på GC/MS (SIM) fra UFZ:

Standardløsningene til å fremstille en standardkurve for triclosan ble øderlagt under transport. Det er dermed ingen standardkurve for triclosan. Fire prøver med lik mengde tilsatt triclosan ble analysert i Leipzig (Tabell 9) ble benyttet som standard.

Tabell 9: Deteksjon av triclosan som standard

Triclosan µg/ml	Detektert topp (areal) I GC-MS med selektiv ion monitorering	Gjennomsnittelig detektert areal
0,01	864149 <sup>7</sup>	683828
0,01	657985	
0,01	563422	
0,01	649757	

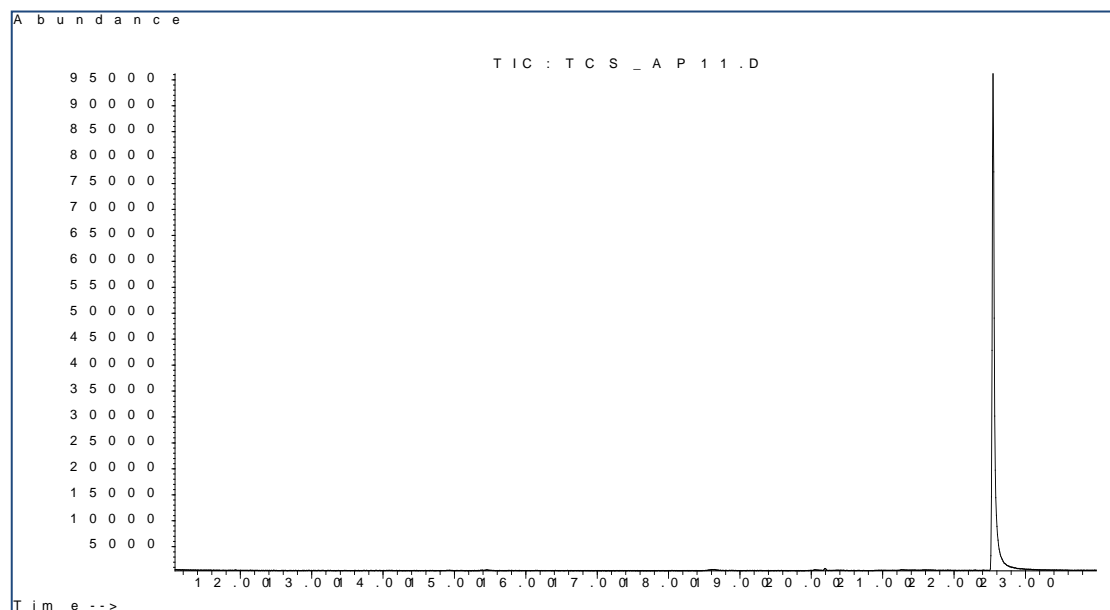
Tabell 10: Resultater fra analysen av husdyrgjødsel og jord som kontrolltest

Prøver	µg/gram detektert
Jord blank prøve	0,0
Jord I	---
Jord II	0,0
Gjødsel I i 1ml n-heksan	0,0
Gjødsel II i 1ml n-heksan	0,2
n-heksan	0,0

Tabell 10 viser prøver analysert på UFZ i Leipzig. Første prøven viser ingen deteksjon for triclosan, og dette stemmer ettersom det ikke er tilsatt. Jordprøve I og husdyrgjødsel I gir viser ikke detektert triclosan. Prøvene som ble sendt ned til UFZ i Leipzig inneholdt 8 µg triclosan per gram matriks. Det var kun 0,5 gram matriks som ble ekstrahert per prøve. Ekstraktene ble fortynnet med n-heksan (1:1000). Dette kan forklare den lave deteksjonen.

<sup>7</sup> Er relativ høy i forhold til de andre verdiene.

Alle Ekstraktene med triclosan som er analysert på GC/MS med selektiv ion monitorering viser deteksjon kun for triclosan slik som vist i Figur 26.



Figur 26: Deteksjon av triclosan i GC-MSD (Ionestrøm: 287 and 289 m/z)

Tabell 11 og Tabell 12 viser nedbryningshastigheten for triclosan over 45 dager. Konsentrasjon fra dag 1 ble analysert. Men disse gav alt for lave verdier i forholdt til mengde triclosan tilsatt (5 µg/g T.S). Etersom startkonsentrasjon målt i prøver var tillag for seg selv (ikke fra selve nedbryningsforsøket) og det ikke var tid til å kjøre nye analyser for å identifisere problemet eller feilen med de lave verdiene, er det valgt å ikke bruke disse resultatene som startkonsentrasjon. Det kan ha vært feil tilsatt mengde triclosan og ciprofloxacin. Teoretisk beregnet startkonsentrasjon er 20 µg/g T.S. og startkonsentrasjon antas å være minst like høy som konsentrasjonen som er målt etter 8 dager under anaerob behandling. Selv om det var en innblåsning av luft i aerob behandling, var husdyrgjødslet så tykflytende at det ikke forventes at avdampning av testforbindelsene bidrar vesentlig til en større reduksjon av triclosan i aerob behandling etter syv dagers inkubering, enn i anaerob behandling. Etter 29 dagers inkubering er reduksjonen på omtrent 70 % på begge reaktorene. Med dette brukes denne konsentrasjonen for å beregne nedbrytningen. Den aerobe nedbrytningen ser til å være hurtigere enn den anaerobe.

Tabell 11: Resultater fra anaerobe nedbrytning av triclosan målt i GC-MS- instrument. Resultatet er gitt i µg/g T.S., gjennomsnitt og standardavvik for 3 paralleller er vist.

Inkubasjonstid (dager)	Ekstrakt	µg/gram T.S detektert	Gjennomsnitts konsentrasjon µg/gram	Standard-avvik	% reduksjon
8	I	29,9	21	7	16
8	II	16,8			
8	III	17,2			
17	I	9	6	2	75
17	II	4,8			
17	III	5			
29	I	8,8	7	4	71
29	II	10			
29	III	3,2			
45	I	2	3	2	87
45	II	2,4			
45	III	5,6			

Standardavvik er et mål på spredning på verdiens avvik fra gjennomsnittet. Den forteller om hvor stor spredning det er i datamaterialet. Standardavvik beregnes etter ligning 5 (Ubøe, 2008). Det ble tatt 3 paralleller hver gang det ble tatt ut prøver. Ut fra disse paralleller regnes så standardavviket. Der  $\bar{x}$  er gjennomsnittet og n er totalt målinger.

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \quad (5)$$

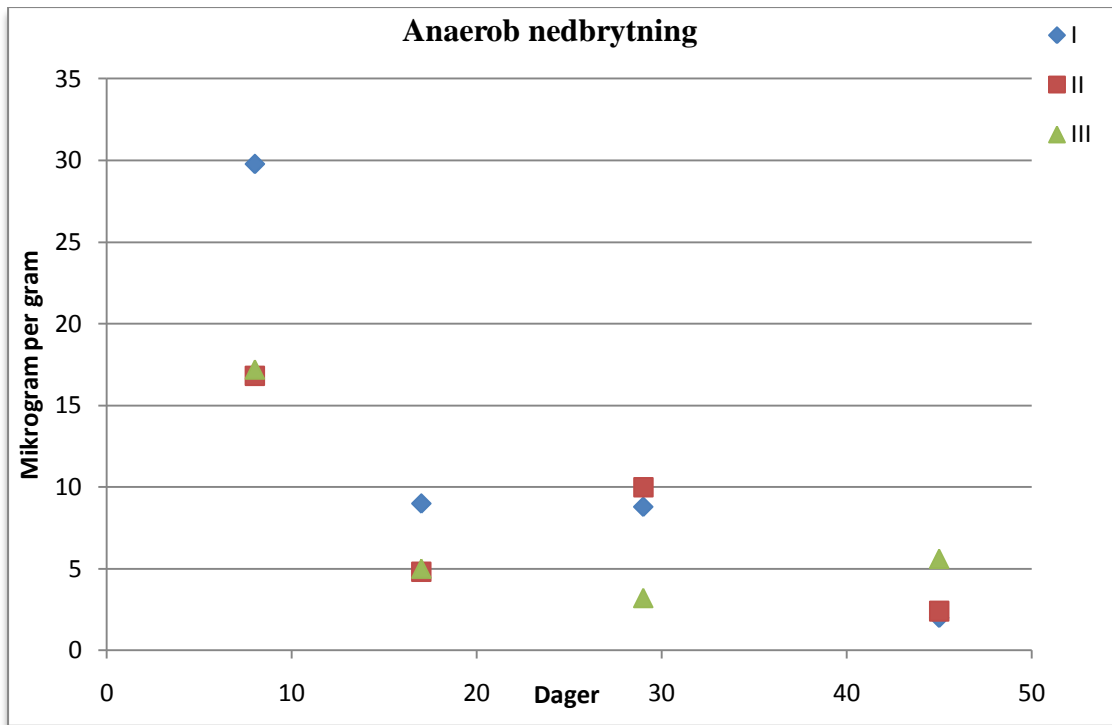
Tabell 12: Resultater fra Aerobe nedbrytning av triclosan målt i GC-MS instrument. Resultatet er gitt i µg/g T.S., gjennomsnitt og standardavvik for 3 paralleller er vist.

Inkubasjonstid (dager)	Ekstrakt	µg/gram T.S. detektert	Gjennomsnitts konsentrasjon µg/gram T.S.	Standard-avvik	% reduksjon
8	I	11,2	8	2	68
8	II	6,6			
8	III	5,8			
17	II	2,8	3,3 <sup>8</sup>	0,7	87
17	III aerob	3,8			
29	I aerob	3,6	8	6	67
29	II aerob	5,2			
29	III aerob	15,8 <sup>9</sup>			
45	I aerob	4,2	4	1	86
45	II aerob	3,6			
45	III aerob	2,8			

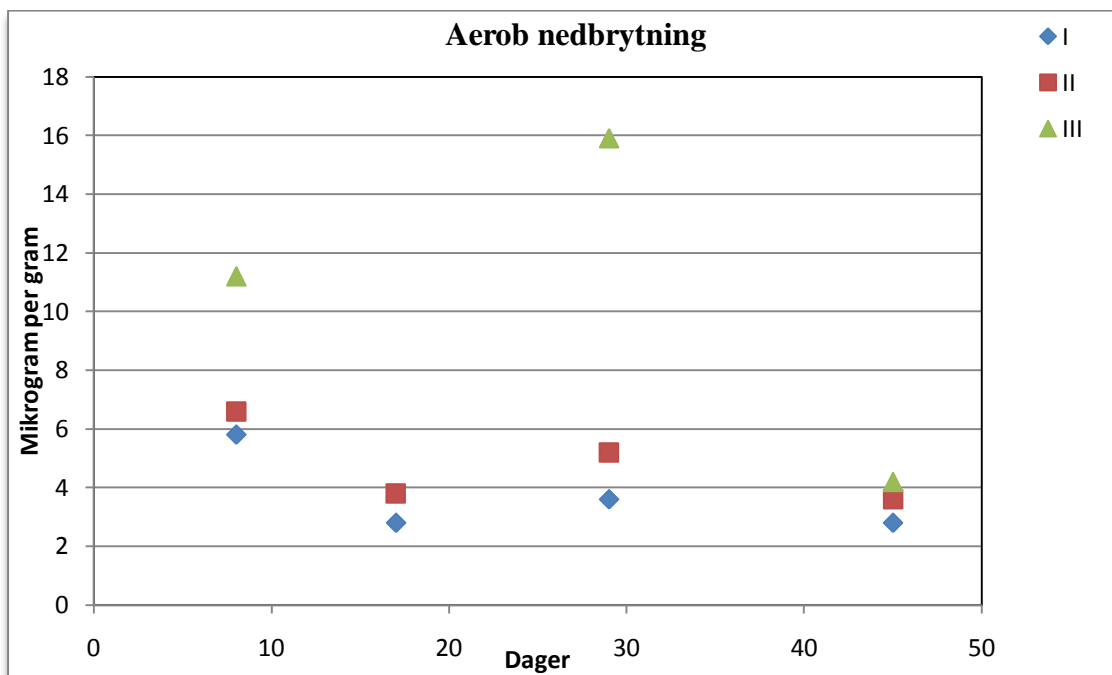
Figur 27 viser anaerob nedbrytning fra dag 8 til dag 45. Tre parallele prøver ble tatt og analysert hva gang. Det ser ut til å være en oppryk i konsentrasjonen etter dag 29.

<sup>8</sup> Parallell I fra dag 17 ble øderlagt under transport.

<sup>9</sup> Denne er en klar avviker (outliner)



Figur 27: Analyserte ekstrakter av triclosan (tre paralleller) fra anaerob nedbrytningsforsøket



Figur 28: Analyserte ekstrakter (paralleller) fra Aerob nedbrytningsforsøk av triclosan



Figur 28 viser nedbryting av triclosan i aerobt miljø. Tre parallelle prøver ble analysert hver gang. Dag 29 viser en oppgang, noe som ikke er ventet å se. En av parallellene avviker fra de to andre på dag 29.

Tabell 13 og Tabell 14 viser temperatur og pH målinger av husdyrgjødsel tilsatt ciprofloxacin og triclosan. Temperatur og pH verdiene holder seg stabilt gjennom forsøket.

**Tabell 13: pH måling av husdyrgjødsel i nedbrytningsforsøket**

Beholder	Dag 2	Dag 17	Dag 29	Dag 44
Aerob	8,5	8,5	8,5	8,5
Anaerob	8,5	8,5	8,5	8,5

**Tabell 14: Temperatur måling i husdyrgjødsel i nedbrytningsforsøk**

Beholder	Dag 2	Dag 4
Aerob	17,3	16,8
Anaerob	17,8	16,9

#### 4.4 Gassmåling, Glødetap og tørrstoff analyse

Glødetapet og tørrstoff analyse ble foretatt. Dette for å vurdere eventuelle større endringer i løpet av nedbrytningsperioden. Vann måtte tilsettes underveis til husdyrgjødsel, ettersom vannet damper vekk. Total organisk karbon (TOC) ble estimert ut fra glødetapet. TOC er estimert som halvparten av glødetapet. Tabell 15 og Tabell 16 viser tørrstoff og glødetap i anaerob og aerob nedbrytningsforsøk. Tørrstoff- og askeinnholdet i anaerobt behandlet husdyrgjødsel viste liten variasjon i løpet av perioden, mellom 9,8-12 % tørrstoff og 20,7-23,4 % askeinnhold. I den aerobe behandlingen var det større variasjoner i tørrstoffinnhold som mest sannsynlig skyldes gjennomluftingen i massene og en ikke helt jevnlig tilføring av ny væske. Estimert TOC var rundt 38-39 % i begge reaktorene.

Tabell 15: Mål av glødetap(%)og tørrstoff(%)i anaerob nedbrytningsforsøket og estimert TOC (%)

	Utregning			
Tid inkubasjon (Dager)	Tørrstoff %	Glødetap %		
			Askeinnhold (uorganisk, C,N,P)	Estimert TOC
3	10,2	77,5	22,5	38,8
3	10,0	78,9	21,1	39,5
3	9,8	76,9	23,1	38,5
3	10,1	76,6	23,4	38,3
29	11,6			
45		79,3	20,7	39,7
45	12,0	78,5	21,5	39,3

Tabell 16: Måling av glødetap og tørrstoff fra nedbrytningsforsøket i aerobt miljø og estimert TOC (%)

Tid inkubasjon (Dager)	Utregning		Askeinnhold (uorganisk C,N, P)	Estimert TOC
	Tørr- stoff %	Glødetap %		
3	10,0	78,2	21,8	39,1
3	10,0	78,6	21,4	39,3
3	10,2	77,5	22,5	38,8
2	9,9	78,1	21,9	39,1
21	14,8			
21	18,3			
21	18,7			
29	12,9			
45		79,0	21,0	39,5
45	11,4	78,4	21,6	39,2
45	11,1	77,7	22,3	38,9
45	9,8	77,4	22,6	38,7

Tabell 17 viser måling av gassene oksygen, karbondioksid, metan og hydrogen i husdyrgjødsel, gassmåling ble foretatt ved hjelp av et bærbart gassmåleapparat. Målingen måtte stoppes ettersom det ble problemer med at husdyrgjødsel kom inn i apparatet og ødela dens funksjon. Det er derfor ingen flere målinger enn de som er nevnt i tabell 17.

Tabell 17: Gassmåling fra husdyrgjødsel fra nedbrytningsforsøket dag 2 og 3

Gass	Anaerob		Aerob
	Dag 2	Dag 3	Dag 3
CO <sub>2</sub> %	0,1	0,1	0,1
O <sub>2</sub> %	20	20,1	19,8
CH <sub>4</sub> %	0	0	0
H <sub>2</sub> i ppm	---	13	6
H <sub>2</sub> S i ppm	---	0	0

## 5 Diskusjon

### 5.1 Ciprofloxacin analyse

Mange av ekstraktene som blir analysert, inneholder en blanding av flere komponenter. Selv om en rekke analyseteknikker er laget for å være selektive, vil en del reelle prøver forøvrig inneholde flere komponenter som gjør det nødvendig å ta separasjon som en del av analysemetoden (Mitra, 2003).

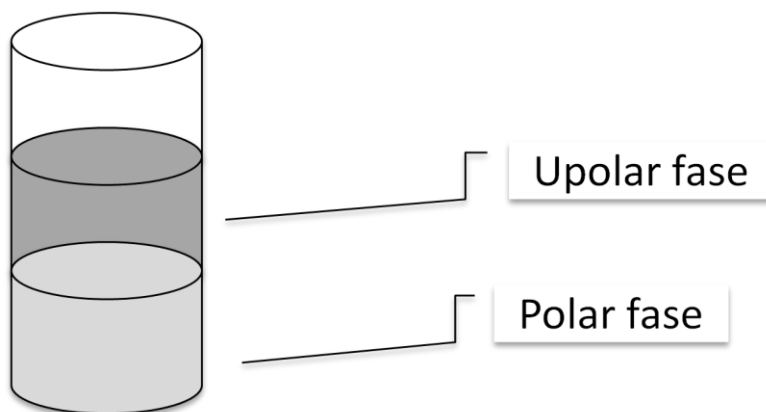
Ekstraksjon og dermed analyse av ciprofloxacin på HPLC gir mange utfordringer. Jord og husdyrgjødsel inneholder komponenter med samme retensjonstid som ciprofloxacin. Løsemidlet som brukes til ekstraksjon, ekstrahere mer enn kun ciprofloxacin, fettsyrer og andre komponenter i matriksen vil også ekstraheres. Dette fører videre til problemer ved analyse i HPLC instrumentet med fluorescensdetektor. Ciprofloxacin blir overskygget av disse komponentene og det blir dermed umulig å lese av deteksjonen for ciprofloxacin. Opprensing er dermed et viktig trinn i analysen. Neste spørsmål er dermed hvilken opprensningsmetode skal man benytte seg av. Her har man både økonomiske betingelser å forholde seg til, samtidig som man ikke har ubegrenset med tid til å finne den beste ekstraksjonsmetoden. Etter å ha lest artikkel (Ôtker Usla et al., 2007) som omtaler om ekstraksjon av ciprofloxacin, hvor silikagel ble omtalt som et godt alternativ, ble dette prøvd med håp om gode resultater. Praksisen viste noe annet. Ingen ciprofloxacin ble detektert. De uønskede komponentene i matriksen, slik som fettsyrer, sukker og lignende substanser blir værende i silikagel. Spesielt gjelder dette husdyrgjødsel. Dette er positivt ettersom vi ikke ønsker dem i analyseekstraktet. Deteksjon av ciprofloxacin på HPLC med fluorescensdetektor viser lav gjenvinning. Ciprofloxacin som er et polart molekyl har sannsynlig blitt absorbert på silikagelen. Dette er tenkelig ettersom silikagelen også er polar. En blanding av n-heksan og aceton ble benyttet som elueringsmiddel, n-heksan er upolar og er ikke blandbar med aceton og vil heller ikke få med seg ciprofloxacin eller de andre polare komponentene i matriksen. Aceton er dermed polar og kan få med seg ciprofloxacin ut gjennom silikagelen. Det hadde kanskje vært bedre å eluere med kun aceton eller med aceton og n-heksan hver for seg.

Figur 9 viser deteksjon fra jordanalysen uten opprensing. Her ser man flere detekterte komponenter. Det er med dette viktig å foreta en opprensing, slik at vi kan fjerne noen av de uønskede komponentene. Dette kromatogrammet viser at ingen klar deteksjon

for ciprofloxacin kan leses av. Muligheten er at ciprofloxacin er til stede, blandet med de andre komponentene i jord. Kontrollprøven skal i utgangspunkt ikke gi deteksjon for noe substans. Men små topper viste seg, disse kan man se bort ifra ettersom de bare er på 5,66 og RT på 2,2.

## 5.2 pH forsøk ved ciprofloxacin analyse

Opprensing av husdyrgjødsel og jord med innsatt ciprofloxacin gir også en del utfordringer. En blanding av n-heksan og aceton ble benyttet som elueringsmiddel. Dette ser ikke ut til å være et godt løsemiddel i denne sammenheng da n-hexan er upolar. Aceton derimot er polar, og vil dermed ta med seg ciprofloxacin gjennom silikagelen. Etter flere forsøk virker det som ciprofloxacin sitter igjen i silikagelen. Dette betyr at det må finnes en bedre løsning. Etter å ha lest artikkelen skrevet av (Andreu et al., 16.02.2007) ble pH-verdien justert, da pH-verdien kan ha en innvirkning på interaksjonen mellom ciprofloxacin og silikagelen. Et pH forsøk ble deretter utført (se prosedyre under kapittel 3.5). Etter elueringen av løsningen med ciprofloxacin observeres et klart faseskille på eluenten, aceton og n-heksan viser seg ikke å være blandbare, se illustrasjon på Figur 29.



Figur 29: Faseskille mellom aceton og n-heksan

Det viste seg at ciprofloxacin satt igjen i den polare fasen (aceton). Det ble tatt prøver av både den polare og den upolare fasen. Begge fasene ble så injisert i HPLC og fluorescensdetektor ble benyttet for deteksjon. Ingen ciprofloxacin ble detektert i den upolare fasen. Den polare fasen derimot innholdt ciprofloxacin. Beholderen med lav og høy pH-verdier gav de beste resultatene, mens beholderen med nøytral pH gav

dårligst resultater. Komponenter som er amfotært er bedre ekstrahert fra jord ved bruk av basiske løsninger som elueringsmiddel.

Figur 12 viser jordprøve renses ved å bruk silikagel og elueres med en blanding av aceton og n-heksan, tilsatt 1 molar saltsyre til pH 2. Retensjonstid viste seg på 2,25 minutter. Ut i fra standardkurven er konsentrasjonen etter opprensingen på 95 % gjenvinning. Retensjonstiden er litt kort, man kunne forvente en retensjonstid på 2,4 minutter. Retensjonstiden kan forandres på ved å forandre sammensettingen på den mobile fasen. Ettersom det lages ny mobilfase hele tiden, med små variasjoner kan dette føre til ulikheter i RT. På denne måten vil retensjonstiden for ciprofloxacin øke, opp til 4-5 minutter. Dette kan føre til at forurensninger fra husdyrgjødsel endrer retensjonstid, og man kan slipper forstyrrende elementer som man ikke har kontroll på i forsøket. Kolonnens lengde er og viktig for separasjon. I analysen av ciprofloxacin ble kolonne C8 benyttet. Det kunne tenke seg at C18 ville ha gitt et annet, kanskje bedre resultat.

Lav pH-verdi i elueringsmiddelet gav best resultat. En ny analyse med lavere pH på 0,9 gav enda bedre resultater, med et utbytte på 97 %, altså total praktisk talt gjenvinning (Figur 11). Fire nye prøver med ulik pH-verdi ble analysert.

Elueringsmiddelet er fortsatt aceton og n-heksan. I to av prøvene ble nøytral pH benyttet, mens i de to andre ble basisk pH brukt. I en av hver prøve med ulik pH områdene, ble silikagel benyttet til opprensing. Elueringsmiddel med basisk pH uten opprensing gav best resultater av disse. Generelt kan en se en klar sammenheng med gjenvinning og opprensing med silikagel. Alle prøvene med opprensing gir dårligere gjenvinning enn prøvene uten opprensing. Dette er nok så logisk ettersom analytten vil feste seg til silikagelen.

Ciprofloxacin er ikke 100 % ren, og det detekteres flere toppe fra disse ekstraktene som analyseres, man kan da anta at disse urenheterne eller toppene kommer fra selve utslagsstoffet. Slik som vist på mange av kromatogrammene, for eksempel på Figur 13 kan det se ut til å være slik. Mobilfasen har påvirkning på retensjonstiden av stoffene. Opprenningsforsøk ble igjen utført, men denne gangen med matriks i ekstraktet. Det viste seg at husdyrgjødsel var vanskeligst å rense. Resultatene var med dette uleselige. Detektert topp var alt for høyt. Resultatene ble tolket med at komponenter i husdyrgjødsel overskygger ciprofloxacin. Best resultat forventes ved

ciprofloxacin analyse uten opprensing med silikagel og uten matriks. Små endringer i pH-verdien endrer resultatet betraktelig. Forsøket ble så gjentatt, og nye pH forsøk utføres. pH- verdi på 9.5 gav en gjenvinning på 55 % (se Figur 17). Tilsettes aceton med en pH på 12 og elueres samme prøve, økes gjenvinningen opp til 93 % (Figur 24). Prøver med pH-verdi på 4,7 gav definitivt dårligst resultater med 49-54 % gjenvinning (Figur 15 og Figur 16).

Fastfase ekstraksjon (SPE) bruker som regel ferdigproduserte kolonner, kolonene er normalt laget av plast eller glass og de inneholder et lag pakket adsorbent (silika). I dette forsøket ble sprøyter à 10 ml benyttet, disse ble tett nederst med bomull og silika korn ble tilsatt. Det kan tenke seg at de ferdigproduserte kolonnene er enklere å bruke. Dette vil sannsynligvis spare noe tid i forsøksdelen. Det er viktig å holde kolonnen loddrett under elueringen, det viste seg å være vanskelig ettersom mangel på utstyr var et faktum. Sprøytene som ble brukt som kolonne ble festet med teip til kolbene.

Quinoloner er pH avhengige, dette ser vi på intensiteten på signalet der pH-verdien er på 4-5. pH ned til 1-1,5 vil sannsynligvis gi mye bedre resultater. Høye pH-verdier kan lage problemer og begrensninger i valg av analytiske kolonne.

### **5.3 Metodeutvikling - ekstraksjon av triclosan i UFZ**

I metodebearbeidelsen ved UFZ i Tyskland ble tomatblader, jord og husdyrgjødsel benyttet som matriks. Prosedyre beskrevet i kapittel 3.7 ble fulgt. Ved første analyse av triclosan ble HPLC med MS-detektor brukt. Analyse av triclosan gav uleselige resultater. Massespektrometrisk detektor (MS) uten innstillinger er ikke følsom nok for triclosan. Dermed måtte en annen analysemetode anvendes. Gasskromatografi med masse spektroskopisk ionet fanger (detektor) ble så utprøvd.

Mellom hver injeksjon ble sprøyten vasket med metanol. Ved injeksjon av løsninger til standardkurv, injiseres lavest konsentrasjon først. Løsningene må ikke ligge i sprøyten for lenge, det er derfor viktig å injisere rett etter opptrekking. Spesielt viktig er dette når man injiserer inn lave konsentrasjoner, da dette kan føre til at triclosan bli liggende igjen i sprøyten. Og skulle dette inntreffe ble målingene feil. Prøvene fra tomatblad trenger opprensing, ekstraktet er nokså mørke i fargen. Dette tyder på at tomatblader kan inneholde mange komponenter som kan være i veien for deteksjon av

ønskede analyserte substanser, slik som triclosan. Opprensing av tomatprøvene ble gjennomført med silikagel tilsatt tørt natriumsulfat for å fjerne eventuelle vannrester. n-heksan og aceton i blandingsforholdet 65:35 ble brukt til å eluere prøven gjennom silikagelen. Vakuum ble koblet til SPE kolonne. Etter opprensing filtreres prøven. Prøven blir lysere, da noe av fargestoffene er igjen i silikagelen. Dette betyr at man har fått en renere prøve og mindre forurensninger til analysen. Retensjonstid for triclosan er ventet til å ligge mellom 17,8-18,8 minutter.

#### **5.4 Nedbrytningsforsøk – triclosan**

I nedbrytningsforsøket ble abiotiske kontrollprøver vurdert som et analyseparameter. Abiotisk kontrolltest vil gi et mål på forsvinning av stoff som ikke er relatert til mikrobiell nedbrytning. To metoder ble vurdert:

- I. Kjemisk inhibering av bakterieaktivitet; Er lite praktisk i denne sammenheng hvor et stort volum brukes. Husdyrgjødsel er et svært biologisk aktivt medium, og dette kan føre til problemer.
- II. Autoklaving, var i dette tilfellet problematisk ettersom en autoklav ikke var tilgjengelig.

Det er også en tredje metode for å fremstille abiotiske kontroller er med gammastråling, som gjerne brukes i større forskningsprosjekter, men denne metoden er relativt dyrt og ble dermed ikke tatt med i den videre vurderingen.

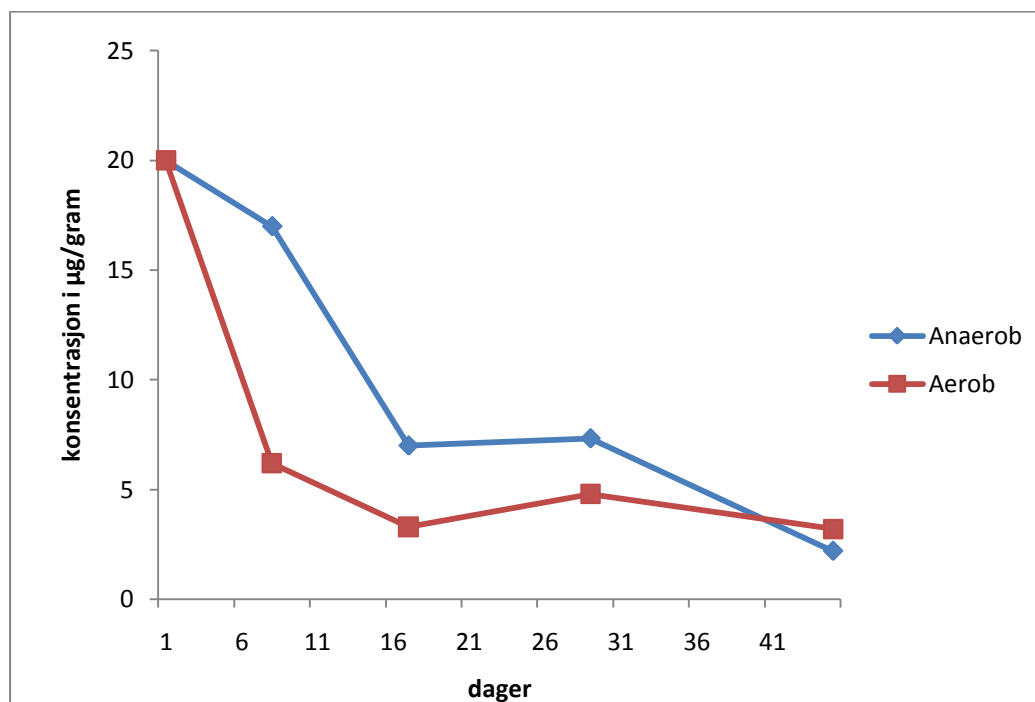
Temperatur, lys, type utstyr som benyttes og avdamping av vann i løpet av forsøket er noen viktige faktorer man må ta hensyn til i en slik nedbrytningsprosess. Av utstyr ble glass benyttet, med dette kan man konkludere at binding av substanser til veggarealet er minimalt. Avdamping er derimot av stor betydning, men gjelder ikke i den anaerobe reaktoren, ettersom reaktoren har vært tett under forsøket.

Det er viltig å ikke ha for høye konsentrasjoner av ciprofloxacin og triclosan i husdyrgjødsel ved nedbrytningsforsøk. Hadde dette vært tilfelle kunne man ventet en stans i bakteriell nedbrytning, ettersom antibiotika kan ta knekken på disse. Det er fortsatt en mulighet på at noen av disse bakteriene i husdyrgjødsel er svekket.

Løseligheten til triclosan i vann er avgjørende for å se hvordan triclosan ligger fordelt i de 2 kg husdyrgjødsel vi har i reaktoren. Ettersom triclosan har en log  $K_{ow}$  på 5,4,



kan dette tyde på at substansen bindes godt til den organiske fasen i husdyrgjødsel. Men hvordan er egentlig triclosan fordelt, vil det ligge noe igjen i vannfasen? For å finne svaret på dette er det viktig å tenke på triclosan sin løselighet i vann. En viktig ting å merke seg er at  $\text{Log } K_{ow}$  kan variere med pH-verdien. Mengde salinitet øker ved tilsetning av  $\text{H}^+$  (syre) og eventuelt  $\text{OH}^-$  (base), disse er med på å skyve over de upolare komponentene. Det kan også være slik at triclosan går over i ioneform og dermed velger å bli i den polare fasen.



Figur 30: Illustrasjon av anaerob og aerob nedbrytning (gjennomsnittet av to paralleller er tatt med på hvert punkt). Startkonsentrasjonene er beregnet til å være 20 µg/ml.

Noen av prøvene som ble tatt ut i løpet av forsøket var mer flyktige enn andre. Dette betyr at konsentrasjonen vil være noe høyere enn i de prøvene som er mindre flyktige, ettersom substansen ligger godt bundet til den organiske fasen. Som igjen forklarer forskjellige konsentrasjoner i ulike paralleller vist på Figur 27 og Figur 28. Selv om parallellene i utgangspunktet skulle være like flyktige, var ikke dette tilfelle. Noe som kan forklares med fordamping av vannet under nedbrytningsforsøket. Vann ble tilført til reaktantene under forsøket, men det var ingen kontrollert del. Mengde vann tilført ble ikke målt. Nedbrytningsraten er høyere i det aerobe miljøet enn i det anaerobe (illustrert Figur 30). Oppryk i konsentrasjon i dag 29 kan ikke forklares. Det kan være en forveksling mellom prøvene fra da 17 og dag 29. Hadde tiden vært tilstrekkelig hadde det beste vært å utarbeide flere prøver fra dag 29 og analysere disse.

Standardavvikene ble beregnet for disse parallelle prøvene som ble analysert i UFZ. Forskjellene er store. Noen av prøvene har et lavt standardavvik, noe som tyder på at målingene ligger tett inntil gjennomsnittsverdien. Mens andre har en høy standardavvik, noe som tyder på en stor spredning i data materialet. Flere målinger enn 3 hadde gitt et bedre bilde på standardavviket.

Triclosan ble analysert på ulike instrumenter. Den beste analysemetoden av triclosan er ved bruk av GC-MS med selektiv ion monitorering (derivatisering og negativ kjemisk ioniseringsmodus - NCI). Dette oppsettet er den mest sensitive for polare substanser. GC massespektrometer med elektronionisering (GC-MS EI) er mindre sensitiv. Hvis vi skal sammenligne hvilket instrument som er best for analyse av triclosan, kan vi skrive dem opp i følge rekkefølge, der den øverste er mest sensitiv:

1. GC-NCI-MS
2. HPLC med UV eller fluorescensdetektor og GC-(EI)MS
3. Ion Trap GC/ MS

En standardkurve for triclosan skulle fremstilles. Prøvene ble dessverre øderlagt under transport til UFZ i Leipzig Tyskland. Det ble derfor fremstilt og analysert en prøve med kjent mengde konsentrasjon i GC/ MS (SIM). Ut ifra dette kan man sammenligne konsentrasjonen av de ulike prøvene.

Gassmåling i husdyrgjødsel ble foretatt med et gassmåleinstrument. H<sub>2</sub> gassen var uventet å finne i gjødsel. Siden målingene ble stoppet tidlig i analyseforsøket, førte dette til mangel på data. Av den grunn blir ikke disse målingene omtalt.

Tørrstoffanalyse og glødetap ble foretatt. Dette er viktige parametre etter som de beskriver mengde tørrstoff og organisk materiale i sedimentet. Organisk materiale suger til seg vann. En kan anta at tørrstoff vil variere med temperatur og nedbør, dette fordi mengde vann vil påvirke tørrstoffmengden. Hvis mengden organisk materiale er høyt i husdyrgjødsel, vil glødetapet være høyt. Med høy mengde glødetap, vil husdyrgjødslet inneholde komponenter som ikke er omdannet. Videre kan man estimere hvor mye triclosan man har i den organiske fasen.

## 5.5 Tidligere utført arbeid

I artikkelen av (Kummerer et al., 2000) refereres det til at biodegradering av ciprofloxacin og andre legemidler er lite undersøkt. Fra 1980 og frem til i dag har man funnet ut at overflatevannet har blitt kontaminert av enkelte legemidler, blant annet ciprofloxacin. Det er derfor viktig å fortsette arbeidet innen dette feltet.

I analysen ble det ved bruk av HPLC med fluorescensdetektor, undersøkt om ciprofloxacin var til stede i jord og husdyrgjødsel. Ekstraksjonsmetoden er relativt enkel, der en blanding av acetonitrill og 1 M HCl blir benyttet som ekstraksjonsmiddel. Ekstraktet blir så ristet og sentrifugert før det filtreres gjennom et filter av nylonmembran med pore størrelse på 0,2 µm. Det ble ikke funnet noe ciprofloxacin i matriksene som ble benyttet.

I artikkelen "*Triclosan: Occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment*" (Singer et al., 2002) ble flere filtre prøvd. Man fant ut at membranfiltret som er laget av cellulose førte til tap av triclosan, mens polyamidfiltret førte til tilbakeholding av den løste triclosan. Dette forteller oss at det er viktig å vurdere hvilke filter man bruker og hvilke begrensinger de har. I metodebearbeidingsfasen av ciprofloxacin ble Sterile sprøytefilter fra Life Science® med pore størrelse 0,2 µm benyttet. I UFZ ble samme filter brukt, men i 0,45µm, dette på grunn av tilgjengelig i UFZ i Leipzig. Filtrets membran er ikke så ulik costar spin x sentrifuge filter, som ble anbefalt av Viktor Hormazabal ved Norges veterinær høyskole.

HPLC i kombinasjon med MS er mye brukt i analytisk teknikk for å måle små mengder farmasøytiske komponenter. GC er også brukt som en deteksjonsmetode av lave konsentrasjoner på legemidler slik Kot-Wasik et.al (2007) omtaler i sin artikkel. I analysen av triclosan ble HLPC først prøvd ut, uten vellykkede resultater. HPLC er en god metode når det kommer til analyse av ciprofloxacin og andre substanser. HPLC er ikke sensitiv nok for deteksjon av triclosan. Det betyr at GC-MS med selektiv ionmonitorering er et bedre alternativ. I UFZ har man jobbet med triclosan tidligere og benyttet seg av GC-MS ved analyser av triclosan. Viktor Hormazabal ved Veterinærhøyskolen i Oslo har benyttet seg av HPLC med fluorosens detektor ved analyse av ciprofloxacin, men ettersom fluorescensdetektor ikke var tilgjengelig ble GC-MS (SIM) brukt i UFZ.

I analysen av triclosan ble samme metode som Wu et al.(2007) prøvd ut, der triclosan i vandige miljø måles ved bruk av kvadropol MS ionfanger. I denne artikkelen benyttes en annen temperatur, og rettensjonstiden vil derfor være ulik. De ulike prøvematriks i analysen kommer fra Klepp i Vestre Særheim. Rensemetsoden som brukes av (Wu et al., 2007) er fastfase ekstraksjon. I likhet med analysen, der silikagel blir brukt som opprensing og heksan/acetone ble benyttet som elueringsmiddel. Ekstraksjonen av tomatbladene var mørk i fargen, og en opprensing ble derfor valgt som et trinn i analysen. Det er ikke nødvendigvis et godt valg, ettersom noe av substansen kan ligge igjen i silikagelen. (Singer et al., 2002) analyserte triclosan i slam og sediment og brukt ASE (Accelerated solvent extraction) som ekstraksjonsmetode, opprensing med silikagel og videre analyse i GC-MS. Mangel på utstyr på UiS er grunnen til at ikke andre opprensningsmetoder ble utprøvd.

I likhet med (Singer et al.,2002) ble det i dette eksperimentet brukt tørr gjødsel, tomatblad og jord som matriks, blandet med acetone og tilsatt triclosan. (Singer et al.,2002) blandet sedimentet med etanol, som er et mer polart løsemiddel og kan være problematisk i et GC instrument.

## **5.6 Videre arbeid**

Det gjenstår mye arbeid og videre forskning om legemidlers effekt på miljøet. Man kan gå videre og studere nye komponenter eller legemidler. Det er viktig å benytte seg av den forskningen som allerede er gjort. En kan utføre lignende arbeid som er gjort tidligere, men bruke prøvematerial slik som husdyrgjødsel og jord fra ulike deler av landet. På denne måten kan man sammenligne resultatene og se om det ligger forurensningsproblemer i noen deler av landet. Det kan tenke seg at Karmøy kan være et utsatt område for miljøgifter, ettersom Hydro Aluminium har fått mye negativ oppmerksomhet i media de senere årene grunnet utslipp av miljøgifter. Tema innen legemidler som miljøgifter er spennende og mye kan undersøkes videre. Et annet interessant område innen mulige miljøgifter er nye næringsmidler og dens nedbrytning i miljøet. Slike stoffer kan være Sakrose, Saviosid og andre søtstoffer som i de siste årene har fått stor oppmerksomhet.

## 6 Konklusjon

Analysene av triclosan fungerer bra med heksan som løsemiddel og GC- MS som metode, spesielt når man hadde innstilling på selektiv ion monitorering. Det er viktig å vaske sprøyten med heksan mellom hver injisering av de ulike prøvene. Dette for ikke å kontaminere neste prøve med rester som er igjen fra forrige injeksjon. Det kan være nødvendig å forhøye temperaturen ved vasking med heksan.

I analysen av ciprofloxacin benyttets acetonitrill, vann og maursyre som løsemiddel, dette førte til at mange elementer fra jord også er ekstrahert over (i motsetning til heksan ekstraksjon i triclosan analysen som ga blanke løsninger). Gulfargen i løsningen avslører dette. Jord som matriks kan være vanskelig å jobbe med. Jord inneholder ulike aminosyrer, sukker, glukosamin og mange andre substanser som kan ha nesten samme molekylvekt som ciprofloxacin. Dette vil derfor føre til at det blir vanskelig å lese av ciprofloxacin i HPLC når vi bruker kvadropol massespektrometri. I andre matriks slik som tomatblader og husdyrgjødsel får vi ikke det samme problemet, og resultatenes kvalitet blir dermed betydelig bedre. En mulig løsning på problemet er å foreta en rensing (cleanup) før injisering eller å benytte seg av en annen detektor. Etter å ha utført en del analyser, konkluderes det at pH verdien i elueringsmiddelet spiller en viktig rolle for videre analyse av prøvene. Ingen konkret konklusjon kan trekkes om hvilke pH-verdi som gir best resultat ved ciprofloxacin analyse. Med dette vil man anbefale å utføre flere pH forsøk før en endelig konklusjon kan trekkes. Av tidlig utført arbeid inne dette feltet, finner man motsigelser. Noen mener at lav p- verdi vil gi best utslag, men andre kommer frem til at en høy pH verdi vil gi best utslag. En ting alle er enige i er av ved nøytral pH vil ciprofloxacin gi dårligst gjenvinning.

## 7 Referanser

- ANDREU, V., BLASCO, C. & PICÒ, Y. (16.02.2007) Analytical strategies to determine quinolone residues in food and environment  
[\[http://www.sciencedirect.com/sciences/jurnal/01659936/27.02.2009\]](http://www.sciencedirect.com/sciences/jurnal/01659936/27.02.2009).  
Valencia, Sciencedirect.
- BØCKMAN, O. C. (1991) *Landbruk og gjødsling: mineralgjødning i perspektiv : betydningen for verdens matforsyning, miljøutfordringer, er det alternativer*, Oslo, Landbrukdivisjonen, Norsk Hydro.
- DATAAPEX (14.04.2009) Agilent 68xx Control. 19.03.2009 ed.,  
<http://www.dataapex.com/product.php?id=controls-gc-agilent68xx.php>.
- FEDERLE, T. W., KAISER, S. K. & NUCK, B. A. (2001) Fate and effects of triclosan in activated sludge. *Environmental toxicology and chemistry* 21, 1330-1337.
- GRAHL-NIELSEN, O. & FRØYSTEIN, A. G. (2007) Laboratorieheftet Kjemi/Farm 250 analytisk kjemi Bergen, kjemisk institutt.
- HLAVINEK, P., BONACCI, O., MARSAKEK, J. & MAHRIKOVA, I. (2007) *Dangerous pollutants (xenobiotics in urban water cycle*, Springer
- KOT-WASIK, A., DEBSKA, J. & NAMIESNIK, J. (2007) Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal care products. *Trend in Analytical Chemistry*, 26, 557-568.
- KROGSTAD, T. (1992) *Metoder for jordanalyser*. IN LANDBRUKSHØYSKOLE, N. (Ed. Ås, Institutt for jordfag.
- KUMMERER, K. (2004) *Pharmaceuticals in the environment: sources, fate, effects and risks* Freiburg, Springer
- KUMMERER, K., AL-AHMAD, A. & MERSCH-SUNDERMANN, V. (2000) Biodegradability of some antibiotics, elimination of the genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a sample test *Chemosphere* 40, 701-710.
- LIMITED, M. L. (20.11.2008) List of Active Pharmaceutical Ingredients. 2003 ed.,  
<http://www.matrixlabsindia.com/inside/productslist.asp>.
- LINDSAY, S. (1992) *High performance liquid chromatography*, Chichester, Published on behalf of Thames Polytechnic, London, by Wiley.
- MITRA, S. (2003) *Sample preparation techniques in analytical chemistry*, Hoboken, N.J., Wiley.
- ÔTKER USLA, M., YEDILER, A., AKMEHMET BALCIOGLU, I. & SCHULTE-HOSTEDE, S. (2007) Analysis and sorption behavior of fluoroquinolones in soil matrices. *Water Air Soil Pollut*, 2008, 55-63.
- RØNNING, P. O. (2006) *Prøvetaking og prøveopparbeiding* Høyskolen i Oslo, Avdeling for Ingeniørutdanning
- SINGER, H., MÜLLER, S., TIXIER, C. & PILLONEL, L. (2002) Triclosan: Occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. *Environment science and technology* 36, 4998-5004.
- SKOOG, D. A., WEST, D. M. & HOLLER, F. J. (1996) *Fundamentals of analytical chemistry*, Fort Worth, Saunders College Publ.
- SPARKS, D. L. (2003) *Environmental soil chemistry*, Amsterdam, Academic Press.
- STERNBECK, J., ÔSTERÅS, A. H. & JOSEFSSON, K. (2007) Triclosan, DEHP och klordan- samlad utvärdering av svenska miljöövervakningsdata IN NATURVÅRDSVERKET (Ed. Stockholm.

- SUPELCO (01.02.2009) Guide to soil Phase Extraction. *sigma aldrich*. 1998 ed.,  
<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/t197910.Par.0001.File.tmp/t197910.pdf>.
- SUPELCO (1998) Guide to soil Phase Extraction  
[<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Supelco/Bulletin/t197910.Par.0001.File.tmp/t197910.pdf>] 01.02.2009. Sigma-Aldrich Co.
- TVEITNES, S. (1993) *Husdyrgjødsel*, Ås, Statens fagtjeneste for landbruket.
- UBØE, J. (2008) *Statistikk for økonomifag*, Oslo, Gyldendal.
- VERLIEFDE, A., AMY, G., VAN DER BRUGGEN, B., VAN DIJK, H. J. & VAN VLIET, N. (2006) A semi-Quantitative Method for prediction of the rejection of uncharged organic micropollutant with nanofiltration [<http://www.iwaponline.com/wpt/001/wpt0010084.htm>]  
02.05.2009. IWA Publishing.
- VILBERG, A. (2007) *Norsk legemiddelhåndbok for helsepersonell*, [Oslo], forening for utgivelse av Norsk legemiddelhåndbok.
- WU, J.-L., LAM, N. P., MARTENS, D., KETTRUP, A. & CAI, Z. (2007) Triclosan determination in water related to wastewater treatment *Talanta*, 72, 1650-1654.