



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΧΗΜΕΙΑΣ»
ΕΙΔΙΚΕΥΣΗ «Αναλυτική Χημεία»**

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ
ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΩΝ ΡΥΠΩΝ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ,
ΑΝΟΞΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ ΜΕ LC-QToF-MS**

**Αττιτή Σοφία
ΧΗΜΙΚΟΣ**

ΑΘΗΝΑ 2016

ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΔΙΠΛΩΜΑΤΟΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΚΑΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ
ΑΝΑΔΥΟΜΕΝΩΝ ΡΥΠΩΝ ΥΠΟ ΑΕΡΟΒΙΕΣ, ΑΝΟΞΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΝΑΕΡΟΒΙΕΣ
ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΕΝΕΡΓΟΥ ΙΛΥΟΣ ΜΕ LC-QToF-MS

Αττιπή Σοφία

ΧΗΜΙΚΟΣ

Αριθμός Μητρώου: 11304

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ:

ΘΩΜΑΪΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

ΘΩΜΑΪΔΗΣ ΝΙΚΟΛΑΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΚΟΥΠΠΑΡΗΣ ΜΙΧΑΗΛ, ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΟΙΚΟΝΟΜΟΥ ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ, ΑΝΑΠΛΗΡΩΤΗΣ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΚΠΑ

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΞΕΤΑΣΗΣ: 30/06/2016

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι φαρμακευτικές ουσίες και τα βιομηχανικά κατάλοιπα απορρίπτονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσω των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (ΕΕΛ), όπου και υπόκεινται μερικώς σε μικροβιακή αποικοδόμηση. Έρευνες έχουν δείξει ότι διάφοροι μετασχηματισμοί μπορούν να λάβουν χώρα σχηματίζοντας προϊόντα των οποίων η περιβαλλοντική συμπεριφορά πολλές φορές διαφέρει σημαντικά σε σχέση με τη μητρική ένωση, και τα οποία ονομάζονται προϊόντα μετασχηματισμού. Επομένως, είναι πολύ σημαντική η έρευνα για το μηχανισμό της μετατροπής και την ολική ή μερική απομάκρυνσή των παραπάνω ενώσεων που πραγματοποιείται στις ΕΕΛ. Λόγω της ευρείας χρήσης των παραπάνω ενώσεων, αποτελούν σημαντικούς ρύπους του υδάτινου περιβάλλοντος. Πρόσφατες μελέτες υποδεικνύουν την ύπαρξη τους τόσο στις εισροές όσο και στις εκροές των ΕΕΛ, γεγονός που τα κατατάσσει στην ευρύτερη κατηγορία των αναδυόμενων ρύπων. Ωστόσο, οι πληροφορίες και η ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με το ποσοστό απομάκρυνσής τους και το μετασχηματισμό τους κατά την επεξεργασία τους στις ΕΕΛ είναι σχετικά περιορισμένη.

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η μελέτη της κινητικής απομάκρυνσης και της ταυτοποίησης των προϊόντων μετασχηματισμού των φαρμακευτικών ενώσεων ρανιτιδίνη, λιδοκαΐνη, σιταλοπράμη, μετφορμίνη, τραμαδόλη, εφεδρίνη, φουροσεμίδιο, τοπιραμάτη, υδροχλωροθειαζίδιο και του συνθετικού γλυκαντικού κυκλαμικό, υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες, κατά τη επεξεργασία με ενεργό ιλύ. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη απομάκρυνσης, προσρόφησης της πρόδρομης ένωσης και δημιουργίας προϊόντων μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκαν με βιοαντιδραστήρες οι οποίοι περιείχαν ενεργό ιλύ. Στη συνέχεια ανιχνεύτηκαν και ταυτοποιήθηκαν ορισμένα προϊόντα μετασχηματισμού τους, μέσω σάρωσης πιθανών ενώσεων (suspect screening), με τη χρήση φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Τέλος, για την ανίχνευση των προϊόντων μετασχηματισμού, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία “broad band collision induce dissociation” (bbCID) και η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση και την ταυτοποίησή τους ήταν εκείνη της σάρωσης πιθανών προϊόντων μέσω

δημιουργίας λίστας με βάση τη βιβλιογραφία και λογισμικά πρόβλεψης, όπως το σύστημα πρόβλεψης EAWAG-PPS, (Pathway Prediction System, EAWAG-PPS) καθώς επίσης και το λογισμικό πρόβλεψης μεταβολιτών της Bruker (Metabolite Predict, Bruker Daltonics).

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Περιβαλλοντική Αναλυτική Χημεία.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Αναδυόμενοι ρύποι, βιοαποικοδόμηση, αερόβιες/ανοξικές/αναερόβιες συνθήκες, προϊόντα μετασχηματισμού, LC-QTOF-MS

ABSTRACT

Pharmaceuticals and industrial chemicals are discharged into the aquatic environment *via* wastewater treatment plants (WWTPs), where they are subjected to microbial degradation. Studies have shown that different transformation pathways can take place, resulting in the formation of transformation products (TPs) that, to some extent, differ in their environmental behavior compared to the parent compound. Therefore, it is crucial to investigate the biotransformation mechanism during the wastewater treatment. Due to their widespread use, the studied compounds are important environmental pollutants mainly addressed to the aquatic ecosystem. Recent studies indicate their existence in both influent and effluent wastewater samples, classifying them in the broader category of 'emerging pollutants'. However, information and research activity on the rate of removal and transformation during the wastewater treatment is limited.

The goals of this thesis were to study the degradation kinetics and to identify novel TPs of the pharmaceutical compounds ranitidine, lidocaine, citalopram, metformin, tramadol, ephedrine, furosemide, hydrochlorothiazide and sweetener cyclamate under aerobic, anoxic and anaerobic conditions treated with activated sludge were investigated. The number of transformation products were detected and identified through suspect screening with HR-MS techniques. More specifically, the removal and sorption of the PC as well as the formation of TPs were investigated by setting batch reactors seeded with activated sludge.

Finally, for the detection of TPs, the analysis was performed in broad band collision induced dissociation (bbCID) mode suspect screening workflow was used for the detection and identification of TPs, by creating a suspect list. The suspect list was compiled with all the TPs that have already been published in relevant degradation studies. In silico on-line free prediction tools such as EAWAG-PPS and Bruker's software Metabolite Predict were used for predicting possible TPs of the compounds.

SUBJECT AREA: Environmental Analytical Chemistry.

KEYWORDS: Emerging contaminants, biodegradation, aerobic/anoxic/anaerobic conditions, transformation products, LC-QTOF-MS

Στην ανηψιά μου,

Άρτεμις

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον κ. Θωμαΐδη Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών και επιβλέποντα της ερευνητικής εργασίας, για την επιστημονική καθοδήγηση, εμπιστοσύνη και συμπαράσταση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια εκπόνησης και συγγραφής αυτής, καθώς και για τη δυνατότητα που μου έδωσε να γίνω μέλος της ερευνητικής του ομάδας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα παιδιά από την ερευνητική ομάδα του κύριου Θωμαΐδη για τη συνεργασία μας. Ειδικότερα ευχαριστώ την Διδάκτωρα Άννα Μπλέτσου και την Υποψήφια Διδάκτωρα Κατερίνα Ψωμά για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν, ώστε να ολοκληρωθεί η παρούσα εργασία.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Υποψήφιο Διδάκτωρα Μάριο Κωστάκη για την συνεργασία, καθοδήγηση και βοήθεια που μου προσέφερε στο επόμενο βήμα μου στο εργαστήριο.

Ακόμη ένα ευχαριστώ στην Ελένη Γεωργαντζή της οποίας η βοήθεια ήταν καταλυτική για την συγγραφή της εργασίας.

Τέλος, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένεια μου για την υποστήριξη που μου παρέχει όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και στον Γεώργιο Καζαμία για τις συμβουλές του.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΥΤΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΕ ΑΠΟΒΛΗΤΑ.....	31
1.1 Εισαγωγή	31
1.2 Απελευθέρωση των φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον	32
1.2.1 Βιομηχανικές εκπομπές	32
1.2.2 Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Ε.Ε.Λ)	33
1.2.3 Χρήση της λυματολάσπης – άρδευση με απόβλητα	33
1.2.4 Εκπομπές από νοσοκομειακές μονάδες	34
1.2.5 Απόρριψη μη χρησιμοποιούμενων φαρμάκων	34
1.3 Περιβαλλοντική τύχη των φαρμακευτικών ενώσεων	34
1.3.1 Οι διεργασίες στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων	35
1.3.1.1 Συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.....	35
1.3.1.2 Προχωρημένες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων	36
1.4 Τεχνικά γλυκαντικά στο περιβάλλον	37
1.5 Προϊόντα μετασχηματισμού φαρμακευτικών ενώσεων και γλυκαντικών	37
1.5.1 Προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται κάτω από βιοτικές συνθήκες	38
1.5.1.1 Προϊόντα μετασχηματισμού (μεταβολίτες) από τον ανθρώπινο οργανισμό.....	39
1.5.1.2 Προϊόντα μετασχηματισμού από διάφορους μικροοργανισμούς 39	
1.5.2 Προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται κάτω από αβιοτικές συνθήκες	40
ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ - ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ	43

2.1 Εισαγωγή.....	43
2.2 Φασματομετρία Μαζών σε σύζευξη με LC (LC-MS)	43
2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού παραπροϊόντων	46
2.5.1 Στοχευμένη σάρωση (target screening)	46
2.5.2 Σάρωση πιθανών ενώσεων (suspect screening)	47
2.6 Επίπεδα ταυτοποίησης από μη στοχευμένη ανάλυση με HRMS.....	49
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.....	53
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	53
ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	59
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5.....	61
ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-.....	61
ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	61
5.1 Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών.....	61
5.2 Λογισμικό	62
5.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός.....	62
5.4 Αντιδραστήρια - Διαλύτες	63
5.5 Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα	64
ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΙΛΥ	65

6.1 Εισαγωγή.....	65
6.2 Σύγκριση αερόβιων-ανοξικών-αναερόβιων συνθηκών.....	65
6.2.1 Πειραματικό σύστημα μελέτης και ανίχνευσης βιομετατροπής	66
6.3 Ανάλυση δειγμάτων.....	69
6.3.1 Ανάλυση δειγμάτων με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης.....	69
6.3.2 Επεξεργασία δεδομένων	70
6.4 Μελέτη αναζήτησης και προσδιορισμού προϊόντων μετασχηματισμού των υπό εξέταση ενώσεων.....	71
6.4.1 Δημιουργία λίστας ύποπτων ενώσεων για πιθανά προϊόντα μετασχηματισμού των υπό εξέταση ενώσεων	72
6.4.1.1 Λίστα ήδη ταυτοποιημένων προϊόντων μετασχηματισμού στην υπάρχουσα βιβλιογραφία.....	73
6.4.1.2 Λίστα προϊόντων μετασχηματισμού από το EAWAG-PPS.....	73
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	77
7.1 Μελέτη απομάκρυνσης των υπό εξέταση ενώσεων κατά την επεξεργασία με ενεργό ιλύ υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.....	77
7.1.1 Μελέτη απομάκρυνσης των εξεταζόμενων ενώσεων υπό αερόβιες, ανοξικές, αναερόβιες συνθήκες με χρωματογραφία RP.....	77
7.2 Μελέτη ανίχνευσης και προσδιορισμού προϊόντων μετασχηματισμού.....	82
7.3 Ρανιτιδίνη	83
7.3.1 RAN317.....	86
7.3.2 RAN302.....	87
7.3.3 RAN301.....	88
7.3.4 RAN331.....	90
7.3.5 RAN286.....	93

7.4 Λιδοκαΐνη	94
7.4.1 LDC207	95
7.4.2 LDC219	97
7.4.3 LDC251	98
7.5 Εφεδρίνη	100
7.5.1 EPH164.....	101
7.6 Τραμαδόλη	103
7.6.1 TRA250	105
7.6.2 TRA236	106
7.6.3 TRA280	107
7.6.4 TRA278	109
7.6.5 TRA266	111
7.7 Μετορφίνη	112
7.7.1 MET103.....	113
7.8 Σιταλοπράμη	115
7.8.1 CTR311	117
7.8.2 CTR343.....	119
7.8.3 CTR344	120
7.8.4 CTR341	122
7.8.5 CTR329.....	124
7.8.6 CTR330.....	125
7.8.7 CTR339.....	126
7.9 Φουροσεμίδιο	127
7.10 Υδροχλωροθειαζίδιο	128
7.11 Κυκλαμικό	128
7.12 Τοπιραμάτη	129
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	131

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ.....	133
ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	135
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	137

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1: Προτεινόμενα επίπεδα ταυτοποίησης αναλυτών μέσω φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας	49
Εικόνα 2: Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή υβριδικό αναλυτή μαζών τετραπόλου-χρόνου πτήσης (LC-MS/MS) της Bruker Maxis Impact	61
Εικόνα 3: Σημεία Δειγματοληψίας για την μελέτη βιοαποικοδόμησης. Α: λύματα εκροών Β: ενεργός ιλύ.	67
Εικόνα 4: Μορφή μια εμπειρικής βάσης δεδομένων.	72
Εικόνα 5: Χρονική τάση σχηματισμού των ΤΡs της ρανιτιδίνης στις τρεις συνθήκες: (α) αερόβια, (β) ανοξικά, (γ) αναερόβια.....	84
Εικόνα 6: Α) ΧΙC της ρανιτιδίνης υπό αερόβιες συνθήκες, Β) Φάσμα MS/MS της ρανιτιδίνης υπό αερόβιες συνθήκες	85
Εικόνα 7: ΧΙC του ΤΡ RAN317 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 2 days.	86
Εικόνα 8: Α) ΧΙC της ένωσης RAN302 στις αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 2 days, Β) ΧΙC της ένωσης RAN302 στις ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 4 days.....	87
Εικόνα 9: Α) MS/MS φάσμα της ένωσης RAN302 υπό αερόβιες συνθήκες. .	88
Εικόνα 10: Α) ΧΙC του ΤΡ RAN301 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 24 h, Β) ΧΙC του ΤΡ RAN301 υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 48 h.	89
Εικόνα 11: MS/MS φάσμα της ένωσης RAN301 Α) υπό αερόβιες συνθήκες.	90
Εικόνα 12: ΧΙC της ένωσης RAN331 Α) στις αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 24 h, Β) στις ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 3 days, Γ) στις αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή t = 3 days.	91
Εικόνα 13: MS/MS φάσμα των ενώσεων Α) RAN331_a1, Β) RAN331_a2 Γ) RAN331_β, στις αερόβιες συνθήκες.	92
Εικόνα 14: MS/MS φάσμα της ένωσης RAN331_a2 τη χρονική στιγμή t = 3 days στις ανοξικές συνθήκες.....	92

Εικόνα 15: MS/MS φάσματα του προτύπου S-Oxide και N-Oxide A) Ranitide S-Oxide $t_r=1,5\text{min}$, B) Ranitidine S-Oxide $t_r=2,0\text{min}$, Γ) Ranitidine N-Oxide $t_r=3,4\text{min}$	93
Εικόνα 16: ΧΙC της ένωσης RAN286 τη χρονική στιγμή $t = 4 \text{ days}$ υπό αερόβιες συνθήκες.....	93
Εικόνα 17: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της λιδοκαΐνης (α) αερόβια, (β) ανοξικά.	94
Εικόνα 18: A) ΧΙC της λιδοκαΐνης υπό αερόβιες συνθήκες, B) Φάσμα MS/MS της λιδοκαΐνης υπό αερόβιες συνθήκες.....	95
Εικόνα 19: ΧΙC της ένωσης LDC207 τη χρονική στιγμή $t= 2 \text{ days}$, A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.....	96
Εικόνα 20: A) Φάσμα MS/MS της ένωσης LDC207 υπό αερόβιες συνθήκες, B) Φάσμα MS/MS πρότυπης ένωσης αναφοράς LDC207.....	97
Εικόνα 21: ΧΙC της ένωσης LDC219 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4 \text{ days}$, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5 \text{ days}$	98
Εικόνα 22: Φάσμα MS/MS της ένωσης LDC219 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.	98
Εικόνα 23: ΧΙC της ένωσης LDC251 τη χρονική στιγμή $t = 2 \text{ days}$ A) υπό αερόβιες συνθήκες, β) υπό ανοξικές συνθήκες.....	99
Εικόνα 24: A) MS/MS φάσμα της ένωσης LDC251 υπό αερόβιες συνθήκες, B) MS/MS φάσμα πρότυπης ένωσης αναφοράς LDC251.	99
Εικόνα 25: Διάγραμμα σχηματισμού του TP EPH164 υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες.	100
Εικόνα 26: A) ΧΙC της ένωσης εφεδρίνης τη χρονική στιγμή $t = 1 \text{ h}$, B) Φάσμα MS/MS της ένωσης εφεδρίνης.	101
Εικόνα 27: ΧΙC της ένωσης EPH164 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 6 \text{ h}$, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24 \text{ h}$. ..	102
Εικόνα 28: Φάσμα MS/MS του TP EPH164 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.	102
Εικόνα 29: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της τραμαδόλης (α) αερόβια, (β) ανοξικά.	104
Εικόνα 30: A) ΧΙC της τραμαδόλης τη χρονική στιγμή $t = 1 \text{ h}$, B) Φάσμα MS/MS της τραμαδόλης.....	104

Εικόνα 31: XIC της ένωσης TRA250 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.	106
Εικόνα 32: MS/MS φάσμα της ένωσης TRA250 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.	106
Εικόνα 33: XIC της ένωσης TRA236 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days.	107
Εικόνα 34: A) XIC της ένωσης TRA280 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 2$ days, B) MS/MS φάσμα της ένωσης TRA280.....	109
Εικόνα 35: XIC της ένωσης TRA278 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h.	110
Εικόνα 36: MS/MS φάσμα της ένωσης TRA278 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.	111
Εικόνα 37: XIC της ένωσης TRA266 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.....	112
Εικόνα 38: Διαγράμματα σχηματισμού του TP MET103 υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες.	112
Εικόνα 39: A) XIC της ένωσης μετορφίνης στις αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 1$ h, B) φάσμα MS/MS της ένωσης μετορφίνης.	113
Εικόνα 40: XIC της ένωσης MET103 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h. .	114
Εικόνα 41: Φάσμα MS/MS της ένωσης MET 103 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.	115
Εικόνα 42: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της σιταλοπράμης (α) αερόβια, (β) ανοξικά, (γ) αναερόβια.	117
Εικόνα 43: A) XIC της ένωσης σιταλοπράμης υπό αερόβιες συνθήκες , B) φάσμα MS/MS της ένωσης σιταλοπράμης.	117
Εικόνα 44: XIC του TP CTR311 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική $t = 24$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική $t = 5$ days.	118
Εικόνα 45: Φάσμα MS/MS του TP CTR311 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.....	119

Εικόνα 46: ΧΙC της ένωσης CTR343 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 3$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ days.	120
Εικόνα 47: ΧΙC της ένωσης CTR344 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ days.	121
Εικόνα 48: Φάσμα MS/MS της ένωσης CTR344 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες.	122
Εικόνα 49: ΧΙC του TP CTR341 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 2$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ days.....	123
Εικόνα 50 : Φάσμα MS/MS του TP CTR341 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες.....	124
Εικόνα 51: A) ΧΙC του TP CTR329 υπο αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) Φάσμα MS/MS του TP CTR329.	125
Εικόνα 52: ΧΙC της ένωσης CTR330 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.....	126
Εικόνα 53: ΧΙC της ένωσης CTR339 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.	127
Εικόνα 54: A) ΧΙC του φουροσεμιδίου, B) MS/MS φάσμα του φουροσεμιδίου.	128
Εικόνα 55: A) ΧΙC του υδροχλωροθειαζιδίου, B) MS/MS φάσμα του υδροχλωροθειαζιδίου.....	128
Εικόνα 56: A) ΧΙC του κυκλαμικού, B) MS/MS φάσμα του κυκλαμικού.	129
Εικόνα 57: A) ΧΙC της τοπιραμάτης, B) MS/MS φάσμα της τοπιραμάτης. ..	130

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού, διαλύτες κινητής φάσης και πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για θετικό και αρνητικό ιοντισμό.....	70
Πίνακας 2: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης ρανιτιδίνης που ανιχνεύτηκαν από την βιοαποικοδόμηση της υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.....	84
Πίνακας 3: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης λιδοκαΐνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.....	94
Πίνακας 4: Προϊόν βιομετατροπής της ένωσης εφεδρίνης που ανιχνεύτηκε από την βιοαποικοδόμηση της υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες....	100
Πίνακας 5: Προϊόντα μετασχηματισμού της τραμαδόλης που ανιχνεύτηκαν από την βιοαποικοδόμηση της υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.....	103
Πίνακας 6: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης μετορφίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.....	112
Πίνακας 7: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης σιταλοπράμης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.....	115
Πίνακας 8: Αντιστοιχία ορολογίας μεταξύ ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.....	133
Πίνακας 9: Ακρωνύμια και ανάπτυξή τους.....	135

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1: Περιβαλλοντική τύχη των αναδυσόμενων ρύπων και κύριες.....	41
Σχήμα 2: Διάγραμμα απομάκρυνσης της ρανιτιδίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	79
Σχήμα 3: Διάγραμμα απομάκρυνσης της λιδοκαΐνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	79
Σχήμα 4: Διάγραμμα απομάκρυνσης της εφεδρίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	79
Σχήμα 5: Διάγραμμα απομάκρυνσης της σιταλοπράμης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	80
Σχήμα 6: Διάγραμμα απομάκρυνσης της μετφορμίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	80
Σχήμα 7: Διάγραμμα απομάκρυνσης του κυκλαμικού υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	80
Σχήμα 8: Διάγραμμα απομάκρυνσης της τραμαδόλης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	81
Σχήμα 9: Διάγραμμα απομάκρυνσης του υδροχλωροθειαζιδίου υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	81
Σχήμα 10: Διάγραμμα απομάκρυνσης του φουροσεμιδίου υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	81
Σχήμα 11: Διάγραμμα απομάκρυνσης της τοπιραμάτης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.	82
Σχήμα 12: Πιθανές δομές της ένωσης RAN 317.	86
Σχήμα 13: Πιθανή δομή της ένωσης RAN302.	87
Σχήμα 14: Πιθανές δομές της ένωσης RAN 301.....	89
Σχήμα 15: Προτεινόμενες δομές της ένωσης RAN331_a (α) και RAN331_b(β).....	91
Σχήμα 16: Προτεινόμενη δομή της ένωσης LDC207.	96
Σχήμα 17: Προτεινόμενη δομή της ένωσης LDC251.	99
Σχήμα 18: Προτεινόμενη δομή της ένωσης EPH164.....	102
Σχήμα 19: Προτεινόμενες δομές για το TP TRA250 όπως προκύπτουν από την απομεθυλίωση της μητρικής ένωσης τραμαδόλης.....	105
Σχήμα 20: Πιθανές δομές του TP TRA236.....	107

Σχήμα 21: Προτεινόμενες δομές της ένωσης TRA280.	108
Σχήμα 22: Προτεινόμενες δομές της ένωσης TRA278.....	110
Σχήμα 23: Πιθανές δομές του TP TRA266.	111
Σχήμα 24: Προτεινόμενη δομή της ένωσης MET103.....	114
Σχήμα 25: Προτεινόμενη δομή της ένωσης CTR311.....	118
Σχήμα 26: Πιθανή δομή της ένωσης CTR343.	119
Σχήμα 27: Προτεινόμενη δομή του TP CTR344.....	120
Σχήμα 28: Προτεινόμενη δομή του TP CTR341.	123
Σχήμα 29: Πιθανή δομή του TP CTR329.....	124
Σχήμα 30: Πιθανή δομή του TP CTR330.....	125
Σχήμα 31: Προτεινόμενες δομές για την ένωσης CTR339.	126

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία πραγματοποιήθηκε στο πλαίσιο του Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών με ειδίκευση στην «Αναλυτική Χημεία», με σκοπό την διερεύνηση της κινητικής αποικοδόμησης αναδύμενων ρύπων και της ανίχνευσης προϊόντων μετασχηματισμού τους κατά την επεξεργασία τους στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων.

Τα πειράματα βιοαποικοδόμησης διενεργήθηκαν στον Τομέα Περιβαλλοντικής Μηχανικής και Επιστήμης του Πανεπιστημίου Αιγαίου, υπό την επίβλεψη του κ. Στασινάκη Αθανάσιου, ενώ η ανάλυση πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας στο Εθνικό και Καπποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α), υπό την επίβλεψη του κ. Θωμάϊδη Νικόλαου.

Η ανάλυση των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε με υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS), με υβριδικό αναλυτή τετραπόλου χρόνου πτήσης (quadrupole Time-Of-Flight, QTOF) του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας του Τμήματος Χημείας του ΕΚΠΑ.

Αθήνα, 2016

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ ΚΑΙ ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΑΥΤΩΝ ΣΤΟ ΥΔΑΤΙΝΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΚΑΙ ΣΕ ΑΠΟΒΛΗΤΑ

1.1 Εισαγωγή

Τις τελευταίες δεκαετίες οι φαρμακευτικές ενώσεις έχουν γίνει μια από τις πιο συχνά μελετούμενες κατηγορίες αναδυόμενων ρύπων εξαιτίας της ευρείας κατανάλωσης τους και των πιθανών αρνητικών επιπτώσεων τους στην ποιότητα του νερού και στους ζωντανούς οργανισμούς. Τα περισσότερα φαρμακευτικά προϊόντα, συμπεριλαμβάνοντας και του ανθρώπινους μεταβολίτες εισέρχονται στο υδάτινο περιβάλλον μέσω του εγχώριου συστήματος αποχέτευσης. Πολυάριθμες αναφορές έχουν δείξει ότι οι ενώσεις αυτές είτε δεν εξαλείφονται πλήρως κατά την επεξεργασία των λυμάτων είτε προσροφώνται στη λάσπη, με αποτέλεσμα την εκτεταμένη παρουσία τους στο περιβάλλον [1].

Καθώς εισέρχονται στο περιβάλλον οι ρύποι υπόκεινται σε βιοτικές και αβιοτικές διεργασίες που συμβάλουν στον μετασχηματισμό ή την αποσύνθεση τους ανάλογα με τις ιδιότητες της κάθε ένωσης ξεχωριστά. Διάφοροι μετασχηματισμοί μπορούν να λάβουν χώρα σχηματίζοντας προϊόντα των οποίων η περιβαλλοντική συμπεριφορά πολλές φορές διαφέρει σημαντικά σε σχέση με την μητρική ένωση, και τα οποία ονομάζονται «προϊόντα μετασχηματισμού» (transformation products, TPs). Τα προϊόντα αυτά σε πολλές περιπτώσεις επιδεικνύουν μεγαλύτερη τοξικότητα ή βρίσκονται σε πολύ μεγαλύτερη συγκέντρωση από τη μητρική ένωση [2]. Γενικά, τα προϊόντα μετασχηματισμού είναι πολύ λιγότερο γνωστά, έχουν μελετηθεί σε πολύ μικρότερη κλίμακα και πιθανώς είναι περισσότερο πολικά σε σχέση με τις μητρικές ενώσεις.

Τα προϊόντα μετασχηματισμού μπορούν να παραχθούν: 1. Απο τον μεταβολισμό του ίδιου του ανθρώπου και των διαφόρων άλλων ζωντανών οργανισμών 2. Λόγω βιοδιάσπασης από διάφορους μικροοργανισμούς του περιβάλλοντος 3. Ως προϊόντα οξειδωσης κατά τη διάρκεια διεργασιών

οζονόλυσης ή χλωρίωσης 4. Μέσω αβιοτικών διεργασιών (φωτόλυση, υδρόλυση)

Η ταυτοποίηση σχετικών προϊόντων που σχηματίζονται λόγω της παρουσίας φαρμακευτικών προϊόντων στο περιβάλλον και η εκτίμηση της τύχης και των αποτελεσμάτων τους καθορίζονται από την οδηγία της Ευρωπαϊκής Ένωσης για την αξιολόγηση του περιβαλλοντικού κινδύνου από τα φαρμακευτικά προϊόντα λόγω της ανθρώπινης χρήσης. Ωστόσο ο αριθμός των χημικών ρύπων που ρυθμίζονται από την ευρωπαϊκή αυτή νομοθεσία εκπροσωπούν ένα πολύ μικρό κομμάτι των ρύπων που υφίσταται στο περιβάλλον ως αποτέλεσμα των φυσικών διεργασιών και των ανθρώπινων δραστηριοτήτων [2,3].

Για το λόγο αυτό, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στην ταυτοποίηση και στη μελέτη της τύχης των αναδυόμενων ρύπων και των προϊόντων μετασχηματισμού τους. Σε αυτό το επίπεδο σημαντικό ρόλο έχει παίξει η ανάπτυξη της αναλυτικής Χημείας τα τελευταία χρόνια καθώς είναι εφικτό πλέον να ανιχνευτούν περισσότερες χημικές ενώσεις. Ταυτόχρονα, τα όρια των συγκεντρώσεων τα οποία μπορούν να μετρηθούν συνεχώς μειώνονται. Ενώ, η φασματομετρία μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας, είναι ένα βήμα για την αδιερεύνηση των δομών των ενώσεων αυτών.

1.2 Απελευθέρωση των φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον

Οι κύριες πηγές προέλευσης των φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον αποτελούν τα απόβλητα από τις βιομηχανικές δραστηριότητες, οι μονάδες βιολογικού καθαρισμού και η μη κατάλληλη επεξεργασία των αχρησιμοποίητων και ληγμένων προϊόντων [4].

1.2.1 Βιομηχανικές εκπομπές

Η βιομηχανική παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων περιλαμβάνει δύο κύρια στάδια: την παραγωγή των πρώτων υλών και την παρασκευή των τελικών φαρμακευτικών προϊόντων. Στις βιομηχανικές εγκαταστάσεις κατά τη σύνθεση και τον καθαρισμό των πρώτων υλών συνήθως χρησιμοποιούνται οργανικοί διαλύτες οι οποίοι επαναχρησιμοποιούνται στη συνθετική διαδικασία και στη συνέχεια επεξεργάζονται ή απορρίπτονται για

αποτέφρωση. Στη βιομηχανία τα περισσότερα απόβλητα είναι στερεά και τα περισσότερα υλικά αποτεφρώνονται. Γι'αυτό το λόγο, οι απορρίψεις από τις βιομηχανικές εγκαταστάσεις είναι λίγες και δεν εξηγούν σε καμία περίπτωση την ευρεία παρουσία των φαρμακευτικών προϊόντων στο περιβάλλον [5].

1.2.2 Εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων (Ε.Ε.Λ)

Μετά τη χρήση των φαρμακευτικών ενώσεων και την έκκριση τους ως αναλλοίωτο φάρμακο ή ως μεταβολίτες καταλήγουν στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων όπου υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες επεξεργασίας προτού απελευθερωθούν. Η επιτυχία της εξάλειψης των φαρμακευτικών ενώσεων κατά τη διάρκεια αυτής της επεξεργασίας εξαρτάται από τις φυσικές και τις χημικές ιδιότητες τους. Οι εγκαταστάσεις επεξεργασίας μπορούν να μολύνουν και το έδαφος καθώς η ανακυκλωμένη λυματολάσπη χρησιμοποιείται ως λίπασμα σε γεωργικά χωράφια. Μόλυνση μπορεί να προκληθεί και από την απόρριψη των αποτεφρωμένων φαρμακευτικών προϊόντων στους τόπους υγειονομικής ταφής και στη θάλασσα. Η απόρριψη των στερεών αποβλήτων στους χώρους υγειονομικής ταφής είναι η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη μέθοδος απόρριψης. Ωστόσο, αυτό αρχίζει να αλλάζει λόγω των αυστηρότερων κανονισμών από την Ε.Ε [5].

1.2.3 Χρήση της λυματολάσπης – άρδευση με απόβλητα

Η εφαρμογή της λυματολάσπης ως λίπασμα στα γεωργικά χωράφια, παρότι αμφιλεγόμενη, χρησιμοποιείται σε αρκετές χώρες. Ως εκ τούτου, τα φαρμακευτικά προϊόντα από ανθρώπινη χρήση μπορούν να μολύνουν πρωτίστως το έδαφος λόγω αυτής της εφαρμογής ή της άρδευσης των καλλιεργειών με απόβλητα. Επιπλέον, τα φαρμακευτικά προϊόντα μπορούν να διαχυθούν στα επιφανειακά ύδατα έπειτα από βροχοπτώσεις. Διαρροές από τις μονάδες επεξεργασίας και τις αποχετεύσεις σε συνδυασμό με τις βροχοπτώσεις είναι πιθανό να ευθύνονται για την παρουσία των ενώσεων αυτών στα κοντινά επιφανειακά ύδατα. Επίσης, θα πρέπει να ενθαρρύνεται η χρήση της στη γεωργία υπό την προϋπόθεση ότι χρησιμοποιείται σωστά. Η χρήση της δεν θα πρέπει να βλάπτει την ποιότητα του εδάφους και των γεωργικών προϊόντων. Η οδηγία προβλέπει στο άρθρο 8 ότι: «η ιλύς πρέπει να χρησιμοποιείται με τέτοιο τρόπο ώστε να λαμβάνονται υπόψιν οι ανάγκες

θρέψεως των φυτών και ότι η ποιότητα του εδάφους και των επιφανειακών και υπόγειων υδάτων να μην υποβαθμίζεται»[6].

1.2.4 Εκπομπές από νοσοκομειακές μονάδες

Φαρμακευτικές ενώσεις από ανθρώπινη χρήση μπορούν επίσης να αποτεθούν από τα νοσοκομειακά απόβλητα. Μεγάλος αριθμός φαρμακευτικών ενώσεων που παρουσιάζονται στο περιβάλλον χρησιμοποιούνται αποκλειστικά στα νοσοκομεία και ως εκ τούτου αποδίδονται στα νοσοκομειακά απόβλητα [5].

1.2.5 Απόρριψη μη χρησιμοποιούμενων φαρμάκων

Η σωστή απόρριψη των ληγμένων ή αχρησιμοποίητων φαρμάκων είναι πρόκληση καθώς ελάχιστες πληροφορίες είναι διαθέσιμες για τις ασφαλείς και σωστές μεθόδους απόρριψης. Χώροι υγειονομικής ταφής, ήπια η υψηλής θερμοκρασίας αποτέφρωση, επιστροφή στον προμηθευτή ή τον παρασκευαστή είναι κάποιες από τις μεθόδους που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την απόρριψη τους. Ωστόσο, πολλοί χρήστες απορρίπτουν αυτά απευθείας στο σύστημα αποβλήτων [5].

1.3 Περιβαλλοντική τύχη των φαρμακευτικών ενώσεων

Μετά την απόκριση τους, οι φαρμακευτικές ενώσεις εισέρχονται στις μονάδες επεξεργασίας όπου και υποβάλλονται σε διαφορές διαδικασίες επεξεργασίας. Κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας των αποβλήτων οι φαρμακευτικές ενώσεις μπορούν να απομακρυνθούν δια μέσω μικροβιακής διάσπασης είτε να προσροφηθούν στα στερεά όπου και στη συνέχεια θα απομακρυνθούν μαζί με την λάσπη. Τα πιο σταθερά προϊόντα είναι πιθανό να απελευθερώνονται στο περιβάλλον όπου μεταφέρονται και διασπείρονται σε διάφορα μέρη όπως τα επιφανειακά ύδατα, το έδαφος και τα ιζήματα. Οι πιθανές επιπτώσεις των φαρμάκων για ανθρώπινη χρήση στο περιβάλλον εξαρτάται από τη σταθερότητα και τη βιολογική δράση των προϊόντων μετασχηματισμού. Η διασπορά και η τύχη των φαρμακευτικών ενώσεων εξαρτάται από διάφορους παράγοντες όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φαρμάκου, και σε διεργασίες όπως ο διαχωρισμός στο έδαφος και τα ιζήματα και η διάσπαση στο υδάτινο περιβάλλον και το έδαφος. Τα περιβαλλοντικά

χαρακτηριστικά όπως το κλίμα και το είδος το εδάφους επηρεάζουν με τη σειρά τους την τύχη και τη συμπεριφορά των φαρμακευτικών ενώσεων. Οι έρευνες για την τύχη των φαρμακευτικών ενώσεων στο περιβάλλον αποτελούν πρόκληση τα τελευταία χρόνια. Οι περισσότερες έρευνες εστιάζουν στην τύχη των μητρικών ενώσεων σε σχέση με τους μεταβολίτες και τα προϊόντα μετασχηματισμού αυτών, οι οποίες είναι περισσότερο πιθανό να ανιχνευθούν στα απόβλητα και να οδηγηθούν στο περιβάλλον. Τελευταία, όλο και περισσότερες μελέτες επικεντρώνονται στα προϊόντα αποικοδόμησης και μετασχηματισμού των αναδυόμενων ρύπων στις μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων και τις επιδράσεις της πιθανής τοξικότητάς τους [4].

1.3.1 Οι διεργασίες στις εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων [7,8]

Στις συμβατικές μονάδες επεξεργασίας, οι φαρμακευτικές ενώσεις μπορούν να διασπαστούν λόγω μικροβιακής διάσπασης ή να προσροφηθούν στο έδαφος όπου και στη συνέχεια απορρίπτονται ως λάσπη. Τυπικά, οι συμβατικές μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων χρησιμοποιούν πρωτοβάθμια και δευτεροβάθμια στάδια επεξεργασίας. Μερικές μονάδες μπορούν να χρησιμοποιούν και τριτοβάθμια επεξεργασία. Μετά την επεξεργασία παράγονται τόσο επεξεργασμένα υγρά απόβλητα όσο και στερεά. Τα υγρά απόβλητα συχνά απορρίπτονται σε επιφανειακά ύδατα και τα στερεά απόβλητα, γνωστά ως ενεργός ιλύ, μπορούν να αποτεφρωθούν σε χώρους υγειονομικής ταφής ή να ανακυκλωθούν με τη χρησιμοποίησή τους ως λιπάσματα σε γεωργικά χωράφια.

1.3.1.1 Συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων [7,8]

Η πρωτοβάθμια επεξεργασία των αποβλήτων, γνωστή και ως μηχανική επεξεργασία περιλαμβάνει την εσχάρωση, την αμμοσυλλογή, τη λιποσυλλογή και την πρωτοβάθμια καθίζηση των λυμάτων κατά την οποία απομακρύνεται ένα μέρος των αιωρούμενων στερεών και ένα μέρος των οργανικών ουσιών. Προηγείται το στάδιο της προεπεξεργασίας, κατά το οποίο απομακρύνονται υλικά όπως πανιά, χαλίκια, άμμος, μικρά τεμάχια ξύλου και πλαστικού, λάδια, λίπη κ.λ.π. τα οποία συνήθως προκαλούν ζημίες στο μηχανολογικό εξοπλισμό και προβλήματα στη συντήρηση και τη λειτουργία των Ε.Ε.Λ. Η συνολική απόδοση της πρωτοβάθμιας μηχανικής επεξεργασίας αστικών

λυματών υπολογίζεται στη μειωμένη συγκέντρωση των αιωρούμενων σωματιδίων (total suspended solids, TSS) κατά 40-50% καθώς και στη μείωση του οργανικού φορτίου (biological oxygen demand, BOD₅) κατά 25-30%.

Η δευτεροβάθμια επεξεργασία είναι μια βιολογική επεξεργασία κατά την οποία απομακρύνονται οι βιοαποικοδομήσιμες οργανικές ουσίες και τα αιωρούμενα στερεά με τη χρήση βιολογικών και χημικών διεργασιών. Επιπλέον μπορεί να στοχεύσει και στη μείωση των αζωτούχων (N) και φωσφορικών (P) ενώσεων, που μπορεί να υπάρχουν στα υγρά απόβλητα. Σημειώνεται ότι και η απολύμανση περιλαμβάνεται στον τυπικό ορισμό της συμβατικής δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Η δευτεροβάθμια επεξεργασία διακρίνεται ανάλογα με τους μικροοργανισμούς, οι οποίοι παίζουν το σπουδαιότερο ρόλο και είναι υπεύθυνοι για τη διάσπαση και σταθεροποίηση των οργανικών ουσιών, καθώς και από το διαθέσιμο οξυγόνο, σε:

- αερόβια, κατά την οποία επιτυγχάνεται διάσπαση και σταθεροποίηση από αερόβιους και επαμφοτερίζοντες μικροοργανισμούς
- αναερόβια, κατά την οποία επιτυγχάνεται διάσπαση και σταθεροποίηση από αναερόβιους και επαμφοτερίζοντες μικροοργανισμούς και
- αερόβια-αναερόβια, κατά την οποία επιτυγχάνεται διάσπαση και σταθεροποίηση και από τα τρία είδη των οργανισμών (αερόβιους, αναερόβιους και επαμφοτερίζοντες).

Οι περισσότερες μελέτες των φαρμακευτικών ενώσεων στοχεύουν στην μελέτη απομάκρυνσης κατά τη διάρκεια της πρωτοβάθμιας ή δευτεροβάθμιας επεξεργασίας. Πολλές φαρμακευτικές ενώσεις αναφέρεται ότι ουσιαστικά απομακρύνονται κατά τη διάρκεια δευτεροβάθμιας επεξεργασίας με ενεργό ιλύ, ενώ άλλες απομακρύνονται λιγότερο αποτελεσματικά.

1.3.1.2 Προχωρημένες εγκαταστάσεις επεξεργασίας λυμάτων [7,8]

Είναι προφανές ότι στα λύματα είναι δυνατόν να υπάρχουν και ουσίες οι οποίες προέρχονται από τη βιομηχανία και τη βιοτεχνία και οι οποίες δεν απομακρύνονται στις συμβατικές εγκαταστάσεις επεξεργασίας. Επίσης οι προδιαγραφές για τη διάθεση κατεργασμένων λυμάτων σε αποδέκτες τα νερά των οποίων χρησιμοποιούνται για την ύδρευση οικισμών, είναι πολύ

αυστηρές. Στις περιπτώσεις αυτές επιβάλλεται η χρήση μεθόδων προχωρημένου καθαρισμού, δηλαδή συστημάτων τριτοβάθμιας επεξεργασίας των υγρών αποβλήτων.

Η τριτοβάθμια ή προχωρημένη επεξεργασία έπεται της δευτεροβάθμιας και αποσκοπεί στην περαιτέρω αφαίρεση στερεών, οργανικού φορτίου, χρώματος, αμμωνιακών, νιτρικών, φωσφορικών και άλλων ρυπαντών όπως τα βαρέα μέταλλα, το αρσενικό (As), οι τοξικές οργανικές ενώσεις, τα θειούχα (S^{2-}), τα κυανιούχα (CN^-) κ.λ.π. Οι διατάξεις και οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι:

- η διήθηση με πολλές παραλλαγές όπως η διήθηση χώρου, η διήθηση επιφάνειας κ.λ.π με διάφορους συνδυασμούς διηθητικών μέσων όπως η άμμος, ο ανθρακίτης και διάφορες συνθετικές ίνες και μεμβράνες
- η αντίστροφη ώσμωση
- η χημική επεξεργασία
- οι διεργασίες προχωρημένης οξειδωσης (Advanced Oxidation Processes AOP)
- η προσρόφηση (κυρίως σε ενεργό άνθρακα)
- η ιοντοαλλαγή

1.4 Τεχνικά γλυκαντικά στο περιβάλλον

Τα τεχνητά γλυκαντικά έχουν αναγνωρισθεί πρόσφατα ως περιβαλλοντικοί ρύποι. Αυτό οφείλεται στην παρουσία τους σε διάφορα υδάτινα οικοσυστήματα. Είναι ανθεκτικά στις διαδικασίες επεξεργασίας λυμάτων με αποτέλεσμα να εισάγονται συνεχώς στο υδάτινο περιβάλλον. Μέχρι σήμερα, ωστόσο, η περιβαλλοντική τους συμπεριφορά εξακολουθεί να παραμένει σε μεγάλο βαθμό άγνωστη.

1.5 Προϊόντα μετασχηματισμού φαρμακευτικών ενώσεων και γλυκαντικών

Τα φαρμακευτικά προϊόντα, για ανθρώπινη και κτηνιατρική χρήση, και τα γλυκαντικά απεκκρίνονται με αμετάβλητη μορφή, ως μητρικές ενώσεις ή ως

ελεύθεροι ή συζευγμένοι μεταβολίτες, ή ως προϊόντα μετασχηματισμού (Transformation Products, TPs). Αυτές οι ενώσεις συχνά δεν απομακρύνονται πλήρως κατά την επεξεργασία των λυμάτων άλλα ελαφρώς τροποποιούνται, με αποτέλεσμα τα προϊόντα μετασχηματισμού τους να έχουν συγκρίσιμη ή αυξημένη τοξικότητα έναντι των μητρικών ενώσεων, να ελευθερώνονται στο περιβάλλον και να καταλήγουν στα επιφανειακά και υπόγεια ύδατα [10].

Ο σχηματισμός των προϊόντων μετασχηματισμού γίνεται κυρίως μέσω οξειδωσης, υδροξείλιωσης, υδρόλυσης, σύζευξης, διάσπασης, μεθυλίωσης και διμεθυλίωσης. Ανάλογα με τη διεργασία που λαμβάνει χώρα, τα προϊόντα μπορεί να είναι περισσότερο πολικά και ενώ έχει προβλεφθεί ότι η τοξικότητα τους είναι μικρότερη, υπάρχουν περιπτώσεις όπου ο μετασχηματισμός μπορεί να οδηγήσει σε πιο τοξικά προϊόντα [11].

Τα προϊόντα μετασχηματισμού που παρουσιάζονται στο περιβάλλον μπορούν να ταξινομηθούν σε δυο κύριες κατηγορίες. Σε αυτά που σχηματίζονται από βιοτικές διεργασίες και σε αυτά που σχηματίζονται κάτω από αβιοτικές συνθήκες. Τα προϊόντα βιομετασχηματισμού περιλαμβάνουν τόσο τους ανθρώπινους μεταβολίτες και τα προϊόντα που προκύπτουν από την διάσπαση μέσω μικροβίων όσο και προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται στο περιβάλλον. Τα προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται κάτω από αβιοτικές συνθήκες είναι αποτέλεσμα φωτολυτικής και φωτοκαταλυτικής διάσπασης καθώς επίσης και διαδικασιών επεξεργασίας του νερού όπως οζονόλυση και οξειδωση. Στο Σχήμα 2 παρουσιάζεται η περιβαλλοντική τύχη των αναδυόμενων ρύπων και κύριες πορείες μετασχηματισμού τους .

1.5.1 Προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται κάτω από βιοτικές συνθήκες

Τα προϊόντα μετασχηματισμού από βιοτικές αντιδράσεις μπορούν να χωριστούν σε δύο υποκατηγορίες: α) προϊόντα μετασχηματισμού (μεταβολίτες) από τον ανθρώπινο οργανισμό β) προϊόντα μετασχηματισμού από διάφορους μικροοργανισμούς.

1.5.1.1 Προϊόντα μετασχηματισμού (μεταβολίτες) από τον ανθρώπινο οργανισμό.

Μετά τη λήψη του φάρμακου αυτό χρειάζεται να απορροφηθεί πρώτου φτάσει στο εσωτερικό του σώματος. Στην πλειονότητα των φαρμακευτικών ενώσεων η απορρόφηση πραγματοποιείται με απλή διάχυση. Ωστόσο, η απορρόφηση επηρεάζεται από κάποια φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης όπως το μοριακό βάρος, ο βαθμός ιοντισμού και η σχετική λιποδιαλυτότητα. Οι κυτταρικές μεμβράνες διατηρούν τα συστατικά που επιτρέπουν στις λιπόφιλες ουσίες να διαπεράσουν τις μεμβράνες ταχέως και με σχετική ευκολία. Μετά την απορρόφηση το φάρμακο εισέρχεται στο κυκλοφορικό. Μετά την δράση του, το φάρμακο μπορεί να μεταβολιστεί σε κάποια περισσότερο υδροφιλική ένωση ώστε να απεκκριθεί καθώς εάν το φάρμακο παρέμενε σε λιποφιλική μορφή αυτό θα απορροφούνταν εκ νέου και θα παρέμενε στο σώμα για μεγαλύτερη χρονική περίοδο. Γενικά ο μεταβολισμός των φαρμακευτικών προϊόντων σχηματίζει περισσότερο πολικά προϊόντα με μικρότερη δραστική ικανότητα ώστε να μπορούν να απεκκριθούν από τον οργανισμό με ευκολία. Σε μερικές περιπτώσεις, παράγονται μεταβολίτες με βιολογική δράση ή αυξημένη τοξικότητα [5].

1.5.1.2 Προϊόντα μετασχηματισμού από διάφορους μικροοργανισμούς

Προϊόντα μετασχηματισμού μπορούν να σχηματιστούν από διάφορες μικροβιακές δραστηριότητες σε διάφορα φυσικά και τεχνητά περιβαλλοντικά συστήματα όπως στο έδαφος, στα επιφανειακά ύδατα ή στις μονάδες επεξεργασίας των αποβλήτων.

Λόγω της αυξανόμενης παρουσίας των αναδυόμενων ρύπων στα απόβλητα, ο σχηματισμός των προϊόντων μετασχηματισμού κυρίως στις μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων έχει μελετηθεί εκτενώς σε διάφορες κατηγορίες ενώσεων. Στις μονάδες επεξεργασίας λυμάτων έχει παρατηρηθεί πιο γρήγορη μικροβιακή διάσπαση σε σχέση με τα επιφανειακά ύδατα και το έδαφος καθώς είναι αυξημένη η πυκνότητα από διαφορετικά βακτήρια. Η βιοδιάσπαση των φαρμακευτικών ενώσεων αξιολογείται στο εργαστήριο με πείραμα σε μικρής κλίμακας προσωμοιάζοντας τις συνθήκες που επικρατούν στις ΕΕΛ.

Στις περισσότερες μελέτες παρατηρήθηκαν οξειδωτικές αντιδράσεις όπως υδροξείλωση, οξείδωση, διαλκυλίωση. Άλλες οξειδωτικές αντιδράσεις περιελάμβαναν άνοιγμα δακτυλίου, οξειδωτική απαμίνωση, και οξειδωτική αποχλωρίωση [5,12].

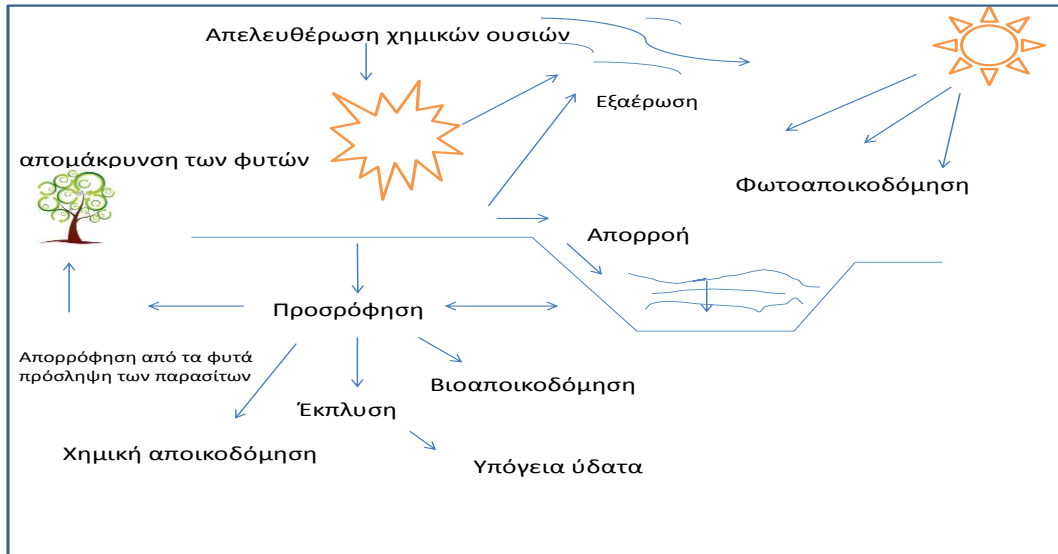
1.4.2 Προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται κάτω από αβιοτικές συνθήκες

Μόλις οι ρύποι απελευθερώνονται στο περιβάλλον, είτε ως επεξεργασμένα είτε ως μη επεξεργασμένα λύματα, υπόκεινται σε διάφορες διεργασίες, όπως αραίωση, φωτοδιάσπαση, βιοαποικοδόμηση και προσρόφηση σε ιζήματα, που συμβάλλουν στην εξάλειψή τους στα περιβαλλοντικά νερά [9].

Το κυριότερο μονοπάτι για τη δημιουργία των προϊόντων μετασχηματισμού κάτω από αβιοτικές συνθήκες είναι οι διεργασίες κατά τη διάρκεια επεξεργασίας του νερού και επιπλέον η φωτοαποικοδόμηση και η φωτοκαταλυτική αποικοδόμηση. Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν πολλές μελέτες γύρω από την αποικοδόμηση και την απομάκρυνση των αναδυόμενων ρύπων, αλλά μόνο τα τελευταία χρόνια οι μελέτες επικεντρώνονται στο σχηματισμό των προϊόντων μετασχηματισμού.

Αντιδράσεις οξείδωσης όπως χλωρίωση, χλωραμίνωση, οζονόλυση και οξείδωση από UV/H₂O₂ επεξεργασία είναι οι κυριότερες διεργασίες στην προηγμένη επεξεργασία του νερού για την απολύμανση και την απομάκρυνση των επικίνδυνων προσμίξεων. Ωστόσο κατά τη διάρκεια αυτών των διεργασιών, πλήθος άλλων ενώσεων σχηματίζονται οι οποίες μπορεί να εμφανίζουν ανεπιθύμητες ενέργειες στην υδάτινη ζωή αλλά και στον άνθρωπο. Γενικά, τα προϊόντα μετασχηματισμού που σχηματίζονται εξαρτώνται από τις συνθήκες των διεργασιών, όπως οι φυσικοχημικές ιδιότητες της μήτρας και οι συγκεκριμένες συνθήκες της επεξεργασίας.

Όλες αυτές οι διεργασίες συνήθως αναφέρονται ως προηγμένες διεργασίες οξείδωσης και προηγμένες τεχνολογίες οξείδωσης είτε μερικές φορές ως ενισχυμένες διεργασίες οξείδωσης. [11].



Σχήμα 1: Περιβαλλοντική τύχη των αναδυόμενων ρύπων και κύριες πορείες μετασχηματισμού τους [13].

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΤΕΧΝΙΚΗ ΥΓΡΟΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ-ΦΑΣΜΑΤΟΜΕΤΡΙΑΣ ΜΑΖΩΝ ΜΕ ΑΝΑΛΥΤΗ ΤΕΤΡΑΠΟΛΟΥ ΧΡΟΝΟΥ ΠΤΗΣΗΣ - ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΠΑΡΑΠΡΟΪΟΝΤΩΝ

2.1 Εισαγωγή

Στις μέρες μας, η υγροχρωματογραφία (liquid chromatography, LC) συνδεδεμένη με τη φασματομετρία μάζας χρησιμοποιώντας ποικιλία αναλυτών μαζών είναι η κυριότερη τεχνική που χρησιμοποιείται στην μελέτη των οργανικών ρύπων στα περιβαλλοντικά δείγματα και σε πληθώρα άλλων δειγμάτων. Οι ανιχνευτές μαζών που χρησιμοποιούνται συχνότερα περιλαμβάνουν τριπλό τετραπόλο (triple quadrupole, QqQ), ανιχνευτή χρόνου πτήσης (time-of-flight, TOF), υβριδικό ανιχνευτή τετραπόλου- χρόνου πτήσης (QTOF), παγίδα ιόντων (ion-trap, IT) ή το orbitrap. Οι αναδεδεμένοι ρύποι, όπως τα φαρμακευτικά προϊόντα ελέγχονται στο περιβάλλον με υγροχρωματογραφία συνδεδεμένη με τη φασματομετρία μάζας εξαιτίας της υψηλής πολικότητας τους και της χαμηλής μεταβλητότητας τους. Ομοίως αυτό ισχύει και στους μεταβολίτες και τα προϊόντα μετασχηματισμού των φαρμακευτικών ενώσεων, τα οποία συνήθως είναι περισσότερο πολικά σε σχέση με τις μητρικές του ενώσεις.

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ή τεχνική της υγροχρωματογραφίας/Φασματομετρίας Μαζών (Liquid Chromatography/Mass Spectrometry) με αναλυτή χρόνου πτήσης (Time Of Flight, TOF) σε σειρά με τετράπολο (quadrupole, Q).

2.2 Φασματομετρία Μαζών σε σύζευξη με LC (LC-MS)

Η σύζευξη της χρωματογραφίας με τη φασματομετρία μαζών έχει ως αποτέλεσμα ένα πολύ ισχυρό συνδυασμό με μεγάλη αποτελεσματικότητα. Χαρακτηριστικά θα πρέπει να τονιστεί ότι ο συνδυασμός GC-MS είναι το όργανο αναφοράς για τον προσδιορισμό πολλών πτητικών-ημιπτητικών ενώσεων, ενώ ο συνδυασμός LC-MS είναι το όργανο αναφοράς για την

ανάλυση των υπόλοιπων τάξεων ενώσεων (μεγαλομόριων, μη πτητικές, θερμοευαίσθητες ενώσεις).

Η σύζευξη της φασματομετρίας μαζών με υγροχρωματογραφία ήταν για πολλά χρόνια το αντικείμενο της έρευνας, τόσο από την πλευρά της χρωματογραφίας, όσο και από την πλευρά της φασματομετρίας μαζών. Από την πλευρά της χρωματογραφίας τα μεγάλα κέρδη από την σύζευξη είναι:

- i. Η εφαρμογή ενός ολικού ανιχνευτή.
- ii. Η μεγάλη ευαισθησία της τεχνικής.
- iii. Η μεγάλη εκλεκτικότητα της μεθόδου (απόλυτη ταυτοποίηση) .
- iv. Η δυνατότητα ταυτοποίησης άγνωστων ενώσεων σε άγνωστα δείγματα.

Από την πλευρά της φασματομετρίας μαζών τα κέρδη είναι:

- i. Η άμεση εισαγωγή μη πτητικών ενώσεων χωρίς την ανάγκη τροποποίησης του μορίου της προσδιοριζόμενης ένωσης.
- ii. Η εκμετάλλευση της υψηλής διαχωριστικής ικανότητας της υγροχρωματογραφίας.
- iii. Ο περιορισμός ανεπιθύμητων φαινομένων (π.χ μείωση της απόδοσης ιοντισμού λόγω επίδρασης υποστρώματος) λόγω της κλασματοποίησης περίπλοκων δειγμάτων.

Η σύζευξη με υγρή χρωματογραφία (LC-MS) εφαρμόζεται στις περιπτώσεις που απαιτείται ο προσδιορισμός ενώσεων, των οποίων ο προσδιορισμός δεν είναι εφικτός με GC, π.χ ενώσεων που είτε δεν είναι πτητικές, είτε διασπώνται σε αυξημένη θερμοκρασία. Στην κατηγορία αυτή ουσιαστικά εντάσσεται η πλειοψηφία των βιολογικά δραστικών ενώσεων, γι'αυτό και αποτελεί το πιο σημαντικό εργαλείο στην έρευνα των οργανικών ρύπων στα περιβαλλοντικά δείγματα και σε πληθώρα άλλων δειγμάτων.

Η σύζευξη με υγροχρωματογραφία απαιτεί τη χρήση διάταξης σύζευξης (interface) αφού ουσιαστικά το ζητούμενο είναι η σύζευξη δυο ασύμβατων τεχνικών. Το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο είναι ο ηλεκτροψεκασμός (electrospray) [14-17].

2.3 Φασματομετρία μαζών σε σειρά (Tandem MS)

Για την ταυτοποίηση της δομής μιας ένωσης πολύ συχνά απαιτούνται από τη Φασματομετρία Μαζών περισσότερες πληροφορίες από τη μάζα του μοριακού ιόντος (δηλαδή το μοριακό βάρος της ένωσης). Για το λόγο αυτό είναι μεγάλης σημασίας η θραυσματοποίηση της ένωσης σε χαρακτηριστικά θραύσματα. Η αναγνώριση της ταυτότητας αυτών των θραυσμάτων μας επιτρέπει στη συνέχεια να έχουμε μια ασφαλέστερη αναγνώριση της δομής της αρχικής ένωσης. Τυπικά εμπορικά διαθέσιμα φασματομέτρα μαζών είναι: Τριπλό τετράπολο (triple quadrupole, QqQ), τετραπολική παγίδα ιόντων (Quadrupole Ion Trap, QIT), αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης (Time of Flight, TOF), γραμμική παγίδα ιόντων (Orbitrap) και ο αναλυτής μαζών κυκλοτρονικού συντονισμού ιόντων με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance, FT-ICR).

Συνοπτικά, όργανα όπως το τριπλό τετράπολο και η τετραπολική παγίδα ιόντων είναι οι τεχνολογίες που επιστρατεύονται για ποσοτικές αναλύσεις ρουτίνας. Αυτοί οι αναλυτές προσφέρουν υψηλή ευαισθησία και εκλεκτικότητα αλλά λειτουργούν με χαμηλή διακριτική ικανότητα ($FWHM=0,7$ Da) και στην περίπτωση του τριπλού τετραπόλου υπάρχει και χαμηλή ευαισθησία σε λειτουργία πλήρους σάρωσης γεγονός που καθιστά τον αναλυτή μαζών μη ικανοποιητικό για ανάλυση αγνώστων ουσιών. Οι σύγχρονοι αναλυτές μαζών χρόνου πτήσης έχουν υψηλή ταχύτητα και είναι ικανοί να έχουν διακριτική ικανότητα έως 40,000 αλλά όμως έχουν χαμηλή ευαισθησία και περιορισμένη γραμμική δυναμική περιοχή, μειονεκτήματα που ωστόσο τείνουν να απαλειφθούν

Συνδυασμός δύο ή περισσότερων αναλυτών μαζών δημιουργούν τα λεγόμενα υβριδικά όργανα όπως το τετράπολο-αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης (QTOF) ή γραμμική ιοντική παγίδα (orbitrap) που αναδεικνύουν υψηλές ικανότητες ανίχνευσης και ταυτοποίησης ουσιών με χαμηλά μοριακά βάρη σε διαφορετικές μήτρες [18]. Στη σύγχρονη περιβαλλοντική ανάλυση αλλά και σε άλλα ερευνητικά πεδία όπως η μεταβολομική επιστρατεύονται κυρίως αναλυτές QTOF ή Orbitrap εξαιτίας της χρήσης της λειτουργίας συνεχούς καταγραφής φασμάτων πλήρους σάρωσης. Έτσι είναι εφικτό να ανευρεθούν αναμενόμενα συστατικά αλλά και εντελώς άγνωστα συστατικά σε

ένα πολύπλοκο δείγμα. Δηλαδή καθίσταται εφικτή η λεγόμενη μετά τις μετρήσεις διερεύνηση των δεδομένων (post-run data acquisition) [19]. Η χρήση φασματομέτρων μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας με αναλυτές μαζών Orbitrap και TOF παρέχουν τόσο υψηλή ακρίβεια μάζας όσο και υψηλή διακριτική ικανότητα σε λειτουργία πλήρους σάρωσης και έτσι καθιστά εφικτή την ανίχνευση θεωρητικά απεριόριστου αριθμού οργανικών ρύπων [20].

2.5 Μέθοδοι προσδιορισμού παραπροϊόντων

Για την επίτευξη του προσδιορισμού των προϊόντων μετασχηματισμού τρεις είναι οι κυριότερες τεχνικές που χρησιμοποιούνται. Η στοχευμένη σάρωση (target screening), στην οποία τα προϊόντα μετασχηματισμού είναι γνωστά και ταυτοποιούνται μέσω προτύπων διαλυμάτων. Η σάρωση πιθανών ενώσεων (suspect screening), οι οποίες προκύπτουν από τα βιβλιογραφικά δεδομένα είτε από ειδικά λογισμικά πρόβλεψης. Τέλος, η μη στοχευόμενη σάρωση (non target screening) άγνωστων προϊόντων μετασχηματισμού τα οποία προκύπτουν μέσω εξελιγμένων λογισμικών επεξεργασίας δεδομένων.

2.5.1 Στοχευμένη σάρωση (target screening)

Στη στοχευμένη σάρωση τα προϊόντα μετασχηματισμού είναι εκ των προτέρων γνωστά, περιλαμβάνονται σε καθορισμένη μέθοδο MS και μπορούν να παρακολουθούνται μέσω αναλύσεων ρουτίνας και της χρήσης προτύπων αντιδραστηρίων.

Η υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματομετρία μαζών (LC-MS/MS) με τριπλό τετράπολο (QqQ), σε λειτουργία παρακολούθησης επιλεγμένη αντίδρασης (Selected Reaction Monitoring, SRM) αποτελεί την κινητήρια δύναμη στη στοχευμένη ανάλυση. Λόγω της εξαιρετικής ευαισθησίας και της αξιοσημείωτης εκλεκτικότητας που επιτυγχάνεται με τη χρήση της LC-MS/MS, γίνεται δυνατή η αξιόπιστη ποσοτικοποίηση και ταυτοποίηση ενός σημαντικού αριθμού ενώσεων. Γενικά, υπήρχε η ανάγκη στο τομέα της δημόσιας υγείας για την ανάπτυξη αξιόπιστων μεθόδων για την μεγάλη κλίμακας σάρωση, οι οποίες να είναι ικανές για την ανίχνευση και ταυτοποίηση μεγάλου αριθμού τοξικών ενώσεων οι οποίες μπορεί να υπάρχουν στο περιβάλλον. Για αυτό το λόγο, οι τεχνικές στοχευμένης

σάρωσης φάσματος είναι ικανές να παρέχουν μετρήσεις ακρίβειας μάζας μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετική βοήθεια.

Για να επιλυθούν οι περιορισμοί που παρουσιάζονται, χρησιμοποιούνται δυο κύριες εναλλακτικές που βασίζονται στη χρήση οργάνων υψηλής διακριτικής ικανότητας όπως οι αναλυτές χρόνου πτήσης και οι αναλυτές Orbitrap. Και οι δυο αναλυτές παρέχουν δεδομένα με φάσματα πλήρους σάρωσης και ακρίβεια μάζας με ικανοποιητική ευαισθησία. Αυτές οι δυνατότητες είναι πολύ χρήσιμες όχι μόνο για την ανίχνευση και ποσοτικοποίηση γνωστών ρύπων αλλά και για πληθώρα άγνωστων προσμίξεων οι οποίες μπορεί να αποτελούν κίνδυνο για την ανθρώπινη υγεία.

Παρόλο που έχει δημοσιευτεί πλήθος εφαρμογών ποσοτικοποίησης χρησιμοποιώντας LC-TOF-MS ή LC-QTOF-MS, η ποσοτικοποίηση δεν αποτελεί το πιο ελκυστικό χαρακτηριστικό αυτών των ανιχνευτών. Αυτό οφείλεται στα μεγαλύτερα όρια ανίχνευσης και του στενότερου γραμμικού δυναμικού εύρους. Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές του TOF-MS με ευρύ πεδίο εφαρμογής, είναι η σάρωση μεγάλου αριθμού προσμίξεων και υπολειμμάτων σε διαφορετικούς τύπους δειγμάτων, καθώς παρέχουν πληθώρα χρήσιμων πληροφοριών για ενώσεις οι οποίες μπορούν να ιοντιστούν στα δείγματα τα οποία εμπεριέχονται. Η επεξεργασία των δειγμάτων και ο χρωματογραφικός διαχωρισμός απαιτούνται ώστε να διευρύνουν το αντικείμενο της μεθόδου σε όσο το δυνατόν περισσότερους αναλύτες.

2.5.2 Σάρωση πιθανών ενώσεων (suspect screening)

Η τεχνική της σάρωσης πιθανών ενώσεων χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενώσεων που είναι πιθανόν να υπάρχουν σ'ένα δείγμα και δεν υπάρχουν διαθέσιμα πρότυπα για την επιβεβαίωση της ανίχνευσης τους αλλά ο συντακτικός τύπος και η μοριακή τους δομή μπορούν να προβλεφθούν.

Ακόμα, χρησιμοποιείται για την ανίχνευση των προϊόντων μετασχηματισμού, όπου πιο κρίσιμος παράγοντας είναι η πρόβλεψη των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού. Διάφορα υπολογιστικά εργαλεία χρησιμοποιούνται, στόχος των οποίων είναι να προβλέψουν τα αερόβια/αναερόβια μονοπάτια της βιομετατροπής. Από αυτά μόνο το

CATABOL και το σύστημα πρόβλεψης μεταβολιτών μονοπατιών του EAWAG-PPS είναι προς το παρόν υπό συνεχή ανάπτυξη. Και στα δύο συστήματα, η πρόβλεψη βασίζεται σε μια εκτενή συλλογή από γνωστές ενζυμικές αντιδράσεις, με βάση τις οποίες έχουν συνταχθεί οι κανόνες μετασχηματισμού.

Η ακριβής μάζα εξάγεται από το χρωματογράφημα ενώ περαιτέρω πληροφορίες για την τελική προτεινόμενη δομή εξάγονται μέσω της αξιολόγησης του χρόνου ανάσχεσης (retention time, t_R), της ισοτοπικής αναλογίας, της αποτελεσματικότητας του ιοντισμού, και του φάσματος MS/MS (ή MS^n).

2.5.3 Μη στοχευμένη σάρωση (non-target screening)

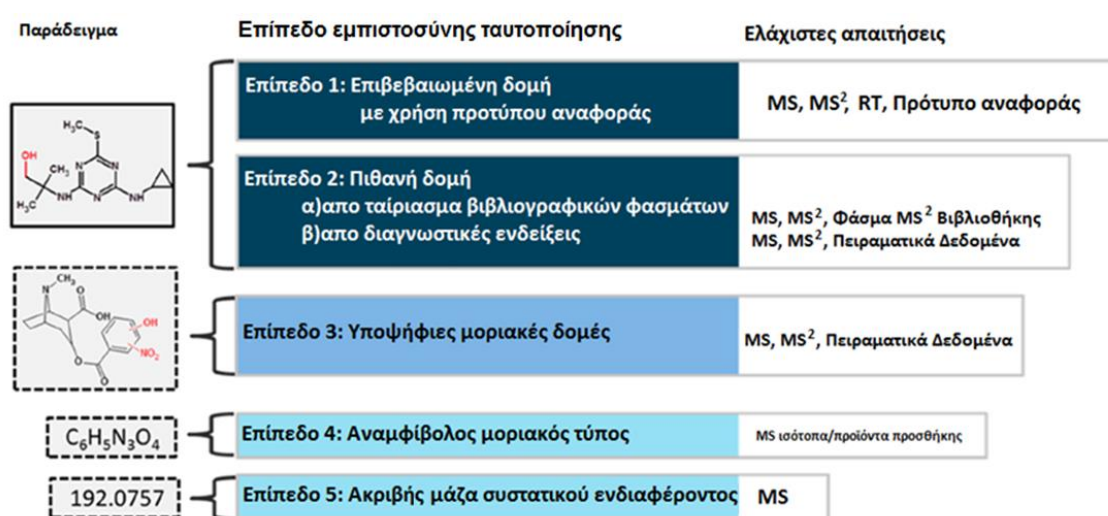
Η μη στοχευμένη σάρωση χρησιμοποιείται για την ανίχνευση ενώσεων για τις οποίες δεν έχουμε επαρκή γνώση. Όσον αφορά στην ανίχνευση των προϊόντων μετασχηματισμού, η γνώση ορισμένων χαρακτηριστικών της μητρικής ένωσης, όπως ο συντακτικός τύπος, ο χρόνος ανάσχεσης, οι διάφορες φυσικοχημικές της ιδιότητες και το φάσμα MS/MS, μπορεί να διευκολύνουν την ταυτοποίηση, προτείνοντας πιθανές δομές.

Τα βασικά στάδια της μη στοχευμένης ανάλυσης είναι η επιλογή των κορυφών που μπορεί να οφείλονται σε προϊόντα μετασχηματισμού μετά από σύγκριση με λευκά δείγματα (blank samples) και δείγματα ελέγχου (control samples), η απομάκρυνση κορυφών που οφείλονται σε χρωματογραφικό θόρυβο, η σύζευξη των κορυφών που οφείλονται σε ισότοπα και σε προϊόντα προσθήκης, η εξαγωγή του συντακτικού τύπου και τέλος η αναζήτηση για την ταυτοποίηση των ουσιών σε βιβλιοθήκες όπως: ChemSpider, PubChem, DAIOS database και NIST. Αυτές οι βιβλιοθήκες φασμάτων μάζας βασίζονται σε βάσεις δεδομένων της μοριακής δομής και δημιουργούνται για να επιτρέπουν την αύξηση του αριθμού των ενώσεων που μπορούν να αναζητηθούν καθώς αυτές χρησιμοποιούν υπολογισμούς για την ακρίβεια μάζας και το ισοτοπικό αποτύπωμα για την επιβεβαίωση. Αυτές οι πειραματικές βιβλιοθήκες προσφέρουν πληροφορίες για τη θρασματοποίηση και τους χρόνους έκλυσης προσφέροντας περισσότερη σιγουριά στις διαδικασίες ανίχνευσης και ταυτοποίησης των ενώσεων. Ωστόσο, η

πιθανότητα για την ανίχνευση και την ταυτοποίηση χρησιμοποιώντας και τα δύο είδη βιβλιοθηκών στη μη στοχευμένη σάρωση εξαρτάται από την επιτυχία διαχωρισμού των κορυφών της επιθυμητής ένωσης από της παρεμβαλλόμενες πιθανές κορυφές από το δείγμα. Κατά κανόνα, όσο πιο πολύπλοκη είναι η μήτρα του δείγματος τόσο πιο δύσκολος είναι αυτός ο διαχωρισμός [12,25].

2.6 Επίπεδα ταυτοποίησης από μη στοχευμένη ανάλυση με HRMS [26]

Έχουν προταθεί τα ακόλουθα πέντε επίπεδα ταυτοποίησης για τη μη στοχευμένη και ύποπτη σάρωση:



Εικόνα 1: Προτεινόμενα επίπεδα ταυτοποίησης αναλυτών μέσω φασματομετρίας μαζών υψηλής διακριτικής ικανότητας [26]

Το επίπεδο 5 οδηγεί στην ανίχνευση της ακριβούς μάζας ενός συστατικού, μπορεί να μετρηθεί σε ένα δείγμα και να είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος σε μια έρευνα, αλλά υπάρχει ελλιπής πληροφορία για να αποδοθεί ένας μοριακός τύπος. Μη στοχευμένες μέθοδοι που επιτρέπουν την εύρεση αυτών των μαζών σε άλλες έρευνες επιτρέπονται αλλά το επίπεδο αυτό υπονοεί ότι δεν υπάρχει κατηγορηματική πληροφορία για τη δομή ή τον μοριακό τύπο. Είναι ακόμα πιθανόν να έχει καταγραφεί φάσμα MS/MS μιας μάζας επιπέδου πέντε και να σωθεί ως άγνωστο φάσμα. Αυτό το επίπεδο μπορεί μόνο να εφαρμοστεί σε λίγες μάζες ειδικού ενδιαφέροντος αφού θα μπορούσε να είναι αντιπαραγωγικό να τεθούν ταμπέλες σε όλες τις μάζες σε ένα δείγμα ως επίπεδο πέντε. Στο επίπεδο αυτό είναι σημαντικό να

διασφαλιστεί ότι η μάζα δεν υπάρχει στο τυφλό δείγμα και άρα δεν προκύπτει από τα στάδια προκατεργασίας του δείγματος [26].

Το επίπεδο 4 υποδηλώνει ότι υπάρχει αναμφίβολος μοριακός τύπος. Ο μοριακός τύπος μπορεί να αποδοθεί χρησιμοποιώντας τη πληροφορία από τα φάσματα (π.χ. προϊόντα προσθήκης, ισοτοπικές κορυφές ή πληροφορία θραυσμάτων) αλλά δεν υπάρχουν επαρκή στοιχεία για να προταθούν δομές. Το φάσμα MS/MS μπορεί να μην περιέχει σαφείς πληροφορίες παρεμποδίσσεις ή ακόμα και να μην είναι διαθέσιμο. Παρόλα αυτά ο μοριακός τύπος παρέχει κάποια πληροφορία που είναι άξια παρουσίασης καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μελλοντικές έρευνες.

Το επίπεδο 3 υποδηλώνει ότι υπάρχουν υποψήφια δομές και περιγράφει μια γκρίζα ζώνη όπου υπάρχουν αποδείξεις για πιθανές δομές αλλά μη επαρκής πειραματική πληροφορία, έτσι ώστε να οδηγηθούμε σε μία μόνο επακριβή δομή (για παράδειγμα έχουν προκύψει πιθανές ισομερείς δομές). Παρόλο που υπάρχει αβεβαιότητα μεταξύ των πιθανών καταστάσεων, η ακριβής δομή παραμένει θεωρητική. Μπορούμε να οδηγηθούμε σε αυτό το επίπεδο ταυτοποίησης αν προκύψουν δομές με υψηλή βαθμολογία ταύτισης στις οποίες ταυτίζονται σε μεγάλο βαθμό το πειραματικό φάσμα MS/MS με το *in silico* φάσμα. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρόσθετη πληροφορία η υψηλή πιθανότητα μετασχηματισμού ενός συστατικού, ο αριθμός αναφορών ενός συστατικού σε χημικές βιβλιοθήκες (ChemSpider) ή η συμπεριφορά του ως προς το χρόνο ανάλυσης.

Το επίπεδο 2 υποδηλώνει ότι υπάρχει μόνο μία πιθανή δομή που μπορεί να προταθεί και έχει προκύψει από διαφορετικές ενδείξεις. Το επίπεδο δυο χωρίζεται σε δυο υποεπίπεδα, το 2A και το 2B. Για το επίπεδο 2A πρέπει να περιλαμβάνεται αναμφίβολη σύμπτωση του πειραματικού φάσματος MS/MS με φάσματα από βιβλιογραφία ή από βιβλιοθήκες φασμάτων. Πρέπει να ληφθεί μέριμνα ώστε τα υπο σύγκριση φάσματα να έχουν παρθεί με ίδιες παραμέτρους (ενέργεια διάσπασης, ιοντισμός, επίπεδο MS) προκειμένου να διασφαλιστεί η εγκυρότητα και η ταύτιση και τα κριτήρια επιλογής πρέπει να αναπαρίσταται με σαφήνεια. Επιθυμητή επιπλέον είναι η ένδειξη όπως η συμπεριφορά του χρόνου ανάλυσης. Στο επίπεδο 2B, που καλείται και διαγνωστικό επίπεδο, υπάρχουν διαγνωστικά θραύσματα από φάσμα MS/MS.

Υποδηλώνει την περίπτωση στην οποία δεν υπάρχουν άλλες ισομερείς δομές που να ταιριάζουν με το πειραματικό φάσμα, αλλά όμως δεν υπάρχει πρότυπο ή βιβλιογραφικό φάσμα για επιβεβαίωση. Οι ενδείξεις μπορούν να περιλαμβάνουν θραύσματα MS/MS ή/και συμπεριφορά ιοντισμού, πληροφορίες για το αρχικό συστατικό και πειραματικές πληροφορίες.

Τέλος, το επίπεδο 1 υποδειλώνει την ιδανική κατάσταση, στην οποία υπάρχει επιβεβαιωμένη δομή και η επιβεβαίωση έχει πραγματοποιηθεί με τη χρήση προτύπου αναφοράς και σύγκριση των φασμάτων MS, MS/MS και ταύτιση μέσω χρόνου ανάλυσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΕΜΦΑΝΙΣΗΣ ΚΑΙ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ

Εξαιτίας της ευρείας κατανάλωσης τους, οι φαρμακευτικές ενώσεις και τα τεχνικά γλυκαντικά αποτελούν τις πιο συχνά μελετούμενες κατηγορίες αναδυόμενων ρύπων. Τα πλέον συνταγογραφούμενα φάρμακα ανά τον κόσμο όπως η ρανιτιδίνη, η λιδοκαΐνη, η σιταλοπράμη, η μετορμίνη, η τραμαδόλη κλπ έχουν έντονη παρουσία στο περιβάλλον. Παρ'όλα αυτά η παρουσία τους δεν είναι τόσο σημαντικά μεγάλη συγκρινόμενη με άλλες κατηγορίες φαρμάκων όπως τα διουρητικά πχ φουροσεμίδιο, εφεδρίνη, υδροχλωροθειαζίδιο κλπ [32,40-44]. Επίσης, τεχνικά γλυκαντικά όπως το κυκλαμικό, η σουκραλόζη, η σακχαρίνη κλπ χρησιμοποιούνται σε πάνω από 6.000 τρόφιμα. Έχουν κεντρίσει, λοιπόν, το παγκόσμιο ενδιαφέρον των επιστημονικών ερευνών τα τελευταία χρόνια λόγω της ανίχνευσής τους σε διάφορα υδατικά περιβαλλοντικά δείγματα, όπως εισερχόμενα και εξερχόμενα δείγματα των ΕΕΛ, επιφανειακά ύδατα, νερά ποταμού και πόσιμο νερό. Λόγω της εμφάνισης των αναδυόμενων ρύπων τόσο στα μη επεξεργασμένα όσο και στα επεξεργασμένα λύματα, η δημιουργία προϊόντων μετασχηματισμού αυτών των ενώσεων κατά τις διεργασίες απομάκρυνσης και απολύμανσης των ΕΕΛ καθώς και η μελέτη της τοξικότητάς τους όλο και περισσότερο κερδίζει την προσοχή των επιστημονικών ερευνών. Για τους παραπάνω λόγους αποφασίσαμε να μελετήσουμε την απομάκρυνση εννιά φαρμακευτικών ενώσεων (ρανιτιδίνη, λιδοκαΐνη, μετορμίνη, τραμαδόλη, τοπιραμάτη, φουροσεμίδιο, εφεδρίνη, υδροχλωροθειαζίδιο, σιταλοπράμη) και ενός τεχνικού γλυκαντικού (κυκλαμικό), καθώς και την ταυτοποίηση προϊόντων βιομετατροπής τους σε συστήματα ενεργού ιλύος.

Η ρανιτιδίνη (ranitidine, RAN) είναι ένας ισχυρός ανταγωνιστής της ισταμίνης, με πολύ γρήγορη δράση. Χρησιμοποιείται στη θεραπεία του έλκους στομάχου και δωδεκαδακτύλου, σε περιπτώσεις γαστροοισοφαγικής παλινδρόμησης καθώς και σε περιπτώσεις αυξημένης γαστρικής οξύτητας. Η ρανιτιδίνη μεταβολίζεται στο ήπαρ. Στον άνθρωπο ο κύριος μεταβολίτης είναι το N-οξειδίο της ρανιτιδίνης (N-oxideRAN) σε ποσοστό 6% της δόσης.

Άλλοι μεταβολίτες είναι το S-οξειδίο της ρανιτιδίνης (S-oxideRAN) και η απομεθυλιωμένη ρανιτιδίνη (desmethylranitidine) σε πολύ μικρότερα ποσοστά. Περίπου το 30% της ένωσης αποβάλλεται αμετάβλητο και περνά στο υδάτινο περιβάλλον.

Η λιδοκαΐνη (lidocaine, LDC), επίσης γνωστή και ως ξυλοκαΐνη, είναι τοπικό αναισθητικό και ανήκει στην κατηγορία των αμινοαμιδίων. Η έναρξη της δράσης της λιδοκαΐνης είναι περίπου 45 έως 90 δευτερόλεπτα και διαρκεί 10 έως 20 λεπτά. Το 95% περίπου μεταβολίζεται στην ήπαρ προς τον ενεργό μεταβολίτη απομεθυλιωμένης λιδοκαΐνης (diethyl LDC, MEGX) και στη συνέχεια προς το ανενεργό ξυλιδικό της γλυκίνης (EGX). Ο MEGX έχει μεγαλύτερη ημίσεια ζωή από ό,τι η λιδοκαΐνη, αλλά επίσης είναι λιγότερο ισχυρός [63]. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της λιδοκαΐνης είναι 90-120 λεπτά στους περισσότερους ασθενείς. [64] Η λιδοκαΐνη αποβάλλεται στα ούρα (το 90% με τη μορφή μεταβολιτών και το 10% με την αναλλοίωτη μορφή του φαρμάκου) [65].

Η σιταλοπράμη (citalopram, CTR) είναι εκλεκτικός αναστολέας επαναπρόσληψης σεροτονίνης (SSRIs). Ανήκει στη κατηγορία φαρμάκων που χρησιμοποιούνται συνήθως ως αντικαταθλιπτικά για τη θεραπεία καταθλιπτικής διαταραχής και αγχώδους διαταραχής. Η σιταλοπράμη μεταβολίζεται στο ήπαρ. Μεταβολίτες της είναι η αποθυλιωμένη σιταλοπράμη (desmethylcitalopram, desmethyl-CTR) και η διαποθυλιωμένη σιταλοπράμη (didesmethylcitalopram, didesmethyl-CTR). Ο χρόνος ημίσειας ζωής της σιταλοπράμης είναι περίπου 35 ώρες. Το 85% αποβάλλεται από το ήπαρ και το 25% από τα νεφρά. Βρέθηκε ότι ο βιομετασχηματισμός της σιταλοπράμης σε ζώα αναστέλλεται στην έκθεση στον καπνό του τσιγάρου, γεγονός που υποδηλώνει ότι ο ρυθμός απομάκρυνσης της σιταλοπράμης μειώνεται μετά από έκθεση σε καπνό. Μετά την ενδογαστρική χορήγηση, ο χρόνος ημίσειας ζωής του ρακεμικού μίγματος της σιταλοπράμης αυξήθηκε κατά περίπου 287%. [66]

Η εφεδρίνη (ephedrine, EPH) είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για την πρόληψη της χαμηλής αρτηριακής πίεσης. Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για το άσθμα, τη ναρκοληψία και την παχυσαρκία. Μπορεί να ληφθεί από το στόμα ή με ένεση. Η δράση της εφεδρίνης με ενδοφλέβια ένεση

είναι γρήγορη, ενώ η δράση της με χορήγηση από το στόμα μπορεί να διαρκέσει μία ώρα. Όταν χορηγείται με ένεση διαρκεί περίπου μία ώρα ενώ όταν λαμβάνεται από το στόμα μπορεί να διαρκέσει έως και τέσσερις ώρες [67]. Η εφεδρίνη μπορεί να ποσοτικοποιηθεί στο αίμα ή στα ούρα για την παρακολούθηση ενδεχόμενης κατάχρησης από τους αθλητές. Χαρακτηρίζεται ως «τονοτικό» (stimulant) και αποτελεί πρόδρομη ένωση για τη σύνθεση μεθαμφεταμίνης της οποίας η χρήση είναι παράνομη.

Η μετφορμίνη (metformine, MET) είναι το πλέον συνταγογραφούμενο φάρμακο για τη θεραπεία του διαβήτη τύπου 2 [68-69]. Αυτό ισχύει ιδιαίτερα σε ανθρώπους που είναι υπέρβαροι [70]. Επίσης χρησιμοποιείται για τη θεραπεία του συνδρόμου πολυκυστικών ωοθηκών [68]. Η μετφορμίνη μειώνει την υπεργλυκαιμία κατά κύριο λόγο από την καταστολή της παραγωγής γλυκόζης στο ήπαρ [71]. Παράλληλα, αυξάνει την ευαισθησία στην ινσουλίνη [73], και μειώνει την απορρόφηση της γλυκόζης από το γαστρεντερικό σωλήνα. Η μετφορμίνη δεν ανιχνεύεται στο πλάσμα του αίματος εντός 24 ωρών [72,74]. Ο μέσος χρόνος ημίσειας ζωής στο πλάσμα είναι 6,2 ώρες. Η μετφορμίνη κατανέμεται στα ερυθρά αιμοσφαίρια, με πολύ μεγαλύτερο χρόνο ημίσειας ζωής, 17,6 ωρών [72].

Η τραμαδόλη (tramadol, TRA) είναι ένα οπιοειδές φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία μέτριου έως σοβαρού πόνου [75]. Όταν λαμβάνεται ως πόσιμο σκεύασμα άμεσης αποδέσμευσης, η έναρξη της ανακούφισης από τον πόνο συμβαίνει μέσα σε περίπου μία ώρα [76]. Έχει δύο διαφορετικούς μηχανισμούς δράσης. Ο πρώτος μηχανισμός περιλαμβάνει την πρόσδεση στον υποδοχέα μ-οπιοειδών, ενώ ο δεύτερος αναστέλλει την επαναπρόσληψη της σεροτονίνης και νορεπινεφρίνης [77-78]. Η ταμαδόλη υφίσταται ηπατικό μεταβολισμό κυρίως προς τα αποθυλιωμένα παράγωγά της (O - και N -demethylated) και στη συνέχεια σε πέντε διαφορετικούς μεταβολίτες. Από αυτά, το O-desmethyltramadol είναι το σημαντικότερο, το οποίο είναι ένα πιο ισχυρό οπιοειδές. Έχει χρόνο ημίσειας ζωής εννέα ώρες, ενώ η ταμαδόλη έξι ώρες.

Το κυκλαμικό (cyclamate, CYC), με κωδικό 952, είναι μια τεχνητή γλυκαντική ουσία και έχει 30-50 φορές πιο γλυκιά γεύση από τη σακχαρόζη. Είναι λιγότερο ακριβό από τα περισσότερα γλυκαντικά, συμπεριλαμβανομένης

της σουκραλόζης, και είναι σταθερό υπό θέρμανση. Κύριος μεταβολίτης του κυκλαμικού στον άνθρωπο είναι η κυκλοεξιλαμίνη (cyclohexylamine). Αν και το κυκλαμικό δεν είναι τοξικό, η κυκλοεξιλαμίνη παρουσιάζει τοξικότητα [82]. Έχει εγκριθεί για χρήση ως γλυκαντική ουσία σε πάνω από 55 χώρες. Στα τέλη της δεκαετίας του 1960 το κυκλαμικό είχε απαγορευτεί στο Ηνωμένο Βασίλειο, αλλά εγκρίθηκε μετά την εκ νέου αξιολόγηση από την Ευρωπαϊκή Ένωση το 1996. Στην Φιλιππίνες το κυκλαμικό απαγορευόταν μέχρι το 2013, ενώ απογορεύεται η χρήση του στις Ηνωμένες Πολιτείες.

Το φουροσεμίδιο (furosemide, FRS) είναι ένα φάρμακο που χρησιμοποιείται για τη θεραπεία συσσώρευσης υγρού λόγω καρδιακής ανεπάρκειας, ηπατικής ή νεφρικής νόσου. Μπορεί, επίσης, να χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία της υψηλής αρτηριακής πίεσης. Το φουροσεμίδιο είναι ένα ισχυρό διουρητικό με ταχεία δράση (σε μια ώρα περίπου από το στόμα, και μισή ώρα ενδοφλεβίως που διαρκεί περί τις 6 ώρες). Απεκκρίνεται αμετάβλητη στα ούρα κατά 80-90% και έχει χρόνο ημίσειας ζωής 0,5 έως 9,7 ώρες.

Η τοπιραμάτη (topiramate, TPM) είναι αντιεπιληπτική ουσία, η οποία μειώνει τη συχνότητα με την οποία δημιουργούνται δυναμικά ενεργείας όταν οι νευρώνες υπόκεινται σε επίμονη αποπόλωση. Παράλληλα, αυξάνει έντονα τη δράση του GABA σε μερικούς τύπους GABA υποδοχέων και ανταγωνίζεται, ασθενώς, τη διεγερτική δράση του γλουταμινικού στον AMPA υποδοχέα του γλουταμινικού [80]. Η φαρμακοκινητική της τοπιραμάτης συνδυάζει πολλές επιθυμητές ιδιότητες για ένα αντιεπιληπτικό φάρμακο. Η τοπιραμάτη απορροφάται ταχέως, με υψηλή βιοδιαθεσιμότητα, που δεν επηρεάζεται από τη ταυτόχρονη λήψη τροφής. Η τοπιραμάτη απεκκρίνεται μη μεταβολισμένη, κυρίως, από τα νεφρά. Περίπου το 20% - 50% από του στόματος χορηγούμενης τοπιραμάτης μεταβολίζεται στο ήπαρ. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της τοπιραμάτης είναι σχετικά μεγάλος [79].

Το υδροχλωροθειαζίδιο (hydrochlorothiazide, HCT) είναι ένα διουρητικό που αναστέλλει την επαναρρόφηση του νερού στα νεφρά [81]. Η διούρηση αρχίζει εντός 2 ωρών, μετά τη λήψη, με κορύφωση τις 4 ώρες και διαρκεί, περίπου, 6 έως 12 ώρες. Το υδροχλωροθειαζίδιο δεν μεταβολίζεται αλλά αποβάλλεται ταχέως από τα νεφρά. Στο πλάσμα του αίματος ο χρόνος

ημιζωής έχει παρατηρηθεί να ποικίλει μεταξύ 5,6 έως και 14,8 ωρών. Τουλάχιστον το 61% της χορήγησης αποβάλλεται αμετάβλητο μέσα σε 24 ώρες [81]. Τέλος, ενώ το υδροχλωροθειαζίδιο δεν είναι η ίδια ένα φάρμακο που βελτιώνει την απόδοση, μπορεί να χρησιμοποιηθεί από τους αθλητές για να καλύψει τη χρήση αναβολικών και έχει χαρακτηριστεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Αντι-Ντόπινγκ ως «εξειδικευμένη ουσία» (specified substance).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Λόγω της ευρείας χρήσης τους οι φαρμακευτικές ενώσεις και τα γλυκαντικά αποτελούν έναν σημαντικό ρύπο του περιβάλλοντος με κύριο αποδέκτη το υδάτινο οικοσύστημα. Πρόσφατες μελέτες καταδεικνύουν την ύπαρξη τους τόσο στις εισροές όσο και στις εκροές των εγκαταστάσεων επεξεργασίας λυμάτων (ΕΕΛ), γεγονός που τις κατατάσσει στην ευρύτερη κατηγορία των αναδυόμενων ρύπων. Ωστόσο, οι πληροφορίες και η ερευνητική δραστηριότητα σχετικά με το ποσοστό απομάκρυνσής τους και το μετασχηματισμό τους σε προϊόντα μετασχηματισμού κατά τις μεθόδους επεξεργασίας των ΕΕΛ είναι σχετικά περιορισμένη.

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι:

- i. Η πραγματοποίηση μελετών βιοδιάσπασης των φαρμακευτικών ενώσεων ρανιτιδίνη, λιδοκαΐνη, εφεδρίνη, σιταλοπράμη, μετφορμίνη, τραμαδόλη, φουροσεμίδιο, κυκλαμικό, υδροχλωροθειαζίδιο και τοπιραμάτη κατά την επεξεργασία τους στις ΕΕΛ, υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.
- ii. Η ανίχνευση και ταυτοποίηση των προϊόντων μετασχηματισμού τους με τη χρήση της τεχνικής σάρωσης πιθανών ενώσεων (suspect screening), με φασματομετρία μάζας υψηλής διακριτικής ικανότητας.

Πιο συγκεκριμένα, οι μελέτες απομάκρυνσης και δημιουργίας προϊόντων μετασχηματισμού πραγματοποιήθηκαν σε βιοαντιδραστήρες οι όποιοι περιείχαν ενεργό ιλύ. Η ενεργός ιλύς προέρχεται από τον αερόβιο χωνευτή για τις αερόβιες και ανοξικές συνθήκες, ενώ για τις αναερόβιες συνθήκες η ιλύς προέρχεται από τον αναερόβιο χωνευτή. Οι επιλεγμένες ενώσεις, εμβολιάστηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση υπό τη μορφή μείγματος. Δείγματα λαμβανόταν περιοδικά σε καθορισμένα χρονικά σημεία για διάστημα δώδεκα ημερών, ώστε να προβλεφθεί η απομάκρυνση της κάθε ένωσης. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση των δειγμάτων ήταν αυτή της υδροχρωματογραφίας συζευγμένη με φασματομετρία μαζών με υβριδικό αναλυτή τετράπολο χρόνου πτήσης.

Για την ανίχνευση των προϊόντων μετασχηματισμού, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε σε λειτουργία πλήρους σάρωσης (bbCID) και η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την επιβεβαίωση και την ταυτοποίησή τους ήταν εκείνη της σάρωσης πιθανών προϊόντων μέσω δημιουργίας βάσεων δεδομένων. Συγκεκριμένα, δημιουργήθηκε μία λίστα ύποπτων ενώσεων η οποία περιελάμβανε όλα τα δημοσιευμένα σε βιβλιογραφία προϊόντα μετασχηματισμού και όλα τα προϊόντα μετασχηματισμού που προβλέφθηκαν χρησιμοποιώντας το σύστημα πρόβλεψης του πανεπιστημίου του EAWAG-PPS καθώς επίσης και το λογισμικό πρόβλεψης της Bruker Metabolite Predict (Bruker Daltonics).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ-ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-

ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

5.1 Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτές φασματομετρίας μαζών

Το υγροχρωματογραφικό σύστημα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία περιελάμβανε σύστημα υγροχρωματογραφίας υπερυψηλής απόδοσης (Ultrahigh performance liquid chromatograph-UHPLC) συζευγμένης με υψηλής διακριτικής ικανότητας φασματομετρία μάζας σε σειρά UHPLC – HRMS (Εικόνα 2), αποτελούμενο από τα εξής μέρη:



Εικόνα 2: Υγροχρωματογραφικό σύστημα με ανιχνευτή υβριδικό αναλυτή μαζών τετραπόλου-χρόνου πτήσης (LC-MS/MS) της Bruker Maxis Impact

- Φασματόμετρο μαζών με υβριδικό αναλυτή μαζών τετραπόλου χρόνου πτήσης (Q-ToF, Bruker MaXis Impact, Bremen, Germany)
- Αντλία υγροχρωματογραφίας υπερ-υψηλής απόδοσης HPG-3400 (Dionex UltiMate 3000 RSLC, Thermo Fisher Scientific, Germany)

Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός έγινε με αναλυτική στήλη Acclaim™ RSLC 120 C18 (2.2 μm 120A°, 2.1 x 100 mm), (Thermo Scientific), εξοπλισμένη με προστήλη Acquity UPLC BEH C18 1.7μm (Waters, Ireland) θερμοστατούμενη στους 30.0 °C.

Για την ανάλυση επιλέχτηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (electrospray ionization, ESI), σε λειτουργία τόσο θετικής όσο και αρνητικής πολικότητας. Η θερμοκρασία της στήλης παραμένει ίδια τόσο στον θετικό ιονισμό όσο και στον αρνητικό ιονισμό.

5.2 Λογισμικό

Η λήψη των δεδομένων και ο έλεγχος του συστήματος φασματομετρίας μάζας πραγματοποιήθηκαν με τα λογισμικά Hystar και Compass που παρέχει ο κατασκευαστής του συστήματος Brucker Daltoniks. Η ανάλυση και επεξεργασία των δεδομένων έγινε με το λογισμικό DATA ANALYSIS 4.1 προερχόμενο από την ίδια πηγή. Για την ανίχνευση των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό Target Analysis της ίδιας εταιρείας και για την δημιουργία βάσης δεδομένων πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού χρησιμοποιήθηκε το Metabolite Predict.

5.3 Εργαστηριακός εξοπλισμός

Στον εργαστηριακό εξοπλισμό που χρησιμοποιήθηκε περιλαμβάνονται διακριβωμένος αναλυτικός ζυγός τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (Santorius-Basic), συσκευή παραγωγής υπερκαθαρού νερού ειδικής αντίστασης 18,2 ΜΩ/cm (Millipore Direct-Q UV), αναδευτήρας περιδίνησης (Vortex-Velp Scientifica), και πεχάμετρο (MQ30d, HACH). Για τους βιοαντιδραστήρες χρησιμοποιήθηκαν σκουρόχρωμα μπουκαλάκια 500mL.

Χρησιμοποιήθηκαν επίσης, σκουρόχρωμα φιαλίδια των 20 mL, ογκομετρικοί κύλινδροι των 100 mL, ογκομετρικές φιάλες των 250 mL, γυάλινες και πλαστικές πιπέτες Pasteur, πλαστικά Eppendorf των 2 mL, αυτόματες πιπέτες μεταβλητού όγκου 1-10 μL, 10-100 μL και 100-1000 μL για οργανικούς διαλύτες (GILSON), καθώς και 10-100 μL και 100-1000 μL για

υδατικούς διαλύτες (Transferpipette). Για την διήθηση των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκαν με τη σειρά φιλτράκια glass microfiber filters και disposable syring filters 1.0μm GMF, 25mm, Whatman ενώ η διήθηση των κινητών φάσεων πραγματοποιήθηκε με φιλτρακια 0.45μm, 47mm, Whatman. Τα δείγματα για την ανάλυση στο φασματόμετρο μαζών τοποθετήθηκαν σε γυάλινα φιαλίδια αυτόματου δειγματολήπτη (vials) των 1,5 mL.

5.4 Αντιδραστήρια - Διαλύτες

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τις υγροχρωματογραφικές αναλύσεις ήταν υψηλής καθαρότητας (LC-MS). Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν, μεθανόλη (Merck) καθώς και υπερκάθαρο νερό (18,2 MΩ/cm).

Στη συνέχεια αναφέρεται ο τρόπος παρασκευής των διαλυμάτων κατά την πορεία της εργασίας:

- Νερό:Μεθανόλη 90:10, 5 mM μυρμηκικό αμμώνιο με 0.01% μυρμηκικό οξύ.
Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL προστίθεται 0,0788 g μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH_4 , μοριακό βάρος=63,06 g/mol, Fluka) και διαλύεται με 25 mL MeOH. Προστίθεται 25 μL μυρμηκικού οξέος (HCOOH) και αραιώνεται μέχρι την χαραγή με υπερκάθαρο νερό.
- Μεθανόλη 5 mM με μυρμηκικό αμμώνιο με 0,01% μυρμηκικό οξύ.
Σε ογκομετρική φιάλη των 250 mL προστίθεται 0,0788 g μυρμηκικό αμμώνιο (HCOONH_4 , μοριακό βάρος=63,06 g/mol, Fluka) και διαλύεται με MeOH. Προστίθεται 25 μL μυρμηκικού οξέος (HCOOH) και αραιώνεται μέχρι την χαραγή με MeOH.

Οδηγίες υγιεινής και ασφάλειας:

Ο βαθμός τοξικότητας και η καρκινογόνος δράση κάθε χημικού αντιδραστηρίου ή διαλύτη δεν έχουν πλήρως καθοριστεί. Εντούτοις, αντιμετωπίζονται ως πιθανά επιβλαβή για την υγεία και η έκθεση στα χημικά αυτά είναι περιορισμένη. Τα πτητικά αντιδραστήρια και οι διαλύτες διαχειρίστηκαν απαραίτητως σε απαγωγούς. Απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή για

τα εύφλεκτα υλικά. Ακολουθήθηκαν οι γενικοί κανόνες ασφάλειας και υγιεινής των χημικών εργαστηρίων.

5.5 Πρότυπες ουσίες και πρότυπα διαλύματα

Για την παρασκευή των πρότυπων διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα αντιδραστήρια υψηλής καθαρότητας. Για κάθε αναλύτη παρασκευάστηκε πρότυπο διάλυμα σε μεθανόλη υψηλής καθαρότητας 1000 μg/mL και από αυτό, για τις ανάγκες του πειράματος, έγιναν όλες οι απαραίτητες αραιώσεις με σκοπό την παρασκευή διαλυμάτων χαμηλότερης συγκέντρωσης. Όλα τα πρότυπα μετά την παρασκευή τους, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία -2°C στην κατάψυξη. Εξαιρέση αποτελεί το πρότυπο διάλυμα της μετορφίνης το οποίο παρασκευάστηκε σε νερό και φυλάχθηκε στο ψυγείο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

ΜΕΛΕΤΗ ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗΣ ΚΑΙ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥ ΠΡΟΪΟΝΤΩΝ ΒΙΟΜΕΤΑΤΡΟΠΗΣ ΤΩΝ ΕΞΕΤΑΖΟΜΕΝΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΜΕ ΕΝΕΡΓΟ ΙΛΥ

6.1 Εισαγωγή

Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας πραγματοποιήθηκαν μελέτες βιομετατροπής των ενώσεων κατά την επεξεργασία τους στις ΕΕΛ καθώς επίσης και ανίχνευση και ταυτοποίηση των προϊόντων μετασχηματισμού τους με τη χρήση της τεχνικής σάρωσης πιθανών παραπροϊόντων (suspect screening) .

Πιο συγκεκριμένα, οι μελέτες βιομετατροπής πραγματοποιήθηκαν με βιοαντιδραστήρες οι όποιοι περιείχαν ενεργό ιλύ. Οι επιλεγμένες ενώσεις εμβολιάστηκαν σε συγκεκριμένη συγκέντρωση. Δείγματα λαμβανόταν περιοδικά σε καθορισμένα χρονικά σημεία για διάστημα δώδεκα ημερών ώστε να προβλεφθεί η απομάκρυνση των ενώσεων.

6.2 Σύγκριση αερόβιων-ανοξικών-αναερόβιων συνθηκών

Η αερόβια χώνευση είναι μια βακτηριακή διαδικασία που συμβαίνει υπό την παρουσία οξυγόνου. Τα βακτήρια καταναλώνουν γρήγορα οργανική ύλη και την μετατρέπουν σε διοξείδιο του άνθρακα, νερό και σε οργανικές ενώσεις χαμηλότερου μοριακού βάρους. Δεδομένου ότι το οργανικό υλικό δεν ανανεώνεται, οι ζώντες οργανισμοί της ενεργούς ιλύος αρχίζουν να πεθαίνουν και καταναλώνονται ως τροφή από μύκητες. Αυτό το στάδιο της διαδικασίας είναι γνωστό ως «ενδογενής αναπνοή» και είναι διαδικασία που μειώνει τον όγκο της ιλύς. Η διεργασία συνήθως εκτελείται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και η διαδικασία είναι πιο γρήγορη και λιγότερο πολύπλοκη από την αναερόβια χώνευση.

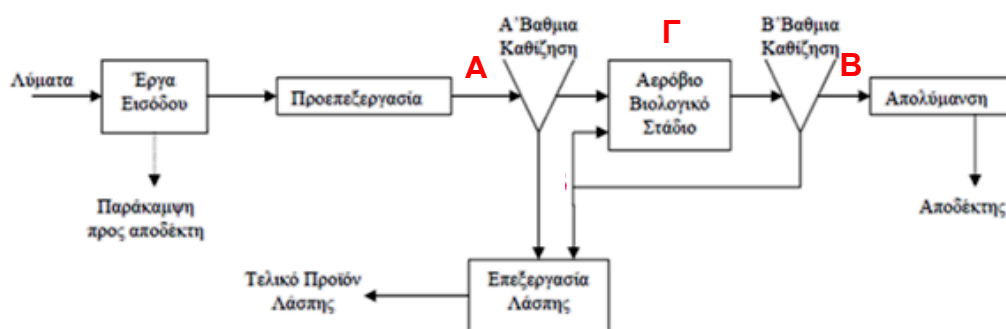
Στην αναερόβια χώνευση υπάρχει απουσία του αερίου οξυγόνου. Σ'έναν αναερόβιο χωνευτή, το αέριο οξυγόνο εμποδίζεται να εισέρθει στο σύστημα μέσω φυσικού περιορισμού σε σφραγισμένες δεξαμενές. Πολλοί μικροοργανισμοί επηρεάζουν την αναερόβια χώνευση, συμπεριλαμβανομένων βακτήρια (acetogens) και μεθανογόνα τα οποία σχηματίζουν οξικό οξύ και μεθάνιο. Αυτοί οι μικροοργανισμοί προωθούν μια σειρά από χημικές διεργασίες κατά την μετατροπή της βιομάζας σε βιοαέριο. Όμως, οι μικροοργανισμοί που δρουν αναερόβια απαιτούν ένα σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα ώστε να εγκατασταθούν και να δράσουν αποτελεσματικά. Στις αναερόβιες συνθήκες το οξυγόνο δεν παίζει τον ρόλο του αποδέκτη ηλεκτρονίων όπως γίνεται στις αερόβιες συνθήκες. Αναερόβια δέκτες ηλεκτρονίων μπορεί να είναι το ίδιο το οργανικό υλικό ή να παρέχονται από την προσθήκη ανόργανων οξειδίων. Όταν η πηγή οξυγόνου σ'ένα αναερόβιο σύστημα προέρχεται από το ίδιο το οργανικό υλικό, τα τελικά προϊόντα είναι κυρίως αλκοόλες, αλδεΐδες, και οργανικά οξέα, συν διοξείδιο του άνθρακα.

Ανοξικές συνθήκες σημαίνει ότι δεν υπάρχει μοριακό οξυγόνο, αλλά είναι παρόντα νιτρώδη ή νιτρικά άλατα πχ NaNO_3 . Μια απλή διάκριση μεταξύ αναερόβιων και ανοξικών συνθηκών είναι ότι αναερόβια η προϋπόθεση είναι να μην υπάρχει μοριακό οξυγόνο ούτε οξειδωμένη μορφή του αζώτου (δηλ, νιτρώδη, νιτρικά, κ.λ.π.). Κατά συνέπεια η διαφορά έγκειται στο ποιος παίζει τον ρόλο του δέκτη/δότη ηλεκτρονίων. Ανοξικά τα NO_3^- δρουν ως τελικός αποδέκτης των ηλεκτρονίων που παράγονται από ετερότροφα βακτήρια κατά τη διάσπαση της οργανικής ύλης.

6.2.1 Πειραματικό σύστημα μελέτης και ανίχνευσης βιομετατροπής

Το πείραμα βιομετατροπής των εξεταζόμενων ενώσεων διενεργήθηκε στο τμήμα Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου, τομέα Περιβαλλοντικής Μηχανικής και Επιστήμης, ενώ η ανάλυσή τους έγινε στον τομέα Αναλυτικής Χημείας του τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Αθηνών (Ε.Κ.Π.Α)

Τα λύματα εκροών και η ενεργός ιλύ πάρθηκαν από τις εγκαταστάσεις επεξεργασίας αποβλήτων της Ψυτάλλειας, από τον αερόβιο και αναερόβιο βιοαντιδραστήρα. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζονται τα σημεία συλλογής λυμάτων για την πραγματοποίηση των πειραμάτων βιομετατροπής. Σημείο δειγματοληψίας Α λύματα εισροών, σημείο δειγματοληψίας Β, λύματα εκροών και Σημείο Γ ενεργός ιλύς. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε τον Οκτώβριο του 2014.



Εικόνα 3: Σημεία Δειγματοληψίας για την μελέτη βιοαποικοδόμησης. Α: λύματα εισροών Β: λύματα εκροών Γ: ενεργός ιλύς [59].

Η λυματολάσπη μαζί με ένα μείγμα των υπό εξάταση ενώσεων στάλθηκαν στο τμήμα Περιβάλλοντος του Πανεπιστημίου Αιγαίου, ώστε να ξεκινήσει η πειραματική διαδικασία. Τα λύματα εκροών, πριν γίνει οποιαδήποτε χρήση τους, φιλτραρίστηκαν με GF filters, με σκοπό να απομακρυνθούν αιωρούμενα σωματίδια. Σύμφωνα με το πρωτόκολλο της πειραματικής διαδικασίας, στήθηκαν τέσσερις διαφορετικοί βιοαντιδραστήρες, για κάθε μία από τις υπό μελέτη συνθήκες (αερόβια/ανοξικά/αναερόβια) όπως περιγράφεται στη συνέχεια:

Αερόβια Βιοαποικοδόμηση

- Αντιδραστήρας βιοτικών διεργασιών: ο οποίος αποτελείται από 200 mL ενεργούς ιλύος και προσθήκης 2 mL από το μίχ των εξεταζόμενων ενώσεων, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/L. Σκοπός του αντιδραστήρα αυτού είναι η μελέτη απομάκρυνσης και βιομετατροπής της εξεταζόμενων ενώσεων.

- Αντιδραστήρας αβιοτικών διεργασιών: ο οποίος αποτελείται από 30 mL νερού βρύσης και προσθήκης 0.30 mL από το μίχ των ενώσεων. Σκοπός του αντιδραστήρα αυτού είναι η μελέτη της συμπεριφοράς των εξεταζόμενων ενώσεων υπό αβιοτικές συνθήκες.
- Αντιδραστήρας ελέγχου προσρόφησης: ο οποίος αποτελείται από 200 mL λυματολάσπης, 2,5 mL πυκνού διαλύματος NaN_3 , ώστε να αδρανοποιηθεί η δράση των μικροοργανισμών, και προσθήκης 2 mL από το μίχ των ενώσεων, ο οποίος σκοπό έχει την μελέτη της πιθανής προσρόφησης των ενώσεων στα σωματίδια λάσπης.
- Βιοαντιδραστήρας ελέγχου: ο οποίος περιέχει 200 mL ενεργούς ιλύος και 2 mL μεθανόλης, χρησιμοποιείται ως βιοαντιδραστήρας ελέγχου.

Ανοξική Βιοαποικοδόμηση

- Αντιδραστήρας βιοτικών διεργασιών: ο οποίος αποτελείται από 200 mL ενεργούς ιλύος, 100 μL πυκνού διαλύματος NaNO_3 και προσθήκης 1 mL από το μίχ των εξεταζόμενων ενώσεων, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 0,5 mg/L .
- Αντιδραστήρας αβιοτικών διεργασιών: ο οποίος αποτελείται από 15 mL νερού βρύσης, 7,5 μL πυκνού διαλύματος NaNO_3 και προσθήκης 0.075 mL από το μίχ των ενώσεων.
- Αντιδραστήρας ελέγχου προσρόφησης: ο οποίος αποτελείται από 200 mL λυματολάσπης, 100 μL πυκνού διαλύματος NaNO_3 , 2,5 mL πυκνού διαλύματος NaN_3 , και προσθήκης 1 mL από το μίχ των εξεταζόμενων ενώσεων.
- Βιοαντιδραστήρας ελέγχου: ο οποίος περιέχει 200 mL ενεργούς ιλύος, 100 μL πυκνού διαλύματος NaNO_3 και 1 mL μεθανόλης.

Αναερόβια Βιοαποικοδόμηση

- Αντιδραστήρας βιοτικών διεργασιών (έξι φιάλες μία για κάθε χρονική στιγμή): ο οποίος αποτελείται από 15 mL βιομάζας από αναερόβιο χωνευτή στους 35 ° και προσθήκης 0,15 mL από το μίχ των εξεταζόμενων ενώσεων, ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 1 mg/L .

- Αντιδραστήρας αβιοτικών διεργασιών(μία φιάλη): ο οποίος αποτελείται από 15 mL νερού βρύσης στους 35 °C, και προσθήκης 0,15 mL από το μίχ των ενώσεων.
- Αντιδραστήρας ελέγχου προσρόφησης(δύο φιάλες μία για κάθε χρονική στιγμή): ο οποίος αποτελείται από 15 mL βιομάζας από αναερόβιο χωνευτή στους 35 °C, 187,5 μL πυκνού διαλύματος NaN_3 , και προσθήκης 0,15 mL από το μίχ των εξεταζόμενων ενώσεων.
- Βιοαντιδραστήρας ελέγχου(δύο φιάλες μία για κάθε χρονική στιγμή): ο οποίος περιέχει 15 mL βιομάζας από αναερόβιο χωνευτή στους 35 °C και 0,15 mL μεθανόλης.

Στο εξής οι αναφορές στους βιοαντιδραστήρες στο κείμενο θα αναφέρονται αντιστοιχά biotic, abiotic, sorption και blank.

Στην αερόβια βιοαποικοδόμηση υπήρξε συνεχής αερισμός, ενώ στην ανοξική και αναερόβια βιοαποικοδόμηση υπήρξε ροή αζώτου. Συλλέχθηκαν, περιπού, 2 mL δείγματος σε κάθε χρονική στιγμή. Για την αερόβια και ανοξική βιοαποικοδόμηση λήφθηκαν δείγματα από τον βιοτικό βιοαντιδραστήρα τις χρονικές στιγμές $t = 1, 2, 6, 8, 10, 24, 48, 72, 96, 120$ ώρες. Για την αναερόβια βιοαποικοδόμηση λήφθηκαν δείγματα από τον βιοτικό βιοαντιδραστήρα τις χρονικές στιγμές $t = 24, 72, 120, 168, 240, 288$ ώρες. Στη συνέχεια τα δείγματα φιλτράρονταν με φίλτρα σύριγγας από ίνες υάλου (GF Filters, 25 mm διάμετρος, 1,0 μm μέγεθος πόρων) και διαδοχικά μέσω φίλτρων αναγεννημένης κυτταρίνης (RC Filters, 15 mm διάμετρος, 0,20 μm μέγεθος πόρων). Τέλος, αραιώνονταν σε vial σε αναλογία 50:50 με διάλυμα $\text{MeOH:H}_2\text{O}$. Τα δείγματα αναλύθηκαν και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν στην κατάψυξη στους -2°C .

6.3 Ανάλυση δειγμάτων

6.3.1 Ανάλυση δειγμάτων με χρωματογραφία αντίστροφης φάσης

Για την ανάλυση επιλέχτηκε η τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό ESI, σε λειτουργία τόσο θετικής όσο και αρνητικής πολικότητας, με τις παραμέτρους που παρατίθενται παρακάτω:

Πίνακας 1: Συνθήκες ηλεκτροψεκασμού, διαλύτες κινητής φάσης και πρόγραμμα βαθμιδωτής έκλουσης για θετικό και αρνητικό ιοντισμό

Θετικός Ιοντισμός				
Πρόγραμμα Έκλουσης			Παράμετροι Ηλεκτροψεκασμού	
Χρόνος (λεπτά)	% B	Ροή (mL min ⁻¹)	Capillary Voltage	2500V
0	1	0,200	End plate offset	500V
1	1	0,200	Nebulizer	2 bar
3	39	0,200	Drying gas	8 L min ⁻¹
14	99,9	0,400	Drying temperature	200 °C
16	99,9	0,480	(A) Νερό:Μεθανόλη 90:10 5mM μυρμηκικό αμμώνιο με 0,01% μυρμηκικό οξύ (B) Μεθανόλη 5mM με μυρμηκικό αμμώνιο με 0,01% μυρμηκικό οξύ	
16.1	1	0,480		
20	1	0,200		
Αρνητικός Ιοντισμός				
Χρόνος (λεπτά)	% B	Ροή (mL min ⁻¹)	Capillary Voltage	3500 V
0	1	0,200	End plate offset	500 V
1	1	0,200	nebulizer	2 bar
3	39	0,200	Drying gas	8 L min ⁻¹
14	99,9	0,400	Drying temperature	200 °C
16	99,9	0,480	(A) Νερό:Μεθανόλη 90:10 5 mM οξικό αμμώνιο (B) Μεθανόλη 5 mM οξικό αμμώνιο	
16.1	1	0,480		
20	1	0,200		
Το φασματόμετρο μαζών σταματάει την καταγραφή στα 15,5 min				

6.3.2 Επεξεργασία δεδομένων

Τα δεδομένα που προέκυψαν μετά την ανάλυση (εμβαδόν κορυφής, area) των δειγμάτων των υπό εξέταση φαρμακευτικών ενώσεων έπειτα από την επεξεργασία τους με την ενεργό ιλύ εντός των βιοαντιδραστήρων και μέσω αναλογικής σχέσης αντιστοιχούν στην συγκέντρωση των ενώσεων σε

κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας από την στιγμή όπου προστέθηκαν στο σύστημα αποικοδόμησης, κανονικοποιήθηκαν δε αναλόγως με σκοπό να μπορεί να εκτιμηθεί η απομάκρυνση των ουσιών κατά τη διάρκεια της επεξεργασίας.

Έτσι το δείγμα σε χρόνο μηδέν, που δεν έχει υποστεί καμία επεξεργασία κανονικοποιούνται κάθε φορά ως 100, ενώ τα δείγματα που προέκυπταν από τα διαφορετικά χρονικά σημεία της επεξεργασίας εντός του συστήματος βιοδιάσπασης, κανονικοποιήθηκαν και παρουσιάστηκαν ως ποσοστά του δείγματος μηδενικού χρόνου. Η επί της εκατό συγκέντρωση της κάθε ένωσης σε κάθε χρονικό σημείο δειγματοληψίας μπορεί έτσι να υπολογιστεί ως:

$$\frac{\text{Αρεα επεξεργασμένου δείγματος σε χρόνο } t}{\text{Αρεα δείγματος μηδενικού χρόνου } t_0} \times 100$$

Στην παραπάνω σχέση t είναι ο χρόνος μετρούμενος σε h όπου t_0 θεωρείται ο χρόνος κατά την στιγμή όπου προστίθεται η ένωση, C_0 είναι η αρχική συγκέντρωση της κάθε ένωσης και θεωρείται ότι είναι 100%, C_t είναι η εξαρτώμενη από το χρόνο συγκέντρωση των υπο εξέταση ενώσεων και υπολογίζεται όπως αναφέρθηκε παραπάνω.

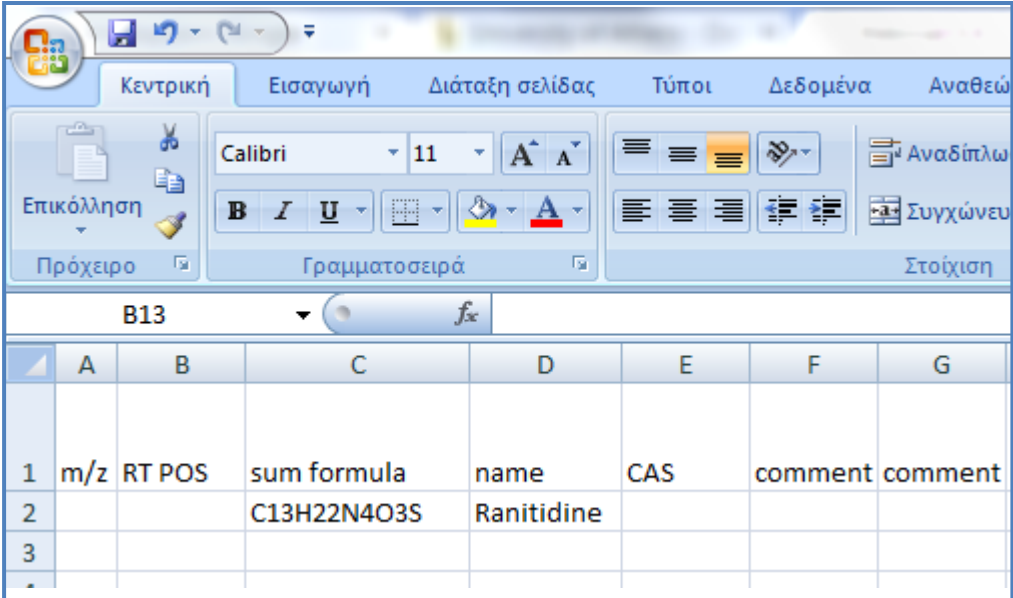
6.4 Μελέτη αναζήτησης και προσδιορισμού προϊόντων μετασχηματισμού των υπό εξέταση ενώσεων

Για τη μελέτη της αναζήτησης και προσδιορισμού προϊόντων μετασχηματισμού των υπό εξέταση φαρμακευτικών ενώσεων, τα δείγματα σαρώθηκαν για τις ακριβείς μάζες των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού με τη βοήθεια του λογισμικού Target Analysis1.3 από την Bruker Daltonics. Η σάρωση πραγματοποιήθηκε με λίστα ύποπτων ενώσεων οι οποίες δημιουργήθηκαν με προβλεπόμενα προϊόντα μετασχηματισμού από το EAWAG-PPS, από την βιβλιογραφία και με τη βοήθεια του λογισμικού Metabolite Predict 2.0 SR4 από την Bruker Daltonics.

6.4.1 Δημιουργία λίστας ύποπτων ενώσεων για πιθανά προϊόντα μετασχηματισμού των υπό εξέταση ενώσεων

Μια λίστα ύποπτων ενώσεων δημιουργήθηκε ώστε να περιέχει τις απαραίτητες πληροφορίες για κάθε πιθανό προϊόν μετασχηματισμού. Στην σάρωση ύποπτων ενώσεων (suspect screening) οι πληροφορίες για το κάθε m/z των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού είναι διαθέσιμες, οπότε και σαρώνονται τα αντίστοιχα χρωματογραφήματα του δείγματος ελέγχου (blank), του δείγματος κατά την στιγμή όπου προστίθεται η φαρμακευτική ένωση (t_0) και του δείγματος σε κάθε χρονικό σημείο της επεξεργασίας στον βιοαντιδραστήρα. Το προϊόν μετασχηματισμού θα πρέπει να απουσιάζει από τα δύο πρώτα δείγματα (blank, t_0) και να εμφανίζεται μόνο στο χρωματογράφημα του δείγματος σε κάποιο χρονικό σημείο της δειγματοληψίας.

Η κάθε λίστα ύποπτων ενώσεων δημιουργείται ως ένα .csv αρχείο στο excel έχοντας της μορφή που φαίνεται στην Εικόνα 4. Συνολικά δημιουργήθηκαν τρεις διαφορετικές βάσεις δεδομένων η οποίες και συγχωνεύτηκαν σε μία.



	A	B	C	D	E	F	G
1	m/z	RT	POS	sum formula	name	CAS	comment
2				C13H22N4O3S	Ranitidine		
3							

Εικόνα 4: Μορφή μια εμπειρικής βάσης δεδομένων.

6.4.1.1 Λίστα ήδη ταυτοποιημένων προϊόντων μετασχηματισμού στην υπάρχουσα βιβλιογραφία

Αρχικά, η λίστα με τις πιθανές δομές συμπληρώνεται με τα προϊόντα μετασχηματισμού που έχουν ταυτοποιηθεί στην υπάρχουσα βιβλιογραφία.

6.4.1.2 Λίστα προϊόντων μετασχηματισμού από το EAWAG-PPS

Ένας κρίσιμος παράγοντας που περιορίζει σήμερα την αξιολόγηση του μετασχηματισμού για τις ουσίες, εκτός από τα φυτοφάρμακα, είναι η έλλειψη πληροφοριών σχετικά με την πορεία μετασχηματισμού. Διάφορα εργαλεία πληροφορικής υπάρχουν, στόχος των οποίων είναι να προβλεφθούν τα μονοπάτια της βιοαποικοδόμησης. Ένα από τα πιο αναπτυγμένα συστήματα είναι το Σύστημα πρόβλεψης Μεταβολικών Μονοπατιών EAWAG-PPS στο οποίο η οδός πρόβλεψης βασίζεται σε μια εκτενή συλλογή από γνωστές ενζυμικές αντιδράσεις, με βάση τις οποίες έχουν συνταχθεί οι κανόνες μετασχηματισμού [60].

Για τη δημιουργία της αντίστοιχης λίστας πιθανών ενώσεων, το EAWAG-PPS χρησιμοποιήθηκε χωρίς τη λειτουργία για τη σχετική αιτιολογία για την πρόβλεψη δύο γενεών προϊόντων μετασχηματισμού [61-62].

6.4.1.3 Λίστα προϊόντων μετασχηματισμού από το Metabolite Predict

Στη λίστα προστέθηκαν ακόμα πιθανά προϊόντα μετασχηματισμού από το λογισμικό πρόβλεψης μεταβολιτών της εταιρίας Bruker (Metabolite Predict 2.0 SR4). Επιλέχθηκε η λίστα να περιέχει πιθανά προϊόντα τα οποία να προέρχονται από όλους τους κανόνες που διέπουν τον μεταβολισμό των θηλαστικών (All mammals rules). Η λίστα αυτή συμπληρώνει την λίστα που προέκυψε από το EAWAG-PPS καθώς περιέχει πληροφορίες για προϊόντα τα προέκυψαν από πχ υδροξυλίωση, κάτι το οποίο το EAWAG-PPS δεν έχει τη δυνατότητα να προβλέψει.

6.5 Επεξεργασία δεδομένων – Ανίχνευση m/z πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού

Στο πρώτο στάδιο, τα δείγματα σαρώθηκαν για την ανίχνευση m/z με ακριβεία μάζας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων, των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού σύμφωνα βασισμένα στην λίστα ύποπτων ενώσεων. Η σάρωση πραγματοποιήθηκε με τη βοήθεια του λογισμικού TargetAnalysis 1.3 από την Bruker Daltonics.

Στο επόμενο στάδιο για την ανίχνευση των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού ήταν η χρήση της μεθόδου εξαγωγής χρωματογραφήματος συγκεκριμένου ιόντος (eXtracted Ion Chromatogram, XIC). Έτσι τα δεδομένα που συλλέγονται από το φάσμα λειτουργίας πλήρους σάρωσης, μπορούν να υποστούν επεξεργασία μετά το τέλος της ανάλυσης, με σκοπό την εξαγωγή του προφίλ έκλουσης του επιλεγμένου ιόντος και ανοχή (mass tolerance) - συνήθως ≤ 5 ppm.

Ύστερα μπορεί να υπολογιστεί η ακρίβεια μάζας του ιόντος και να αξιολογηθεί ο χρόνος έκλουσης του πιθανού προϊόντος μετασχηματισμού σε σχέση με την αρχική ένωση, με βάση τη χρωματογραφία που επιλέχθηκε, τις φυσικοχημικές ιδιότητες του προϊόντος μετασχηματισμού ($\log P$) – εφόσον είναι γνωστές και τη βιβλιογραφία.

Η ανίχνευση των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού στηρίχθηκε στις παρακάτω παραδοχές:

- Ανίχνευση του επιθυμητού m/z στα επεξεργασμένα δείγματα
- Απουσία του επιθυμητού m/z (στον ίδιο χρόνο έκλουσης) στα μη επεξεργασμένα δείγματα (blank δείγμα)
- Το εμβαδόν της κορυφής του επιθυμητού m/z θα πρέπει να αυξάνεται με τον χρόνο, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο το σχηματισμό του προϊόντος μετασχηματισμού
- Ακρίβεια μάζας ≤ 5 ppm και
- Σωστός χρόνος έκλουσης (σύμφωνα με το $\log P$).
- Το MS/MS φάσμα του πιθανού προϊόντος μετασχηματισμού θα πρέπει να είναι συγκρίσιμο με το MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης. Παρόμοια

MS/MS θραύσματα υποδεικνύουν ότι δύο ενώσεις μπορεί να έχουν παρόμοια δομή.

6.5.1 Μέθοδος θραυσματοποίησης-Επιβεβαίωση δομής πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού

Μετά την επεξεργασία των δεδομένων του φάσματος πλήρους σάρωσης, δημιουργήθηκε μια νέα μέθοδος MS/MS, με σκοπό την αύξηση της ευαισθησίας και την αποκόμιση περισσότερων πληροφοριών σχετικά με τη δομή των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν. Σκοπός ήταν η επιβεβαίωση της δομής των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού που προέκυψαν. Οι μάζες που ανιχνεύονταν και θεωρήθηκαν ότι οφείλονται σε προϊόντα μετασχηματισμού, αντιστοιχήθηκαν σε πιθανές δομές με τη χρήση των διαθέσιμων λογισμικών και βιβλιοθηκών (Metabolite Predict– ChemSpider database-chemicalize) η από τις ήδη ταυτοποιημένες δομές από την βιβλιογραφία.

Τα MS/MS φάσματα αποκτήθηκαν χρησιμοποιώντας τη λειτουργία Auto MS με inclusion list. Η ενέργεια στην κυψελίδα σύγκρουσεων (collision cell energy) που εφαρμόστηκε ορίστηκε σε προκαθορισμένες τιμές, ανάλογα με την μάζα και το φορτίο του κάθε ιόντος. Η λειτουργία Auto MS απομονώνει τα ιόντα τα οποία έπειτα θραυσματοποιούνται και οδηγούμαστε στο φάσμα MS/MS συγκεκριμένων αναλυτών.

Ως μέθοδος εξωτερικής βαθμονόμησης του αναλυτή χρόνου πτήσης κάθε μέρα πραγματοποιείται βαθμονόμηση με διάλυμα μυρμηκικού νατρίου ενώ στην αρχή κάθε χρωματογραφήματος γίνεται έγχυση του ίδιου διαλύματος για εσωτερική βαθμονόμηση. Το διάλυμα βαθμονόμησης είναι μίγμα νερού ισοπροπανόλης με 10 mM μυρμηκικό νάτριο σε αναλογία 1:1 παρέχοντας χαρακτηριστικές μάζες σε ένα εύρος μαζών 50-1000 Da.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

7.1 Μελέτη απομάκρυνσης των υπό εξέταση ενώσεων κατά την επεξεργασία με ενεργό ιλύ υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες

Τα δείγματα αναλύθηκαν με χρωματογραφία RP, με την τεχνική ιοντισμού με ηλεκτροψεκασμό (ESI), σε λειτουργία τόσο θετικής όσο και αρνητικής πολικότητας όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 6.3. Σε λειτουργία θετικής πολικότητας ιοντίζεται η ρανιτιδίνη, η λιδοκαΐνη, η μετφορμίνη, η σιταλοπράμη, η εφεδρίνη, η τραμαδόλη και τα προϊόντα μετασχηματισμού τους. Ενώ, το φουροσεμίδιο, το κυκλαμικό, η τοπιραμάτη και το υδροχλωροθειαζίδιο ιοντίζονται σε λειτουργία αρνητικής πολικότητας.

7.1.1 Μελέτη απομάκρυνσης των εξεταζόμενων ενώσεων υπό αερόβιες, ανοξικές, αναερόβιες συνθήκες με χρωματογραφία RP

Από τα διαγράμματα απομάκρυνσης (Σχήμα 2) είναι φανερό πως η ένωση ρανιτιδίνη απομακρύνεται πλήρως κάτω από αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, ενώ υπό ανοξικές συνθήκες η μητρική ένωση απομακρύνεται κατά 60%. Συγκεκριμένα, υπό αερόβιες συνθήκες η ένωση έχει απομακρυνθεί πλήρως από την δεύτερη ημέρα.

Στην περίπτωση της ένωσης λιδοκαΐνης, η απομάκρυνση της μητρικής ένωσης είναι της τάξης του 70 % υπό αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες και 50% υπό ανοξικές συνθήκες (Σχήμα 3). Στις αναερόβιες συνθήκες, την τρίτη ημέρα, η ένωση έχει απομάκρυνση μόλις 20% της αρχικής συγκέντρωσης. Στη συνέχεια, παρατηρούμε ότι για τις επόμενες τέσσερις ημέρες δεν υπάρχει περαιτέρω απομάκρυνση της ένωσης. Από την έβδομη μέχρι και την δωδέκατη ημέρα απομακρύνεται ακόμα κατά 50%.

Η ένωση εφεδρίνη απομακρύνεται πλήρως υπό αερόβιες συνθήκες την πρώτη ημέρα και υπό ανοξικές συνθήκες η απομάκρυνση της ένωσης φτάνει το 60% την πέμπτη ημέρα (Σχήμα 4). Υπό αναερόβιες συνθήκες παρατηρούμε ελάχιστη απομάκρυνση της μητρικής ένωσης (20%) την

πέμπτη ημέρα ενώ μέχρι και την δωδέκατη ημέρα δεν παρατηρείται επιπλέον απομάκρυνση.

Η απομάκρυνση της ένωσης σιταλοπράμης την πέμπτη μέρα δειγματοληψίας έχει φτάσει υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες το 90% και 70%, αντίστοιχα (Σχήμα 5). Υπό αναερόβιες συνθήκες η μητρική ένωση σιταλοπράμη απομακρύνεται κατά 40% τις πρώτες τρεις ημέρες και στη συνέχεια η συγκέντρωσή της στον βιοαντιδραστήρα παραμένει σταθερή.

Η μετορμίνη, όπως και η εφεδρίνη, απομακρύνονται ταχύτατα υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες (100%) (Σχήμα 6). Από τις πρώτες οχτώ ώρες η ένωση έχει απομακρυνθεί κατά 80%. Αντίθετα, στις αναερόβιες συνθήκες η απομάκρυνση της μετορμίνης είναι ελάχιστη ($\approx 20\%$).

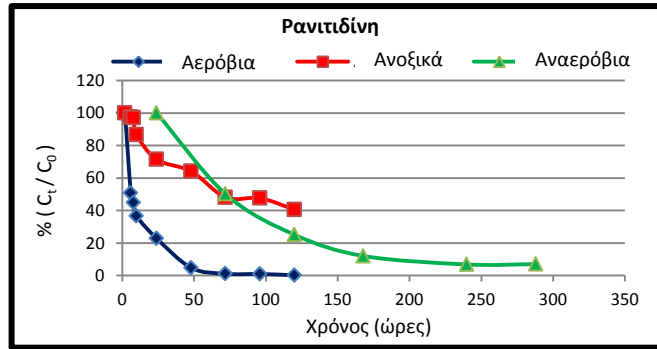
Το κυκλαμικό παρουσιάζει παρόμοια τάση απομάκρυνσης με αυτήν της ρανιτιδίνης και της λιδοκαΐνης (Σχήμα 7). Απομακρύνεται πλήρως στις αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες, ενώ ανοξικά η απομάκρυνση είναι 50% λιγότερη.

Η ένωση τραμαδόλη απομακρύνεται σχεδόν πλήρως υπό αερόβιες συνθήκες, ενώ υπό ανοξικές και ανερόβιες συνθήκες η απομάκρυνση είναι της τάξης του 40% (Σχήμα 8).

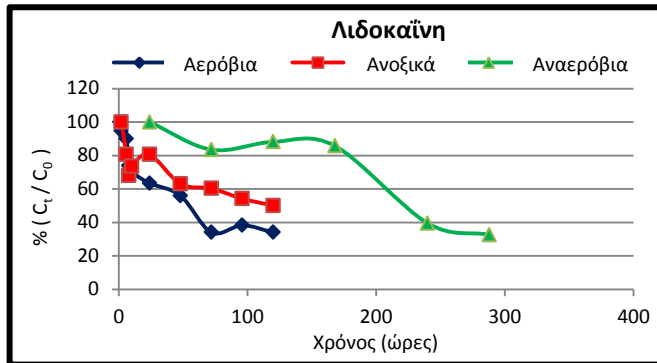
Το υδροχλωροθειαζίδιο υπό αερόβιες συνθήκες απομακρύνεται κατά 60%. Υπό ανοξικές συνθήκες απομακρύνεται κατά 30% ενώ, υπό αναερόβιες συνθήκες η ένωση δεν ανιχνεύτηκε την πρώτη χρονική στιγμή δειγματοληψίας (24 ώρες) (Σχήμα 9). Επειδή οι χρόνοι δειγματοληψίας προσαρμόστηκαν για όλες τις ενώσεις δυστυχώς υποθέτουμε πως το υδροχλωροθειαζίδιο απομακρύνθηκε πλήρως υπό αναερόβιες συνθήκες από την πρώτη μέρα.

Από τα διαγράμματα απομάκρυνσης φαίνεται ότι η ένωση φουροσεμίδιο απομακρύνεται αερόβια κατά 70%, ενώ ανοξικά και αναερόβια απομακρύνεται ελάχιστα σε ποσοστό 20–30% (Σχήμα 10).

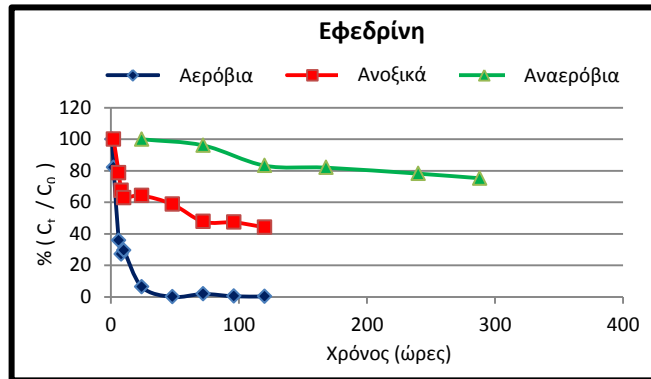
Τέλος, η τοπιραμάτη απομακρύνεται αερόβια και ανοξικά κατά 40% και αναερόβια κατά 30% (Σχήμα 11).



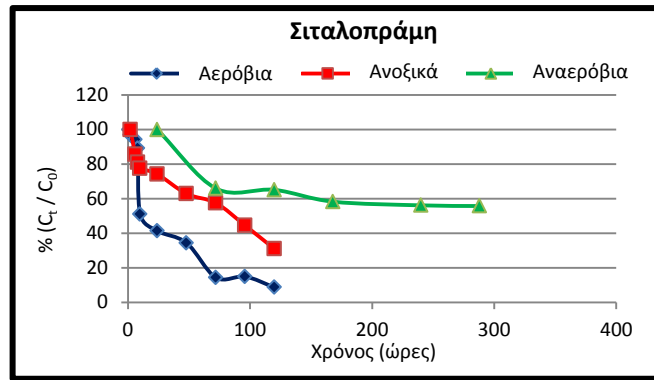
Σχήμα 2: Διάγραμμα απομάκρυνσης της ρανιτιδίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



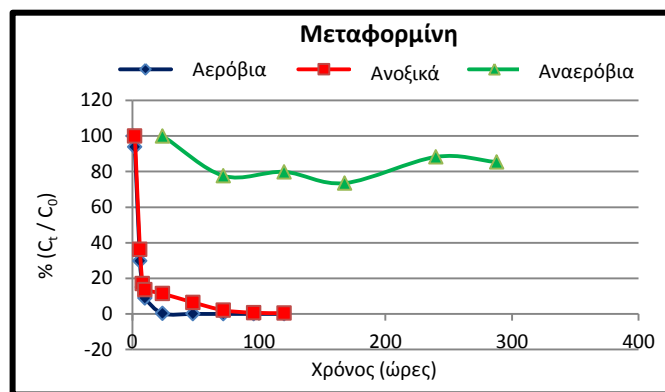
Σχήμα 3: Διάγραμμα απομάκρυνσης της λιδοκαΐνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



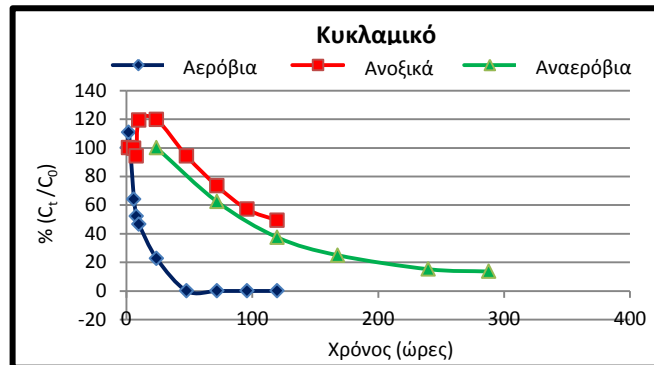
Σχήμα 4: Διάγραμμα απομάκρυνσης της εφεδρίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



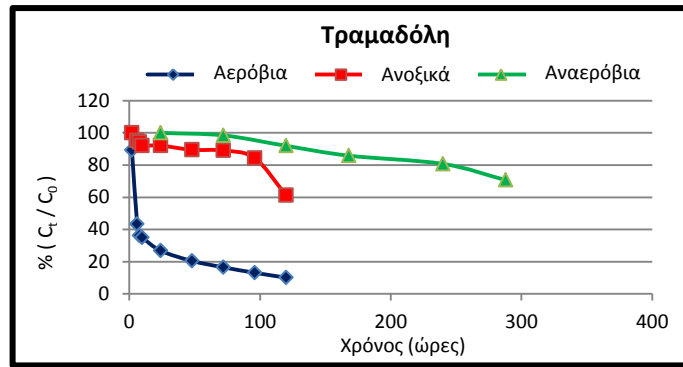
Σχήμα 5: Διάγραμμα απομάκρυνσης της σιταλοπράμης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



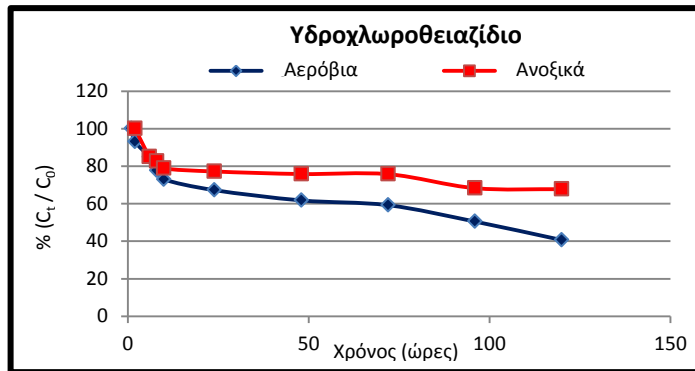
Σχήμα 6: Διάγραμμα απομάκρυνσης της μεταφορμίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



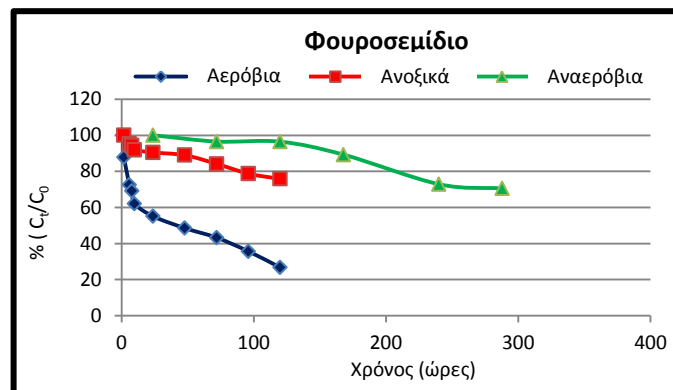
Σχήμα 7: Διάγραμμα απομάκρυνσης του κυκλαμικού υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



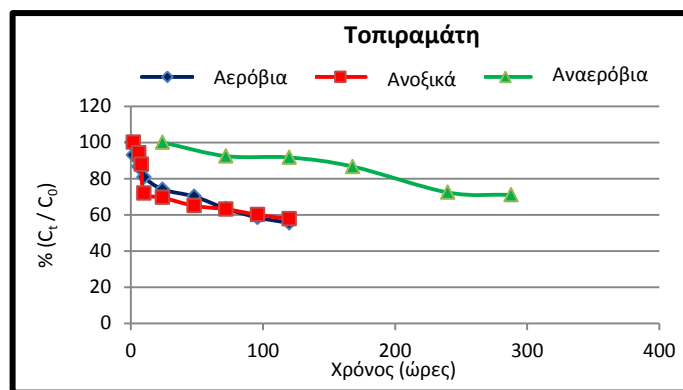
Σχήμα 8: Διάγραμμα απομάκρυνσης της τραμαδόλης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



Σχήμα 9: Διάγραμμα απομάκρυνσης του υδροχλωροθειαζιδίου υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



Σχήμα 10: Διάγραμμα απομάκρυνσης του φουροσεμίδιου υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.



Σχήμα 11: Διάγραμμα απομάκρυνσης της τοπιραμάτης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.

Διαπιστώνουμε ότι και στα δέκα παραδείγματα απομάκρυνσης, ο ρυθμός απομάκρυνσης των μητρικών ενώσεων είναι μεγαλύτερος στις αερόβιες συνθήκες. Ο ρυθμός, αυτός, μειώνεται στις ανοξικές συνθήκες ενώ μειώνεται ακόμη περισσότερο στις αναερόβιες συνθήκες. Σαν πρώτο συμπέρασμα, οπότε, θα μπορούσαμε να εξάγουμε πως παρουσία οξυγόνου η δράση των μικροοργανισμών είναι εντονότερη με αποτέλεσμα την ταχύτερη απομάκρυνση των ενώσεων.

7.2 Μελέτη ανίχνευσης και προσδιορισμού προϊόντων μετασχηματισμού

Για τον προσδιορισμό της στοιχειακής σύνθεσης των πρόδρομων ιόντων και των θραυσμάτων τόσο της μητρικής ένωσης όσο και των προϊόντων μετασχηματισμού χρησιμοποιείται το λογισμικό SmartFormula manually που περιέχεται στο πακέτο λογισμικού Data Analysis 4.1. Πιο συγκεκριμένα, το φάσμα MS στο ιόν που μας ενδιαφέρει να προσδιοριστεί η δομή του εισάγονται οι κατάλληλες παράμετροι στο λογισμικό και αυτό μας επιστρέφει μια σειρά από προτεινόμενους τύπους για το m/z που του έχει καθοριστεί. Προκειμένου να επιλεγεί ο σωστός τύπος και βάση αυτού να προσδιοριστεί η σωστή χημική δομή του προϊόντος μετασχηματισμού με μεγάλη βεβαιότητα χρησιμοποιούνται τα εξής κριτήρια:

- η ακρίβεια στη μάζα (mass error, ppm) πρέπει να είναι η μέγιστη δυνατή οπότε η τιμή του σφάλματος μάζας που μας δίνει το λογισμικό πρέπει να είναι η ελάχιστη δυνατή. Γενικά πολύ καλές τιμές σφάλματος μάζας είναι κάτω από 5 ppm, για πρόδρομα ιόντα και τιμές κάτω από 7 ppm είναι αποδεκτές για τα θραύσματα.
- το ισοτοπικό αποτύπωμα (isotope pattern) εκφράζεται μέσω της αδιάστατης τιμής mSigma που επιστρέφει το λογισμικό. Τιμές κάτω από 50 είναι πολύ καλές αλλά και κάτω από 100 είναι αποδεκτές επίσης.

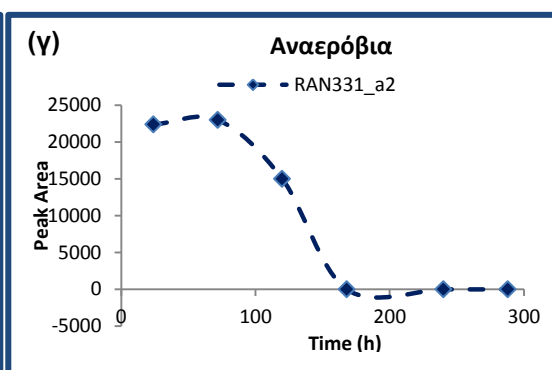
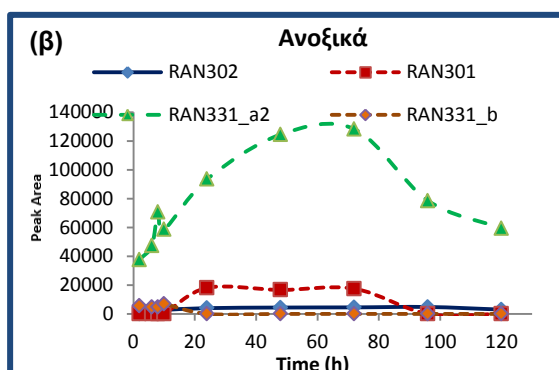
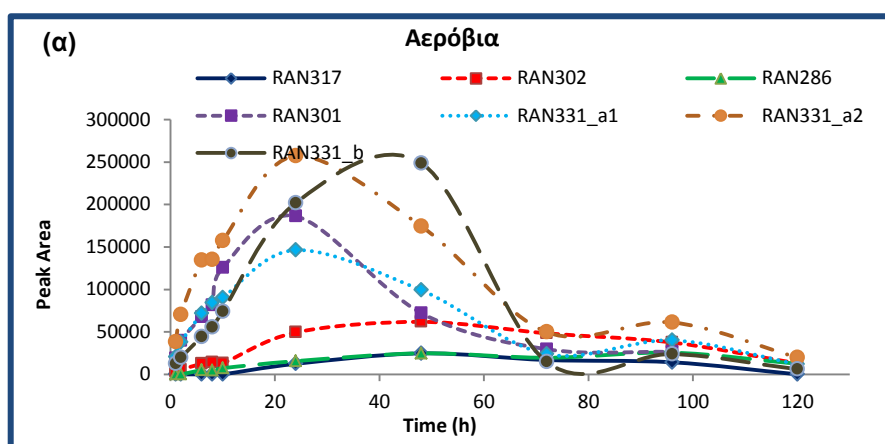
Εκτός του λογισμικού smart formula manually πληροφορίες για πιθανές δομές των θραυσμάτων συλλέχτηκαν από το mass bank.

7.3 Ρανιτιδίνη

Η ένωση ρανιτιδίνη έχει μοριακό τύπο $C_{13}H_{22}N_4O_3S$, μονοισοτοπική μάζα 314,1407, $[M + H] = 315,1485$ και $\log P = 0,99$. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων παρτίδας σχηματίστηκαν επτά ενώσεις στις αερόβιες συνθήκες, τέσσερις από αυτές τις ενώσεις σχηματίστηκαν στις ανοξικές συνθήκες και μόνο μία από αυτές σχηματίστηκε στις αναερόβιες συνθήκες. Σχεδόν όλα τα TPs έχουν σχηματιστεί από την πρώτη κιόλας ώρα, αλλά τα εύρη των χρωματογραφικών κορυφών είναι μέγιστα έπειτα από 24 με 48 ώρες. Στις ανοξικές συνθήκες οι ενώσεις σχηματίζονται σε μεγαλύτερους χρόνους, δίνοντας μέγιστα εύρη χρωματογραφικών κορυφών στις 72 ώρες. Στις αναερόβιες συνθήκες ο σχηματισμός της ένωσης RAN331_α2 έχει ξεκινήσει πριν τις 24 ώρες, όπου έγινε η πρώτη δειγματοληψία με μέγιστο σχηματισμού στις 72 ώρες.

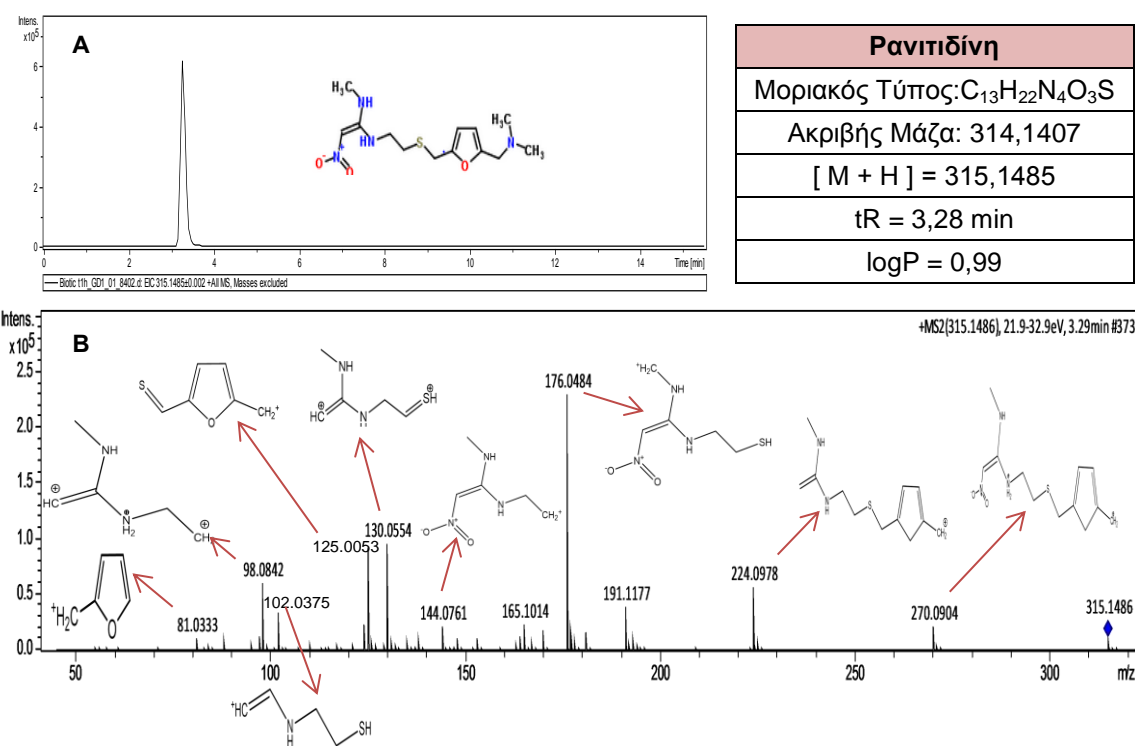
Πίνακας 2: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης ρανιτιδίνης που ανιχνεύθηκαν από την βιοαποικοδόμηση της υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.

TPs	Αεροβικά	Ανοξικά	Αναερόβια	Μοριακός Τύπος	Όνομα	Χρόνος Ανάσχεσης (min)
RAN317	✓	✗	✗	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₄ S	Desmethyl-hydro ranitidine	1,3 / 1,8
RAN302	✓	✓	✗	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₅ S	Ranitidine carboxylic acid	3,7
RAN286	✓	✗	✗	C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₄ S	-	3,0 / 3,2
RAN301	✓	✓	✗	C ₁₂ H ₂₀ N ₄ O ₃ S	Desmethyl ranitidine	3,3
RAN331_α1	✓	✗	✗	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	Ranitidine-S-Oxide	1,4
RAN331_α2	✓	✓	✓	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	Ranitidine-S-Oxide	2,1
RAN331_β	✓	✓	✗	C ₁₃ H ₂₂ N ₄ O ₄ S	Ranitidine-N-Oxide	3,4



Εικόνα 5: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της ρανιτιδίνης στις τρεις συνθήκες: (α) αερόβια, (β) ανοξικά, (γ) αναερόβια

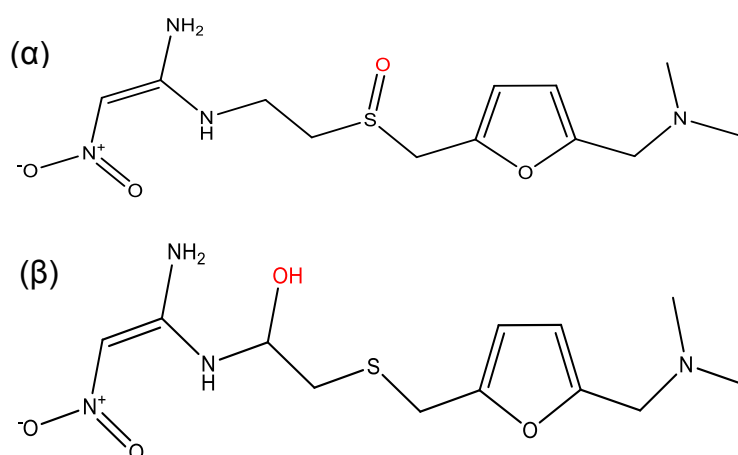
Στο MS/MS φάσμα της ρανιτιδίνης τα θραύσματα που παρατηρούνται έχουν $m/z = 81,0331, 98,0841, 102,0369, 110,0975, 125,0369, 130,0559, 144,0763, 165,1017, 176,0484, 191,1176, 224,0978, 270,0906$. Από αυτά τα θραύσματα στα περισσότερα αποδόθηκε δομή σύμφωνα με τη θραυσματοποίηση της ένωσης. Η θραυσματοποίηση της μητρικής ένωσης παίζει καθοριστικό ρόλο στην ταυτοποίηση των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού καθώς σε κάθε ένα πιθανό προϊόν μετασχηματισμού γίνεται σύγκριση των m/z με αυτά της μητρικής ένωσης ώστε να αποδοθεί η δομή τους μέσω των θραυσμάτων. Στην Εικόνα 17 παρουσιάζονται το MS/MS φάσμα και όλες οι δομές που αποδόθηκαν στα θραύσματα της ένωσης.



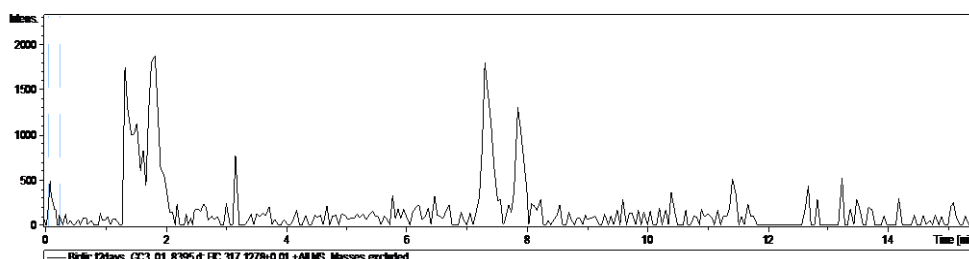
Εικόνα 6: A) ΧΙC της ρανιτιδίνης υπό αερόβιες συνθήκες, B) Φάσμα MS/MS της ρανιτιδίνης υπό αερόβιες συνθήκες

7.3.1 RAN317

Η ένωση RAN317 σχηματίστηκε από την υδροξυλίωση της μητρικής ένωσης, στις αερόβιες συνθήκες, ή από την προσθήκη ενός ατόμου οξυγόνου στο άτομο θείου της ένωσης ρανιτιδίνης (s-oxide) και την απόσπαση ενός μεθυλίου. Δύο πιθανές δομές προτείνονται από το Metabolite Predict από τις οποίες η μία προτείνεται από το EAWAG-PPS (δεν προβλέπει υδροξυλιώσεις). Η διαφορά των δύο ισομερών έγκειται στην διαφορά της πολικότητας τους όπως φαίνεται από την διπλή κορυφή στο ΧΙC της ένωσης RAN317 για την χρονική στιγμή $t = 2$ days. Οι ενώσεις εκλύονται σε χρόνο 1,35 min και 1,84 min αντίστοιχα. Ο RAN317 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=317,1278$ με μοριακό τύπο $C_{12}H_{20}N_4O_4S$. Από το φάσμα MS/MS της ένωσης RAN317 εντοπίζονται τα θραύσματα με $m/z = 71,0860, 88,0777, 106,0887, 141,1312, 255,2397$ και $298,2827$. Δυστυχώς, δεν μπορέσαμε να λάβουμε φάσμα MS/MS ώστε να ταυτοποιήσουμε τη δομή του RAN317.



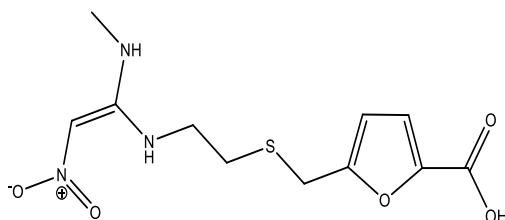
Σχήμα 12: Πιθανές δομές της ένωσης RAN 317.



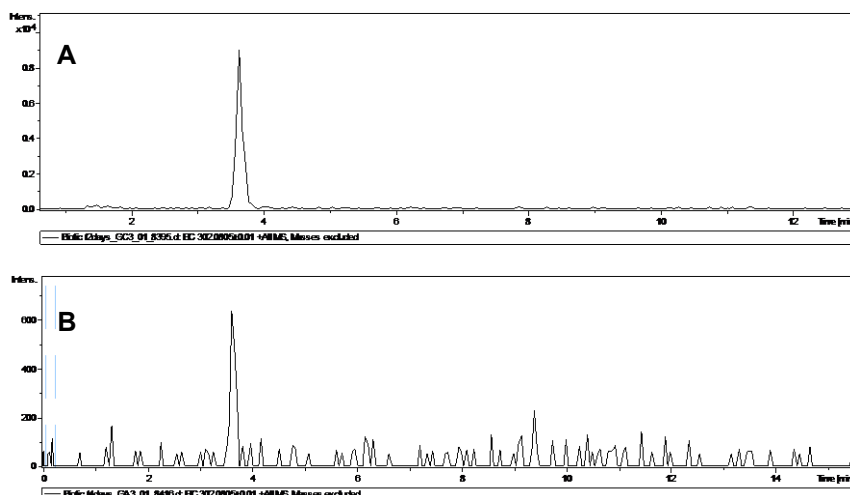
Εικόνα 7: ΧΙC του TP RAN317 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 2$ days.

7.3.2 RAN302

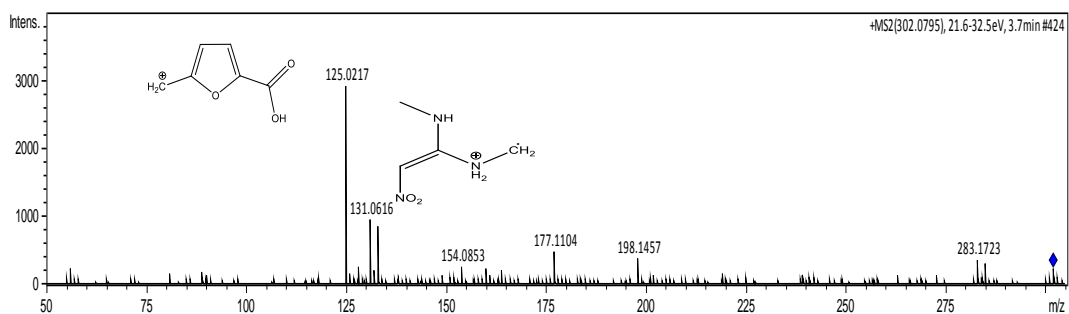
Η ένωση RAN302 σχηματίζεται στις αερόβιες συνθήκες από την πρώτη ώρα και στις ανοξικές συνθήκες έπειτα από 6 ώρες. Έχει $[M+H] = 302,0805$ και χρόνο έκλουσης 3,7 min. Σχηματίστηκε με την απομάκρυνση της τριτοταγούς αμίνης και μετατροπή της σε καρβοξυλικό οξύ. Το MS/MS φάσμα της ένωσης στις αερόβιες συνθήκες δείχνει σε μεγαλύτερες αφθονίες τα θράσματα με $m/z = 125,0217$, $131,0616$, $154,0853$, $177,1104$, $198,1457$ και $283,1723$. Στις αερόβιες συνθήκες το θραύσμα με $m/z = 125,0217$ ταυτοποιεί την προτεινόμενη δομή για τον RAN302. Δυστυχώς για τις ανοξικές συνθήκες δεν καταφέραμε να πάρουμε φάσμα MS/MS για να ταυτοποιήσουμε ότι και ανοξικά το RAN302 έχει την ίδια δομή.



Σχήμα 13: Πιθανή δομή της ένωσης RAN302.



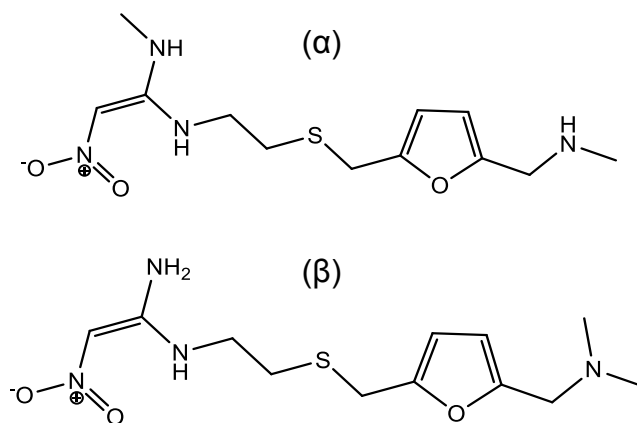
Εικόνα 8: A) XIC της ένωσης RAN302 στις αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 2$ days, B) XIC της ένωσης RAN302 στις ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days.



Εικόνα 9: MS/MS φάσμα της ένωσης RAN302 υπό αερόβιες συνθήκες.

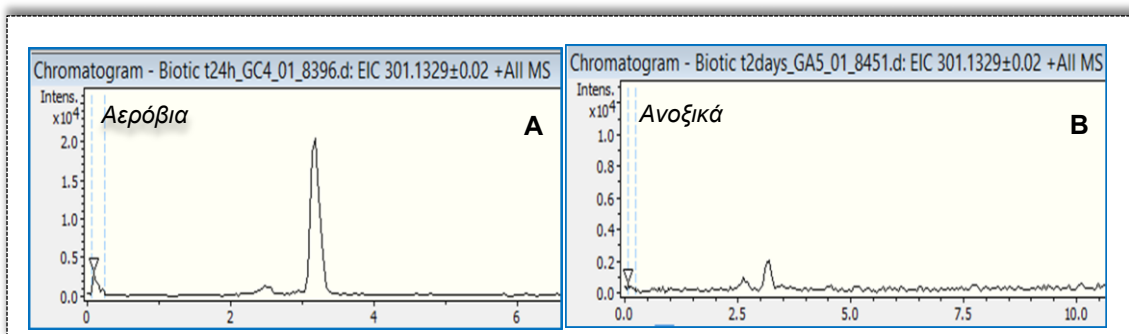
7.3.3 RAN301

Το TP RAN301 σχηματίζεται από την πρώτη ώρα του πειράματος στις αερόβιες συνθήκες με μέγιστο σχηματισμού στις 24 ώρες, ενώ στις ανοξικές συνθήκες οι εντάσεις των χρωματογραφικών κορυφών είναι πολύ χαμηλές. Παρ'όλα αυτά υπάρχει μία τάση σχηματισμού την πρώτη ημέρα. Την δεύτερη ημέρα φαίνεται να υπάρχει ένα μέγιστο και την τρίτη ημέρα έχει απομακρυνθεί πλήρως. Και στις δύο περιπτώσεις βλέπουμε μια δεύτερη κόρυφη με χρόνο έκλουσης 2,6 min. να έχει την ίδια τάση. Όμως οι υπερβολικά μικρές εντάσεις δεν μας επέτρεψαν να το διερευνήσουμε περαιτέρω. Ο RAN301 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=301,1329$ με μοριακό τύπο $C_{12}H_{20}N_4O_3S$ και χρόνο έκλουσης $t_r = 3,3$ min. Πρόκειται για προϊόν που οφείλεται στην απομάκρυνση ενός μεθυλίου και τη δημιουργία του Desmethylranitidine. Τόσο το EAWAG-PPS όσο και το Metabolite Predict προτείνουν δύο διαφορετικές πιθανές δομές, ενώ πρόκειται για ένα προϊόν μετασχηματισμού το οποίο έχει ανιχνευτεί και βιβλιογραφικά. Στο Σχήμα 14 παρουσιάζονται οι δύο διαφορετικές πιθανές δομές και οι διαφορετικές θέσεις από τις οποίες είναι πιθανό να απομακρυνθεί το μεθύλιο.

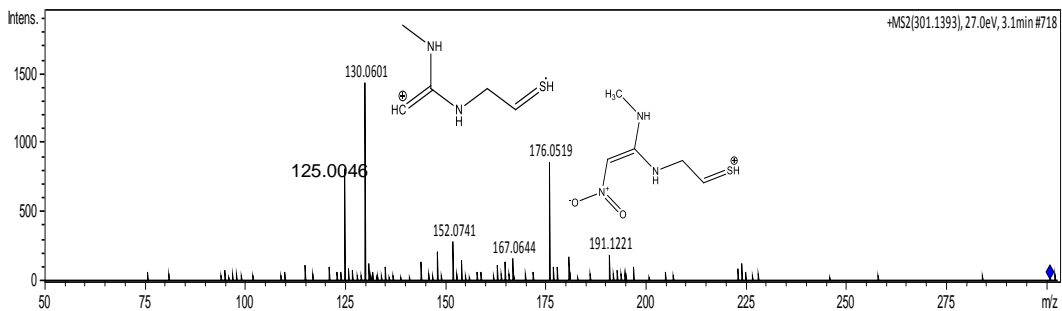


Σχήμα 14: Πιθανές δομές της ένωσης RAN 301.

Τα κύρια θραύσματα της ένωσης RAN301, έτσι όπως φαίνονται από το MS/MS φάσμα της ένωσης στις αερόβιες συνθήκες είναι τα $m/z = 125,0046, 130,0601, 152,0741, 167,0644, 176,0519$ και $191,1221$. Τα θραύσματα με $m/z = 125,0046, 130,0601, 176,0519$ και $191,1221$ είναι θραύσματα και της μητρικής ένωσης. Η δομή που αποδόθηκε στο χαρακτηριστικό θραύσμα με $m/z = 176,0519$ δείχνει ότι υπό αερόβιες συνθήκες η απομεθυλίωση πιθανότερα να έχει συμβεί στην τριτοταγής αμίνη(α). Θεωρούμε ότι η κορυφή στον χρόνο 2,6 min. αντιστοιχεί στο δεύτερο ισομερές. Υπό ανοξικές συνθήκες δεν μπόρεσαμε να λάβουμε φάσματα MS/MS.



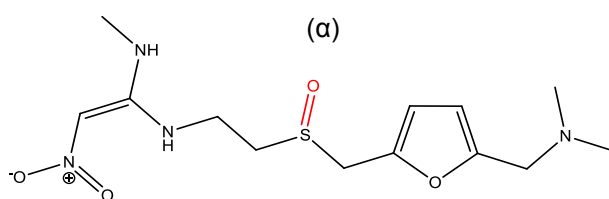
Εικόνα 10: A) XIC του TP RAN301 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h, B) XIC του TP RAN301 υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 48$ h.

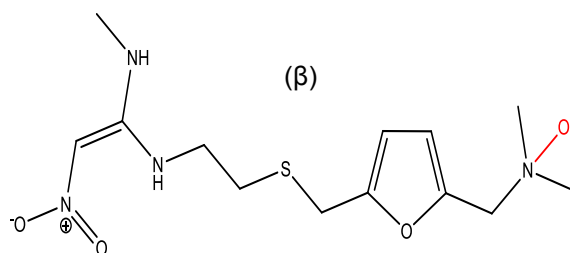


Εικόνα 11: MS/MS φάσμα της ένωσης RAN301 A) υπό αερόβιες συνθήκες.

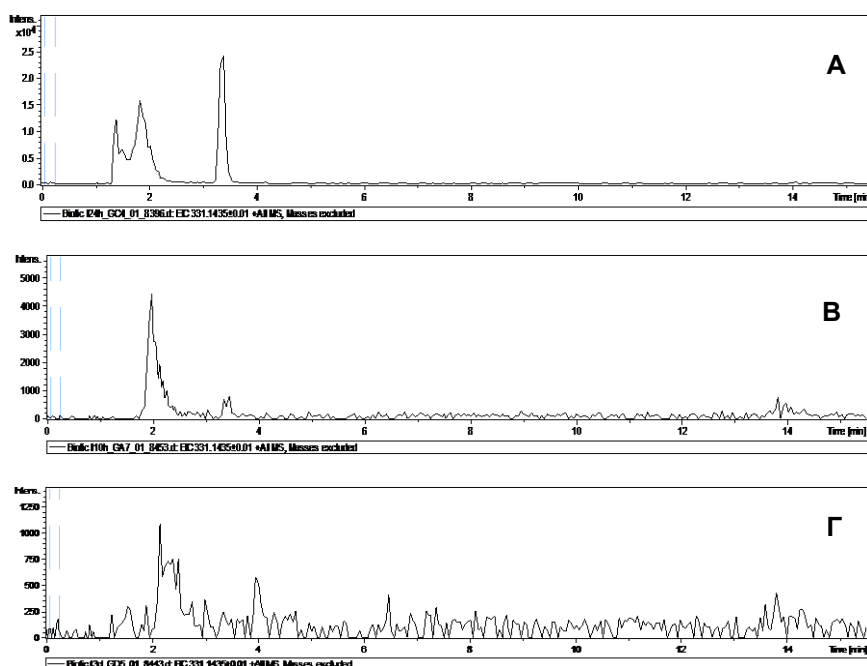
7.3.4 RAN331

Ο RAN331 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=331,1435$ με μοριακό τύπο $C_{13}H_{23}N_4O_3S$. Είναι το προϊόν οξειδωσης της μητρικής ένωσης ρανιτιδίνης. Η ένωση RAN331 εμφανίζεται ως μία διπλή κορυφή στις αερόβιες συνθήκες στους χρόνους 1,4 min (RAN331_a1 / s-oxide) και 2.1 min (RAN331_a2/ s-oxide) και ως μία κορυφή σε χρόνο 3,4min (RAN331_b / n-oxide) . Στις ανοξικές συνθήκες σχηματίζονται οι ενώσεις RAN331_a2 και RAN331_b. Στις αναερόβιες συνθήκες σχηματίζεται μόνο η ένωση RAN331_a2. Παρουσιάζει μέγιστο στις 24 ώρες υπό αερόβιες συνθήκες και στις τρεις ημέρες υπό ανοξικές συνθήκες. Υπό αναερόβιες συνθήκες ο σχηματισμός του προϊόντος μετασχηματισμού έχει ξεκινήσει πριν τη πρώτη δειγματοληψία και απομακρύνεται πλήρως την πέμπτη ημέρα. Στο MS/MS φάσμα της ένωσης RAN331_a2 στις ανοξικές συνθήκες παρατηρούμε πέντε θραύσματα. Το θραύσμα με $m/z = 176,0491$ εμφανίζεται και στο MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης. Τα θραύσματα με $m/z = 110,0966$, $138,0907$ και $176,0491$ είναι παρόμοια με θραύσματα που υπάρχουν στο MS/MS φάσμα της ίδιας ένωσης στις αερόβιες συνθήκες





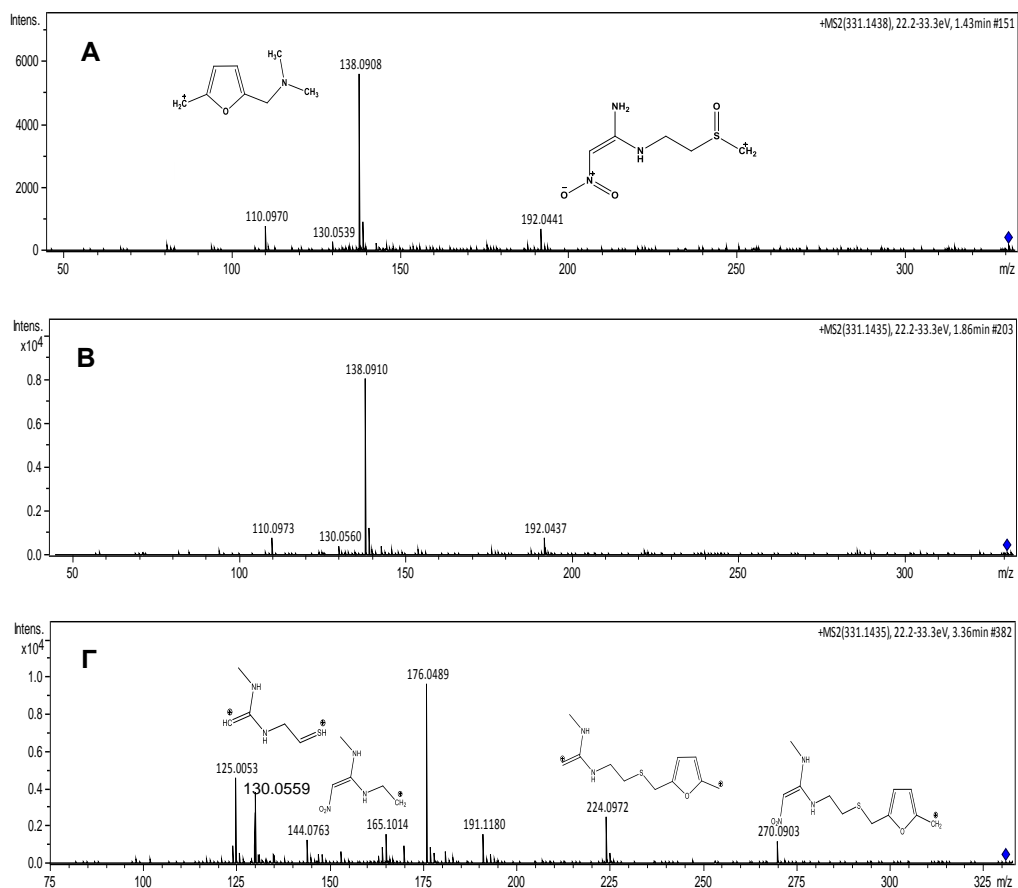
Σχήμα 15: Προτεινόμενες δομές της ένωσης RAN331_a (α) και RAN331_b (β).



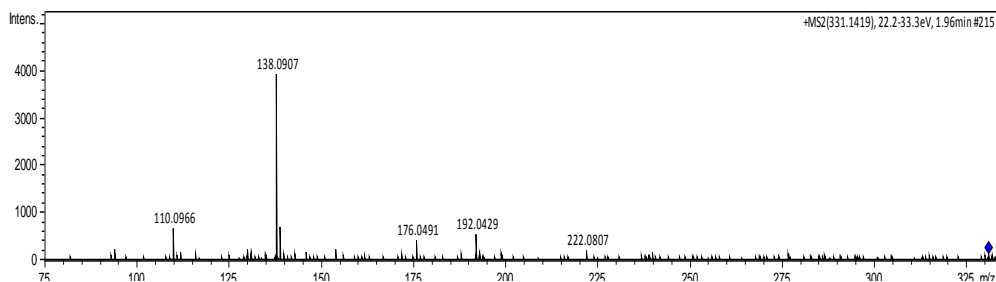
Εικόνα 12: XIC της ένωσης RAN331 A) στις αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24 \text{ h}$, B) στις ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 3 \text{ days}$, Γ) στις αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 3 \text{ days}$.

Υπό αερόβιες συνθήκες φαίνεται να σχηματίζονται και οι δύο πιθανές δομές της ένωσης RAN331. Συγκεκριμένα οι δομές που αποδώθηκαν στα σχηματιζόμενα θραύσματα με $m/z = 192,0441$, $224,0972$ δείχνουν ότι οι πρώτες δύο κορυφές αντιστοιχούν στην s-oxide ένωση, ενώ η τρίτη κορυφή αντιστοιχεί στην N-oxide. Παράλληλα, και τα τρία MS/MS φάσματα περιέχουν πολλά από τα θραύσματα που υπάρχουν στο MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης. Ομοίως, η ύπαρξη του θραύσματος με $m/z = 192,0441$ στο φάσμα των ανοξικών συνθηκών και η απουσία του $224,0972$ δείχνει ότι υπό ανοξικές συνθήκες σχηματίζεται μόνο η μία μορφή του προϊόντος μετασχηματισμού (s-

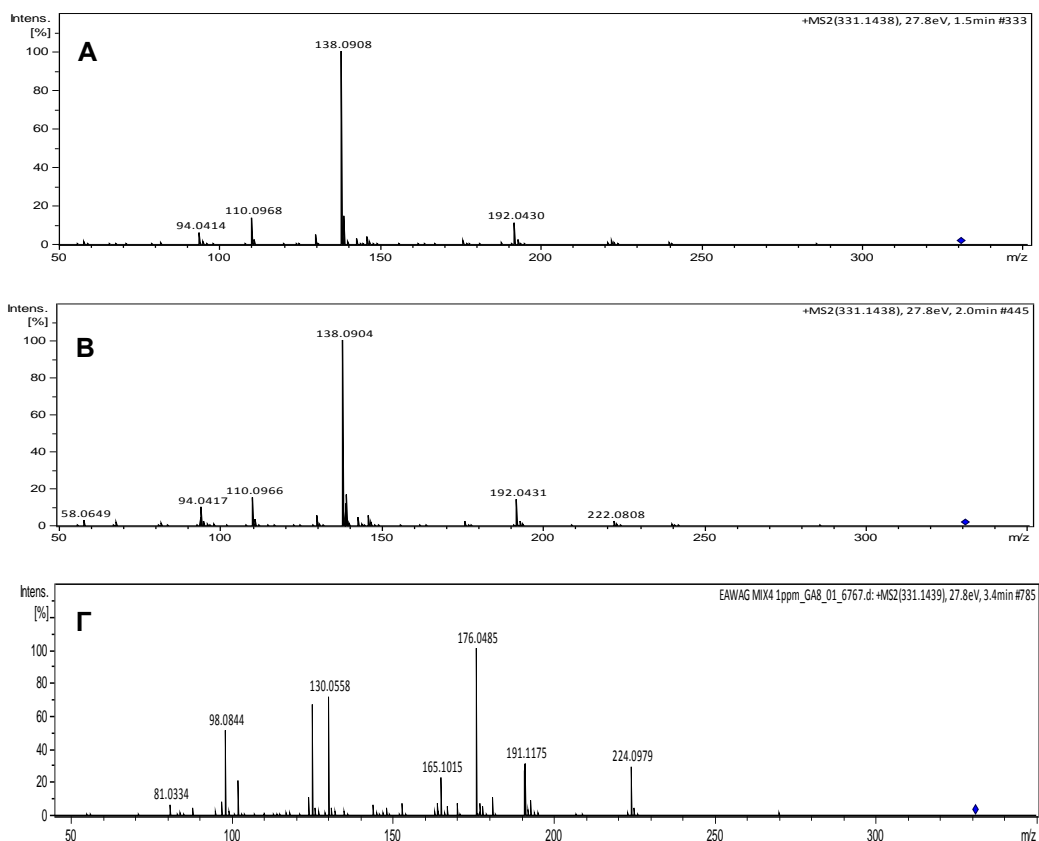
oxide). Για την δεύτερη κορυφή που παρουσιάζεται στο χρωματογράφημα των ανοξικών συνθηκών δεν μπορέσαμε να πάρουμε φάσμα MS/MS. Λόγω της χαμηλής ευαισθησίας στις αναερόβιες συνθήκες δεν ήταν εφικτή η παροχή φάσματος MS/MS. Από τον χρόνο έκλουσης μπορούμε να υποθέσουμε ότι υπό αναερόβιες συνθήκες σχηματίζεται η ένωση RAN331_s-oxide.



Εικόνα 13: MS/MS φάσμα των ενώσεων A) RAN331_a1, B) RAN331_a2 Γ) RAN331_β, στις αερόβιες συνθήκες.



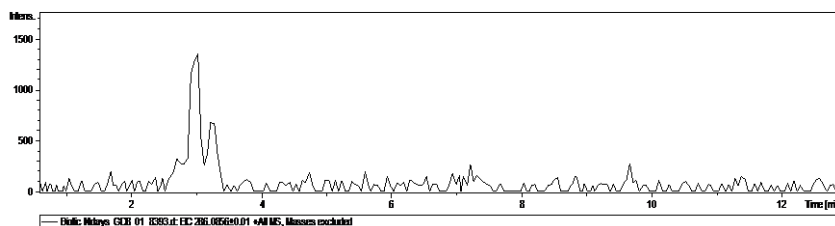
Εικόνα 14: MS/MS φάσμα της ένωσης RAN331_a2 τη χρονική στιγμή $t = 3$ days στις ανοξικές συνθήκες.



Εικόνα 15: MS/MS φάσματα του προτύπου S-Oxide και N-Oxide A) Ranitide S-Oxide $t_r=1,5\text{min}$, B) Ranitidine S-Oxide $t_r=2,0\text{min}$, Γ) Ranitidine N-Oxide $t_r=3,4\text{min}$.

7.3.5 RAN286

Ο RAN286 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=286,0856$ με μοριακό τύπο $C_{11}H_{15}N_3O_4S$. Σχηματίστηκε μόνο υπό αερόβιες συνθήκες και παρουσιάζει μέγιστο στις 4 ημέρες. Στο χρωματογράφημα εμφανίζονται δύο κορυφές, σε χρόνους $t = 3\text{min}$. και $t = 3,2\text{min}$. Δεν καταφέρουμε να λάβουμε φάσμα MS/MS, οπότε δεν μπορέσαμε να ταυτοποιήσουμε την δομή του.



Εικόνα 16: XIC της ένωσης RAN286 τη χρονική στιγμή $t = 4\text{ days}$ υπό αερόβιες συνθήκες.

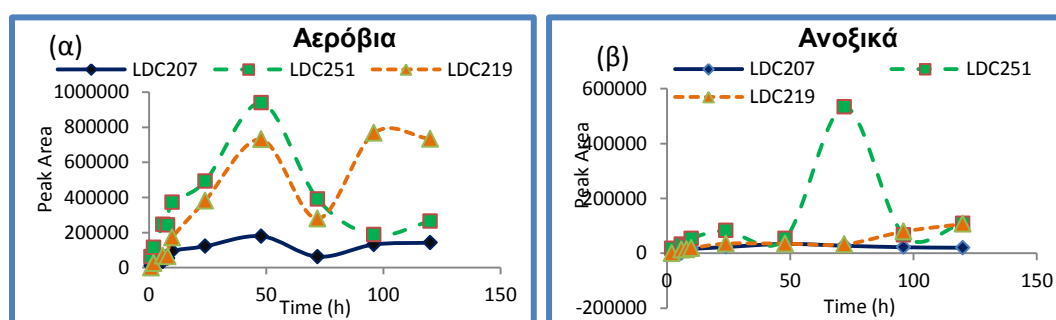
7.4 Λιδοκαΐνη

Η ένωση λιδοκαΐνη έχει μοριακό τύπο $C_{14}H_{22}N_2O$, μονοϊσοτοπική μάζα 234,1726, $[M + H] = 235,1805$ και $\log P = 2,84$. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων σχηματίστηκαν τρεις ενώσεις στις αερόβιες και στις ανοξικές συνθήκες ενώ, κανένα TP δεν σχηματίστηκε υπό αναερόβιες συνθήκες.

Πίνακας 3: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης λιδοκαΐνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.

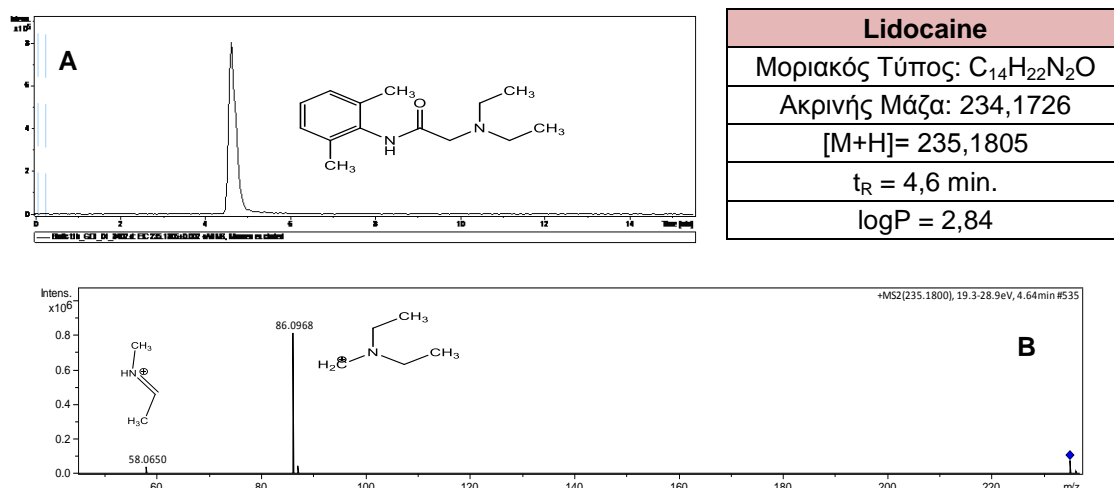
TPs	Αερόβια	Ανοξικά	Αναερόβια	Μοριακός Τύπος	Όνομα	Χρόνος Ανάσχεσης (min)
LDC207	✓	✓	✗	$C_{12}H_{18}N_2O$	N-ethylglycinexylidide	4,3
LDC251	✓	✓	✗	$C_{14}H_{22}N_2O_2$	Lidocaine-N-oxide	5,2
LDC219	✓	✓	✗	$C_{13}H_{18}N_2O$		6,7

Η ένωση LDC207 σχηματίζεται αερόβια από την πρώτη ώρα και ανοξικά από την όδγο ενώ, παρουσιάζει μέγιστο εύρος χρωματογραφικής κορυφής στις 2 ημέρες. Ο σχηματισμός της ένωσης LDC219 ξεκινά υπό αερόβιες συνθήκες την δεύτερη ώρα, ενώ υπό ανοξικές συνθήκες την έκτη ώρα. Παρουσιάζει μέγιστο εύρος χρωματογραφικής κορυφής στις τέσσερις και πέντε ημέρες αντίστοιχα. Το TP LDC251 σχηματίζεται αερόβια από την πρώτη ώρα, με αυξανόμενη τάση σχηματισμού μέχρι τις δύο ημέρες και στη συνέχεια απομακρύνεται. Υπό ανοξικές συνθήκες σχηματίζεται, εξίσου, από την πρώτη ώρα, με πιο αργούς όμως ρυθμούς και παρουσιάζει μέγιστο σχηματισμού στις τρεις ημέρες.



Εικόνα 17: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της λιδοκαΐνης (α) αερόβια, (β) ανοξικά.

Η ένωση λιδοκαΐνη εκλύεται σε χρόνο $t = 4,6$ min. Στο MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης παρατηρούμε τα θραύσματα με $m/z = 56,0650$ και $86,0968$ στα οποία αποδόθηκε δομή. Η θραυσματοποίηση της μητρικής ένωσης παίζει καθοριστικό ρόλο στην ταυτοποίηση των πιθανών προϊόντων μετασχηματισμού καθώς σε κάθε ένα πιθανό προϊόν μετασχηματισμού γίνεται σύγκριση των m/z με αυτά της μητρικής ένωσης, ώστε να αποδοθεί η δομή τους μέσω των θραυσμάτων. Στην Εικόνα 19 παρουσιάζονται το MS/MS φάσμα για χρωματογραφία RP και όλες οι δομές που αποδόθηκαν στα θραύσματα της ένωσης.

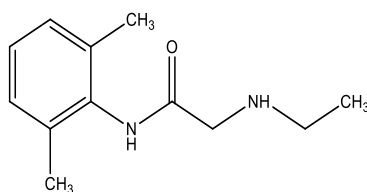


Εικόνα 18: A) ΧIC της λιδοκαΐνης υπό αερόβιες συνθήκες, B) Φάσμα MS/MS της λιδοκαΐνης υπό αερόβιες συνθήκες.

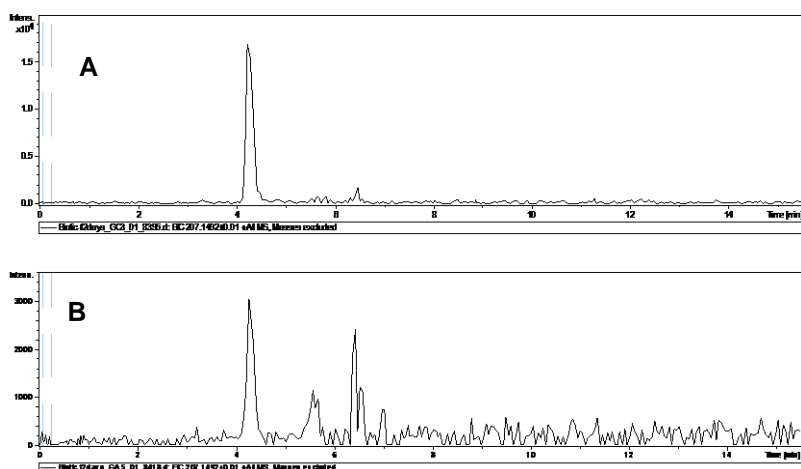
7.4.1 LDC207

Η ένωση LDC207 είναι πιθανό προϊόν μετασχηματισμού της μητρικής ένωσης λιδοκαΐνης και σχηματίζεται υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Προκύπτει από την απομάκρυνση μιας αιθυλομάδας $-CH_2CH_3$, ενώ προτείνεται μία πιθανή δομή από το EAWAG-PPS. Η ίδια δομή, επίσης, προτείνεται και βιβλιογραφικά. Εκλύεται σε χρόνο $t = 4,3$ min, έχει μοριακό τύπο $C_{12}H_{18}N_2O$ και αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H] = 207,1492$. Στο MS/MS φάσμα του TP LDC207, υπό αερόβιες συνθήκες, παρατηρούμε τα θραύσματα με $m/z = 58,0652$, $122,0923$ και $150,0890$ στα οποία αποδόθηκε πιθανή δομή. Υπό ανοξικές συνθήκες στο χρωματογραφήμα της ένωσης

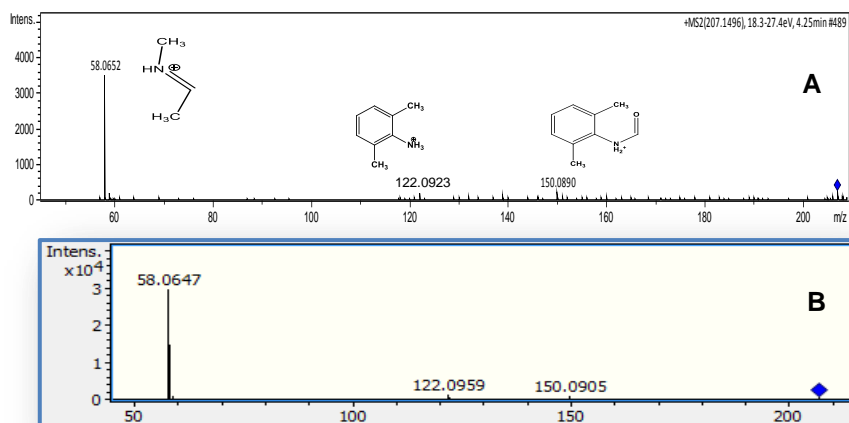
φαίνονται τρεις κορυφές σε χρόνους 4,27min, 5,58min και 6,43min. Ωστόσο, δεν ήταν δυνατή η λήψη φάσματος MS/MS ώστε να προβούμε σε περαιτέρω συμπεράσματα Παρί'ολο που καμία από τις δομές που αποδόθηκαν στα θραύσματα δεν επιβεβαιώνει την προτεινόμενη δομή για τον LDC207, ωστόσο η ταυτοποίηση προκύπτει από την πλήρη ταύτιση του φάσματος MS/MS με το αντίστοιχο φάσμα πρότυπης ένωσης αναφοράς.



Σχήμα 16: Προτεινόμενη δομή της ένωσης LDC207.



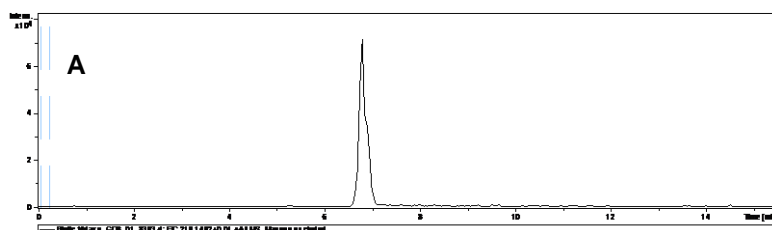
Εικόνα 19: ΧIC της ένωσης LDC207 τη χρονική στιγμή $t = 2$ days, A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

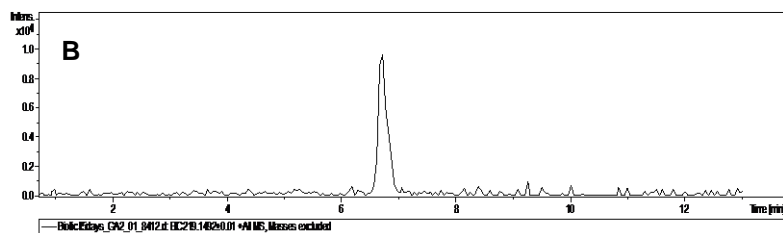


Εικόνα 20: Α) Φάσμα MS/MS της ένωσης LDC207 υπό αερόβιες συνθήκες, Β) Φάσμα MS/MS πρότυπης ένωσης αναφοράς LDC207.

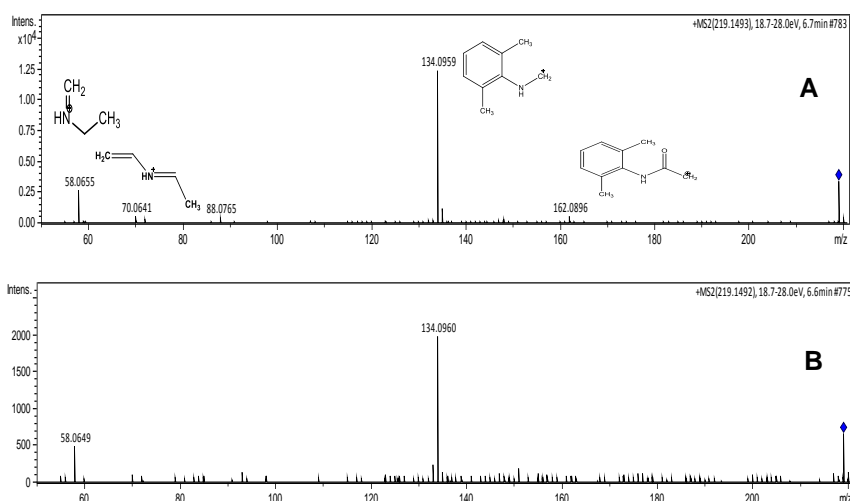
7.4.2 LDC219

Για το προϊόν μετασχηματισμού της μητρικής ένωσης λιδικαΐνης με $m/z = 219,1492$ δεν προτείνεται κάποια δομή από το Metabolite Predict ή από το EAWAG-PPS. Παρ'όλα αυτά έχει εντοπιστεί σε παλαιότερα πειράματα βιοαποικοδόμησης που πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο με non-target screening. Οπότε, προσθέσαμε το συγκεκριμένο m/z στη suspect list της λιδοκαΐνης, ώστε να παρατηρήσουμε τη τάση του και σ'αυτή την παρτίδα πειραμάτων. Σχηματίζεται υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες με αυξανόμενη τάση σχηματισμού. Στο MS/MS φάσμα διακρίνονται τα κύρια θραύσματα με $m/z = 58,0655, 70,0641, 88,0765, 134,0959$ και $162,0896$ στα οποία αποδόθηκαν δομές.





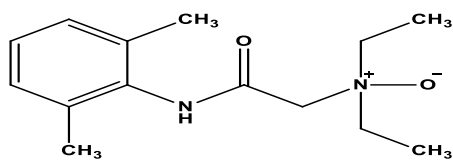
Εικόνα 21: ΧIC της ένωσης LDC219 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.



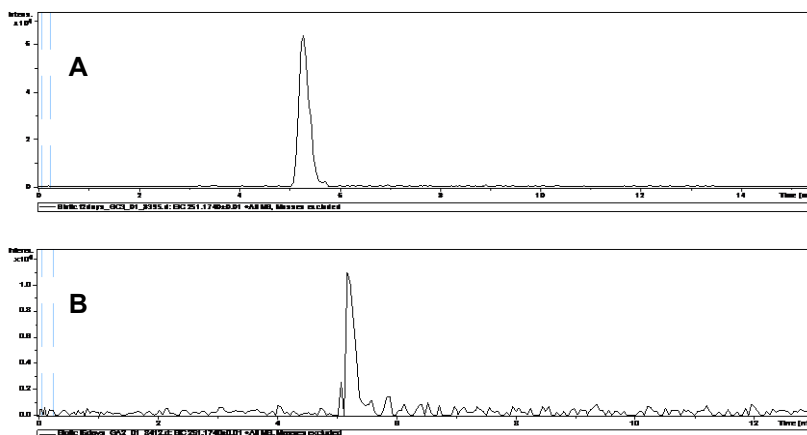
Εικόνα 22: Φάσμα MS/MS της ένωσης LDC219 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

7.4.3 LDC251

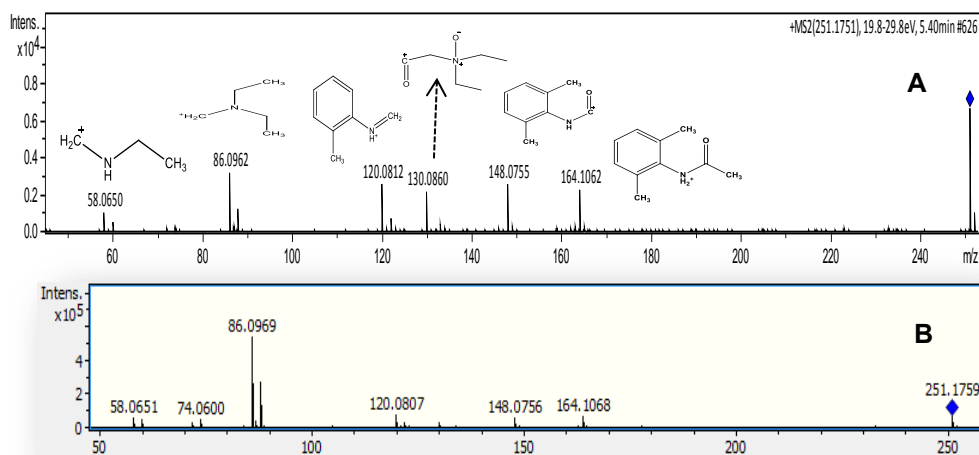
Η ένωση LDC251 είναι πιθανό προϊόν μετασχηματισμού της μητρικής ένωσης λιδοκαΐνης και σχηματίζεται υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Μπορεί να προκύψει από την υδροξυλίωση της μητρικής ένωσης λιδοκαΐνης ή την οξείδωση της τριτοταγούς αμίνης, ενώ προτείνεται μία πιθανή δομή από το EAWAG-PPS. Η ίδιες δομές, επίσης, προτείνονται και βιβλιογραφικά. Και στις δύο συνθήκες παρατηρούμε μία χρωματογραφική κορυφή σε χρόνο $t=5,2$ min. Έχει μοριακό τύπο $C_{14}H_{22}N_2O_2$ και αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]^+ = 251,1754$. Στο MS/MS φάσμα του LDC251, υπό αερόβιες συνθήκες, φαίνονται τα κύρια θραύσματα με $m/z = 58,0650, 86,0962, 120,0812, 130,0860, 148,0755$ και $164,1062$ τα οποία ταυτοποιούνται με πρότυπο αναφοράς της οξειδωμένης μορφής του LDC251. Υπό ανοξικές συνθήκες δεν ήταν δυνατή η λήψη φάσματος MS/MS.



Σχήμα 17: Προτεινόμενη δομή της ένωσης LDC251.



Εικόνα 23: ΧIC της ένωσης LDC251 τη χρονική στιγμή $t = 2$ days A) υπό αερόβιες συνθήκες, β) υπό αναερόβιες συνθήκες.



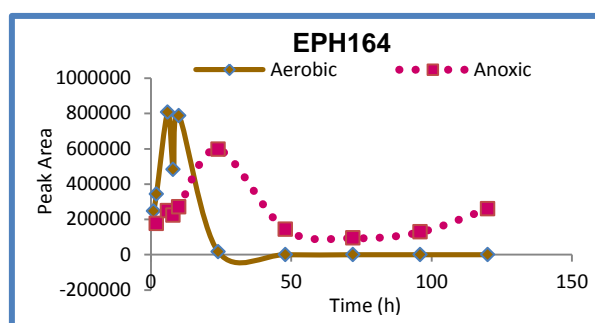
Εικόνα 24: A) MS/MS φάσμα της ένωσης LDC251 υπό αερόβιες συνθήκες, B) MS/MS φάσμα πρότυπης ένωσης αναφοράς LDC251.

7.5 Εφεδρίνη

Η ένωση εφεδρίνη έχει μοριακό τύπο $C_{10}H_{15}NO$, μονοϊσοτοπική μάζα 165,1154, $[M + H]=166,1226$ και $\log P=1,32$. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων σχηματίστηκε ένα TP στις αερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Στις αερόβιες συνθήκες η ένωση EPH164 αρχίζει να σχηματίζεται από την πρώτη ώρα και παρουσιάζει μέγιστο εύρος χρωματογραφικής κορυφής έπειτα από χρόνο έξι ωρών, ενώ στις 24 ώρες έχει απομακρυνθεί πλήρως. Αντίστοιχα, υπό ανοξικές συνθήκες, η σύνθεση της ίδιας ένωσης έχει ξεκινήσει από τις πρώτες ώρες με μέγιστο σχηματισμού στη μία ημέρα.

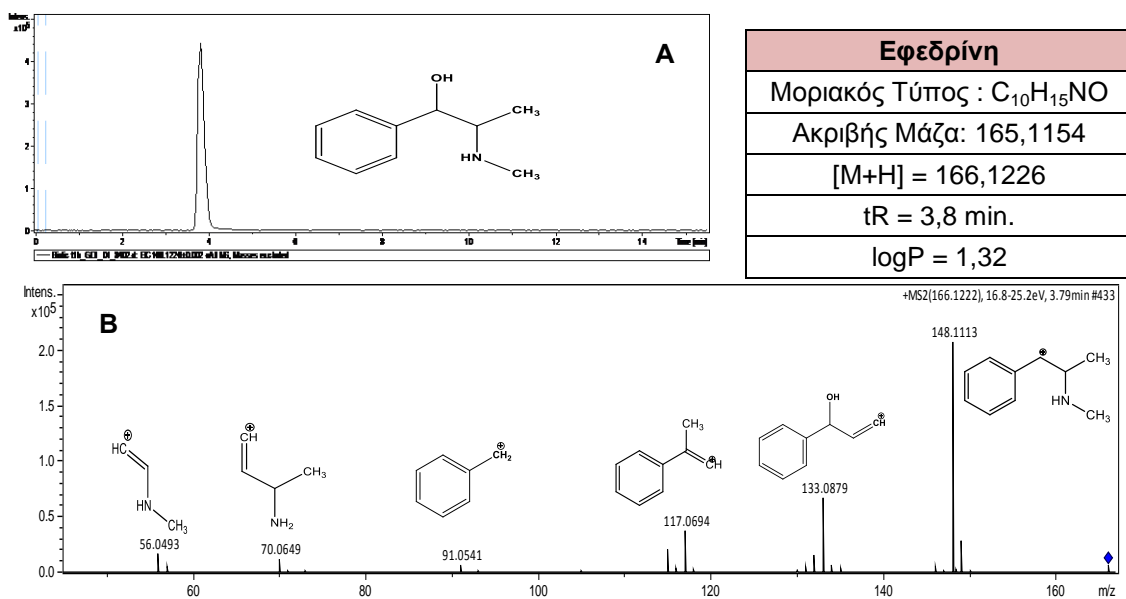
Πίνακας 4: Προϊόν βιομετατροπής της ένωσης εφεδρίνης που ανιχνεύτηκε από την βιοαποικοδόμηση της υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες.

TPs	Αερόβια	Ανοξικά	Αναερόβια	Μοριακός Τύπος	Όνομα	Χρόνος Ανάσχεσης (min)
EPH164	✓	✓	×	$C_{10}H_{13}NO$	Ephedrone	3,7



Εικόνα 25: Διάγραμμα σχηματισμού του TP EPH164 υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες.

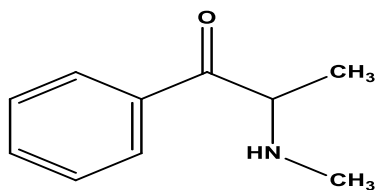
Στο MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης εφεδρίνης τα κύρια θραύσματα έχουν $m/z = 56,0493, 70,0649, 91,0541, 117,0649, 133,0879, 148,1113$ στα οποία αποδόθηκε πιθανή δομή.



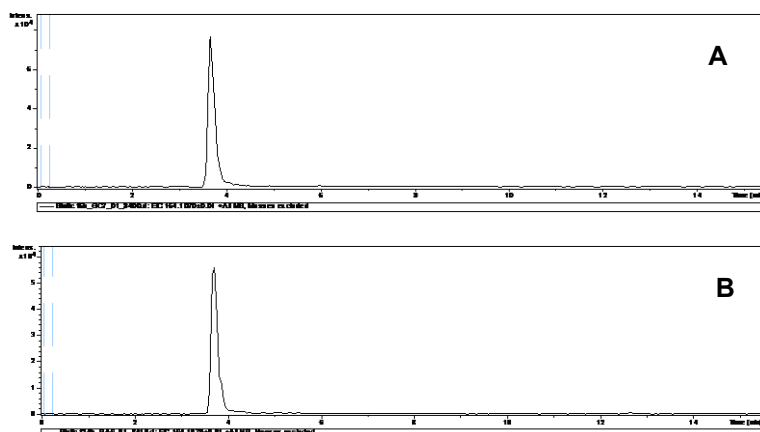
Εικόνα 26: A) XIC της ένωσης εφεδρίνης τη χρονική στιγμή $t = 1$ h, B) Φάσμα MS/MS της ένωσης εφεδρίνης.

7.5.1 EPH164

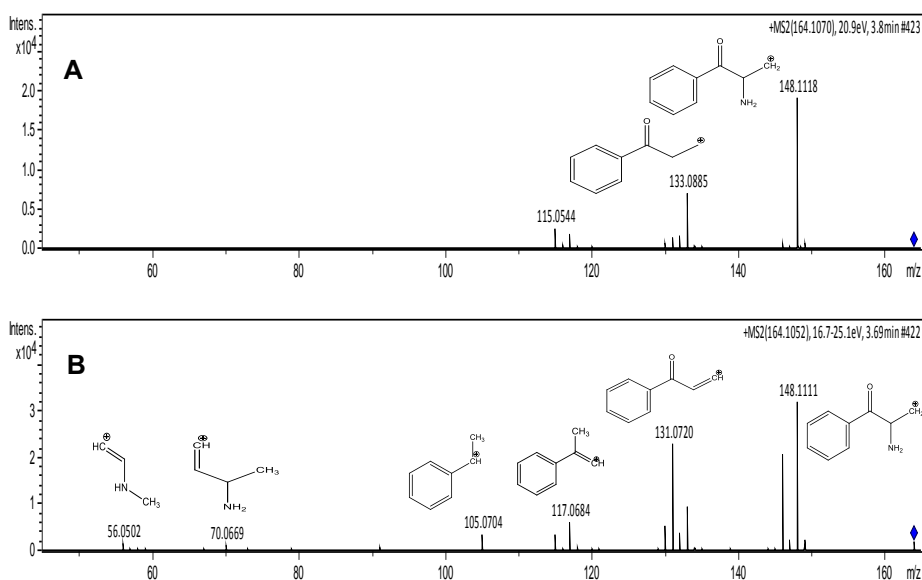
Η ένωση EPH164 είναι πιθανό προϊόν μετασχηματισμού της ένωσης εφεδρίνης, υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες, για το οποίο προτείνεται μία δομή από το Metabolite Predict και το EAWAG-PPS. Είναι προϊόν οξειδωσης της μητρικής ένωσης εφεδρίνης, με ακριβή μάζα $[M+H] = 164,1070$ και μοριακό τύπο C₁₀H₁₃NO. Εκλούεται σε χρόνο $t=3,7$ min. Στα MS/MS φάσματα της ένωσης, υπό αερόβιες και υπό ανοξικές συνθήκες, παρατηρούνται τα θραύσματα με $m/z = 56,0502, 70,0669, 105,0704, 115,0544, 117,0684, 131,0720, 133,0885$ και $148,1118$ απ'τα οποία τα περισσότερα υπάρχουν και στο φάσμα της μητρικής ένωσης. Επίσης, η δομή που αποδόθηκε στα κύρια θραύσματα με $m/z = 131,0702, 133,0885, 148,1118$, τόσο στις αερόβιες όσο και στις ανοξικές συνθήκες, ταυτοποιούν πως η ένωση EPH164 είναι προϊόν οξειδωσης της μητρικής ένωσης εφεδρίνης.



Σχήμα 18: Προτεινόμενη δομή της ένωσης EPH164.



Εικόνα 27: ΧΙC της ένωσης EPH164 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 6$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h.



Εικόνα 28: Φάσμα MS/MS του TP EPH164 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

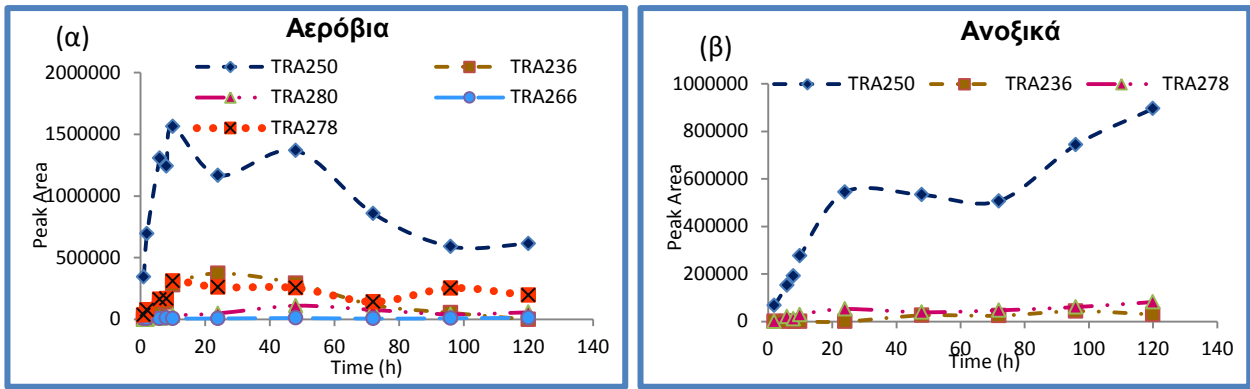
7.6 Τραμαδόλη

Η ένωση τραμαδόλη έχει μοριακό τύπο $C_{16}H_{25}NO_2$, μονοισοτοπική μάζα 263,1880, $[M + H]=264,1958$ και $\log P = 2,45$. Κατά τη διάρκεια της βιομετατροπής της ένωσης σχηματίστηκαν πέντε ενώσεις στις αερόβιες συνθήκες, τρεις ενώσεις στις ανοξικές συνθήκες, ενώ κανένα προϊόν βιομετατροπής δεν σχηματίστηκε υπό αναερόβιες συνθήκες.

Πίνακας 5: Προϊόντα μετασχηματισμού της τραμαδόλης που ανιχνεύτηκαν από την βιοαποικοδόμηση της υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.

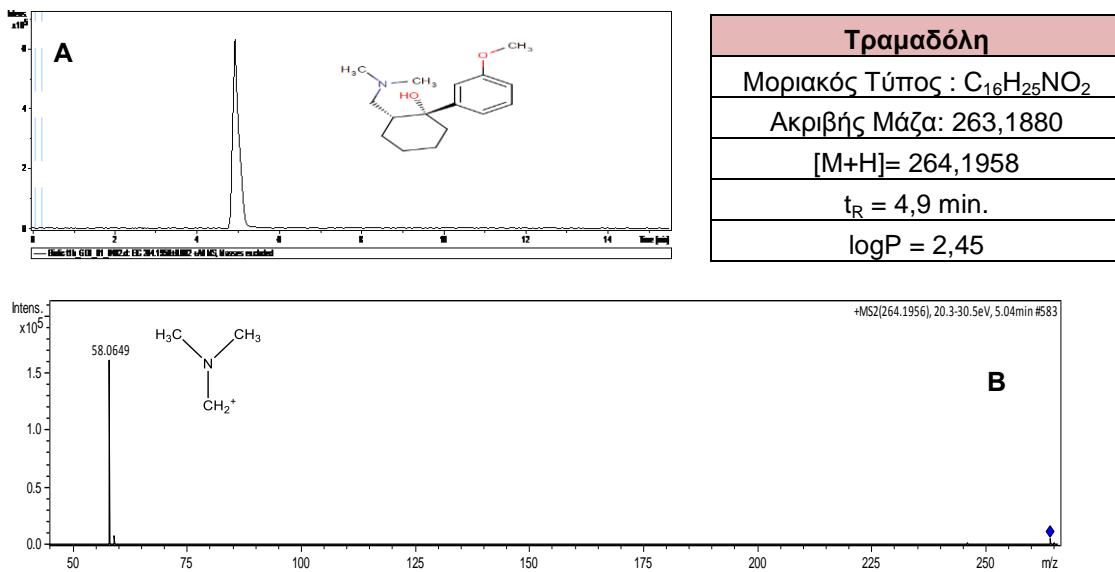
TPs	Αερόβια	Ανοξικά	Αναερόβια	Μοριακός Τύπος	Όνομα	Χρόνος Ανάσχεσης (min)
TRA250	✓	✓	✗	$C_{15}H_{23}NO_2$	Desmethyl tramadol	5,2
TRA236	✓	✓	✗	$C_{14}H_{21}NO_2$	Didesmethyl tramadol	5,3
TRA280	✓	✗	✗	$C_{16}H_{25}NO_3$	Hydroxy - tramadol	5,3
TRA266	✓	✗	✗	$C_{15}H_{23}NO_3$	Desmethyl-hydroxy tramadol	9,1
TRA278	✓	✓	✗	$C_{16}H_{23}NO_3$	Oxo-tramadol	7,8

Η ένωση TRA250 σχηματίστηκε αερόβια και ανοξικά από την πρώτη κιόλας ώρα. Στις αερόβιες συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο σχηματισμού στις 10 ώρες, ενώ φαίνεται να μην έχει απομακρυνθεί πλήρως την πέμπτη ημέρα. Στις ανοξικές συνθήκες, αντίθετα, έχει μια συνεχή ανοδική τάση. Η ένωση TRA236 σχηματίστηκε στις ανοξικές συνθήκες την δεύτερη ημέρα με μέγιστο στις 4 ημέρες ενώ κατώ από αερόβιες συνθήκες στις 6 ώρες με μέγιστο στις 24 ώρες. Η ένωση TRA280 σχηματίστηκε στις 6 ώρες ενώ μέγιστο έχει στις 2 ημέρες. Η ένωση TRA266 έχει μια μικρή ανοδική τάση στις αερόβιες συνθήκες. Η ένωση TRA278 σχηματίστηκε αερόβια από την πρώτη ώρα με μέγιστο στις 10 ώρες, ενώ ανοξικά ο σχηματισμός της ξεκίνησε την δεύτερη ώρα και έχει ανοδική τάση.



Εικόνα 29: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της τραμαδόλης (α) αερόβια, (β) ανοξικά.

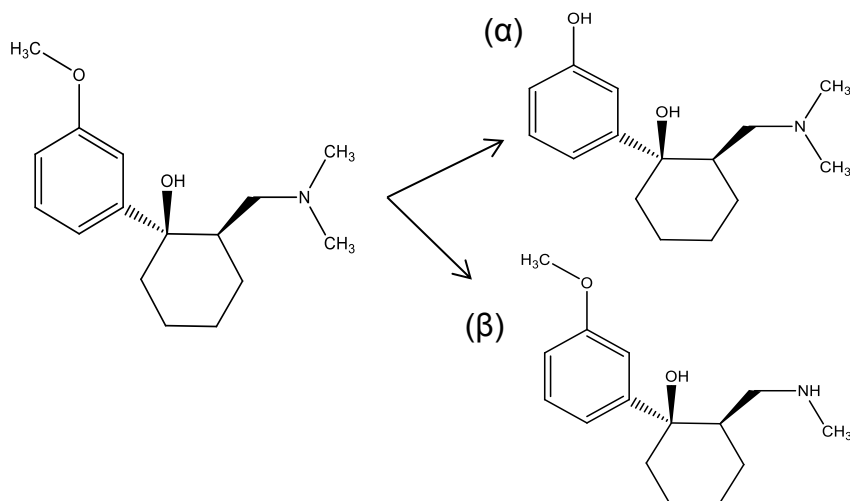
Στο MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης τραμαδόλης παρατηρείται ένα θραύσμα με $m/z = 58,0649$, στο οποίο δόθηκε μία προτεινόμενη δομή.



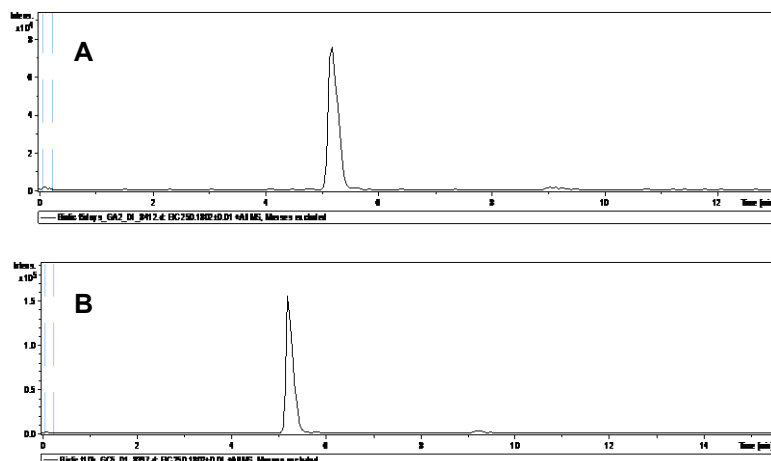
Εικόνα 30: Α) ΧIC της τραμαδόλης τη χρονική στιγμή $t = 1$ h, Β) Φάσμα MS/MS της τραμαδόλης.

7.6.1 TRA250

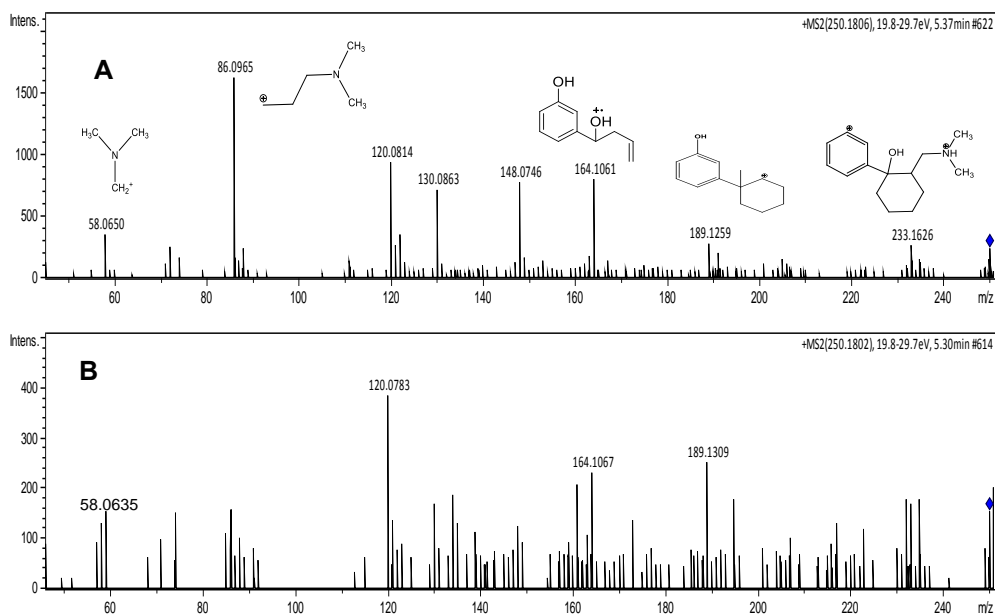
Για την ένωση TRA250 προτείνονται δύο πιθανές δομές από το Metabolite Predict και από το UMPPS. Και στις δύο περιπτώσεις το προϊόν βιομετατροπής έχει προκύψει έπειτα από απομεθυλίωση της μητρικής ένωσης τραμαδόλης. Η διαφορά έγκειται ότι στην πρώτη περίπτωση η μεθυλομάδα –CH₃ αποσπάστηκε από το άτομο οξυγόνου (α), ενώ στην δεύτερη περίπτωση από το άτομο αζώτου (β). Παρ'όλα αυτά βλέπουμε μόνο μία κορυφή στο χρόνο $t = 5,2 \text{ min}$. Η ένωση έχει ακριβή μάζα $[M+H] = 250,1802$ και μοριακό τύπο C₁₅H₂₃NO₂. Το MS/MS φάσμα της ένωσης υπό αερόβιες συνθήκες δίνει τα κύρια θραύσματα με $m/z = 58,0650, 86,0965, 120,0814, 130,0863, 148,0746, 164,1061, 189,1259$ και $233,1629$. Υπό ανοξικές συνθήκες παίρνουμε παρόμοια θραύσματα με $m/z = 58,0635, 120,0783, 164,1067$ και $189,1309$. Τελικά, η δομή που αποδόθηκε στα χαρακτηριστικά θραύσματα με $m/z = 58,0650, 86,0955, 164,1061$ και $189,1259$ μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανότερη δομή, τόσο για τις αερόβιες όσο και για τις ανοξικές συνθήκες, είναι η (α).



Σχήμα 19: Προτεινόμενες δομές για το TP TRA250 όπως προκύπτουν από την απομεθυλίωση της μητρικής ένωσης τραμαδόλης.



Εικόνα 31: XIC της ένωσης TRA250 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.

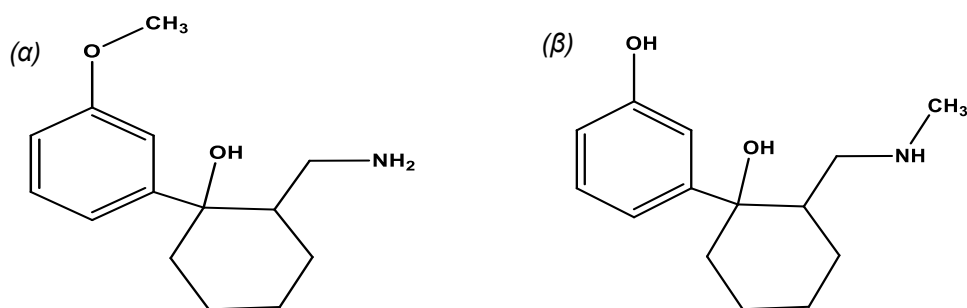


Εικόνα 32: MS/MS φάσμα της ένωσης TRA250 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

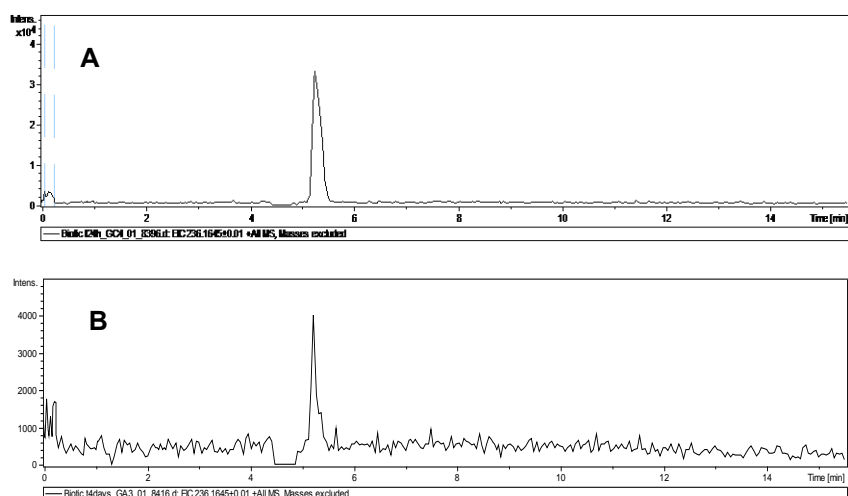
7.6.2 TRA236

Για την ένωση TRA236 προτείνονται δύο πιθανές δομές από το EAWAG-PPS. Το προϊόν βιομετατροπής έχει προκύψει έπειτα από διπλή απομεθυλίωση της μητρικής ένωσης τραμαδόλης. Στην πρώτη περίπτωση και τα δύο μεθύλια αποσπάστηκαν από την τριτοταγής αμίνη (α), ενώ στην

δεύτερη περίπτωση το ένα μεθυλίο αποσπάζεται από το άτομο του οξυγόνου (β). Χρωματογραφικά βλέπουμε μόνο μία κορυφή στο χρόνο $t = 5,3$ min στις αερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Η ένωση έχει ακριβή μάζα $[M+H] = 236,1645$ και μοριακό τύπο $C_{14}H_{21}NO_2$. Δυστυχώς, λόγω χαμηλών εντάσεων δεν ήταν δυνατή η λήψη φάσματος MS/MS ώστε να τεκμηριωθεί η δομή της ένωσης.



Σχήμα 20: Πιθανές δομές του TP TRA236.

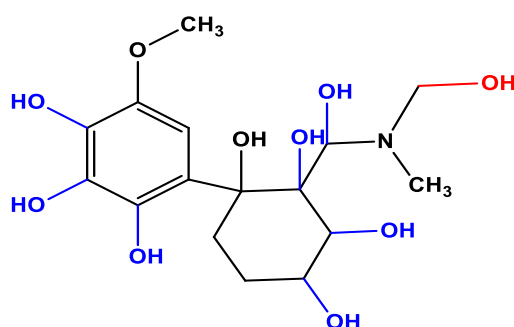


Εικόνα 33: XIC της ένωσης TRA236 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days.

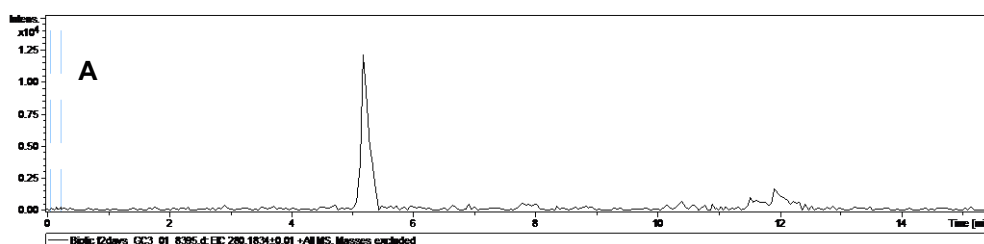
7.6.3 TRA280

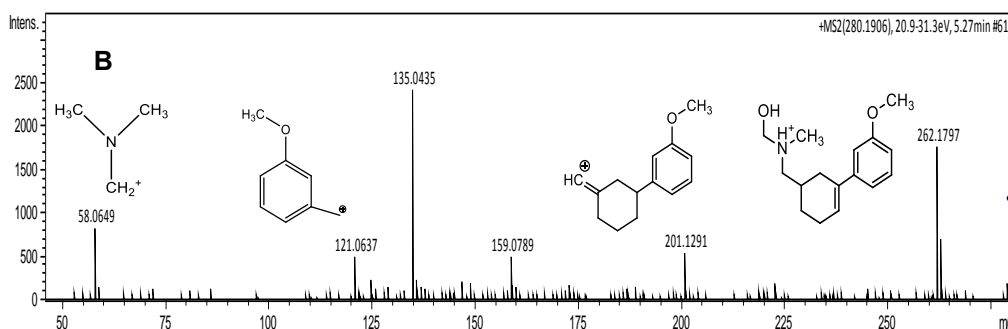
Για την ένωση TRA280 προτείνονται οχτώ πιθανές δομές από το Metabolite Predict. Και στις οχτώ περιπτώσεις το προϊόν βιομετατροπής έχει προκύψει έπειτα από υδροξυλίωση της μητρικής ένωσης τραμαδόλης.

Προτείνονται, δηλαδή, τέσσερις διαφορετικές θέσεις στις οποίες είναι πιθανό να γίνει η υδροξυλίωση. Καθώς το χρωματογράφημα της ένωσης TRA280 έχει μοναδική κορυφή η υδροξυλίωση, μάλλον, έχει πραγματοποιηθεί σε μία μόνο θέση. Στο Σχήμα 21 φαίνεται σε ποιες θέσεις μπορεί να προστεθεί η υδροξυλομάδα -OH στο μόριο της αρχικής ένωσης (μπλε χρώμα). Η ένωση έχει ακριβή μάζα $[M+H] = 280,1907$ και μοριακό τύπο $C_{16}H_{25}NO_3$. Το MS/MS φάσμα της ένωσης υπό αερόβιες συνθήκες δίνει τα κύρια θραύσματα με $m/z = 58,0649, 121,0637, 135,0435, 159,0789, 201,1291$ και $262,1797$. Η μάζα $58,0649$ υπάρχει και στο MS/MS φάσμα της μητρικής ένωσης. Η δομή που αποδόθηκε στα χαρακτηριστικά θραύσματα με $m/z = 121,0637, 201,1291$ και $262,1797$ μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιο πιθανό είναι η υδροξυλίωση να έχει πραγματοποιηθεί στον άνθρακα της τριτοταγούς αμίνης (κόκκινο χρώμα).



Σχήμα 21: Προτεινόμενες δομές της ένωσης TRA280.

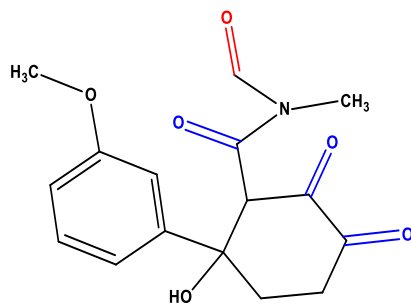




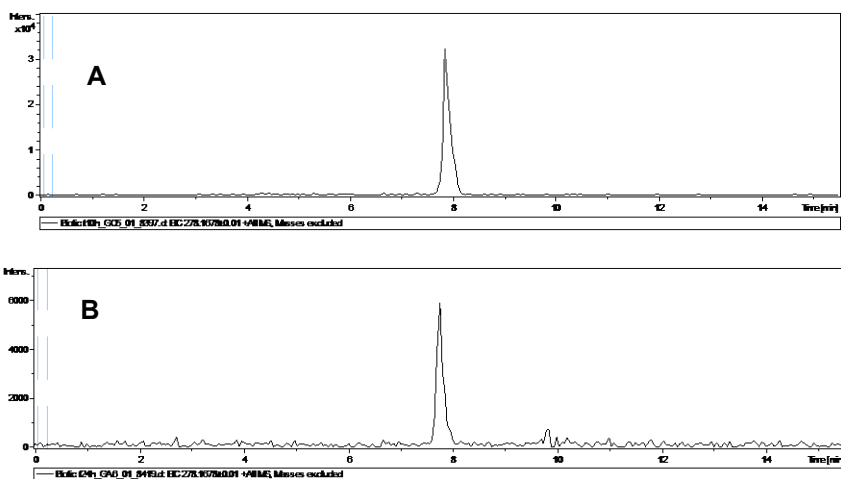
Εικόνα 34: A) ΧIC της ένωσης TRA280 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 2$ days, B) MS/MS φάσμα της ένωσης TRA280.

7.6.4 TRA278

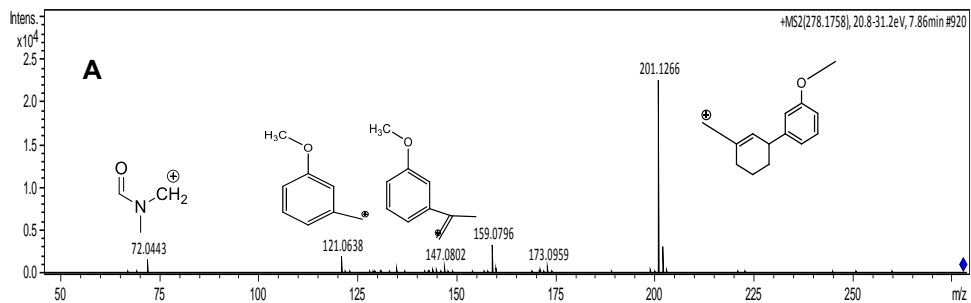
Για την ένωση TRA278 προτείνονται τέσσερις πιθανές δομές από το EAWAG-PPS. Όπως φαίνεται η ένωση TRA278 έχει προκύψει από την οξειδωση της ένωσης TRA280. Η οξειδωση πραγματοποιείται στις πιθανές θέσεις όπου έγινε η υδροξυλίωση για την ένωση TRA280 (μπλε χρώμα). Στο χρωματογράφημα βλέπουμε μόνο μία κορυφή στο χρόνο $t=7,8$ min. Η ένωση έχει ακριβή μάζα $[M+H] = 278,1751$ και μοριακό τύπο $C_{16}H_{23}NO_3$. Το MS/MS φάσμα της ένωσης υπό αερόβιες συνθήκες δίνει τα κύρια θραύσματα με $m/z = 72,0443$, $121,0638$, $147,0802$, $159,0796$, $173,0959$ και $201,1266$. Υπό ανοξικές συνθήκες παίρνουμε τα θραύσματα με $m/z = 72,0475$, $149,0257$, $159,0782$ και $201,1260$. Παρατηρούμε ότι και τα δύο φάσματα έχουν παρόμοια θραύσματα άρα υποθέτουμε ότι έχει σχηματιστεί η ίδια ένωση και στις δύο συνθήκες. Η δομή που αποδόθηκε στο θραύσμα με $m/z = 72,0443$ μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως πιθανότερη δομή για το TRA278, τόσο για τις αερόβιες όσο και για τις ανοξικές συνθήκες, είναι η οξειδωση με το κόκκινο χρώμα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 22.

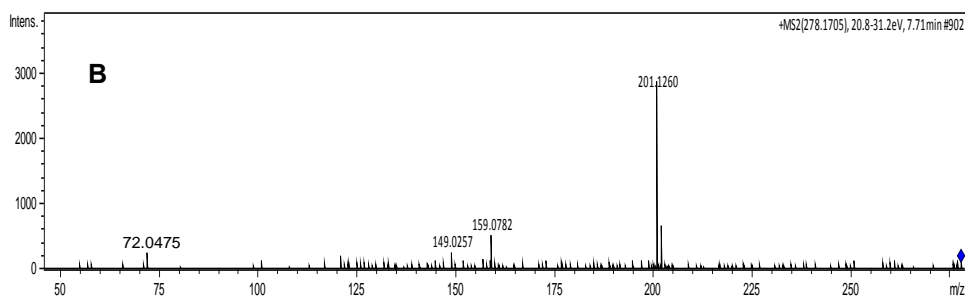


Σχήμα 22: Προτεινόμενες δομές της ένωσης TRA278.



Εικόνα 35: XIC της ένωσης TRA278 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ h, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h.

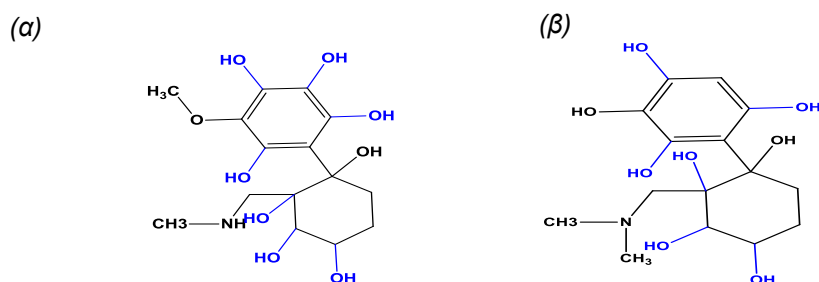




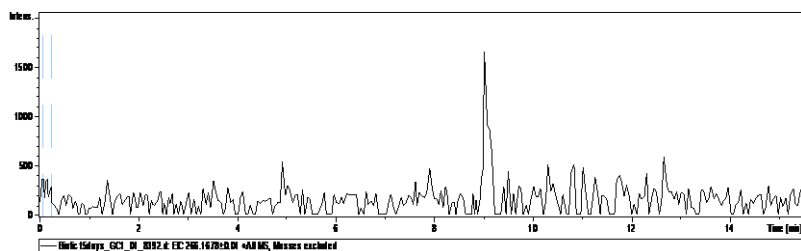
Εικόνα 36: MS/MS φάσμα της ένωσης TRA278 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

7.6.5 TRA266

Η ένωση έχει ακριβή μάζα $[M+H] = 266,1750$ και μοριακό τύπο $C_{15}H_{23}NO_3$. Στο χρωματογράφημα της ένωσης, αερόβια, βλέπουμε μία κορυφή σε χρόνο $t = 9,1$ min. Προτείνονται πιθανές δομές από το UMPPS στις οποίες φαίνεται ότι η ένωση TRA266 έχει προκύψει από την υδροξυλίωση της ένωσης TRA250. Δηλαδή, απομεθυλίωση της μητρικής ένωσης tramadol και στη συνέχεια υδροξυλίωση. Έχοντας ταυτοποιήσει την ένωση TRA250 μπορούμε να υποθέσουμε ότι η υδροξυλίωση έγινε στην δομή εκείνη όπου η απομεθυλίωση είχε συμβεί στο άτομο του οξυγόνου (Σχήμα 20α). Όμως, εξαιτίας των χαμηλών εντάσεων δεν μπορέσαμε να λάβουμε φάσμα MS/MS ώστε να εξετάσουμε αν η υπόθεσή μας είναι ορθή.



Σχήμα 23: Πιθανές δομές του TP TRA266.



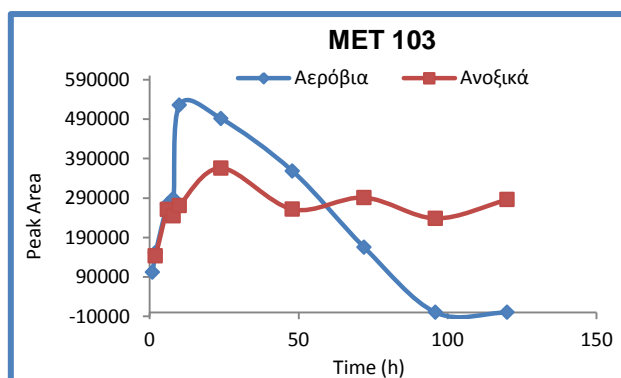
Εικόνα 37: XIC της ένωσης TRA266 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.

7.7 Μετφορμίνη

Η ένωση μετφορμίνη έχει μοριακό τύπο $C_4H_{11}N_5$, μονοισοτοπική μάζα 129,1009, $[M + H] = 130,1087$ και $\log P = -0,92$. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων σχηματίστηκε μία ένωση υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Υπό αερόβιες συνθήκες η ένωση MET103 έχει σχηματιστεί από την πρώτη ώρα με μέγιστο στις 10 ώρες ενώ μετά την τέταρτη ημέρα έχει απομακρυνθεί πλήρως. Η ίδια ένωση υπό ανοξικές συνθήκες παρουσιάζει μέγιστο στις 24 ώρες, ενώ μετά τις 48 ώρες τα επίπεδά της παραμένουν σταθερά.

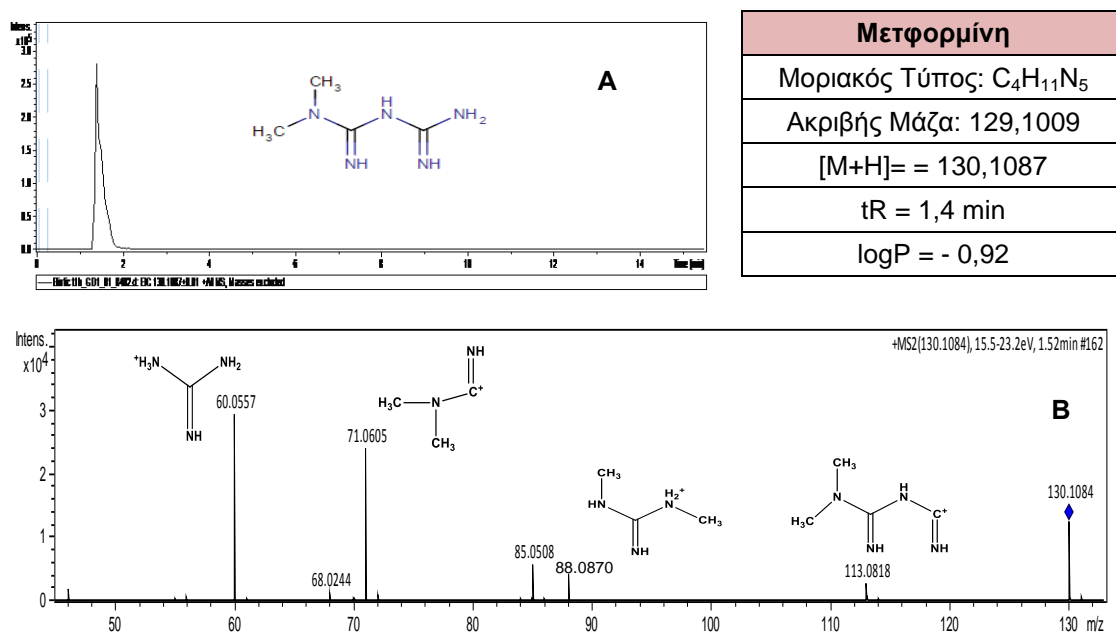
Πίνακας 6: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης μετφορμίνης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.

TPs	Αερόβια	Ανοξικά	Αναερόβια	Μοριακός Τύπος	Όνομα	Χρόνος Ανάσχεσης (min)
MET103	✓	✓	✗	$C_2H_6N_4O$	Guanylurea	1,3



Εικόνα 38: Διαγράμματα σχηματισμού του TP MET103 υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες.

Η ένωση μετφορμίνη εκλούεται σε χρόνο 1,4 min. στον θετικό ιοντισμό. Τα κύρια θραύσματα της ένωσης έχουν $m/z = 60,0557, 68,0244, 71,0605, 85,0508, 88,0870$ και $113,0818$. Από αυτά τα θραύσματα στα περισσότερα δόθηκε δομή σύμφωνα με τη θραυσματοποίηση της ένωσης. Στην εικόνα παρουσιάζονται το MS/MS φάσμα για χρωματογραφία RP και όλες οι δομές που αποδόθηκαν στα θραύσματα της ένωσης.

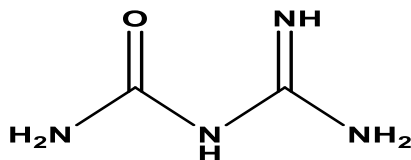


Εικόνα 39: A) ΧIC της ένωσης μετφορμίνης στις αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 1$ h, B) φάσμα MS/MS της ένωσης μετφορμίνης.

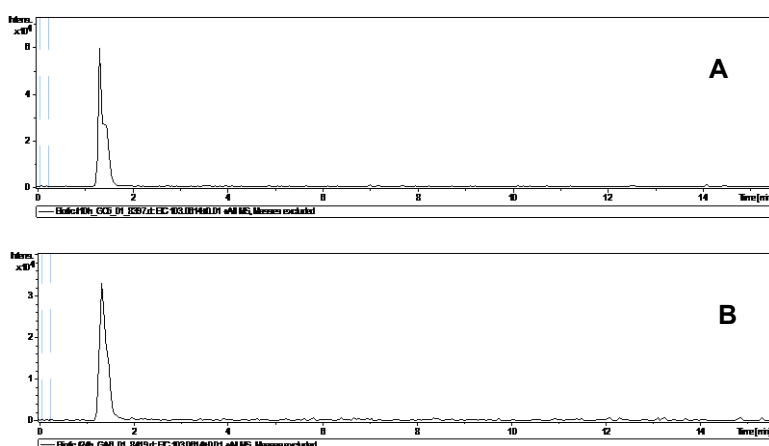
7.7.1 MET103

Το προϊόν μετασχηματισμού MET103 έχει μοριακό τύπο $C_2H_6N_4O$ και $[M+H]^+ = 103,0614$. Μία πιθανή δομή προτείνεται από το EAWAG-PPS. Αυτή η πιθανή δομή δείχνει πως η ένωση MET103 έχει προκύψει από την απομεθυλίωση της μητρικής ένωσης και παράλληλα την οξειδωσή της. Τα δύο χαρακτηριστικά θραύσματα με $m/z 60,055$ και $61,040$ στα φάσματα

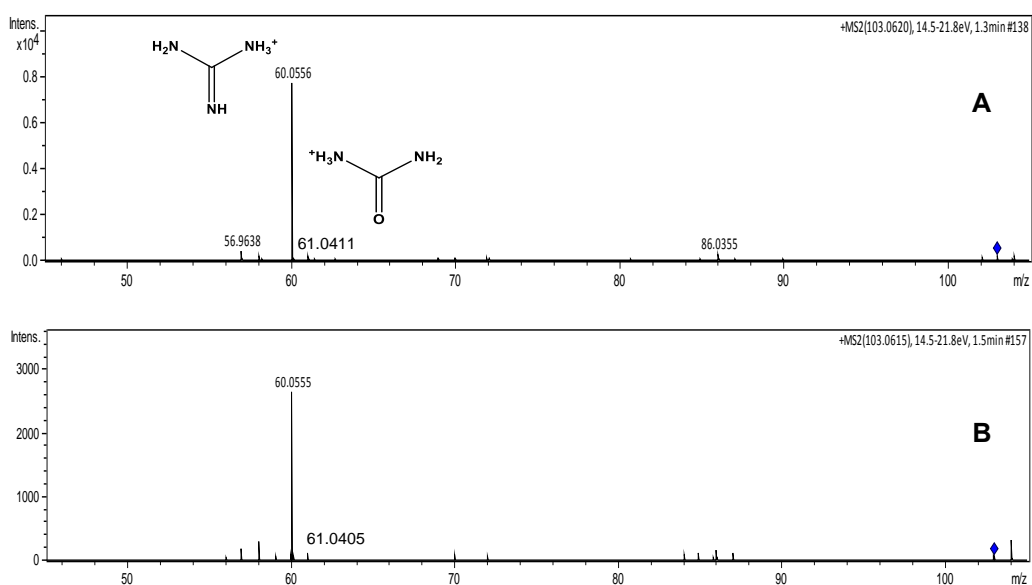
MS/MS δείχνουν πως το προϊόν μετασχηματισμού MET103 έχει θραυσματοποιηθεί στη μέση.



Σχήμα 24: Προτεινόμενη δομή της ένωσης MET103.



Εικόνα 40: ΧIC της ένωσης MET103 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ h, B) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 24$ h.



Εικόνα 41: Φάσμα MS/MS της ένωσης MET 103 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

7.8 Σιταλοπράμη

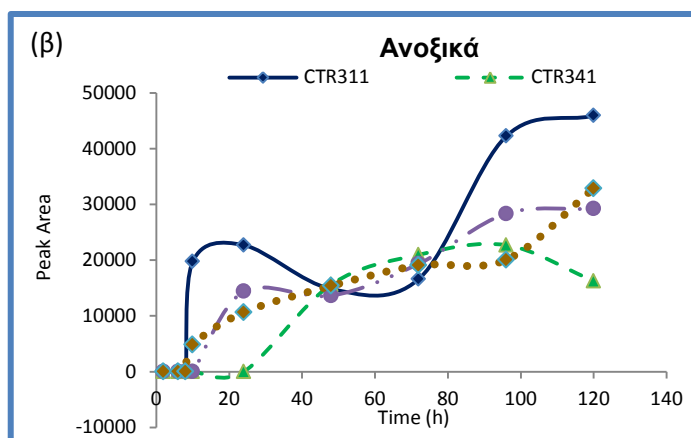
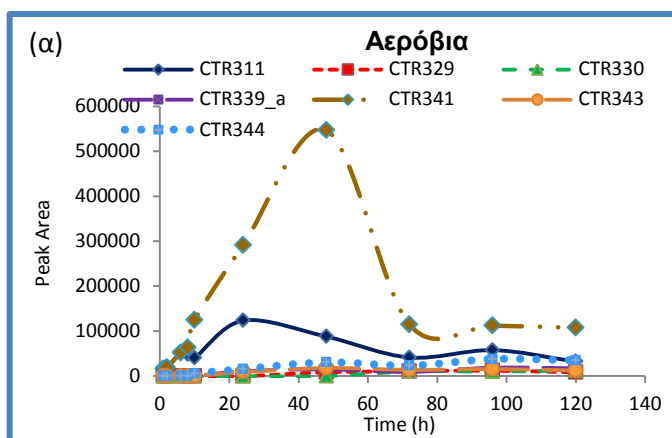
Η ένωση σιταλοπράμη έχει μοριακό τύπο $C_{20}H_{21}FN_2O$, μονοϊσοτοπική μάζα 324,1632, $[M + H] = 325,1711$ και $\log P = 3,76$. Εκλούεται σε χρόνο $t = 6,6$ min. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων σχηματίστηκαν επτά ενώσεις στις αερόβιες συνθήκες, οι τέσσερις από αυτές τις ενώσεις σχηματίστηκαν στις ανοξικές συνθήκες και τρεις από αυτές τις ενώσεις σχηματίστηκαν και υπό αναερόβιες συνθήκες.

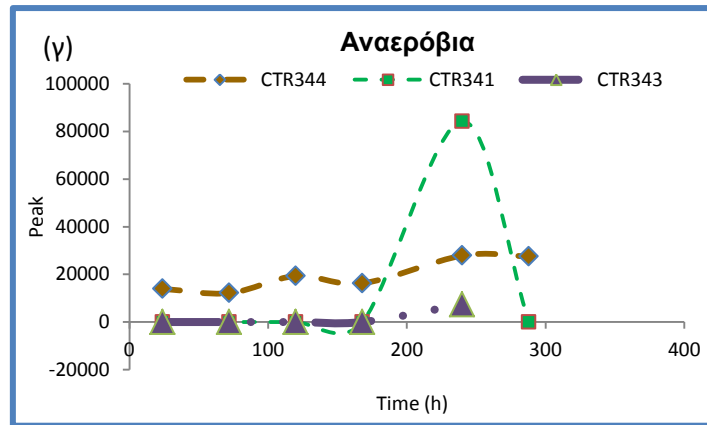
Πίνακας 7: Προϊόντα μετασχηματισμού της ένωσης σιταλοπράμης υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες.

TPs	Αερόβια	Ανοξικά	Αναερόβια	Μοριακός Τύπος	Όνομα	Χρόνος Ανάσχεσης (min)
CTR311	✓	✓	✗	$C_{19}H_{19}FN_2O$	Desmethyl citalopram	6,7
CTR329	✓	✗	✗	$C_{19}H_{21}FN_2O_2$	Desmethyl citalopram amide	5,2
CTR330	✓	✗	✗	$C_{19}H_{20}FNO_3$	Desmethyl citalopram carboxylic acid	5,9
CTR339	✓	✓	✗	$C_{20}H_{19}FN_2O_2$	3-oxo-Citalopram	6,4
CTR341	✓	✓	✓	$C_{20}H_{21}FN_2O_2$	Citalopram N-oxide	7,1
CTR343	✓	✓	✓	$C_{20}H_{23}FN_2O_2$	Citalopram amide	5,2
CTR344	✓	✓	✓	$C_{20}H_{22}FNO_3$	Citalopram carboxylic acid	5,8

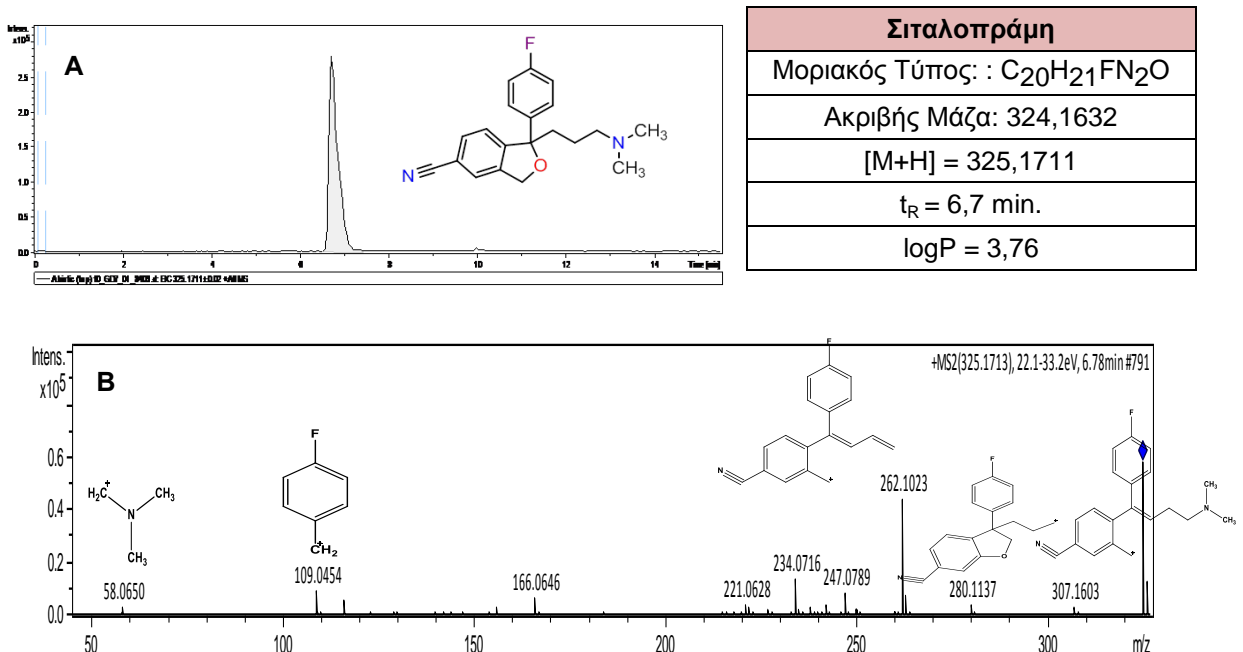
Η ένωση CTR311 σχηματίζεται από την πρώτη ώρα, υπό αερόβιες συνθήκες, με μέγιστο εύρος χρωματογραφικής κορυφής στις 24 ώρες. Υπό ανοξικές συνθήκες, ο σχηματισμός της ίδιας ένωσης ξεκινάει στις 10 ώρες με συνεχή αυξανόμενη τάση. Η ένωση CTR329 σχηματίζεται μόνο στις αερόβιες συνθήκες και παρουσιάζει μέγιστο χρωματογραφικής κορυφής στις τέσσερις ημέρες. Η ένωση CTR330 σχηματίζεται υπό αερόβιες συνθήκες στις τρεις

ημέρες και συνεχίζει να έχει αυξανόμενη τάση σχηματισμού και μετά από τις πέντε ημέρες. Το TP CTR339 σχηματίζεται στις 24 ώρες, αερόβια, και παρουσιάζει μέγιστο στις τέσσερις ημέρες, ενώ ανοξικά σχηματίζεται την τέταρτη ημέρα και συνεχίζει την ανοδική τάση σχηματισμού και μετά τις πέντε ημέρες. Η ένωση CTR341, υπό αερόβιες συνθήκες, σχηματίζεται από την πρώτη ώρα ενώ, παρουσιάζει μέγιστο στις δύο ημέρες. Υπό ανοξικές συνθήκες σχηματίζεται την δεύτερη ημέρα με μέγιστο χρωματογραφικής κορυφής στις τέσσερις ημέρες, ενώ αναερόβια σχηματίζεται την δέκατη ημέρα και απομακρύνεται πλήρως. Η ένωση CTR343 σχηματίζεται υπό αερόβιες και ανοξικές συνθήκες. Ο σχηματισμός του TP ξεκινάει στις 24 ώρες και παρουσιάζει μέγιστο στις δύο ημέρες, αεροβικά, ενώ στις 5 ημέρες ανιξικά. Υπό ανάερόβιες συνθήκες σχηματίζεται στις 10 ημέρες και έπειτα απομακρύνεται. Το TP CTR344 σχηματίζεται υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες. Αερόβια και ανοξικά σχηματίζεται από τις 10 ώρες, ενώ αναερόβια ο σχηματισμός της ένωσης πρέπει να έχει ξεκινήσει πριν από την πρώτη ημέρα. Παρουσιάζει μέγιστο σχηματισμού στις 4 , 5 και 10 ημέρες, αντίστοιχα.





Εικόνα 42: Χρονική τάση σχηματισμού των TPs της σιταλοπράμης (α) αερόβια, (β) ανοξικά, (γ) αναερόβια.

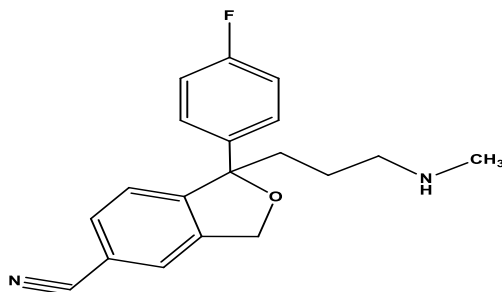


Εικόνα 43: A) XIC της ένωσης σιταλοπράμης υπό αερόβιες συνθήκες, B) φάσμα MS/MS της ένωσης σιταλοπράμης.

7.8.1 CTR311

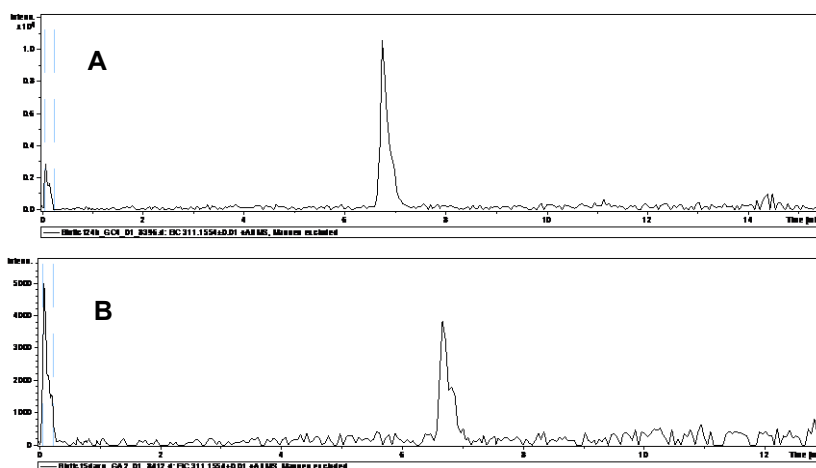
Η ένωση CTR311 σχηματίστηκε από την απόσπαση ενός μεθυλίου από την μητρική ένωση σιταλοπράμη. Μία πιθανή δομή προτείνεται τόσο από την βιβλιογραφία όσο από το Metabolite Predict και το EAWAG-PPS. Ο

CTR311 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=311,1554$, με μοριακό τύπο $C_{19}H_{19}FN_2O$ και εκλύεται σε χρόνο $t = 6,7 \text{ min}$.

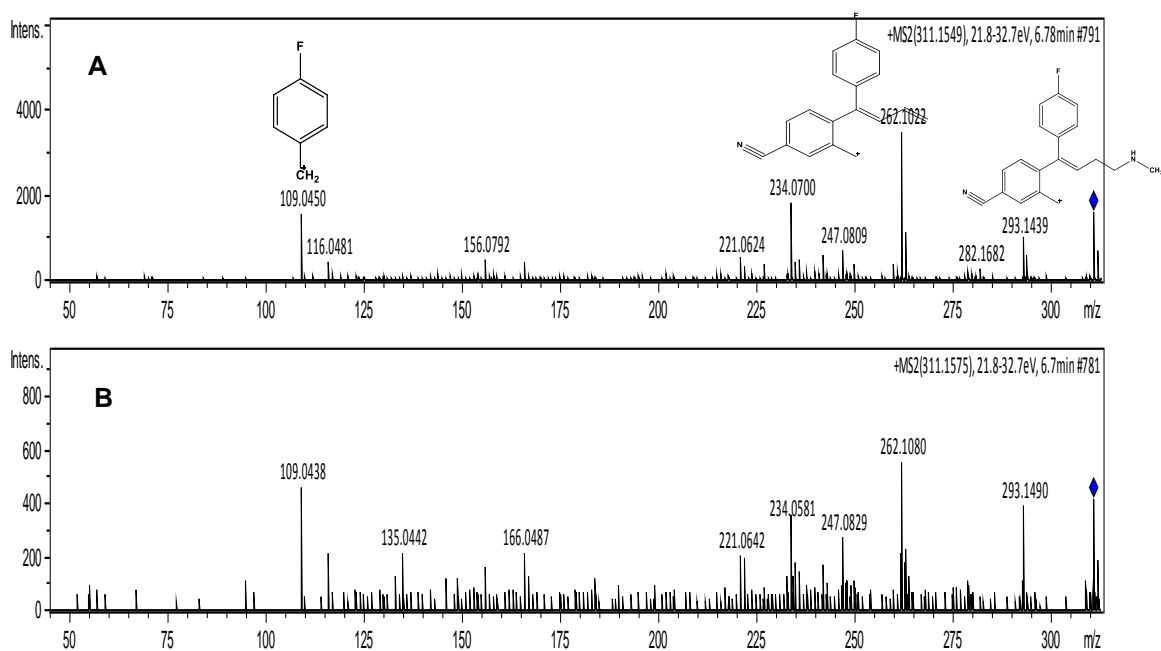


Σχήμα 25: Προτεινόμενη δομή της ένωσης CTR311.

Από το φάσμα MS/MS της ένωσης CTR311 εντοπίζονται τα θραύσματα με $m/z = 109,0450, 116,0481, 156,0792, 221,0624, 234,0700, 247, 0809, 262,1022, 282,1682$ και $293,1439$ από τα οποία τα περισσότερα ανήκουν και στη μητρική ένωση. Στις ανοξικές συνθήκες εμφανίζεται επιπλέον το θραύσμα με $m/z = 135,0442$. Η δομή που αποδόθηκε στα θραύσματα με $m/z = 293,1439$ ταυτίζεται με την προτεινόμενη δομή για το CTR311.



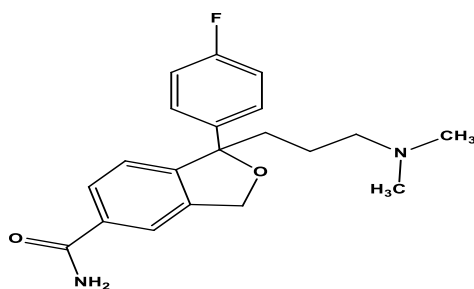
Εικόνα 44: ΧIC του TP CTR311 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική $t = 24 \text{ h}$, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική $t = 5 \text{ days}$.



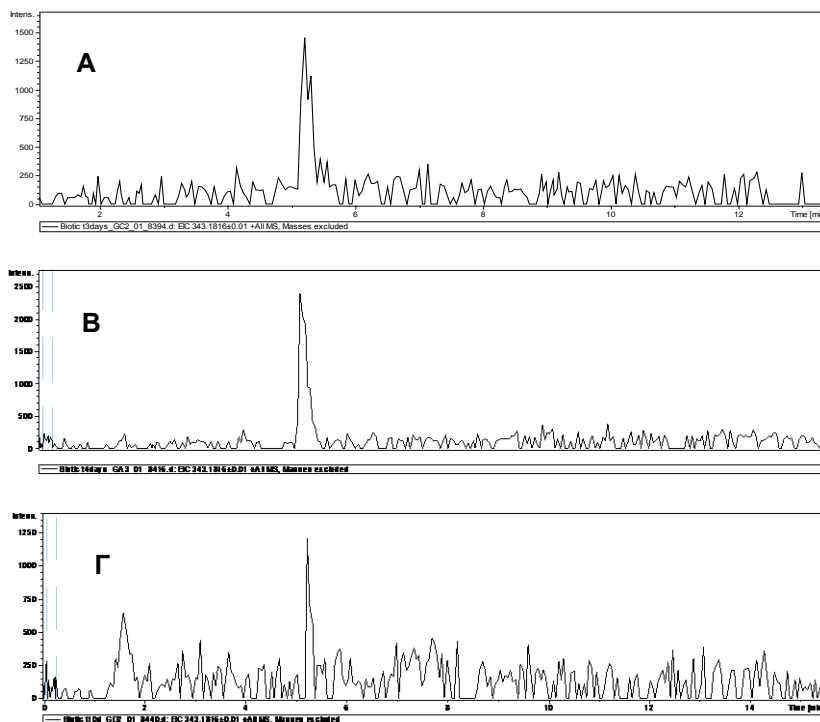
Εικόνα 45: Φάσμα MS/MS του TP CTR311 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες.

7.8.2 CTR343

Η ένωση CTR343 σχηματίστηκε και στις τρεις συνθήκες. Είναι το προϊόν οξειδωσης της μητρικής ένωσης σιταλοπράμης. Μία πιθανή δομή προτείνεται από το Metabolite Predict. Ο CTR343 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=343,1816$, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{23}FN_2O_2$ και εκλύεται σε χρόνο $t = 5,2$ min. Δυστυχώς, λόγω των χαμηλών εντάσεων δεν ήταν δυνατή η λήψη φάσματος MS/MS, σε καμία από τις τρεις συνθήκες, ώστε να προβούμε σε περαιτέρω συμπεράσματα.



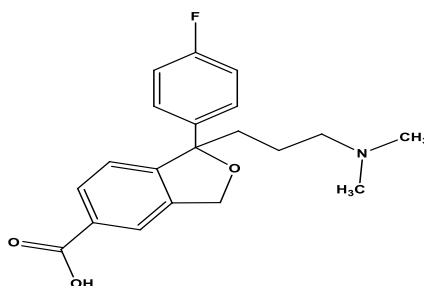
Σχήμα 26: Πιθανή δομή της ένωσης CTR343.



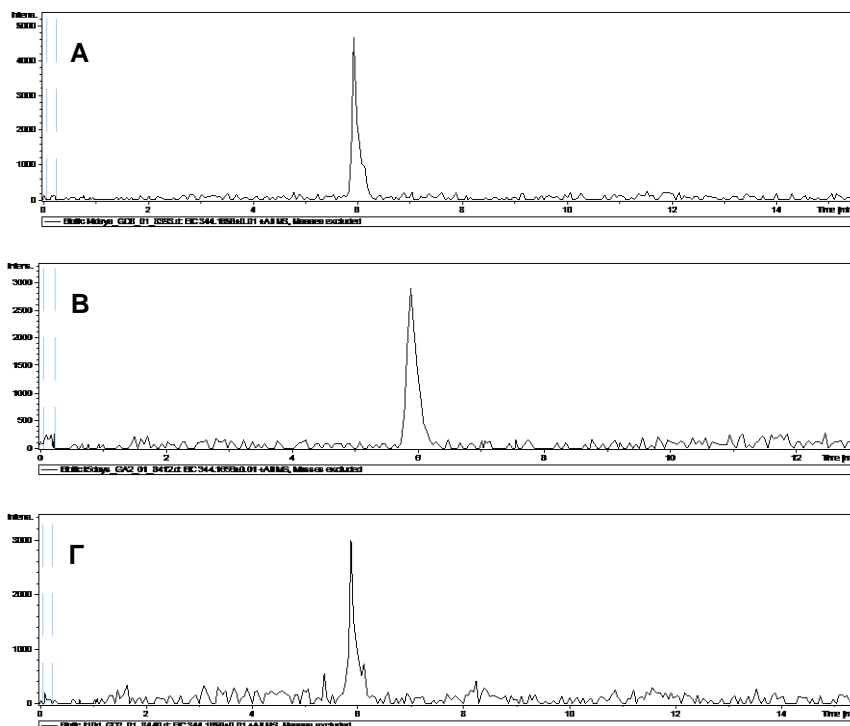
Εικόνα 46: XIC της ένωσης CTR343 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 3$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ days.

7.8.3 CTR344

Η ένωση CTR344 σχηματίστηκε υπό αερόβιες, ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες. Προέκυψε από την μετατροπή της μητρικής ένωσης σιταλοπράμης σε καρβοξυλικό οξύ. Μία πιθανή δομή προτείνεται από το Metabolite Predict και το EAWAG-PPS. Ο CTR344 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=344,1656$, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{22}FNO_3$ και εκλύεται σε χρόνο $t = 5,8$ min.

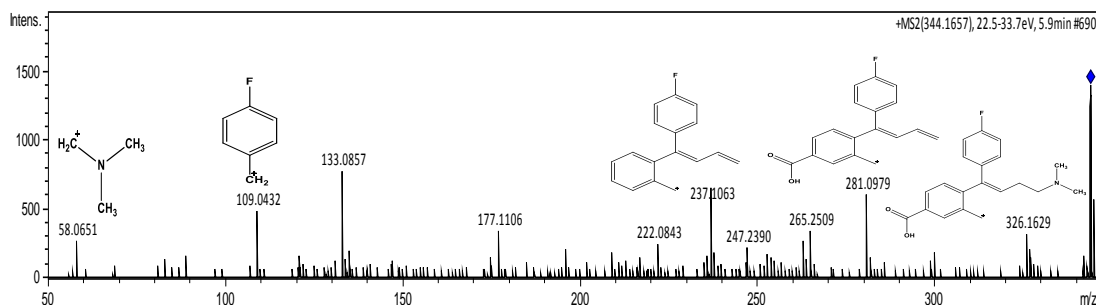


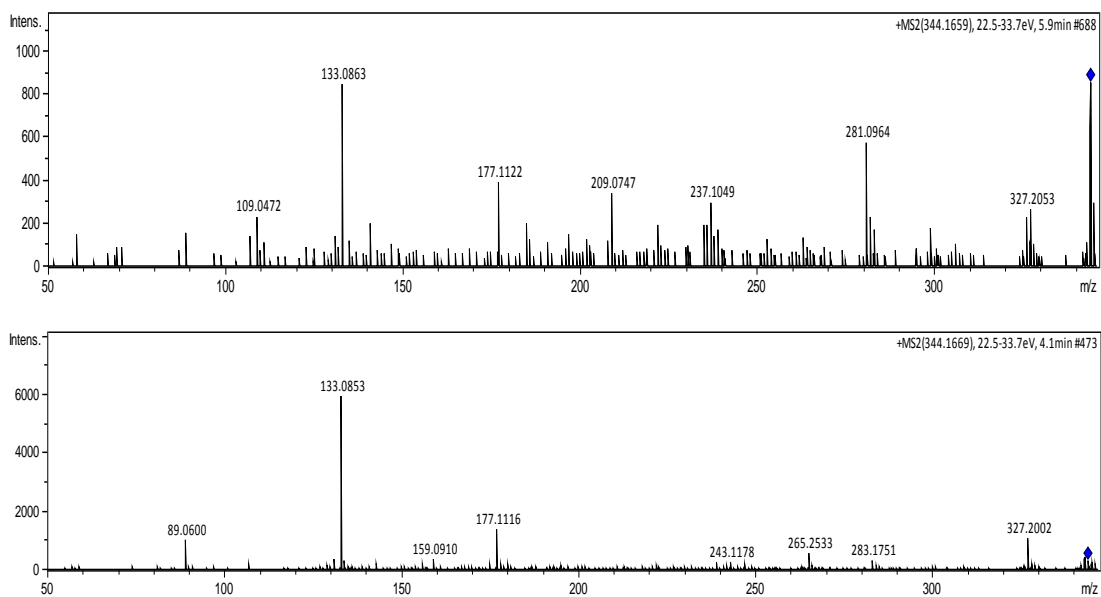
Σχήμα 27: Προτεινόμενη δομή του TP CTR344.



Εικόνα 47: ΧΙC της ένωσης CTR344 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ days.

Τα φάσματα MS/MS του CTR344 παρουσιάζουν κοινά θραύσματα με $m/z = 109,0432, 133,0857, 177,1106, 265,2509, 281,0964$ και $327,2053$. Οι δομές που αποδόθηκαν στα χαρακτηριστικά θραύσματα με $m/z = 281,0979$ και $326,1629$ ταυτοποιούν την προτεινόμενη δομή για το TP CTR344.

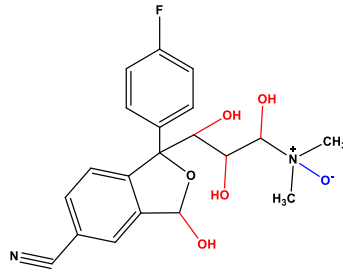




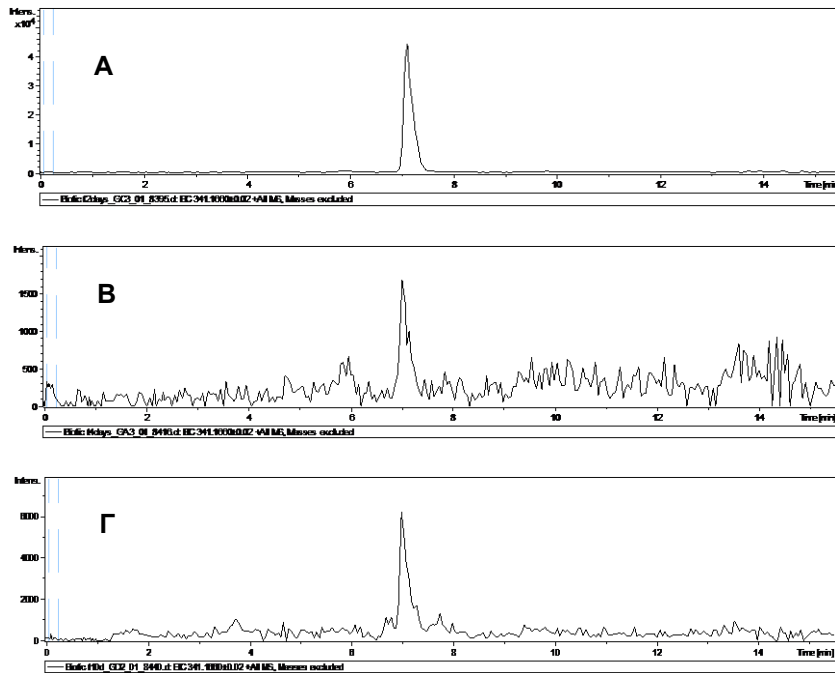
Εικόνα 48: Φάσμα MS/MS της ένωσης CTR344 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες.

7.8.4 CTR341

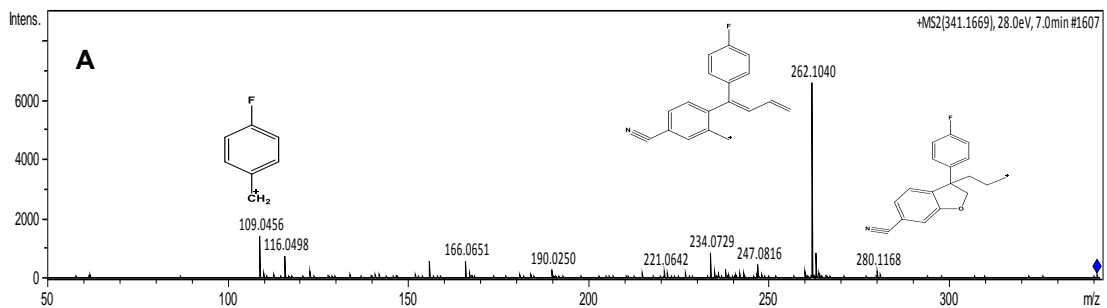
Η ένωση CTR341 σχηματίστηκε από την οξειδωση/υδροξυλίωση της μητρική ένωσης σιταλοπράμης. Το CTR341 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=341,1660$, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{21}FN_2O_2$ και εκλύεται σε χρόνο $t = 7,1$ min. Πέντε πιθανές δομές προτείνονται τόσο από την βιβλιογραφία όσο από το Metabolite Predict και το EAWAG-PPS. Παρ'όλα αυτά παρατηρούμε μοναδική χρωματογραφική κορυφή με αποτέλεσμα να θεωρούμε πιθανότερο πως μία μόνο μορφή του CTR341 εντοπίζουμε. Τα φάσματα MS/MS δείχνουν σχεδόν απόλυτη ταύτηση, με συνέπεια να υποψιαζόμαστε πως έχει σχηματιστεί η ίδια μορφή του CTR341 και στις τρεις συνθήκες. Επίσης, εμφανίζονται παρόμοια θραύσματα με τη μητρική ένωση. Οι δομές που αποδόθηκαν στα χαρακτηριστικά θραύσματα με $m/z = 262,1040$ και $280,1168$ αποδεικνύουν πως δεν έχουν σχηματιστεί οι τέσσερις από τις πέντε πιθανές δομές (κόκκινο χρώμα). Άρα, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η οξειδωση είναι πιθανότερο να έχει πραγματοποιηθεί στο άτομο του αζώτου (μπλε χρώμα).

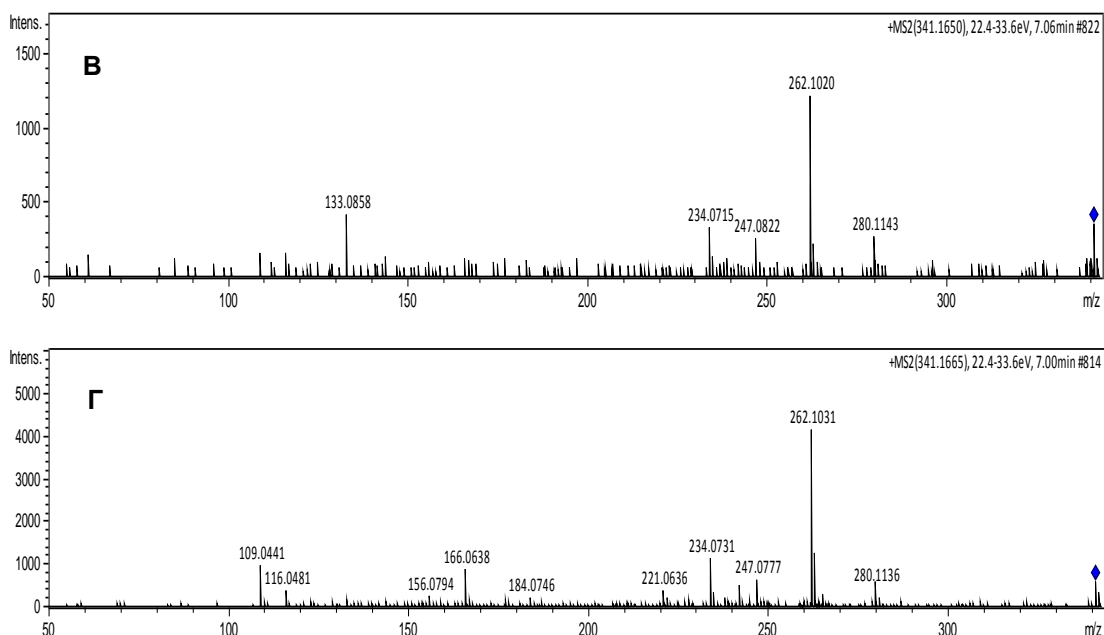


Σχήμα 28: Προτεινόμενη δομή του TP CTR341.



Εικόνα 49: XIC του TP CTR341 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 2$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 10$ days

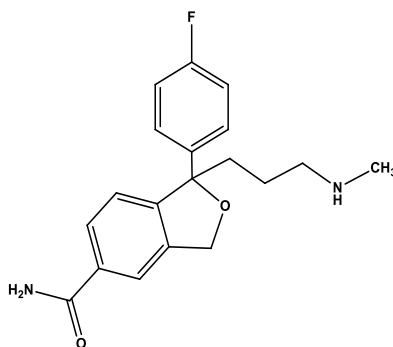




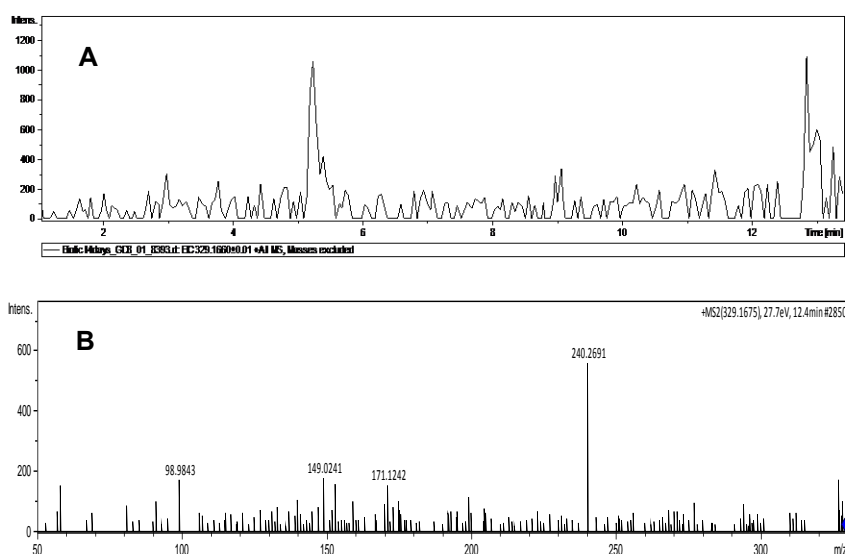
Εικόνα 50 : Φάσμα MS/MS του TP CTR341 A) υπό αερόβιες συνθήκες, B) υπό ανοξικές συνθήκες, Γ) υπό αναερόβιες συνθήκες.

7.8.5 CTR329

Η ένωση CTR329 σχηματίστηκε, αερόβια, από την οξειδωση της μητρικής ένωσης σιταλοπράμης και ταυτόχρονης απομεθυλίωσής της. Φαίνεται να έχει προκύψει από την οξειδωση του TP CTR311 ή από την απομεθυλίωση του TP CTR343. Το CTR329 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=329,1660$, με μοριακό τύπο $C_{19}H_{21}FN_2O_2$ και εκλύεται σε χρόνο $t = 5,2$ min. Μία πιθανή δομή προτείνεται από το Metabolite Predict. Στο MS/MS φάσμα της ένωσης βλέπουμε τα θραύσματα με $m/z = 98,9843, 149,0241, 171,1242, 240,2691$. Δυστυχώς, όμως, δεν καταφέραμε να αποδόσουμε σ'αυτά πιθανή δομή, ώστε να ταυτοποιήσουμε την δομή του CTR329.



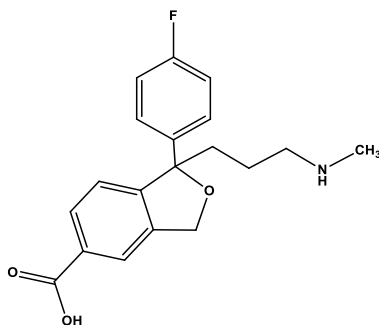
Σχήμα 29: Πιθανή δομή του TP CTR329.



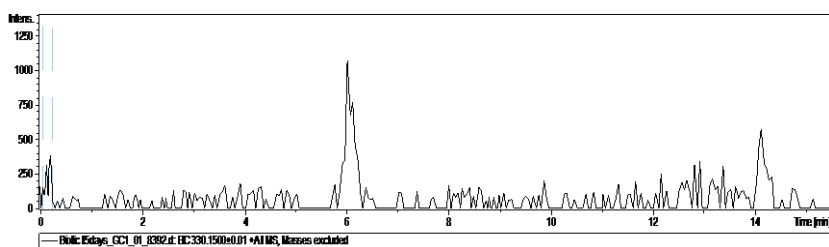
Εικόνα 51: A) XIC του TP CTR329 υπο αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) Φάσμα MS/MS του TP CTR329.

7.8.6 CTR330

Η ένωση CTR330 σχηματίστηκε, αερόβια, από την μετατροπή της μητρικής ένωσης σιταλοπράμης σε καρβοξυλικό οξύ και ταυτόχρονης απομεθυλίωσής της. Φαίνεται να έχει προκύψει από την απομεθυλίωση του TP CTR344. Το CTR330 αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=330,1500$, με μοριακό τύπο $C_{19}H_{20}FNO_3$ και εκλύεται σε χρόνο $t = 5,9$ min. Μία πιθανή δομή προτείνεται από το EAWAG-PPS, αλλά ο CTR330 έχει ταυτοποιηθεί και βιβλιογραφικά. Όμως, λόγω των χαμηλών εντάσεων, δεν καταφέραμε να λάβουμε φάσμα MS/MS, ώστε να ταυτοποιήσουμε τη δομή του CTR330.



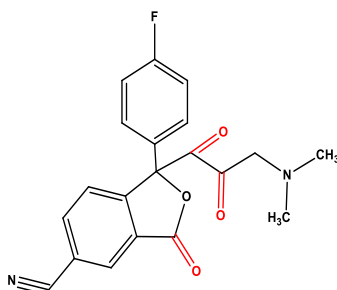
Σχήμα 30: Πιθανή δομή του TP CTR330.



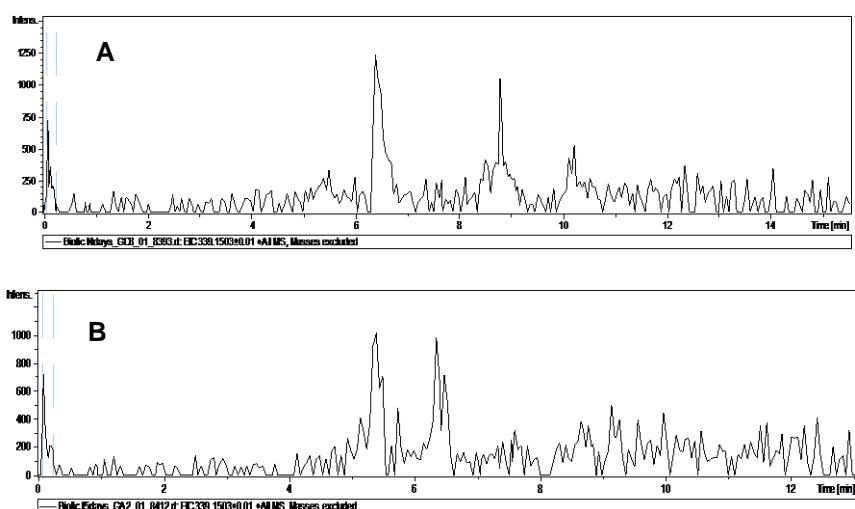
Εικόνα 52: ΧΙC της ένωσης CTR330 υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.

7.8.7 CTR339

Η ένωση CTR339 σχηματίστηκε, αερόβια και ανοξικά, από την οξειδωση της μητρική ένωσης σιταλοπράμης. Αντιστοιχεί σε ακριβή μάζα $[M+H]=339,1503$, με μοριακό τύπο $C_{20}H_{19}FN_2O_2$. Στο χρωματογράφημα του CTR339 βλέπουμε δύο κορυφές. Υπό αερόβιες συνθήκες εκλύεται σε χρόνους $t = 6,4$ και $8,79$ min. ενώ υπό ανοξικές συνθήκες σε χρόνους $t = 5,39$ και $6,35$ min. Τρεις πιθανές δομές προτείνονται για τον CTR339, οι τρεις από το EAWAG-PPS και μία από αυτές από το Metabolite Predict. Μπορούμε να υποθέσουμε, λοιπόν, πως η μία από τις τρεις προτεινόμενες δομές του CTR339 σχηματίζεται και στις δύο συνθήκες ($t = 6,4$ min.). Παράλληλα, λόγω διαφορετικού χρόνου έκλυσης, η δεύτερη πιθανή δομή σχηματίζεται αερόβια και η τρίτη σχηματίζεται ανοξικά. Όμως, λόγω των χαμηλών εντάσεων, δεν καταφέραμε να λάβουμε φάσμα MS/MS, ώστε να ταυτοποιήσουμε τη δομή του CTR339 και να διαπιστώσουμε αν ισχύουν οι υποθέσεις μας.



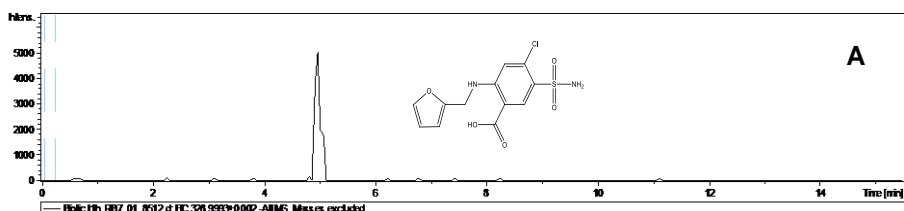
Σχήμα 31: Προτεινόμενες δομές για την ένωσης CTR339.

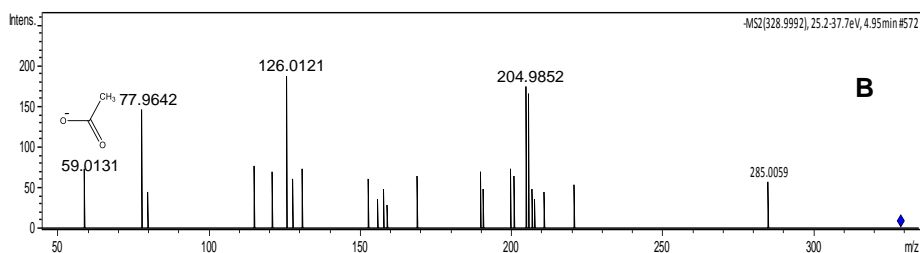


Εικόνα 53: ΧIC της ένωσης CTR339 A) υπό αερόβιες συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 4$ days, B) υπό ανοξικές συνθήκες τη χρονική στιγμή $t = 5$ days.

7.9 Φουροσεμίδιο

Η ένωση φουροσεμίδιο έχει μοριακό τύπο $C_{12}H_{11}ClN_2O_5S$, μονοϊσοτοπική μάζα 330,0072, $[M - H] = 329,0004$ και $\log P = 1,75$. Ιοντίζεται στον αρνητικό ιοντισμό και εκλούεται σε χρόνο $t = 4,98$ min. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων δεν σχηματίστηκαν προϊόντα μετασχηματισμού από την μητρική ένωση φουροσεμίδιο. Αυτό φαίνεται να είναι λογικό αφού υπό ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες η απομάκρυνση του φουροσεμιδίου ήταν ελάχιστη. Υπό αερόβιες συνθήκες η ίδια ένωση απομακρύνθηκε σε ποσοστό 70% αλλά ούτε σε αυτή την περίπτωση ανιχνεύτηκαν TPs.

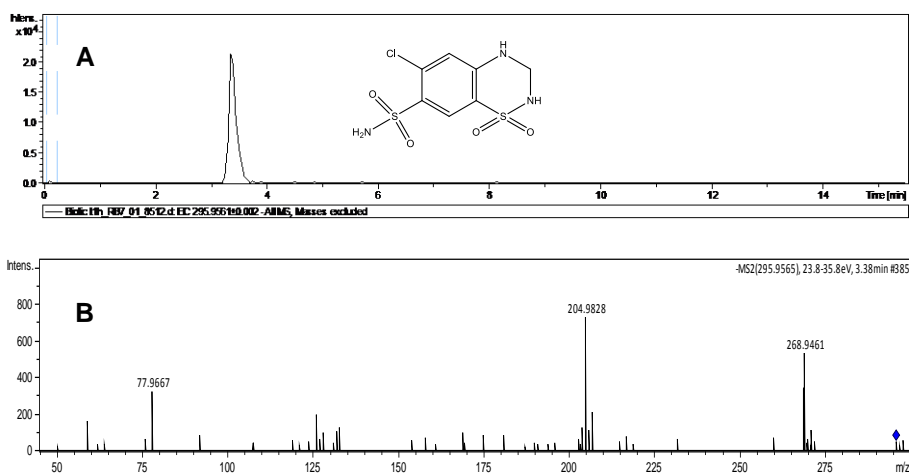




Εικόνα 54: Α) ΧΙC του φουροσεμιδίου, Β) MS/MS φάσμα του φουροσεμιδίου.

7.10 Υδροχλωροθειαζίδιο

Η ένωση υδροχλωροθειαζίδιο έχει μοριακό τύπο $C_7H_8ClN_3O_3S_2$, μονοϊσοτοπική μάζα 296,9639, $[M - H] = 295,9561$ και $\log P = -0,58$. Ιοντίζεται στον αρνητικό ιοντισμό και εκλύεται σε χρόνο $t = 3,37$ min. Όπως ήταν αναμενόμενο δεν ανιχνεύτηκαν προϊόντα μετασχηματισμού της μητρικής ένωσης υδροχλωροθειαζίδιο καθώς η απομάκρυνση του και στις τρεις συνθήκες ήταν αμελητέα.

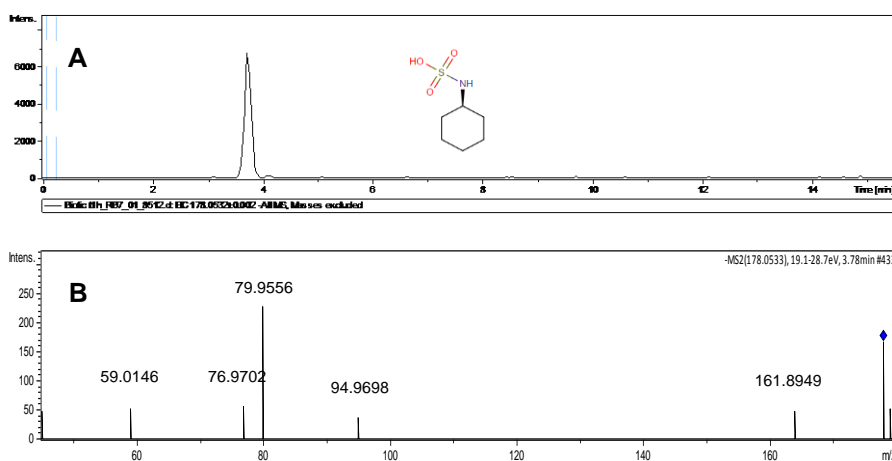


Εικόνα 55: Α) ΧΙC του υδροχλωροθειαζιδίου, Β) MS/MS φάσμα του υδροχλωροθειαζιδίου.

7.11 Κυκλαμικό

Το κυκλαμικό έχει μοριακό τύπο $C_6H_{13}NO_3S$, μονοϊσοτοπική μάζα 179,0611, $[M - H] = 178,0532$ και $\log P = 0,61$. Ιοντίζεται στον αρνητικό ιοντισμό και εκλύεται σε χρόνο $t = 3,72$ min. Το κυκλαμικό απομακρύνθηκε

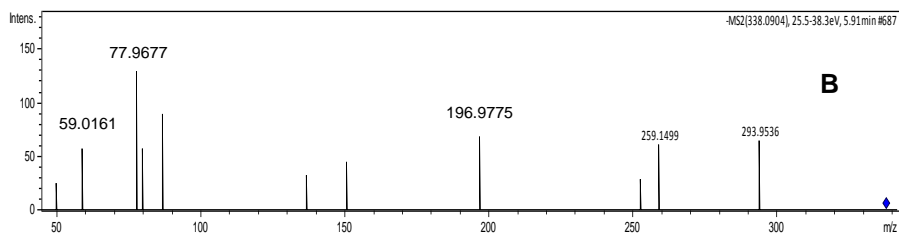
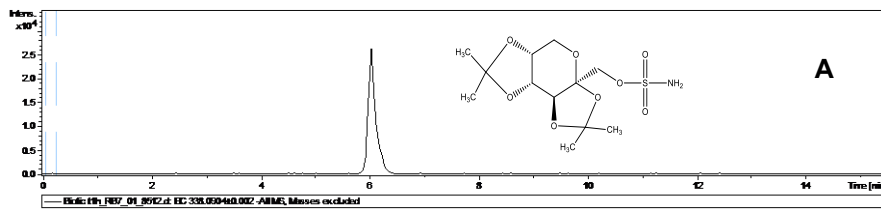
πλήρως τόσο υπό αερόβιες όσο και υπό αναερόβιες συνθήκες, ενώ ανοξικά η απομάκρυνση του έφτασε το 60%. Παραδόξως δεν ανιχνεύτηκαν προϊόντα μετασχηματισμού προερχόμενα από τη μητρική ένωση κυκλαμικό. Θεωρούμε, οπότε, πως θα πρέπει το κυκλαμικό να εξεταστεί ως μοναδική ένωση, και όχι σε μείγμα ενώσεων, ώστε να εφαρμοστεί μη στοχευμένη σάρωση (non-target screening). Με αυτή τη λειτουργία μπορούν να ανιχνευτούν και να ταυτοποιηθούν TPs τα οποία δεν περιέχονται στη λίστα με τα πιθανά προϊόντα μετασχηματισμού.



Εικόνα 56: A) XIC του κυκλαμικού, B) MS/MS φάσμα του κυκλαμικού.

7.12 Τοπιραμάτη

Το κυκλαμικό έχει μοριακό τύπο $C_{12}H_{21}NO_8S$, μονοϊσοτοπική μάζα 339,0982, $[M - H] = 338,0904$ και $\log P = 0,13$. Ιοντίζεται στον αρνητικό ιοντισμό και εκλούεται σε χρόνο $t = 6,03$ min. Κατά την διάρκεια των πειραμάτων δεν ανιχνεύτηκαν TPs της τοπιραμάτης καθώς η απομάκρυνσή της ήταν ελάχιστη και στις τρεις συνθήκες.



Εικόνα 57: A) ΧIC της τοπιραμάτης, B) MS/MS φάσμα της τοπιραμάτης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 8

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τα πειράματα βιοαποικοδόμησης των εννιά φαρμακευτικών ενώσεων και του ενός συνθετικού γλυκαντικού, συμπεραίνουμε πως η απομάκρυνση τους υπό βιοτικές συνθήκες είναι αποτελεσματικότερη υπό αερόβιες συνθήκες σε σύγκριση με τις ανοξικές και αναερόβιες συνθήκες. Συγκεκριμένα, στην περίπτωση των εφεδρίνη, τραμαδόλη και φουρεσεμίδη παρατηρήσαμε έως και 100% απομάκρυνση της μητρικής ένωσης αερόβια ενώ, ανοξικά και αναερόβια η απομάκρυνση ήταν μικρότερη έως και ελάχιστη. Παρ'όλα αυτά είδαμε και περιπτώσεις ενώσεων όπως η ρανιτιδίνη, η λιδοκαΐνη, το κυκλαμικό οι οποίες απομακρύνθηκαν σχεδόν πλήρως και υπό αναερόβιες συνθήκες ή όπως η μετορφίνη η οποία απομακρύνθηκε πλήρως υπό ανοξικές συνθήκες. Αντίθετα, οι ενώσεις υδροχλωροθειαζίδιο και τοπιραμάτη παρουσίασαν ελάχιστη απομάκρυνση κάτω από και τις τρεις συνθήκες.

Από τα πειράματα βιομετατροπής των φαρμακευτικών ενώσεων ανιχνευτήκαν συνολικά 24 πιθανά προϊόντα μετασχηματισμού, υπό αερόβιες συνθήκες, σύμφωνα με την λίστα ύποπτων ενώσεων που δημιουργήθηκε, 17 πιθανά προϊόντα μετασχηματισμού υπό ανοξικές συνθήκες και 4 υπό αναερόβιες συνθήκες. Από αυτά, τα 4 προϊόντα μετασχηματισμού ταυτοποιήθηκαν μέσω πρότυπων ουσιών, ενώ τα υπόλοιπα ταυτοποιήθηκαν μέσω της αξιολόγησης του προφίλ τους. Τέλος, 8 από αυτά τα προϊόντα δεν ήταν εφικτό να ταυτοποιηθούν εξαιτίας του χαμηλού σήματος και της αδυναμίας παροχής MS/MS φάσματος. Τα αποτελέσματα που αναφέρονται παραπάνω προέκυψαν από την επεξεργασία των δεδομένων ύστερα από την ανάλυση των δειγμάτων με υγροχρωματογραφική μέθοδο αντίστροφης φάσης (RP) σε λειτουργία bbCID με αναλυτή μάζας QTOF.

Τέλος, προτείνεται περαιτέρω διερεύνηση προϊόντων μετασχηματισμού της ένωσης κυκλαμικό, το οποίο παρουσίασε πλήρη απομάκρυνση, με μη στοχευμένη σάρωση (no-target screening).

ΠΙΝΑΚΑΣ ΟΡΟΛΟΓΙΑΣ

Πίνακας 8: Αντιστοιχία ορολογίας μεταξύ ελληνικών και ξενόγλωσσων όρων.

Ξενόγλωσσος όρος	Ελληνικός Όρος
transformation products	Προϊόντα μετασχηματισμού
suspect screening	σάρωση πιθανών ενώσεων
target screening	στοχευμένη σάρωση
non-target screening	μη στοχευμένη σάρωση
tandem Mass spectrometry	Φασματομετρία μαζών σε σειρά
Post-run acquisition	μετα τις μετρήσεις διερεύνηση των δεδομένων
full-scan	πλήρης σάρωση
triple quadrupole	τριπλό τετράπολο
high-performance liquid chromatography	υψηλής απόδοσης υγροχρωματογραφία
high-resolution	υψηλή διακριτική ικανότητα
electrospray	ηλεκτροψεκασμός
electrospray ionization	ιοντικός ηλεκτροψεκασμός
selected reaction monitoring	παρακολούθηση επιλεγμένης αντίδρασης
retention time	χρόνος έκλουσης
infusion	έγχυση
positive/negative ionization	θετικός/αρνητικός ιοντισμός
probe	θέση του ακροσωλήνιου ιοντισμού
spray voltage	τιμή του εφαρμοζόμενου δυναμικού
sheath gas	αερίου εκνέφωσης
auxiliary gas	αερίου ξήρανσης
ion transfer capillary temperature	θερμοκρασία αγωγού μεταφοράς των ιόντων
tube lens	εφαρμοζόμενη τάση

collision energy	ενέργεια θραυσματοποίησης
collision pressure	πίεση θραυσματοποίησης
area	εμβαδόν κορυφής

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ – ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

Πίνακας 9: Ακρωνύμια και ανάπτυξη τους.

ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ	ΟΝΟΜΑΣΙΑ
TPs	Transformation Products
ΕΕΛ	Εγκαταστάσεις Επεξεργασίας Λυμάτων
ΕΕ	Ευρωπαϊκή Ένωση
TSS	Total Suspended Solids
BOD	Biochemical Oxygen Demand
AOP	Advanced Oxidation Processes
LC-MS/MS	Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry
GC	Gas Chromatography
RP-HPLC	Reversed phase-High Pressure Liquid Chromatography
LTQ	linear ion trap
Orbitrap	orbital trap
QqQ	triple quadrupole
TOF	Time of-flight
SPE	Solid Phase Extraction
UM-PPS	University of Minnesota Pathway Prediction System
ΕΚΠΑ	Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
SRM	Selected Reaction Monitoring
HPLC	High-Performance Liquid Chromatography
TOF	time-of-flight
IT	ion trap
MS	Mass Spectrometry
HR	high-resolution

LR	low-resolution
TIC	Total Ion Chromatography
ESI	electrospray ionization
t_R	retention time
XIC	eXtracted Ion Chromatogram

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. S. Terzic, I. Senta, M. Matosic, M. Ahel, Identification of biotransformation products of macrolide and fluoroquinolone antimicrobials in membrane bioreactor treatment by ultrahigh-performance liquid chromatography/quadropole time-of-flight mass spectrometry, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 401, 2011, 353-363
2. S. Kern, R. Baumgartner, D.E. Helbling, J. Hollender, H. Singer, M.J. Loos, R.P. Schwarzenbach, K. Fenner, A tiered procedure for assessing the formation of biotransformation products of pharmaceuticals and biocides during activated sludge treatment, *Journal of Environmental Monitoring*, 2010, 12, 2100-2111.
3. European Medicines Agency (EMA), Guideline on the Environmental Risk Assessment of Medicinal Products for Human Use, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP), London, UK, 2006.
4. M. Farré, S. Pérez, L. Kantiani and D. Barceló, Fate and toxicity of emerging pollutants, their metabolites and transformation products in the aquatic environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 27, 2008, 991-1007.
5. S.C. Monteiro, A.B.A Boxall, Occurrence and fate of Human Pharmaceuticals in the Environment, Springer Science and Business Media, LLC 2010.
6. European Commission (a), 2010, Environmental, economic and social Impacts of the use of sewage sludge on land, Belgium.
7. E. Νταράκας, Διεργασίες επεξεργασίας υγρών αποβλήτων (Τεχνική Περιβάλλοντος), Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Τομέας Υδραυλικής και Τεχνικής Περιβάλλοντος (2014).
8. Π. Χρυσοχοΐδου, Διπλωματική εργασία: Ειδικοί ρυπαντές και αξιοποίηση της ιλύος στη γεωργία, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Πολιτικών Μηχανικών, Προγραμμα Μεταπτυχιακών Σπουδών Ειδίκευσης: Προστασία Περιβάλλοντος και Βιώσιμη Ανάπτυξη (2012).
9. Z. Li, M.P. Maier, M. Radke, Screening for pharmaceutical transformation products formed in river sediment by combining ultrahigh performance liquid chromatography/high resolution mass spectrometry with a rapid data-processing method, *Analytica Chimica Acta*, 810, 2014, 61-70.
10. R. Moreno-Gonzalez, S. Rodriguez-Moraz, M. Gros, D Barcelo, V.M. Leon, Seasonal distribution of pharmaceuticals in marine water sediment from

a Mediterranean coastal lagoon (SE Spain), *Environmental Research*, 138, 2015, 326-344.

11. C. Prasse, M. Wagner, R. Schulz, T.A. Ternes, Biotransformation of the Antiviral Drugs Acyclovir and Penciclovir Activated Sludge Treatment, *Environmental Science and Technology*, 2011, 45, 2761-2769.

12. A.A. Bletsou, J. Jeon, J. Hollender, E. Archondaki, N.S. Thomaidis, Targeted and non-targeted determination of transformation products of emerging pollutants by mass spectrometry, *Trends in Analytical Chemistry*, 2016, 66, 32-44.

13. D. Hu, K. Henderson, J. Coats, Fate of Transformation Products of synthetic chemicals, *Hdb Env. Chem.*, 2009, 2, Part P, 103-120.

14. R.E. Ardrey, *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley&Sons, 2003

15. D.A. Skoog, F.J. Holler, T.A. Nieman, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, μετάφραση Μ.Ι. Καραγιάννης, Κ. Η. Ευσταθίου, Ν Χανιωτάκης, Εκδόσεις Κωσταράκη, 5η Έκδοση, 2005

16. E. de Hoffmann and V. Stroobant, *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Willey, 3rd Edition

17. Θ.Π Χατζηγιάννου, Μ.Α. Κουππάρης, *Ενόργανη Ανάλυση*, Αθήνα, (1990).

18. M. Krauss, H. Singer, J. Hollender, LC-high resolution MS in environmental analysis: from target screening to the identification of unknowns, *Anal Bioanal Chem*, 397, 2010, 943-951.

19. E.L. Schymanski, H.P. Singer, P. Longree, M. Loos, M. Ruff, M.A. Stravs, C. Ripolles Vidal, J. Hollender, Strategies to characterize polar organic contamination in wastewater: exploring the capability of high resolution mass spectrometry, *Environmental Science and Technology*, 48, 2014, 1811-1818.

20. C. Moschet, A. Piazzoli, H. Singer, J. Hollender, Alleviating the reference standard dilemma using a systematic exact mass suspect screening approach with liquid chromatography-high resolution mass spectrometry, *Analytical Chemistry*, 85, 2013, 10312-10320.

21. A.J. Alpert, *Journal of Chromatography*, 1990, 499: 177-196

22. J.C. Linden, C.L. Lawhead, *Journal of Chromatography*, 1975, 105, 125-133

23. SeQuant. A practical guide to HILIC: a tutorial and application book, 2005-2008
24. <http://www.sequant.com/default.asp?ml=11625> (08/07/2015)
25. R. Diaz, M. Ibanez, J.V. Sancho, F. Hernandez, Target and non-target screening strategies for organic contaminants, residues and illicit substances in food, environmental and human biological samples by UHPLC-QTOF-MS, *Analytical Methods*, 4, 2012, 196-209
26. E.L. Schymanski, J. Jeon, R. Gulde, K. Fenner, M. Ruff, H.P. Singer, J. Hollender, Identifying small molecules via high resolution mass spectrometry: communicating confidence, *Environmental Science and Technology*, 48, 2014, 2097-2098.
27. <http://www.drugbank.ca> (10/07/2015)
28. M. Bergheim, R. Giere, K. Kümmerer, Biodegradability and ecotoxicity of tramadol, ranitidine, and the photoderivatives in the aquatic environment, *Environ Sci Pollut Res*, 19, 2012, 72-85.
29. Εθνικό Συνταγολόγιο 2007, Εθνικός Οργανισμός Φαρμάκων, Εκδόσεις 2007.
30. A.B Baer and C. P. Holstege, Παντιδίνης, *Encyclopedia of Toxicology* (Second Edition), 2005, Pages 620-621
31. K. Murray, S. Thomas and A. Bodour, Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment, *Environmental Pollution*, 158, 2010, 3462-3471.
32. J-P. Besse, J. Garric, Human pharmaceuticals in surface waters Implementation of a prioritization methodology and application to the French situation, *Toxicology Letters* 176 (2008) 104-123.
33. M. Petrovic and D. Barcelo, Liquid chromatography-mass spectrometry in the analysis of emerging environmental contaminants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 385, 2006, 422-424.
34. M.H. Devier, P. Mazellier, S. Ait-Aissa, and H. Budzinski, New challenges in environmental analytical chemistry: Identification of toxic compounds in complex mixtures, *Comptes Rendus Chimie*, 14, 2011, 766-799.
35. W. Giger, Hydrophilic and amphiphilic water pollutants: using advanced analytical methods for classic and emerging contaminants, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 393, 2009, 37- 44.

36. J. Fawell and C.N. Ong, Emerging Contaminants and the Implications for Drinking Water, *International Journal of Water Resources Development*, 28, 2012, 247-263.
37. S. Richardson and T. Ternes, Water Analysis: Emerging Contaminants and Current Issues, *Analytical Chemistry*, 79, 2007, 4295-4324.
38. S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, M. Gros, M. Petrović, D. Barcelo, J. Muller, T. Knepper, I. Marti, F. Ventura, P. Jovančić, and D. Jabučar, Occurrence and fate of emerging wastewater contaminants in Western Balkan Region, *Science of the Total Environment*, 399, 2008, 66-77.
39. A.C. Hogenboom, J. A. van Leerdam and P. de Voogt, Accurate mass screening and identification of emerging contaminants in environmental samples by liquid chromatography-hybrid linear ion trap Orbitrap mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1216, 2009, 510-519.
40. M.E. Dasenaki, N. Thomaidis, Multianalyte method for the determination of pharmaceuticals in wastewater samples using solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical Bioanalytical Chemistry* 407, 2015, 4229-4245
41. E. Zuccato, S. Castiglioni, R. Fanelli, G. Reitano, R. Bagnati, C. Chiabrando, et al, Pharmaceuticals in the environment in Italy: causes, occurrence, effects and control, *Environmental Science and Pollution Research*, 13(1), 2006, 15-21.
42. D.W. Kolpin, E.T Furlong, M.T Meyer, E.M Thurman, S.D Zaugg, L.B Barber, et al, Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in US streams, 1999-2000:a national reconnaissance, *Environmental Science and Technology*, 36, 2002, 1202-11.
43. M. Gros. M. Petrovic, D. Barcelo, Wastewater treatment plants as a pathway for aquatic contamination by pharmaceuticals in the Ebro river basin (Northeast Spain), *Environmental Toxicology Chemistry* 26(8), 2007, 1553-62.
44. E. Zuccato , S. Castiglioni , R. Fanelli, Identification of the pharmaceuticals for human use contaminate the Italian aquatic environment, *Journal Hazardous Materials*, 122, 2005, 205-9
45. P. Gago-Ferrero, V. Borova, M. Dasenaki, N. Thomaidis, Simultaneous determination of 148 pharmaceuticals and illicit drugs in sewage sludge based on ultrasound-assisted extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Analytical Bioanalytical Chemistry*, 407, 2015, 4287-4297
46. N. Collado, S. Rodriguez-Mozaz, M. Gros, A. Rubirola, D. Barcelo, J. Comas, I. Rodriguez-Roda, G. Buttiglieri, Pharmaceuticals occurrence in a

WWTP with significant industrial contribution and its input into the river system, *Environmental pollution* 185, 2014, 202-212.

47. L. Santos, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz, C. Delerue-Matos, A. Pena, D. Barcelo, M. Conceico-Montenegro, Contribution of hospital effluents to the load of pharmaceuticals in urban wastewaters: Identification of ecologically relevant pharmaceuticals, *Science of the total Environment*, 461-462, 2013, 302-316.

48. D. Dolar, M. Gros, S. Rodriguez-Mozaz, J. Moreno, J. Comas, I. Rodriguez-Roda, D. Barcelo, Removal of emerging contaminants from municipal wastewater with an integrated membrane system, MBR-RO, *Journal of Hazardous Materials*, 239-240, 2012, 64-69

49. R. Lopez-Serna, A. Jurado, E. Vazquez-Sune, J. Carrera, M. Petrovic, Occurrence of 95 pharmaceuticals and transformation products in urban groundwaters underlying the metropolis of Barcelona, Spain, *Environmental Pollution* 174, 2013, 305-315.

50. R. Lopez-Serna, M. Petrovic, D. Barcelo, Occurrence and distribution of multi-class pharmaceuticals and their active metabolites and transformation products in the Ebro River basin(NE Spain), *Science of the total Environment* 440, 2012, 280-289.

51. M. Jose Gomez, M. Petrovic, A. Fernandez-Alba, D. Barcelo, Determination of pharmaceuticals of various therapeutic classes by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis in hospital effluent wastewaters, *Journal of Chromatography A*, 1114, 2006, 224-233.

52. J. Radjenovic, M. Petrovic, D. Barcelo, Fate and distribution of pharmaceuticals in wastewater and sewage sludge of the conventional sludge (CAS) and advanced membrane bioreactor (MBR) treatment, *Water Research* 43, 2009, 831-841.

53. M. Isidori, A. Parrella, P. Pistillo, F. Temussi, Effects of ranitidine and its photoderivatives in the aquatic environment, *Environment International*, 35, 2009, 821-825.

54. M. Bergheim, R. Giere, K. Kümmerer, Biodegradability and ecotoxicity of tramadol, ranitidine and their photoderivatives in the aquatic environment, *Environ. Sci. pollut. Res* 19, 2012, 72-85.

55. S. Kern, R. Baumgartner, D.E. Helbling, J. Hollender, H. Singer, M.J. Loos, R.P. Schwarzenbach, K. Fenner, A tiered procedure for assessing the formation of biotransformation products of pharmaceuticals and biocides during activated sludge treatment, *J. Environ. Monit.*, 12, 2010, 2100-2111.

56. J. Radjenovic, C. Sirtoni, M. Petrovic, D. Barcelo, S. Malato, Characterization of intermediate products of solar photocatalytic degradation of ranitidine at pilot-scale, *Chemosphere*, 79, 2010, 368-376.
57. M. Jamrogiewicz, B. Wielgomas, Detection of some volatile degradation products released during photoexposure of ranitidine in a solid state, *Journal of pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 76, 2013, 177-182.
58. H. Olvera-Vargas, N. Oturan, E. Brillas, D. Buisson, G. Esposito, M.A. Oturan, Electrochemical advanced oxidation for cold incineration of the pharmaceutical of ranitidine: Mineralization pathway and toxicity evolution, *Chemosphere*, 117, 2014, 644-651.
59. Ε. Τζιώλα, Διπλωματική εργασία: Βελτιστοποίηση λειτουργίας εγκατάστασης επεξεργασίας υγρών λυμάτων με γενετικούς αλγόριθμους, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Πολυτεχνική Σχολή, Τμήμα Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Ηλεκτρονικών Υπολογιστών, Τομέας Ηλεκτρονικής και Υπολογιστών 2005.
60. K. Fenner, U. Schenker, M. Scheringer, Modelling Enviromental Exposure to Transformation Products of Organic Chemicals, *Hdb Env. Chem.*, 2, Part P, 2009, 144-145.
61. <<http://test.umbbd.ethz.ch/rxnmulti>> (10/07/2015)
62. K. Fenner, J. Gao, S. Kramer, L. Ellis, L. Wackett, Data-driven extraction of relative reasoning rules to limit combinatorial explosion in biodegradation pathway prediction, *Bioinformatics* 24 (2008) 2079-2085.
63. N.A. Lewin, LH Nelson (2006). "Chapter 61: Antidysrhythmics". In Flomenbaum N, Goldfrank LR, Hoffman RL, Howland MD, Lewin NA, Nelson LH. *Goldfrank's Toxicologic Emergencies* (8th ed.). New York: McGraw-Hill. pp. 963–4. ISBN 0-07-143763-0.
64. P.D. Thomson, K.L. Melmon, J.A. Richardson, K Cohn , W Steinbrunn , R Cudihee, M Rowland (April 1973). "Lidocaine pharmacokinetics in advanced heart failure, liver disease, and renal failure in humans". *Ann. Intern. Med.* 78 (4): 499–508. doi:10.7326/0003-4819-78-4-499. PMID 4694036.
65. K.A. Collinsworth, S.M. Kalman, D.C. Harrison (1974). "The clinical pharmacology of lidocaine as an antiarrhythmic drug". *Circulation* 50 (6): 1217–30. doi:10.1161/01.CIR.50.6.1217. PMID 4609637
66. G. Majcherczyk, M. Kulza, M. Senczuk-Przybyłowska, E. Florek, W. Jawien, W. Piekoszewski, (Feb 2012). "Influence of tobacco smoke on the

pharmacokinetics of citalopram and its enantiomers". *J Physiol Pharmacol* 63 (1): 95–100.

67. "Ephedrine". The American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved Jan 2016

68. "Metformin Hydrochloride". The American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved Jan 2016.

69. N.M. Maruthur, E. Tseng, S. Hutfless, L.M. Wilson, C. Suarez-Cuervo, Z. Berger, Y. Chu, E. Iyoha, J.B. Segal, S. Bolen, (19 April 2016). "Diabetes Medications as Monotherapy or Metformin-Based Combination Therapy for Type 2 Diabetes: A Systematic Review and Meta-analysis.". *Annals of internal medicine*. PMID 27088241.

70. Global Guideline for Type 2 Diabetes (PDF). International Diabetes Federation. 2005. p. 36.

71. D. Kirpichnikov, SI McFarlane, JR Sowers. Metformin: an update [PDF]. *Ann Intern Med*. 2002;137(1):25–33. doi:10.7326/0003-4819-137-1-200207020-00009. PMID 12093242.

72. Bristol-Myers Squibb. U.S. Food and Drug Administration. Glucophage (metformin hydrochloride tablets) Label Information; August 27, 2008 [Retrieved 2009-12-08].

73. C.A. Ollier, C.R. Bruce, A.C. Smith, G. Lopaschuk, D.J. Dyck. Metformin counters the insulin-induced suppression of fatty acid oxidation and stimulation of triacylglycerol storage in rodent skeletal muscle. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2006;291(1):E182–E189. doi:10.1152/ajpendo.00272.2005. PMID 16478780.

74. F. Robert, S. Fendri, L. Hary, C. Lacroix, M. Andréjak, J.D. Lalau . Kinetics of plasma and erythrocyte metformin after acute administration in healthy subjects. *Diabetes Metab*. June 2003;29(3):279–83. doi:10.1016/s1262-3636(07)70037-x. PMID 12909816.

75. "Tramadol Hydrochloride". The American Society of Health-System Pharmacists. Retrieved Dec 1, 2014

76. Katz WA (1996). "Pharmacology and clinical experience with tramadol in osteoarthritis". *Drugs*. 52 Suppl 3: 39–47. doi:10.2165/00003495-199600523-00007. PMID 8911798.

77. DEA Tosses Tramadol in Schedule IV, By Nadia Awad, *MedPage Today*, Jul 10, 2014

78. Leppert, W (November–December 2009). "Tramadol as an analgesic for mild to moderate cancer pain." (PDF). *Pharmacological reports* 61 (6): 978–92. doi:10.1016/s1734-1140(09)70159-8. PMID 20081232.
79. NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12973408> (30/04/2016)
80. <http://www.galinos.gr/web/drugs/main/drugs/topiramate> (30/04/2016)
81. B. Beermann, M. Groschinsky-Grind, A. Rosén (1976). "Absorption, metabolism, and excretion of hydrochlorothiazide". *Clin Pharmacol Ther* 19 (5 (Pt 1)): 531–7.
82. A.G. Renwick, J.P. Thompson, M. O'Shaughnessy, and E.J. Walter «The metabolism of cyclamate to cyclohexylamine in humans during long-term administration».