

Ekstrakcija smjese farmaceutika iz vode

Jozinović, Stjepan

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:775489>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-06**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Stjepan Jozinović

EKSTRAKCIJA SMJESE FARMACEUTIKA IZ VODE

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

dr. sc. Kristina Tolić Čop

dr. sc. Ida Boček Pavlinac

Zagreb, rujan 2023.

Ovaj završni rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović sa Zavoda za analitičku kemiju za odabranu temu i mentorstvo kroz izradu cijeloga rada te dr. sc. Kristini Tolić Čop za svu ukazanu pomoć i razumijevanje tijekom cijelog trajanja završnog rada.

Velike zahvale pripadaju tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić sa Zavoda za analitičku kemiju za srdačnu podršku u eksperimentalnom dijelu rada.

Hvala prijateljima, kolegama i obitelji za stalnu motivaciju tijekom studija i završnog rada.

SAŽETAK

EKSTRAKCIJA SMJESE FARMACEUTIKA IZ VODE

Zbog široke primjene i velike potrošnje farmaceutici su češće zastupljeni u okolišu te dospijevaju u slojeve tla, podzemne i površinske vode. Ugrožavaju živote organizama i negativno utječu na cjelokupni ekosustav. Nužno je razvijati metode za otkrivanje prisutnosti farmaceutika u okolišu kako bi se pospješila kvaliteta ljudskog života.

U ovom radu je razvijena metoda za analizu dvanaest farmaceutika (amoksisicilin, atenolol, prokain, ofloksacin, sulfametazin, sulfametoksazol, torasemid, karbamazepin, deksametazon, β -estradiol, diazepam, diklofenak) s različitim fizikalnim i kemijskim svojstvima iz otpadnih voda. Kao metoda pripreme uzorka ispitivanih farmaceutika iz vode odabrana je ekstrakcija čvrstom fazom čija je učinkovitost određena tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s DAD detektorom. Najbolja iskorištenja su polučena korištenjem 100 mL izvorske vode pri pH 8, uz metanol kao otapalo za eluiranje u dva obroka od po 2 mL. Po završetku optimiranja parametara za ekstrakciju, metoda je validirana.

Prethodno razvijena metoda je nakon validacije primijenjena na stvarnim uzorcima otpadnih voda iz bolnice.

Ključne riječi: farmaceutici, ekstrakcija čvrstom fazom, kromatografija, otpadna voda

ABSTRACT

EXTRACTION OF PHARMACEUTICALS MIXTURE FROM WATER

Due to their widespread use and high consumption, pharmaceuticals are increasingly present in the environment and enter in soil layers, groundwater and surface water. They threaten the life of organisms and negatively affect the entire ecosystem. It is necessary to develop methods for detecting the presence of pharmaceuticals in the environment to improve the quality of human life.

In this study, a method was developed for the analysis of twelve pharmaceuticals (amoxicillin, atenolol, procaine ofloxacin, sulfamethazine, sulfamethoxazole, torasemide, carbamazepine, dexamethasone, β -estradiol, diazepam, diclofenac) with different physical and chemical properties from wastewater. Solid phase extraction was chosen as the method for preparing the sample of tested pharmaceuticals from water, and its efficiency was determined by high-performance liquid chromatography using a DAD detector. The best efficiency was obtained using 100 mL of spring water at pH 8, with methanol as eluent in two portions of 2 mL each. After completing the optimization of the extraction parameters, the method was validated.

After validation, the previously developed method was applied to real hospital wastewater samples.

Key words: pharmaceuticals, solid-phase extraction, chromatography, wastewater

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. FARMACEUTICI.....	2
2.1.1. Antibiotici	3
2.1.1.1. Amoksicilin	3
2.1.1.2. Sulfametazin	5
2.1.1.3. Sulfametoksazol.....	6
2.1.1.4. Ofloksacin.....	7
2.1.2. Ostali farmaceutici	8
2.1.2.1. Atenolol	8
2.1.2.2. Prokain.....	9
2.1.2.3. Torasemid	10
2.1.2.4. Karbamazepin.....	11
2.1.2.5. Deksametazon.....	12
2.1.2.6. β-estradiol	13
2.1.2.7. Diazepam.....	14
2.1.2.8. Diklofenak	15
2.1.3. Farmaceutici u okolišu.....	16
2.2. MODERNE ANALITIČKE METODE U ANALIZI OTPADNIH VODA	17
2.2.1. Ekstrakcija kao metoda pripreme uzoraka za analizu [34]	18
2.2.1.1. Metode ekstrakcije iz tekućih uzoraka	18
2.2.1.2. Metode ekstrakcije iz čvrstih uzoraka	22
2.2.2. Kromatografske instrumentalne metode analize.....	23

2.2.2.1.	Plinska kromatografija (GC)	24
2.2.2.2.	Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) [38]	26
2.3.	VALIDACIJA [34]	29
3.	EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1.	MATERIJALI	33
3.1.1.	Kemikalije.....	33
3.1.2.	Izvorska voda.....	34
3.1.3.	Sorbensi.....	34
3.1.4.	Otpadna voda	35
3.2.	INSTRUMENTI.....	36
3.2.1.	Analitička vaga	36
3.2.2.	Filtracija	37
3.2.3.	pH metar.....	37
3.2.4.	Aparatura za ekstrakciju čvrstom fazom (SPE).....	38
3.2.5.	Rotavapor.....	38
3.2.6.	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)	39
3.3.	OPIS RADA.....	40
3.3.1.	Priprema temeljnih standardnih otopina farmaceutika	40
3.3.2.	Priprema otopina standardnog dodatka.....	40
3.3.3.	Priprema uzorka vode s dodatkom farmaceutika.....	40
3.3.4.	Ekstrakcija čvrstom fazom.....	41
3.3.4.1.	Optimizacija metode.....	42
3.4.	VALIDACIJA	42
3.5.	PRIMJENA METODE NA OTPADNIM VODAMA.....	43

3.6. ANALIZA UZORAKA HPLC-DAD METODOM.....	43
4. REZULTATI I RASPRAVA	46
4.1. OPTIMIZACIJA METODE.....	47
4.1.1. Određivanje optimalnog pH vode.....	47
4.1.2. Određivanje optimalnog otapala za eluiranje	49
4.1.3. Određivanje optimalnog volumena otapala za eluiranje.....	50
4.1.4. Određivanje optimalnog volumena vode	52
4.2. VALIDACIJA METODE	53
4.3. UTJECAJ MATICE	56
4.4. PRIMJENA METODE NA OTPADNIM VODAMA.....	58
5. ZAKLJUČAK.....	610
6. LITERATURA	612
7. ŽIVOTOPIS.....	676

1. UVOD

Zbog porasta broja stanovnika i sve veće primjene farmaceutika u veterini i medicini povećavaju se količine ispuštenih farmaceutski aktivnih tvari u javne prijamnike čime se postiže veći stupanj onečišćenja. Farmaceutici pokazuju štetan utjecaj na živi svijet te mogućnost dospijevanja u ljudski organizam. Zbog mogućnosti akumuliranja farmaceutika u tlu, podzemnim i površinskim vodama nužno je razvijanje suvremenih analitičkih metoda za detekciju i kvantifikaciju farmaceutika u vodama kako bi se omogućilo propisno uklanjanje istih. Potrebno je razvijati metode za istovremeno određivanje više farmaceutika uz zahtijevani nivo učinkovitosti.

Jedna od analitičkih metoda koja se može primijeniti za otkrivanje prisutnosti farmaceutika u vodama je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti pri čemu se za detekciju analita može koristiti detektor s nizom dioda (DAD). Uzorci za analizu su pripremljeni ekstrakcijom čvrstom fazom koja je prethodno optimirana. Potom je učinkovitost i kvaliteta metode procijenjena validacijom odnosno određivanjem izvedbenih značajki metode poput linearnosti, ponovljivosti, obnovljivosti i utjecaja matice. Konačni cilj ovoga rada bio je primijeniti razvijenu i validiranu metodu na uzorcima stvarnih otpadnih voda.

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici su nužni za održavanje i očuvanje ljudskog zdravlja, osiguravanje kvalitete života te kao pomagalo u borbi protiv bolesti. Ubrzanim razvojem farmaceutske industrije i povećanjem standarda kvalitete života nastupila je sve veća konzumacija farmaceutika što za negativnu posljedicu ima veću prisutnost farmaceutika u okolišu ugrožavajući živi svijet. [1]

Farmaceutici mogu nastati prirodnim ili sintetskim putem te su većinom polarne molekule s više ionizirajućih skupina i različitim strukturama i funkcijama u organizmu. Lipofilni su ili topljivi u vodi u manjim količinama te imaju sposobnost prolaziti kroz stanične membrane i ostati u obliku aktivne molekule kada završe u okolišu. [1]

Dijele se u 24 razreda sačinjena od oko 10 000 farmaceutika koji sadrže preko 3000 aktivnih komponenti. Najčešće korišteni su antibiotici, analgetici, antidepresivi, antiepileptici, beta blokatori, anestetici i dr. [1, 2]

U ovom radu je korišteno 12 farmaceutika različitih fizikalnih i kemijskih svojstava te različitih klasa spojeva. Korišteni farmaceutici su: amoksicilin, sulfametazin, sulfametoksazol, ofloksacin, atenolol, prokain, torasemid, karbamazepin, deksametazon, β -estradiol, diazepam i diklofenak.

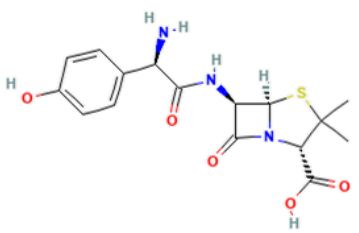
2.1.1. Antibiotici

Antibiotici su jedna od najčešće primjenjivanih klasa farmaceutika u medicini sa širokim rasponom djelovanja. Primjenjuju se za liječenje infektivnih oboljenja prouzrokovanih bakterijama. Mogu djelovati selektivno samo na određeni tip bakterije ili općenito. Djeluju selektivno samo na stanice parazita bez štetnog učinka na stanice domaćina. Postoji mogućnost da nametnici razviju određeni stupanj otpornosti na mehanizme djelovanja antibiotika. [2]

2.1.1.1. Amoksicilin

Amoksicilin specifičnije pripada u klasu penicilina koji inhibiranjem sinteze bakterijske stanične stijenke prouzrokuju smrt bakterija. Koristi se za liječenje različitih bakterijskih infekcija, a djeluje na Gram-pozitivne bakterije i na određene Gram-negativne bakterije. Enzimi koje inhibira su penicilinaze ili β -laktamaze koje bakterije proizvode za razgradnju antibiotika. [3] Liječi infekcije mokraćnog sustava, kože, uha te neke spolno prenosive bolesti. Ne pokazuje se kao uspješan lijek protiv virusnih infekcija (gripe ili prehlade). Negativno djelovanje na ljudski organizam se očituje u alergijskim reakcijama, smetnjama u probavi te gljivičnim infekcijama. [3]

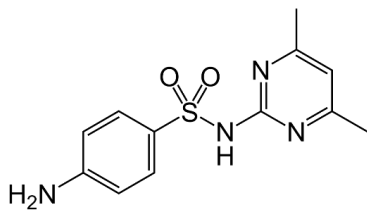
Tablica 2.1. Fizikalno-kemijska svojstva amoksicilina [4]

Strukturna formula	
Empirijska formula	$C_{16}H_{19}N_3O_5S$
CAS broj	26787-78-0
Molarna masa, $g\ mol^{-1}$	365,4
Naziv po IUPAC-u	(2S,5R,6R)-6-[[[(2R)-2-amino-2-(4-hidroksipentil)acetil]amino]-3,3-dimetil-7-okso-4-tia-1-azabicoklo[3.2.0]heptan-2-karboksilna kiselina
pK_k	2,6
$\log K_{ov}$	0,87
$K_{oc},\ cm^3\ g^{-1}$	100
Temperatura taljenja	194 °C
Topljivost u vodi	10,7 $mg\ L^{-1}$
Apsorpcijski maksimum, nm	230

2.1.1.2. Sulfametazin

Sulfametazin je sulfonamidni antibiotik korišten pri tretiranju bakterijskih infekcija tako što usporava enzim ključan za sintezu folne kiseline u bakterijama i tako im priječi razmnožavanje i rast. Liječi bakterijske infekcije pokrovnog sustava (otvorene rane i kožne infekcije), respiratornog te djelomično probavnog sustava. [5]

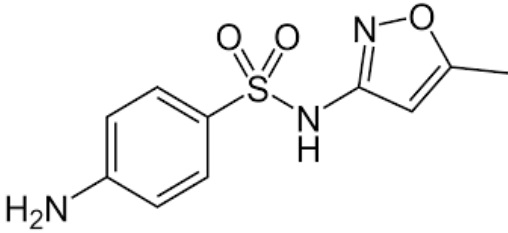
Tablica 2.2. Fizikalno-kemijska svojstva sulfametazina [6]

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S
CAS broj	57-68-1
Molarna masa, g mol ⁻¹	278,33
Naziv po IUPAC-u	4-amino-N-(4,6-dimetilpirimidin-2-il) benzensulfonamid
pK _k	7,59
log K _{ov}	0,14
K _{oc} , cm ³ g ⁻¹	45,1-174
Temperatura taljenja	198,5 °C
Topljivost u vodi	1,0 mg L ⁻¹
Apsorpcijski maksimum, nm	275

2.1.1.3. Sulfametoksazol

Sulfametoksazol se često koristi u kombinaciji s trimetoprimom. Sinergično djelovanje ovih sastavnica se primjenjuje u liječenju bakterijskih infekcija. Sulfametoksazol inhibira sintezu folne kiseline u stanicama bakterija, a trimetoprim djeluje na metabolizam folne kiseline. [7]

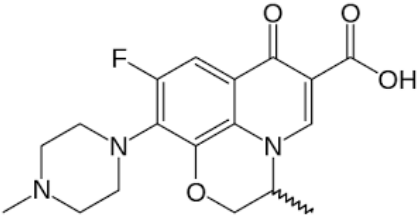
Tablica 2.3. Fizikalno-kemijska svojstva sulfametoksazola [8]

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S
CAS broj	723-46-6
Molarna masa, g mol ⁻¹	253,28
Naziv po IUPAC-u	4-amino- <i>N</i> -(5-metil-3-izoksazolil) benzensulfonamid
p <i>K</i> _k	3,92
log <i>K</i> _{ov}	0,89
<i>K</i> _{oc} , cm ³ g ⁻¹	72
Temperatura taljenja	168– 172 °C
Topljivost u vodi	netopiv
Apsorpcijski maksimum, nm	275

2.1.1.4. Ofloksacin

Ofloksacin pripada u antibiotike te se rabi pri liječenju bakterijskih infekcija. Inhibira enzim za replikaciju DNK u stanicama te tako sprječava razmnožavanje bakterija. Koristi se za infekcije dišnog sustava (bronhitis, upala pluća), infekcije sustava za izlučivanje, kože, probave i ostalih bakterijskih bolesti. Djeluje i na Gram-pozitivne i na Gram-negativne bakterije. [9]

Tablica 2.4. Fizikalno-kemijska svojstva ofloksacina [10]

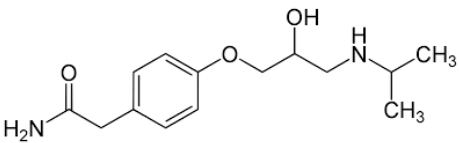
Strukturna formula	
Empirijska formula	$C_{18}H_{20}FN_3O_4$
CAS broj	82419-36-1
Molarna masa, $g\ mol^{-1}$	361,4
Naziv po IUPAC-u	7-fluoro-2-metil-6-(4-metilpiperazin-1-il)-10-okso-4-oksa-1-azatriciklo[7.3.1.0.]trideka-5(13),6,8,11-tetraen-11-karboksilna kiselina
pK_k	8,31
$\log K_{ov}$	- 0,39
Temperatura taljenja	250-257 °C
Topljivost u vodi	netopiv
Apsorpcijski maksimum, nm	290

2.1.2. Ostali farmaceutici

2.1.2.1. Atenolol

Atenolol pripada skupini β -blokatora koji se primjenjuju u liječenju visokog krvnog tlaka (hipertenzije), angine pektoris (bol u prsima uslijed premale opskrbe kisikom u srcu) te pri tretmanima nepravilnog ritma srca. [11]

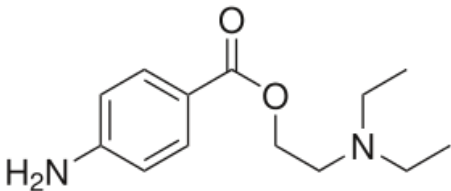
Tablica 2.5 Fizikalno-kemijska svojstva atenolola [12]

Strukturna formula	
Empirijska formula	$C_{14}H_{22}N_2O_3$
CAS broj	29122-68-7
Molarna masa, g mol ⁻¹	266,34
Naziv po IUPAC-u	2-[4-[2-hidroksi-3-(propan-2-ilamino)propoksi]fenil]acetamid
pK _k	9,6
log K _{ov}	0,16
K _{oc} , cm ³ g ⁻¹	72
Temperatura taljenja	158-160 °C
Topljivost u vodi	13,3 mg mL ⁻¹
Apsorpcijski maksimum, nm	230

2.1.2.2. Prokain

Prokain se svrstava među anestetike, specifičnije lokalne, zbog primjene za smanjivanje te cjelovito blokiranje osjeta određenoga dijela tijela na neko vrijeme. Koristi se u dijagnostičke svrhe, u kirurškim zahvatima manjeg opsega zbog kratkog vremena djelovanja (30 minuta do nekoliko sati ovisno o koncentraciji i načinu korištenja) te u dijagnostičke svrhe. [13]

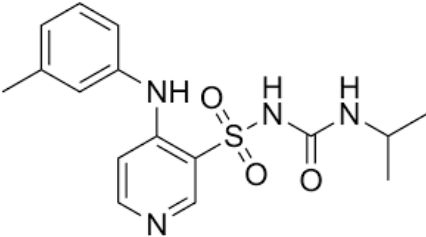
Tablica 2.6. Fizikalno-kemijska svojstva prokaina [14]

Strukturna formula	
Empirijska formula	$C_{13}H_{20}N_2O_2$
CAS broj	59-46-1
Molarna masa, $g\ mol^{-1}$	236,31
Naziv po IUPAC-u	2-(dietilamino)etil-4-aminobenzoat
pK_k	9,04
$\log K_{ov}$	1,92
Temperatura taljenja	61 °C
Topljivost u vodi	5,0 $mg\ L^{-1}$
Apsorpcijski maksimum, nm	290

2.1.2.3. Torasemid

Torasemid pripada diureticima te se koristi pri tretiranju povišenog krvnog tlaka te nakupljanju tekućine uslijed zatajenja rada srca [15], bubrega ili jetre. Uzrokuje povećano izlučivanje mokraće i tako vrši smanjenje nakupljene tekućine. [16]

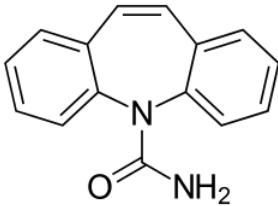
Tablica 2.7. Fizikalno-kemijska svojstva torasemida [17]

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S
CAS broj	56211-40-6
Molarna masa, g mol ⁻¹	348,4
Naziv po IUPAC-u	1-[4-(3-metilanilino)piridin-3-il]sulfonil-3-propan-2-ilurea
pK _k	7,1
log K _{ov}	2,3
Temperatura taljenja	163-164 °C
Topljivost u vodi	> 1,0 mg L ⁻¹
Apsorpcijski maksimum, nm	290

2.1.2.4. Karbamazepin

Karbamazepin spada u antiepileptičku skupinu farmaceutika za liječenje neuroloških poremećaja poput epilepsije. Putem živčanih stanica djeluje na mozak sprječavanjem epileptičkih napada. [18]

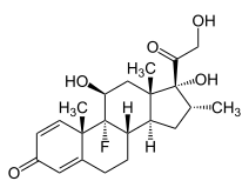
Tablica 2.8. Fizikalno-kemijska svojstva karbamazepina [19]

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O
CAS broj	298-46-4
Molarna masa, g mol ⁻¹	236,27
Naziv po IUPAC-u	5H-dibenzo[b,f]azepin-5-karboksamid
pK _k	13,9
log K _{ov}	2,45
Temperatura taljenja	189-192 °C
Topljivost u vodi	18,0 mg mL ⁻¹
Apsorpcijski maksimum, nm	230

2.1.2.5. Deksametazon

Kortikosteroidi su skupina hormona nadbubrežne žlijezde te u njih se svrstava deksametazon. Primjena se sastoji od smanjivanja upalnih stanica i osjetljivosti imunološkoga sustava čovjeka. Uz protuupalna svojstva deksametazona, važno je izdvojiti i antialergijsko djelovanje. [20]

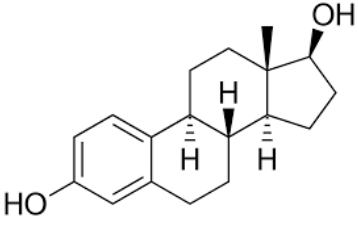
Tablica 2.9. Fizikalno-kemijska svojstva deksametazona [21]

Strukturna formula	
Empirijska formula	$C_{22}H_{29}FO_5$
CAS broj	50-02-2
Molarna masa, $g\ mol^{-1}$	392,5
Naziv po IUPAC-u	(8S,9R,10S,11S,13S,14S,16R,17R)-9-fluoro-11,17-dihidroksi-17-(2-hidroxiacetil)-10,13,16-trimetil-6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-dodekahidro-3H-ciklopenta[a]fenantren-3-on
pK_k	12,42
$\log K_{ov}$	1,83
$K_{oc},\ cm^3\ g^{-1}$	240
Temperatura taljenja	260-264 °C
Topljivost u vodi	89,0 $mg\ mL^{-1}$
Apsorpcijski maksimum, nm	240

2.1.2.6. β -estradiol

β -estradiol je jedan od oblika estrogena (steroidni hormoni) koji se prirodno proizvodi u jajnicima kod žena. Značajan je pri regulaciji menstrualnog ciklusa te održavanju zdravlja reproduktivnih organa. U prirodi se može naći u biljkama i životinjama, no za medicinsku primjenu proizvodi se sintetskim putem i koristi za hormonsku terapiju žena u menopauzi. [22]

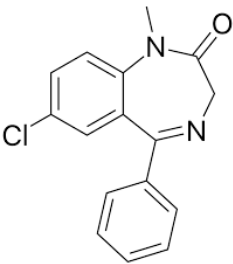
Tablica 2.10. Fizikalno-kemijska svojstva β -estradiola [23]

Strukturna formula	
Empirijska formula	$C_{18}H_{24}O_2$
CAS broj	50-28-2
Molarna masa, $g\ mol^{-1}$	272,4
Naziv po IUPAC-u	(17 β)-estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol
pK_k	10,71
$\log K_{ov}$	4,01
Temperatura taljenja	178-179 °C
Topljivost u vodi	3,90 $mg\ mL^{-1}$
Apsorpcijski maksimum, nm	230

2.1.2.7. Diazepam

Diazepam je anksiolitik koji pomaže protiv nesanice, anksioznosti, epilepsije, grčenja mišića. Nadalje se koristi u medicini kao sedativ. Povećava aktivnost neurotransmitera koji imaju umirujuće djelovanje na mozak. [24, 25]

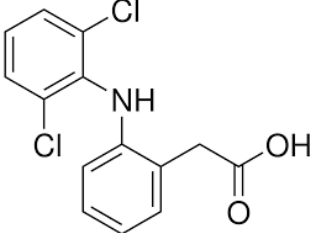
Tablica 2.11. Fizikalno-kemijska svojstva diazepama [26]

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₁₆ H ₁₃ ClN ₂ O
CAS broj	439-14-5
Molarna masa, g mol ⁻¹	284,74
Naziv po IUPAC-u	7-kloro-1-metil-5-fenil-1,3-dihidro-2H-1,4-benzodiazepin-2-on
pK _k	3,4
log K _{ov}	2,82
Temperatura taljenja	125-126 °C
Topljivost u vodi	66,0 mg mL ⁻¹
Apsorpcijski maksimum, nm	230

2.1.2.8. Diklofenak

Diklofenak se klasificira kao nesteroidni protuupalni lijek – NSAID¹. Ublažava fizičke bolove, snižava temperaturu te pozitivno djeluje na smanjenje upala. Sastavna je stavka lijekova za artritis i slične upale mišića i kostiju. [27]

Tablica 2.12. Fizikalno-kemijska svojstva diklofenaka [28]

Strukturna formula	
Empirijska formula	C ₁₄ H ₁₀ Cl ₂ NNaO ₂
CAS broj	15307-79-6
Molarna masa, g mol ⁻¹	318,13
Naziv po IUPAC-u	2-[(2,6-diklorfenil)amino] benzenoetena kiselina
pK _k	4,15
log K _{ov}	4,02
Temperatura taljenja	283-285 °C
Topljivost u vodi	50,0 mg mL ⁻¹
Apsorpcijski maksimum, nm	275

¹ eng. *non-steroidal anti-inflammatory drug*, NSAID

2.1.3. Farmaceutici u okolišu

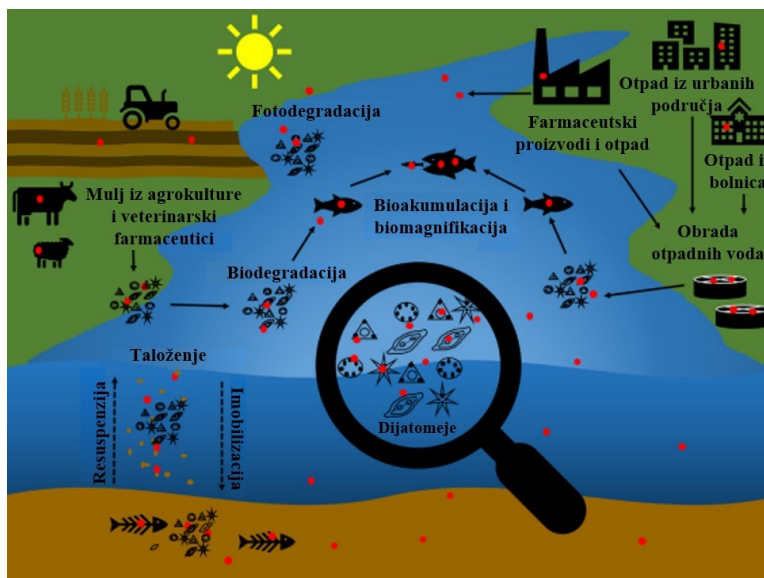
Usljed velike emisije nerazgrađenih farmaceutika u javne prijamnike često dolazi do povećanja njihove koncentracije u vodama i okolišu općenito što izravno utječe na njihovu pojavu u biljnim i životinjskim organizmima kao i u ljudskom organizmu. Istraživanjima je potvrđeno kako kod bioakumulacije farmaceutika u organizmu ljudski urin može obilovati dva do tri puta većim koncentracijama farmaceutika u usporedbi sa zabilježenim koncentracijama u površinskim vodama. [29]

Načini dospijeca farmaceutika u površinske vode su svakodnevna konzumacija farmaceutika (iz metabolizma), nepropisno odlaganje starih i/ili pokvarenih lijekova u kućanstvima te nekvalitetni pročišćivači zagađene vode. Izvori dospijeca farmaceutika su poljoprivreda, stočarstvo, industrija (osobito farmaceutska), zdravstvo i sami ljudi, a oblici u kojima se konzumiraju su prikazani u Tablici 2.12. [30] Ako se koncentracija farmaceutika u okolišu poveća dolazi do bioakumulacije i biomagnifikacije u organizmima te do sedimentacije u vodama (Slika 2.1.).

Tablica 2.13. Različiti oblici konzumacije farmaceutika [31]

farmaceutik	oblici u kojima je dostupan
amoksicilin	tablete, kapsule, sirup, prašak
atenolol	tablete
prokain	injekcije, kreme
ofloksacin	tablete, kapi za oči, otpala za infuzije
sulfametazin	tablete, prašak
sulfametoksazol	tablete, suspenzija za oralnu primjenu
torasemid	Tablete
karbamazepin	tablete, kapsule, suspenzije za oralnu primjenu
deksametazon	tablete, injekcijske otopine, kapi za oči, kapi za uši, kreme, masti za kožu
β -estradiol	tablete, injekcije, gelovi i kreme
diazepam	tablete, injekcije, sprej
diklofenak	tablete

Osobita pažnja je nužna pri obradi bolničkih otpadnih voda. Prema nalogu Svjetske zdravstvene organizacije – WHO² sve bi otpadne vode iz sektora zdravstva morale biti višestupnjevito tretirane prije ispuštanja u površinske vode ili javne odvodne sustave. U zemljama s visokom stopom malignih oboljenja poput Kine i Japana uspostavljeni su posebni *in-situ* procesi pročišćavanja bolničkih voda. [2]



Slika 2.1. Načini dospijevanja farmaceutika u površinske vode [30]

2.2. MODERNE ANALITIČKE METODE U ANALIZI OTPADNIH VODA

Učinkovitost metoda uklanjanja farmaceutika iz otpadnih voda se prati analitičkim metodama te se zato u analitičkoj kemiji posebna pažnja usmjerava na razvoj metoda za detekciju, kvantifikaciju i separaciju farmaceutski aktivnih tvari u prirodnim i umjetnim izvorima. Zbog izrazite složenosti uzoraka u prirodnim izvorima metode analize su uvjetovane i metodama pripreme uzoraka za analizu. Metode pripreme uzoraka su važne zbog unaprjeđenja kvalitete kromatografske analize, pospješivanja granice detekcije analita ili izolacije analiza iz matrice. [32] Nužno je razviti metode

² eng. World Health Organization, WHO

koje omogućuju izrazito nisku i preciznu granicu detekcije budući da su farmaceutici u okolišu prisutni u malim, no ipak štetnim koncentracijama. Matrica često može imati kompleksan sastav koji pogoduje različitim interferencijama te umanjuje kvalitetu kromatografske analize. Dodatni zahtjevi koje metode pripreve uzoraka moraju ispunjavati su preciznost, zadovoljavajuća ponovljivost i optimalna potrošnja otapala budući da je iskorišteno otapalo nužno regenerirati. [33]

2.2.1. Ekstrakcija kao metoda pripreme uzoraka za analizu [34]

Glavnina modernih metoda za pripravu uzoraka je temeljena na ekstrakciji. Zajednički princip svih metoda je selektivno koncentriranje analita u jednoj fazi, a selektivnost se osigurava modificiranjem radnih uvjeta. Ekstrakcijske metode se mogu raščlaniti prema agregatnom stanju faza između kojih dolazi do prijenosa tvari. Razlikujemo ekstrakciju tekuće-tekuće (*LLE*)³, ekstrakciju čvrsto-tekuće te ekstrakciju plinovito-tekuće.

2.2.1.1. Metode ekstrakcije iz tekućih uzoraka

Sve vrste ekstrakcije iz tekućih uzoraka počivaju na zajedničkom načelu prema kojemu tvar koju je potrebno ekstrahirati prelazi iz jednog otapala u drugo.

1.) Ekstrakcija čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom – SPE⁴ je učinkovit način pripreve uzoraka za kemijske analize. Otopljeni analit se raspodjeljuje između dvije faze do postizanja dinamičke ravnoteže. Uzorak u kapljevitoj fazi se propušta kroz sloj adsorbensa koji mora imati veći afinitet za analit od otapala. Nakon ekstrakcije analit se ispire pogodnim otapalom za eluiranje. Ova ekstrakcijska metoda pojednostavljuje analizu uklanjanjem glavine uzorka iz matrice. [35] Učinkovitost uklanjanja uzorka ovisi o uporabi sorbensa. Klasični sorbensi poput C8 ili C18 kemijski modificiranoga silikagela, ionoizmjenjivačkih smola i polimernih sorbensa pokazuju se nedovoljno učinkovitim za ekstrakciju analita iznimno velike polarnosti iz velikog volumena uzorka. Zbog nezadovoljavajuće selektivnosti i velikog doprinosa utjecaja interferencija koje se ekstrahiraju

³ eng. *liquid-liquid extraction*, LLE

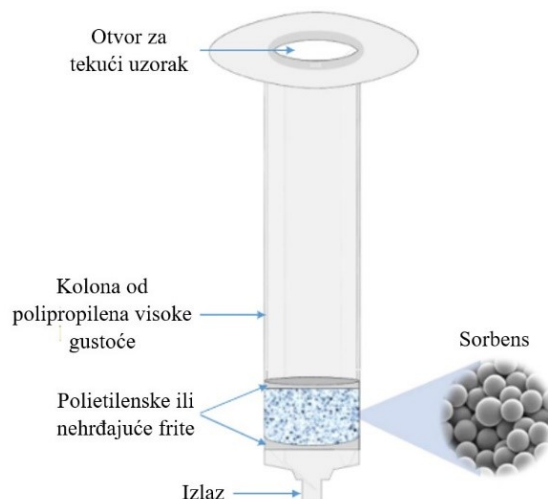
⁴ eng. *Solid Phase Extraction*, SPE

skupa s analitom, klasični sorbensi su zamijenjeni izvjesnim razvijenijim sorbensima za ekstrakciju tragova analita. Među predstavnicima valja izdvojiti afinitetne ligande (imobilizirane metalne ione, peptide, antitijela, imunosorbense, umjetna bojila). Najveći fokus za daljnjim istraživanjem je na polimernim sorbensima s otiskom molekule (MIP)⁵ koji u polimernim maticama imaju ugrađene 3D oblike analita koji se određuje. Ovakvi selektivni sorbensi su karakterizirani bržom ekstrakcijom, većom selektivnosti i osjetljivošću te mogućnošću izravnog vezivanja na detektor.

Zbog mogućnosti različitih izvedbi kolona (Slika 2.2.) i prilagodbe za različite sustave, brzine te cijene ekstrakcija čvrstom fazom zauzima značajniju ulogu u suvremenoj analitici te od 1970.-ih godina gotovo u cijelosti istiskuje ekstrakciju tekuće-tekuće iz uporabe zbog brojnih prednosti:

- dok LLE ne može ekstrahirati polarne komponente, SPE pokazuje veliki uspjeh pri ekstrakciji polarnih, a posebice nepolarnih komponenti
- koristi znatno manje količine organskog otapala
- vremenski je pogodnija jer traje kraće
- zahtijeva manje popratne instrumentacije
- ne postoji opasnost od formiranja emulzija
- dostupnost komercijalnih pripremljenih sorbensa

⁵ eng. *molecularly imprinted polymer*, MIP



Slika 2.2. Shematski prikaz kolone za ekstrakciju čvrstom fazom [35]

Usljed sve veće primjene, ali i sve većih zahtjeva za manjom potrošnjom otapala za eluiranje te potrebe za primjenom sve manjih volumena uzorka, ekstrakcija čvrstom fazom doživljava svoje modifikacije. Tu prvenstveno treba spomenuti mikroekstrakciju čvrstom fazom te ekstrakciju miješalom. U svim prethodno navedenim slučajevima ekstrakcija željenih komponenti se iz jednog u drugo otapalo odvija posredstvom čvrste faze. Kad govorimo o izravnom nadovezivanju na već polako zaboravljenu ekstrakciju tekuće-tekuće u lijevku za odjeljivanje, tada se spominju druge metode ekstrakcije poput mikroekstrakcije tekućom fazom, mikroekstrakcije na kapi, ekstrakcije membranom i mikroekstrakcije raspršenjem tekuće faze.

2.) Mikroekstrakcija čvrstom fazom

Mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME)⁶ se najčešće primjenjuje u analizi hlapljivih komponenata. Razlika u mehanizmu ekstrakcije u odnosu na klasični je u količini i obliku sorbensa. Budući da je sorbens u obliku vlakana, metoda se pokazuje pogodnom za manje količine analita. Vodeća prednost mikroekstrakcije čvrstom fazom je mali utrošak otapala, selektivnost, jednostavnost, brzina te mogućnost izravnog povezivanja s drugim analitičkim metodama (plinska i tekućinska kromatografija, kapilarna elektroforeza). Ograničeno vrijeme trajanja vlakana uslijed

⁶ eng. *solid-phase microextraction*, SPME

oštećenja podižu cijenu metode. Drugi nedostatak je nemogućnost potpune ekstrakcije zbog malog volumena vezane faze (uobičajena debljina vlakana je 7 – 100 μm). Modificiranjem procesnih parametara kao što su temperatura i intenzitet miješanja može se postići veća učinkovitost mikroekstrakcije čvrstom fazom. Uvođenjem miješanja pospješuje se difuzija analita te je iskorištenje veće dok porast temperature djeluje negativno na iskorištenje uslijed egzotermnosti adsorpcije.

3.) Ekstrakcija miješalom

Ekstrakcija miješalom (SBSE)⁷ je razvijena kako bi se poboljšala mikroekstrakcija čvrstom fazom zamjenom vlakana kao nosača sorbensa s magnetnim miješalom. Površina za sorpciju je 50-250 puta veća te je shodno tomu i iskorištenje ekstrakcije veće i za veće volumene uzorka. Vrijeme ekstrakcije ovisi o kinetici, volumenu uzorka, broju okretaja miješala i njegovim dimenzijama. Ekstrahirani analit je moguće desorbirati korištenjem topline, tekuće desorpcije ili tekućinske kromatografije. Trajanje metode predstavlja vodeći nedostatak ekstrakcije miješalom. Stoga se često koriste kombinacije s postupcima hladnog zadržavanja i ponovnoga koncentriranja. Prednost metode je širok raspon oblika uzoraka (složeni, polučvrsti, hlapljivi, poluhlapljivi, nehlapljivi spojevi).

4.) Ekstrakcija membranom

U ekstrakciji membranom membrana može imati dva djelovanja: kao selektivni filter koji limitira difuzivni prijenos između dvije otopine ili ako aktivna membrana čija je selektivnost prolaska uzorka određena kemijskom strukturom. Pokretačka sila procesa je koncentracijski gradijent čiji se doprinos može povećati uklanjanjem analita koji je difundirao u otopinu ionizacijom potpomognutom puferom, kompleksiranjem ili derivatizacijom (prevođenje analita kemijskom reakcijom u pogodniju formu). U praksi je najprimjenjivanija ekstrakcija tekućom membranom (SLM)⁸ koja je utemeljena na trofaznom sustavu u kojem je organska faza smještena između dvije vodene faze te je uslijed kapilarnih sila u poroznoj hidrofobnoj membrani nepolarna. Kvaliteta

⁷ eng. *stir-bar sorptive extraction*, SBSE

⁸ eng. *supported liquid membrane extraction*, SLM

ekstrakcije je zajamčena malom potrošnjom organskih otapala, postizanjem visoke čistoće ekstrahiranih komponenti i zadovoljavajućim stupnjem koncentriranja analita. Ekstrakcija tekućom membranom omogućuje povezivanje s plinskom ili tekućinskom kromatografijom za određivanje ionskih spojeva. Uz primjenu na tekućim uzorcima, moguća je i primjena membranske ekstrakcije na plinovitim uzorcima uz ista načela (razlika je u izmijenjenoj prihvatnoj otopini koja može biti i plin). Za plinovite uzorke koristi se spektrometrija masa (MS)⁹.

2.2.1.2. Metode ekstrakcije iz čvrstih uzoraka

Druga skupina su metode za ekstrakciju iz čvrstih uzoraka (Soxhlet i automatizirani Soxhlet, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija superkritičnim fluidom, ekstrakcija pregrijanom vodom, mikrovalna ekstrakcija, tlačna ekstrakcija otapalom, raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu, ekstrakcija raspršenjem čvrste faze). Među metodama za ekstrakciju iz plinovitih uzoraka značajno je istaknuti pripremu uzoraka hladnim zadržavanjem te ekstrakciju otapalom.

1.) Soxhlet i automatizirani Soxhlet

Metoda Soxhlet ekstrakcije je veoma spor način za pripremu uzoraka (6-48h). Od 1980.-ih je u praksi zamijenjena drugim bržim metodama. Temelj metode je kontinuirano uparivanje, kondenzacija i prolaz otapala kroz uzorak. Radi se o ekološki nepovoljnoj metodi zbog velikog utroška organskih otapala. Za pospješivanje nedostataka metode nastao je automatizirani Soxhlet koji omogućuje znatno bržu ekstrakciju uslijed boljeg kontakta između otapala i uzorka što uvjetuje bolji prijenos tvari. Prednosti Soxhleta zbog kojih se i danas može primjenjivati za pripremu uzoraka su mogućnost primjene na gotovo sve uzorke te simultana ekstrakcija većeg broja uzoraka.

⁹ eng. *mass spectrometry*, MS

2.) Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija (USE)¹⁰ rabi energiju ultrazvuka s ciljem pospešivanja procesa ekstrakcije. Uzorak je potrebno na kraće vrijeme izložiti velikoj količini zračenja. Posljedično rastu temperatura i tlak. Frekvencijski raspon ultrazvuka varira od 20 do 100 kHz pri čemu dolazi do kavitacije (stvaranje, rast i raspad mjehurića u tekućini). Brzina, jednostavnost, mogućnost ekstrahiranja većih količina uzorka (2-30 g), kratko vrijeme trajanja (10-45 min) te manji utrošak organskih otapala su prednosti ultrazvučne ekstrakcije, a među nedostacima se ističe niži stupanj učinkovitosti. Najčešće se primjenjuje u analizama ostataka antibiotika, prehrambenih komponenti, pesticida u uzorcima sedimenta i sl.

3.) Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE)¹¹ se koristi za analize organskih komponenata u okolišnim uzorcima. Manja viskoznost i veće vrijednosti difuzijskih koeficijenata supekritičnih fluida u odnosu na tekuća otapala omogućuju bolju topljivost analita i pogodniju kinetiku reakcije što pozitivno doprinosi iskorištenju ekstrakcije. Za ekstrakciju složenih uzoraka moguće je variranjem tlaka i temperature modificirati jakost otapala. Ekonomski je veoma isplativa metoda uslijed manjeg utroška nezapaljivih i nekorozivnih otapala, brže ekstrakcije i mogućnosti povezivanja s plinskim ili tekućinskim kromatografom. Još jedan značajan čimbenik ekonomičnosti ekstrakcije superkritičnim fluidom je dobivanje čistih ekstrakta bez potrebe za dodatnim procesima pročišćavanja budući da ekstraktor sadrži poroznu keramičku pločicu.

2.2.2. Kromatografske instrumentalne metode analize

Kromatografija je danas najzastupljenija separacijska metoda za razdvajanje tvari iz smjese na skupine analita ili pojedinačne analite. Kromatografske metode obuhvaćaju cijelu skupinu raznih laboratorijskih tehnika za razdvajanja smjesa. Za cijeli skup metoda vrijede zajednička načela. Ispitivani uzorak se nalazi otopljen u pokretnoj fazi te prolazi kroz nepokretnu fazu te tako dolazi do izdvajanja komponenti na osnovu različitog afiniteta prema fazama. Stoga tvar koja je više

¹⁰ eng. *ultrasonic extraction*, USE

¹¹ eng. *supercritical fluid extraction*, SFE

topljiva u nepokretnoj fazi ima manje vrijeme zadržavanja uslijed ostvarenih interakcija sa nepokretnom fazom. Pokretnu fazu mogu činiti kapljevina, plin ili superkritični fluid dok je nepokretna faza u krutom ili kapljevitom agregatnom stanju. Za nepokretnu fazu je ključna sposobnost neprestanog zadržavanja i odcjepljivanja analita kako bi se ostvarile različita vremena potrebna da analit pređe određeni put na osnovu čega se komponente mogu kvalitativno i kvantitativno odrediti .[36]

Podjela kromatografskih metoda:

1) Prema mehanizmu odvajanja komponenti:

- gel-filtracijska kromatografija – razdvajanje na temelju različitih veličina analita
- ionsko-izmjenjivačka – razdvajanje na osnovu ukupnog naboja analita
- afinitetna kromatografija – razdvajanje zbog specifičnog afiniteta analita za vezivanje niskomolekularnih spojeva
- adsorpcijska kromatografija – razdvajanje uzrokovano različitim polarnostima analita
- razdjelna kromatografija

2) Prema agregacijskom stanju pokretne i nepokretne faze:

- kruto-tekućinska kromatografija (kromatografija na stupcu i tankoslojna kromatografija)
- tekućinska kromatografija
- plinska kromatografija
- kromatografija superkritičnim fluidom

Suvremene kromatografske tehnike se dijele prema agregatnom stanju nepokretne faze. Razlikuju se plinska kromatografija (GC)¹² i tekućinska kromatografija (LC). [34, 36]

2.2.2.1. *Plinska kromatografija (GC)*

Postupak provođenja plinske kromatografije počinje ubrizgavanjem uzorka s analitom u plinski tok. Inertni plinovi (helij, dušik, vodik, argon ili mješavina metana i argona [36]) imaju ulogu nosača koji prenosi uzorak kroz kolonu koja je s unutarnje strane obložena ili u sebi sadrži punila pomoću kojih zadržava analite određeno vrijeme [34]. Vrijeme zadržavanja se razlikuje od

¹² eng. *gas chromatography*, GC

komponente do komponente te ovisi o nasumičnim adsorpcijskim i desorpcijskim procesima između analita i nepokretne faze. Nakon izlaska iz kolone komponente se detektiraju te se analogni signal detektora pretvara u digitalni oblik koji se prikazuje na kromatogramu.

U plinskoj kromatografiji se koriste različiti detektori poput plamenog ionizacijskog detektora (FID), termičkog ionizacijskog detektora (TID), spektrometra masa (MS), itd. Primjena pojedinog detektora ovisi o mnogostrukim čimbenicima koji reguliraju u svrhu ostvarivanja veće preciznosti i selektivnosti. Procesni parametri poput temperature u sustavu, protoka intertnog plina nositelja te odabira različitih kolona i punila se mogu regulirati pri provedbi analize. Ove su značajke posebno razvijene kod naprednih GC tehnika poput plinske kromatografije visoke razlučivosti (HRGC).

Plinska kromatografija se najčešće kombinira sa spektrometrijom masa (GC-MS) i plinskim kromatografom (GC-GC). GC-MS se primjenjuje pri razdvajanju spojeva u plinskoj kromatografiji za složene smjese i identifikaciju nepoznatih spojeva. GC-GC uključuje korištenje dvije ili više kolona s različitim svojstvima za razdvajanje spojeva što omogućuje veću selektivnost i razlučivost. Plinska kromatografija s kvadrupolnim detektorom (GC-Q) se primjenjuje za selektivnu detekciju ciljanih spojeva u smjesi te koristi kvadrupol u ulozi filtra masa. Plinska kromatografija s detektorom selektivnim za plameni dušik (GC-NP) naročitu primjenu nalazi u analizi spojeva s dušikom poput amina, nitrita i nitrata. Plinska kromatografija s temperaturno programiranom desorpcijom (GC-TPD) se koristi za analizu materijala koje je moguće termički desorbirati iz tekućih ili krutih uzoraka. Rabi se za identifikaciju i kvantitativno određivanje mirisa i hlapljivih organskih spojeva. [37]

Svoju primjenu plinska kromatografija nalazi u analitičkoj kemiji, farmaceutskoj industriji, prehrambenoj industriji, forenzičkim analizama te znanostima o okolišu. Karakteriziraju ju selektivnost razdvajanja i analize organskih spojeva, plinova, aromatskih spojeva, farmaceutika i brojnih drugih spojeva što ju čini jednom od najprimjenjivijih tehnika u suvremenoj znanosti.

2.2.2.2. *Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti (HPLC) [38]*

Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti¹³ je analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju sastojaka smjese. Riječ je o naprednoj kolonskoj tekućinskoj kromatografiji u kojoj otapalo protječe kroz kolonu tlakovima do 400 bara te se kvalitetna analiza provodi korištenjem kolona s krutim punilima različitih afiniteta vezivanja za različite analite u uzorku. U HPLC-u se koriste pumpe za osiguravanje konstantnog protoka faza te za izdvajanje otopine uzorka koja prolazi kroz kolonu. Adsorbens je najčešće granulirani materijal poput silikagela, polimera i dr.

Ovisno o vrsti korištenog supstrata razvijeno je više vrsta tekućinske kromatografije:

- a) kromatografija normalnih faza¹⁴ - pristup separaciji je utemeljen na polarosti, nepokretna faza je polarna (najčešće silikagel), a pokretna faza je nepolarna (najčešće dietil eter, kloroform, heksan)
- b) kromatografija obrnutih faza¹⁵ - nepokretna faza je nepolarna ili hidrofobna, a pokretna faza je polarna
- c) kromatografija isključenja veličinom¹⁶ - kolone su inkorporirane s precizno kontroliranim molekulama supstrata, do razdvajanja komponenti dolazi na temelju različitih veličina molekula
- d) iono-izmjenivačka HPLC¹⁷ - nepokretna faza je nabijena suprotnim nabojem, a pokretna faza se koristi dvokomponentnim puferom koji može regulirati ionsku jakost i pH

Instrumentacija tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti sastoji se od pumpe, injektorskog sustava, kolone, detektora, mjernog instrumenta i sustava za prikaz rezultata (Slike 2.3.).

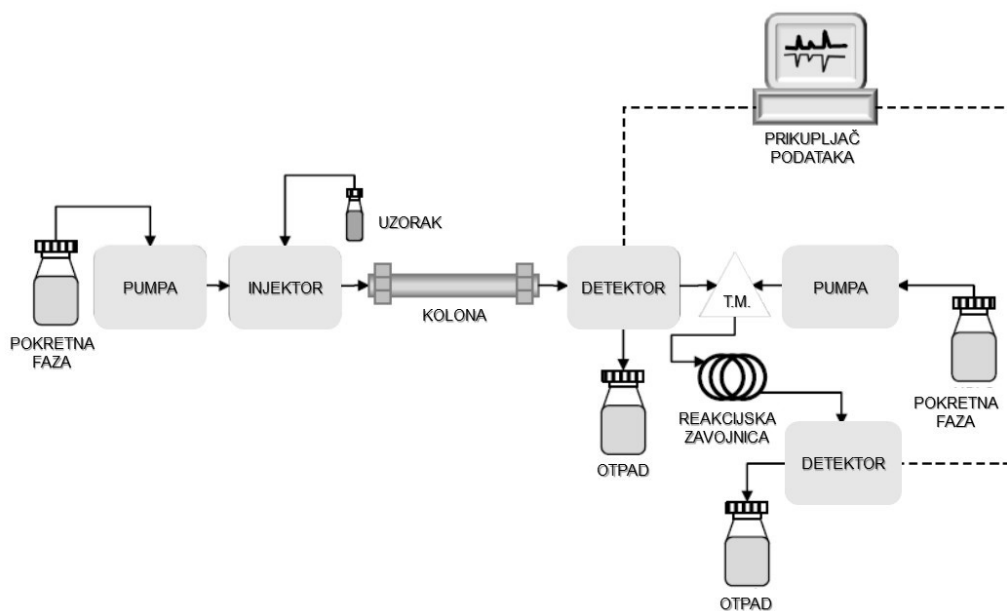
¹³ eng. *High Performance Liquid Chromatography, HPLC*

¹⁴ eng. *Normal phase chromatography*

¹⁵ eng. *Reverse phase HPLC*

¹⁶ eng. *Size-exclusion HPLC*

¹⁷ eng. *Ion-exchange HPLC*



Slika 2.3. Shematski prikaz HPLC uređaja[39]

- a) spremnik otapala – staklena boca ispunjena pokretnom fazom koja je za HPLC smjesa polarnih i nepolarnih kapljevitih komponenti čiji se udijeli mogu mijenjati tijekom analize
- b) sustav za injektiranje uzorka – injektor može biti samostalna smjesa ili elektronička mješavina struktura; trebao bi moći osigurati ubrizgavanje volumena od 0,1 μL do 100 μL pri visokim tlakovima (do 275 bara)
- c) pumpa – omogućuje gibanje pokretne faze iz spremnika kroz kolonu pod operacijskim tlakom čiji iznos ovisi o dimenzijama kolone, veličini punila i volumnom protoku
- d) kolona – najčešće se kolone proizvode od nehrđajućeg čelika, promjera su do 50 mm, a duljine do 30 cm, obično su ispunjene nepokretnom fazom molekulske veličine do 10 μm
- e) detektor – postavlja se na kraju kolone te identificira analite redom kojim izlaze iz kolone, najčešće korišteni su UV-spektroskopski, fluorescentni, spektrometar masa i elektrokemijski detektor
- f) sakupljač podataka ili integrator – prikuplja podatke s detektora te ih nakon obrade prikazuje grafički kao kromatogram (Slika 2.4.)

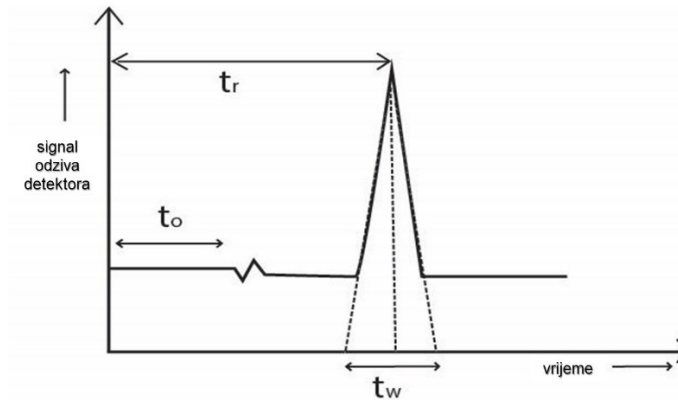
Zbog mogućnosti optimizacije metoda i širokog područja primjene tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti primjenu nalazi u raznim područjima suvremene znanosti. U farmaceutskoj industriji se primjenjuje za proučavanje stabilnosti i mogućnosti razgradnje farmaceutski aktivnih tvari. Primjena HPLC-a u okolišnim znanostima je u promatranju zagađivala i detekciji stupnja zagađenja vode. Forenzička analitika koristi se HPLC-om u analiziranju tekstilnih dokaza te kvantifikaciji lijekova i steroida u biološkim uzorcima. U kliničkim analizama se uzorci urina i krvi najčešće obrađuju HPLC-om. Prehrambena industrija analize šećera u voćnim sokovima, detekciju policikličkih spojeva u voću i povrću i analizi konzervansa.

Ovisno o vrsti kromatografije određuju se različiti parametri kojima se tumači kvaliteta separacije. U plošnoj kromatografiji se identifikacija razdvojenih komponenata temelji na određivanju vrijednosti R_F , faktora zadržavanja. Faktor zadržavanja je omjer puta koji je u nekom vremenu prešla analizirana komponenta i puta koje je prešlo čisto otapalo. U kolonskoj kromatografiji potrebno je odrediti t_R , vrijeme zadržavanja koje se mjeri od trenutka kada je uzorak unesen u kolonu sve do maksimalne vrijednosti njegovog odziva. [34]

Grafički prikaz digitalnog signala detektora se naziva kromatogram i karakteriziran je određenim veličinama. Svaki detektirani analit se prikazuje kromatografskom krivuljom¹⁸ u određenom vremenu. Vrijeme retencije ili vrijeme zadržavanja je vrijeme za koje analit pređe put od injektora kroz kolonu do detektora. Za iste komponente u istim uvjetima vršenja analite vrijeme zadržavanja je isto. To omogućuje kromatografiju kao kvalitativnu analizu. Kvantitativni dio analize temeljen je na površini ispod vrha krivulje i proporcionalnosti količini analita u uzorku. Iz visine ili površine signala se izračunava koncentracija komponenti. Samo odzivi u obliku pravilnih krivulja koje slijede normalnu razdiobu omogućuju određivanje na temelju visine, a budući da na oblik krivulje utječu različiti čimbenici (temperatura kolone, sastav i protok pokretne faze, volumen injektiranog uzorka) uputnije je mjeriti površine ispod krivulja. [34]

Na stupanj učinkovitosti može se utjecati promjenom duljine kolone, promjera čestica punila, radnim tlakom i temperaturom. Povišenjem temperature difuzija uzorka je uspješnija zbog veće pokretačke sile za prijenos tvari, a viskoznost pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji opada. Tako se može pospješiti selektivnost i kinetičke parametre analize.

¹⁸ eng. *Chromatographic curve or peak*



Slika 2.4. Parametri kromatograma

2.3. VALIDACIJA [34]

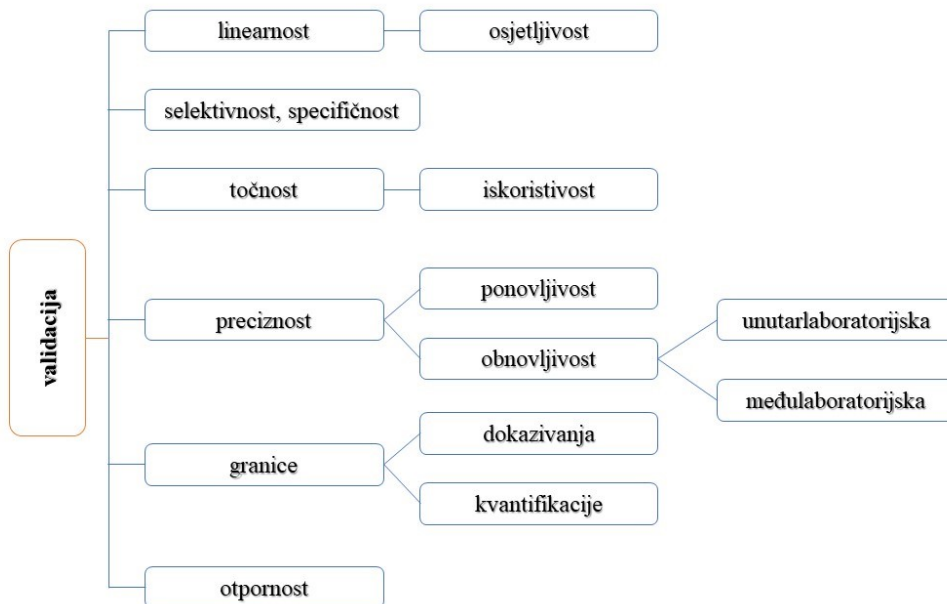
Validacija je proces ispitivanja i potvrđivanja da neki produkt ili postupak ima osiguran ispravan rad te je ispravan za uporabu koja mu je namijenjena. Nužan je korak za sudjelovanje u međulaboratorijskim ispitivanjima te je preduvjet za akreditaciju. U kontekstu HPLC-a, validacija podrazumijeva provjeru jesu li HPLC sustav i metodologija dovoljno točni za ostvarivanje zadovoljavajućih kriterija točnosti i pouzdanosti kako bi se mogli primijeniti u obradi uzoraka. Nužno je definirati kriterij točnosti parametara koji će se validirati ovisno o tipu same metode i cilju zbog kojeg se vrši validacija.

Validacija se provodi pri:

- a) prvoj primjeni nove razvijene metode,
- b) primjeni nenormirane metode,
- c) normirane metode koja se koristi u proširenom mjernom području
- d) promjeni parametara već validirane metode.

Prije validiranja metode potrebno je specificirati analitički sustav i zahtjeve koji moraju biti zadovoljeni. Pod analitički sustav ubrajamo vrstu metode, vrstu analita, doprinos matice uzorka te interval koncentracija za koji će se metoda primjenjivati. Nakon definiranja prethodno navedenih stavki pristupa se ispitivanju točnosti, ponovljivosti, obnovljivosti, selektivnosti te robusnosti.

Dodatni koraci pri validaciji metode su granice detekcije i kvantifikacije i linearnost. Svi značajni parametri za potvrdu valjanosti metode prikazani su na Slici 2.5.



Slika 2.5. Izvedbene značajke metode koje se procjenjuju u postupku validacije

Točnost se definira kao razlika referentne vrijednosti i aritmetičke sredine izmjerenih vrijednosti. Najčešći uzrok odstupanja je sustavna pogreška. U nedostatku vrijednosti za referentne metode moguće je provesti postupak dodavanja poznate količine analita u maticu. Određivanjem iskorištenja mogu se dobiti podaci o točnosti metode. Što je iskorištenje manje, prisutna je značajnija sustavna pogreška te je manja točnost. Točnost i iskoristivost se ne odnose jednako pri svim koncentracijama analita. Stoga je nužno provesti ispitivanje na najmanje tri različite koncentracije unutar koncentracijskog intervala primjene metode.

Specifičnost je značajna za primjenu metoda na kompleksnim maticama kada je nužno jednoznačno identificiranje analita.

Selektivnost je karakteristika metode koja potvrđuje mogućnost identifikacije i kvantifikacije analita bez utjecaja interferencija prisutnih u kompleksnoj matici.

Linearnost je određivanje područja koncentracija analita u uzorku za koje vrijedi linearno proporcionalna funkcijska ovisnost detektiranog signala o koncentraciji analita. [40] Provodi se umjeravanjem te regresijskom analizom dobivenih podataka. Doprinos interferencija se može eliminirati primjenom metode standardnog dodatka. Procjena utjecaja matice se temelji na omjeru nagiba dobivenog regresijskog pravca i krivulje kada je kalibriranje izvršeno pomoću čistih standardnih otopina analita.

Mjerna preciznost je provjera rasipanja rezultata u nekim uvjetima. Može se promatrati kao mjerna ponovljivost, međupreciznost i mjerna obnovljivost. Mjerna ponovljivost se referira na preciznost u uvjetima ponovljivosti kada isti analitičar vrši analizu isto uzorka istom metodom s istim radnim uvjetima u užem vremenskom rasponu. Međupreciznost se postiže u istom laboratoriju kroz dulje vrijeme uz modifikacije opreme, analitičara, kalibratora. Mjerna obnovljivost se mora moći postići između laboratorija s vremenskim odmakom. [41]

Granica određivanja (LOD) je najmanja koncentracija analita koju se razvijenom metodom može provjereno detektirati, ali ne i kvantificirati. Prihvatljivi omjer signala i šuma za granicu detekcije je 3:1. [40] **Granica kvantifikacije** (LOQ) je najmanja koncentracija analita koju se razvijenom metodom može odrediti uz zadani kriterij preciznosti. Za granicu kvantifikacije prihvatljiv omjer signala i šuma je 10:1. Ovi omjeri se matematički mogu izraziti jednadžbama (1) – (6) gdje a predstavlja nagib kalibracijskog pravca, σ standardno odstupanje slijepe probe ili analita u području granice detekcije ili kvantifikacije, N broj mjerenja, x_i očitana površinu ispod krivulje kromatograma, \bar{x} aritmetičku sredinu mjerenja. [40]

$$GD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{a} \quad (1)$$

$$GK = \frac{10 \cdot \sigma}{a} \quad (2)$$

$$\sigma = \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2} \quad (3)$$

$$\sigma_0 = \frac{\sigma}{\sqrt{N}} \quad (4)$$

$$GD = 3,3 \cdot \sigma_0 \quad (5)$$

$$GK = 10 \cdot \sigma_0 \quad (6)$$

Osjetljivost se definira kao nagib pravca dobivenog umjeravanjem te pokazuje za koje najmanje promjene koncentracije analita u uzorku se može očekivati promjena izlaznog signala uređaja.

U postupku validacije se ne ispituju nužno svaku karakteristiku, već samo one koje su relevantne za metodu. Ako je cilj metode potvrditi ili negirati prisutnost analita, sigurno se određuje granica detekcije i granica kvantifikacije. Ako se traži identifikacija komponenti u uzorku, primarno se određuje selektivnost, itd. [41]

Robusnost osigurava primjenu metode u uobičajenim promjenama pri laboratorijskom radu. Nužna je očuvana pouzdanost uslijed promjene temperature za vrijeme pripreve uzoraka, zastarjelost kromatografske kolone ili izmjena radnih elemenata uređaja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Podaci o korištenim farmaceuticima se nalaze u Tablici 3.1., a preostale kemikalije korištene u istraživanju prikazane su u Tablicu 3.2.

Tablica 3.1. Popis korištenih farmaceutika

Farmaceutik	Proizvođač i zemlja porijekla
amoksicilin	Veterina d.o.o., Hrvatska
atenolol	Acros Organics B.V.B.A., Belgija
prokain	Sigma Aldrich, SAD
ofloksacin	Acros Organics B.V.B.A., Belgija
sulfametazin	Veterina d.o.o., Hrvatska
sulfametoksazol	Sigma Aldrich, SAD
torasemid	Pliva, Hrvatska
karbamazepin	Sigma Aldrich, SAD
deksametazon	Acros Organics B.V.B.A., Belgija
β -estradiol	Acros Organics B.V.B.A., Belgija
diazepam	JGL d.d., Hrvatska
diklofenak	Sigma Aldrich, SAD

Tablica 3.2. Popis korištenih kemikalija

Naziv kemikalije	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač i zemlja porijekla
Metanol	CH ₃ OH	<i>p.a.</i>	Fisher Scientific, SAD
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	<i>p.a.</i>	VWR Chemicals, SAD
Etanol	C ₂ H ₅ OH	<i>p.a.</i>	Honeywell, SAD
Aceton	C ₃ H ₆ O	<i>p.a.</i>	Gram-mol, Hrvatska
2-propanol	C ₃ H ₈ O	<i>HPLC</i>	Fischer Chemicals, SAD
Etil-acetat	C ₄ H ₈ O ₂	<i>p.a.</i>	T.T.T. d.o.o., Hrvatska
Klorovodična kiselina	HCl	<i>p.a.</i>	Gram-mol, Hrvatska
Natrijeva lužina	NaOH	<i>p.a.</i>	VWR Chemicals, SAD

3.1.2. Izvorska voda

Tijekom cijele provedbe istraživanja korištena je izvorska voda iz izvora Mikulići, Zagreb, Hrvatska, uzorkovana u razdoblju od veljače do ožujka 2023. godine.

3.1.3. Sorbensi

Ekstrakcija čvrstom fazom sprovedena je korištenjem komercijalnih kolona Oasis HLB 60 mg/3 mL, Waters. Navedene kolone sadrže Oasis HLB hidrofilno-lipofilni sorbens sklon močenju vodom te je zato pogodan za dobro zadržavanje i zadovoljavajući stupanj ispiranja za ponovno korištenje. Može se koristiti za ekstrakciju kiselih, neutralnih i lužnatih komponenti iz različitih matica.

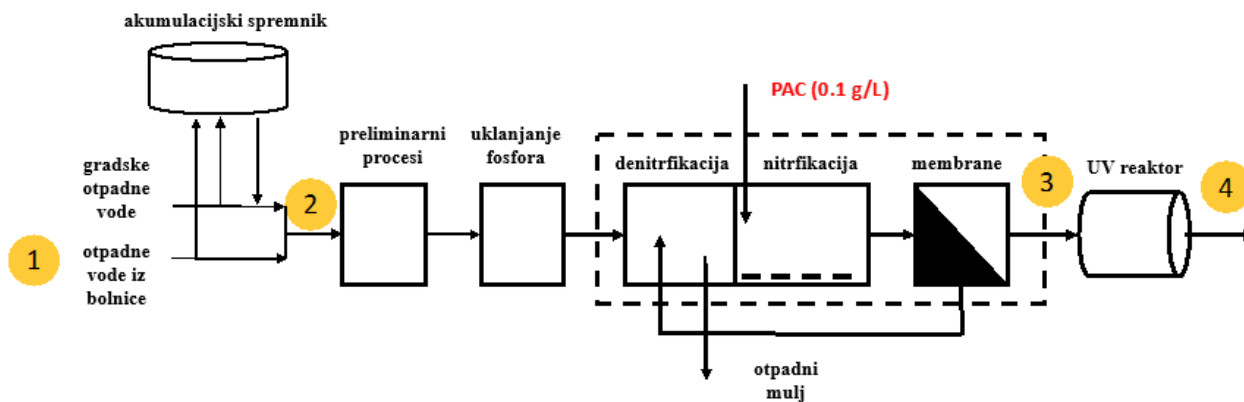


Slika 3.1. Oasis HLB Cartridge kolona

3.1.4. Otpadna voda

Za primjenu razvijene ekstrakcijske metode korištena je realna bolnička otpadna voda uzorkovana u talijanskoj regiji Emilia-Romagna. Voda je uzorkovana u realnom postrojenju za obradu voda WWTP¹⁹ (Slika 3.2.) na mjestu 1 koje odgovara bolničkoj vodi te mjestu 4 koje odgovara vodi nakon cjelokupne obrade, a neposredno prije ispuštanja u obližnje vodotokove. Voda je uzorkovana u listopadu 2021. godine te je nakon uzorkovanja, zaleđena te dopremljena u Zagreb. Neposredno prije analize spomenute vode, uzorak vode se odledio nakon čega su se makro čestice prvo uklonile vakuum filtracijom preko Bühnerovog lijevka primjenom filtra „plava vrpca“ koji ima najsitnije pore, te „bijela“ vrpca. Nakon grube filtracije, otpadna voda se filtrira vakuumskom filtracijom (Slika 3.4.) primjenom PTFE membranskih filtera (47 mm, 0,45 µm). Do provedbe eksperimenata, profiltrirana voda čuvana je u hladnjaku na temperaturi od 4°C.

¹⁹ eng. *Wastewater treatment plant*, WWTP



Slika 3.2. Shematski prikaz WWTP [42]

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga se koristi za vaganje krutih farmaceutika za pripremu temeljnih standardnih otopina. Korištena je analitička vaga modela Mettler Toledo XA105DU prikazana na Slici 3.3. Maksimalna masa koja je dozvoljena za vaganje je 120 g. Preciznost mjerenja je 0,01 g.



Slika 3.3. Analitička vaga Mettler Toledo XA105DU [43]

3.2.2. Filtracija

Izvorska voda je prije korištenja u eksperimentima filtrirana aparaturom prikazanom na Slici 3.4. korištenjem vakuumske filtracije s filtrom veličine pora 0,45 μm . Otpadne vode su prije ekstrakcije filtrirane bijelom i plavom vrpcom, a nakon toga vakumskom filtracijom.



Slika 3.4. Uređaj za vakuumsku filtraciju

3.2.3. pH metar

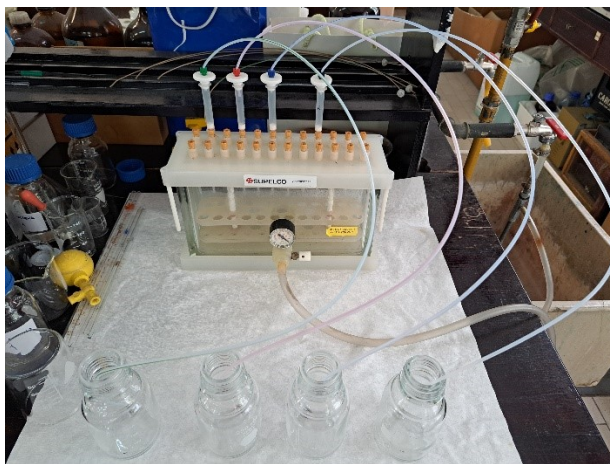
Pri mjerenju pH vrijednosti izvorske vode korišten je pH metar Mettler Toledo, S20 SevenEasy, Švicarska (Slika 3.5.). Mjerno područje je od 0 do 14 pH jedinica, a preciznost mjerenja je 0,01 pH.



Slika 3.5. pH metar Mettler Toledo S20 SevenEasy [44]

3.2.4. Aparatura za ekstrakciju čvrstom fazom (SPE)

Za ekstrakciju farmaceutika iz izvorske vode korišten je uređaj Supelco Visiprep 24 (Slika 3.6.). Vakuuum se u sustavu stvara spajanjem uređaja na odvod. Prihvaća do 24 kolone te je na svakom spojnom mjestu postavljen ventil koji omogućuje kontroliranje protoka vode.



Slika 3.6. Aparatura za vakuumsku ekstrakciju čvrstom fazom

3.2.5. Rotavapor

Eluirani uzorci su nakon ekstrakcije u SPE aparaturi upareni do suha. Korišten je rotacijski uparivač Rotavapor R-114, Buchi, Švicarska (Slika 3.7.). Tikvica se spaja na dio koji je spojen s povratnim hladilom, tikvicom za nakupljanje kondenzata i vakuum sisaljkom. Tikvica je uronjena u vodenu kupelj koja se električnim grijačem termostatira na željenu temperaturu.



Slika 3.7. Rotacijski uparivač

3.2.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)

HPLC-DAD koji je korišten za analizu uzoraka AGILENT 1100 prikazan je na Slici 3.8. Proizvođač kolone je Phenomenex, SAD, C18 100 Å, serijskog broja 00F-4601-E0. Dimenzije kolone su 150 x 4,6 mm, a promjer punila je 5 μm .



Slika 3.8. HPLC-DAD uređaj

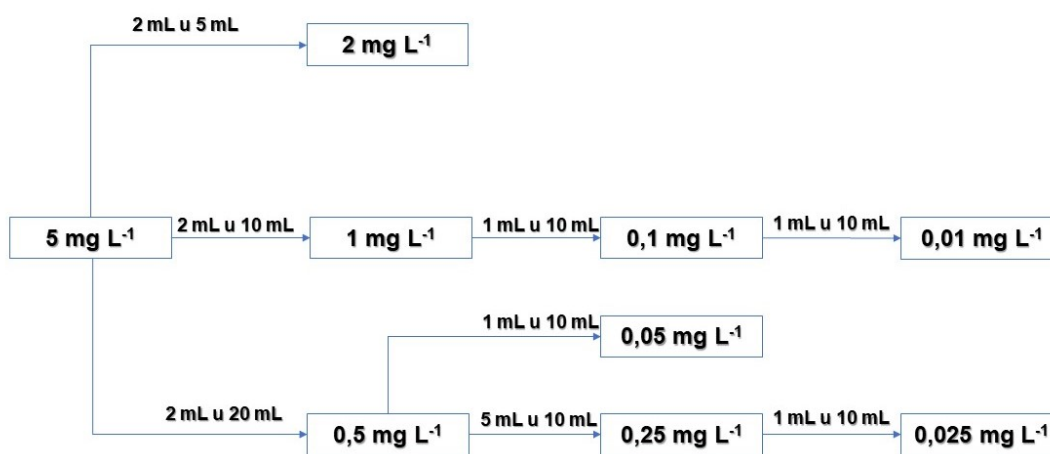
3.3. OPIS RADA

3.3.1. Priprema temeljnih standardnih otopina farmaceutika

Otapanjem odvaga od 5 mg svakog farmaceutika i otapanjem u 5 mL pogodnom otapalu ili smjesi otapala pripremljene su temeljne standardne otopine. Temeljne standardne otopine se čuvaju na niskim temperaturama u mraku kako ne bi došlo do termičke i svjetlosne razgradnje farmaceutika.

3.3.2. Priprema otopina standardnog dodatka

Standardne otopine su napravljene miješanjem 0,125 mL temeljnih standardnih otopina u tikvici od 25 mL te su dopunjene metanolom. Koncentracija farmaceutika u smjesi je 5 mg L^{-1} . Razrjeđenja su pripravljena prema shemi prikazanoj na Slici 3.9.



Slika 3.9. Shema pripreve razrjeđenja

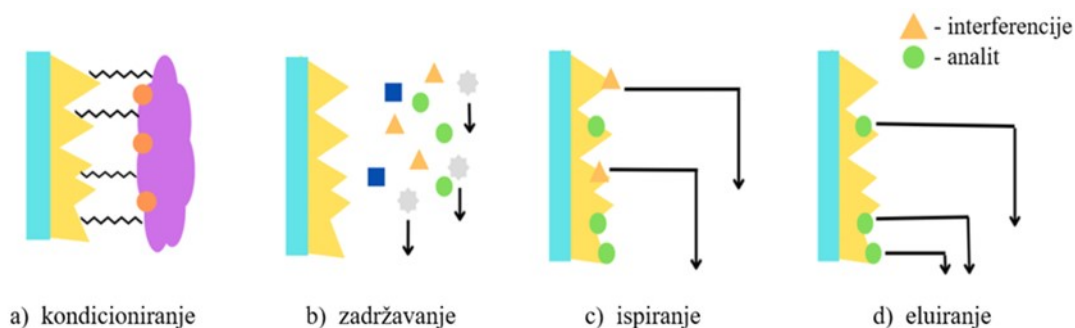
3.3.3. Priprema uzorka vode s dodatkom farmaceutika

Prije provođenja ekstrakcije čvrstom fazom namještena je pH vrijednost uzorka izvorske vode na optimalnu vrijednost. pH vrijednost čiste vode je bila u intervalu od 7,15 do 8,40 te je za optimiranje stupnja kiselosti korištena 0,1 M natrijeva lužina ili 0,1 M klorovodična kiselina.

3.3.4. Ekstrakcija čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom bazira se na nekoliko osnovnih koraka (Slika 3.10.):

1. kondicioniranje kolone: sorbens u koloni se ispiri s oko 2 mL metanola pri čemu se ne ispušta cijeli volumen metanola kroz kolonu, već dio metanola mora ostati kako se sorbens ne bi osušio
2. zadržavanje analita: u 100 mL vode, podešene pH vrijednosti dodaje se 1 mL radne standardne otopine smjese dvanaest farmaceutika. U otopinu se uranja cjevčica spojena na SPE instrument. Svaki eksperiment provodio se istovremeno tri puta, a četvrta proba služila je kao slijepi uzorak – uzorak vode bez dodatka farmaceutika. Vakuum u sustavu se postiže slavinom te služi kao pokretačka sila za prijenos otopine u kolonu. Protok kroz kolonu se regulira ventilom i iznosio je oko 4 mL/min.
3. eluiranje: nakon što je sva smjesa prošla kroz kolonu, postavljaju se kivete te se analiti ispiru iz sorbensa određenim otapalom pet puta u obrocima po 2 mL.
4. uparavanje: sadržaj kiveta prebacuje se u tikvicu s okruglim dnom i upari do suha na rotacijskom uparivaču u vodenoj kupelji temperature 40 °C.
5. otapanje: suhi ostatak u tikvicama se otapa u 1 mL metanola te se prebacuje u vijale.



Slika 3.10. Koraci ekstrakcije čvrstom fazom [34]

3.3.4.1. Optimizacija metode

Na prethodno navedeni način provedeni su setovi eksperimenata s ciljem određivanja parametara za dobivanje najboljeg iskorištenja tijekom procesa ekstrakcije.

1. utjecaj pH
 - ispitane pH vrijednosti: 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9
 - odabrana pH vrijednost izvorske vode: 8
2. odabir otapala za eluiranje
 - eksperimenti su izvedeni s izvorskom vodom podešenom na pH 8
 - ispitana otapala: metanol, etanol, izopropanol, etil-acetat, acetonitril, aceton
 - odabrano otapalo: metanol
3. odabir volumena otapala za eluiranje
 - eksperimenti su izvedeni s izvorskom vodom podešenom na pH 8, a za eluiranje je korišten metanol
 - ispitani volumeni otapala za eluiranje: 1x 2 mL, 2x 2 mL, 3x 2 mL, 4x 2 mL, 5x 2 mL, 6x 2 mL
 - odabrani volumen otapala za eluiranje; 2x 2 mL
4. odabir volumena uzorka vode
 - eksperimenti su izvedeni s izvorskom vodom pH vrijednosti 8, a analiti su eluirani s 2x 2 mL metanola
 - ispitani volumeni uzorka vode: 50 mL, 100 mL, 250 mL, 500 mL
 - odabrani volumen otapala uzorka vode: 100 mL

3.4. VALIDACIJA

Validacija metode provedena je korištenjem kolone Oasis HLB 60 mg/3 mL kroz koju je propuštan 100 mL izvorske vode na pH 8 s dodatkom 1 mL standardne otopine. Analiti su eluirani korištenjem metanola u dva obroka po 2 mL. Određene su sljedeće izvedbene značajke:

- granica detekcije (GD), granica kvantifikacije (GK) i područje linearnosti ispitivanjem pri koncentracijama standardnih otopina: 0,01 mg L⁻¹, 0,025 mg L⁻¹, 0,05 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,25 mg L⁻¹, 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹, 5 mg L⁻¹

- ponovljivost i obnovljivost u 9 ponavljanja s dodatkom standardne otopine koncentracija 1 mg L^{-1} i 2 mg L^{-1} uz slijepu probu u vremenskom intervalu od 2 dana
- utjecaj matice propuštanjem profiltrirane izvorske vode kroz SPE instrument te dodavanjem standardnih otopina koncentracija $0,5 \text{ mg L}^{-1}$, 1 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} i 5 mg L^{-1} u ekstrakt nakon eluiranja

3.5. PRIMJENA METODE NA OTPADNIM VODAMA

Metoda razvijena i optimirana svim prethodno opisanim postupcima je primijenjena za analizu bolničkih otpadnih voda korištenjem optimiranih i validiranih uvjeta. U uzorcima otpadnih voda mogu se pronaći neki od farmaceutika ispitivanih u ovom istraživanju te mnoštvo drugih farmaceutika. Također nužno je uzeti u obzir i postojanje brojnih interferencija.

Kako bi se smanjio utjecaj matice uzorka te kako bi se što točnije odredila koncentracija farmaceutika u uzorcima realne otpadne vode, korištena je metoda standardnog dodatka. Ekstrakcijski postupak je proveden 3 puta za koncentracije $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ i 1 mg L^{-1} te 3 puta za otpadnu vodu bez dodatka standardne otopine kao početnu točku metode standardnog dodatka.

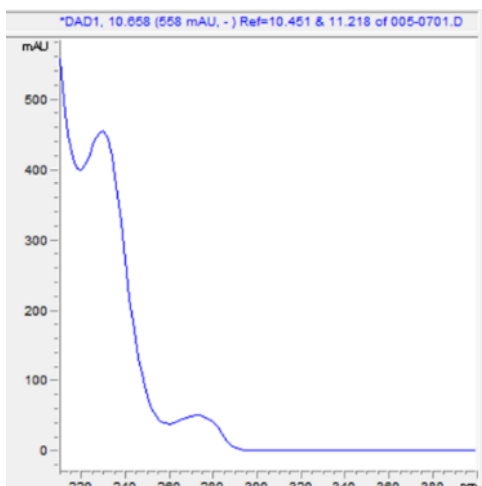
3.6. ANALIZA UZORAKA HPLC-DAD METODOM

Nakon provedene ekstrakcije čvrstom fazom ekstrakti i standardne otopine su snimani na HPLC-DAD uređaju. Vodena faza (A) se sastoji od 0,1 % mravlje kiseline u ultračistoj vodi, a organska faza (B) je 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu. Korištena je gradijentna metoda protoka pokretne faze koji je iznosio $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, a injektirani volumen je $25 \text{ }\mu\text{L}$. U Tablici 3.3. prikazano je kako su mijenjani omjeri pokretnih faza A i B u ovisnosti o vremenu u gradijentnoj metodi.

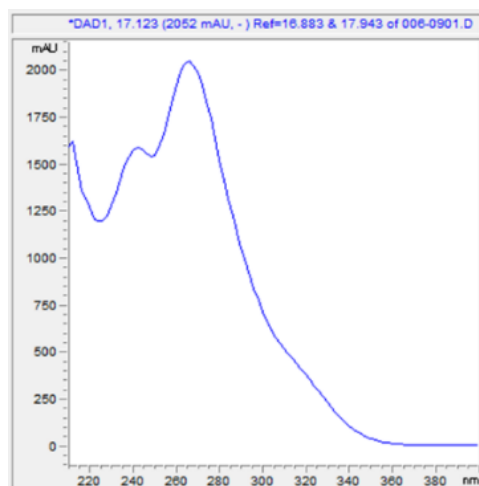
Tablica 3.3. Promjena omjera udjela pokretnih faza u ovisnosti o vremenu

t, min	A, %	B, %
0	98	2
2	98	2
22	60	40
25	50	50
27	50	50
32	10	90
35	2	98
36	2	98
36,01	98	2
40	98	2

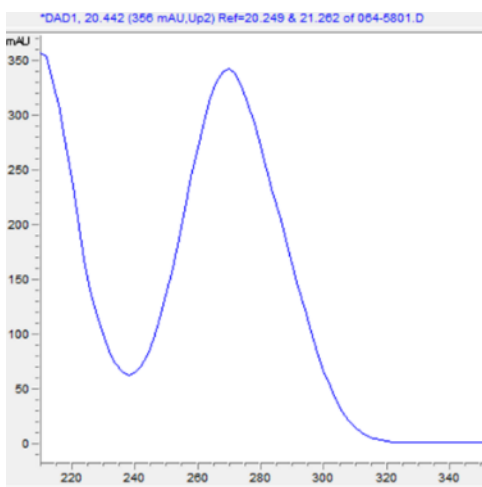
Analizirane komponente su nakon analize opisanom metodom kvalitetno određene prema vremenu zadržavanja te apsorpcijskim spektrima (Slika 3.11. – 3.22.). Spektri su snimani paralelno na pet različitih valnih duljina (230 nm, 240 nm, 255 nm, 275 nm i 290 nm). Maksimumi valnih duljina za pojedini farmaceutik su navedeni u tablicama fizikalno-kemijskih svojstava farmaceutika (Tablica 2.1.-2.12.).



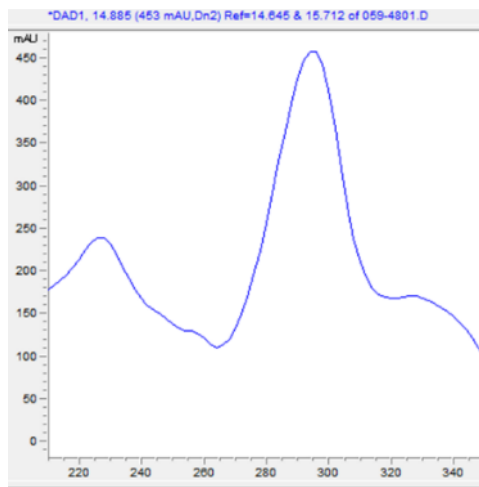
Slika 3.11. Apsorpcijski spektar amoksicilina



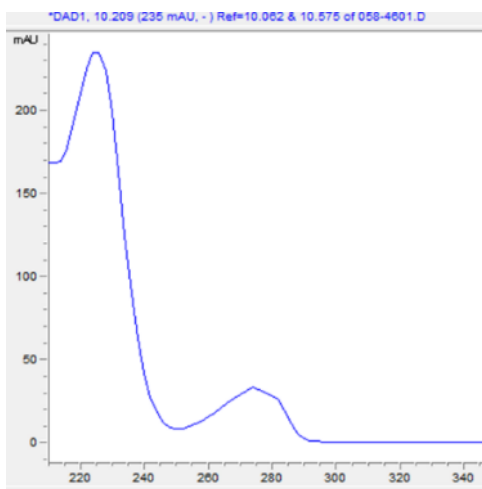
Slika 3.12. Apsorpcijski spektar sulfometazina



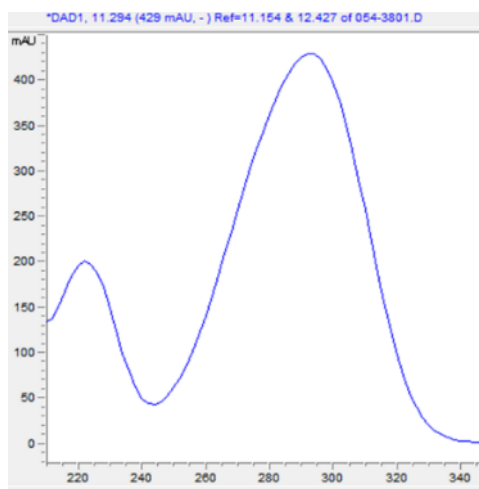
Slika 3.13. Apsorpcijski spektar sulfometoksazola



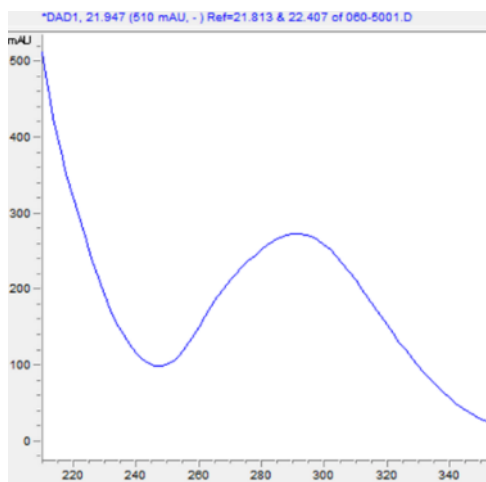
Slika 3.14. Apsorpcijski spektar ofloksacina



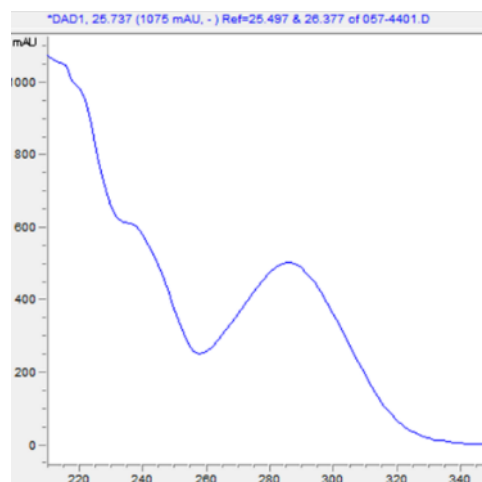
Slika 3.15. Apsorpcijski spektar atenolola



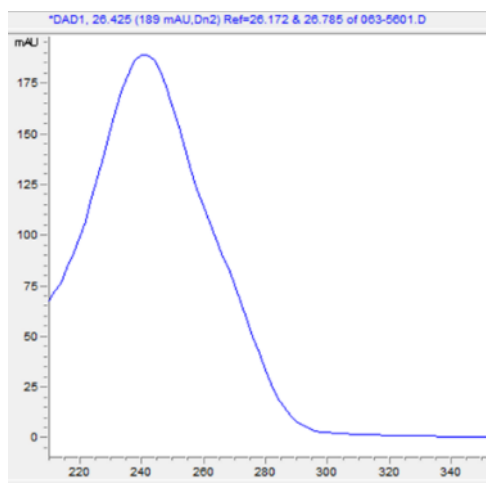
Slika 3.16. Apsorpcijski spektar prokaina



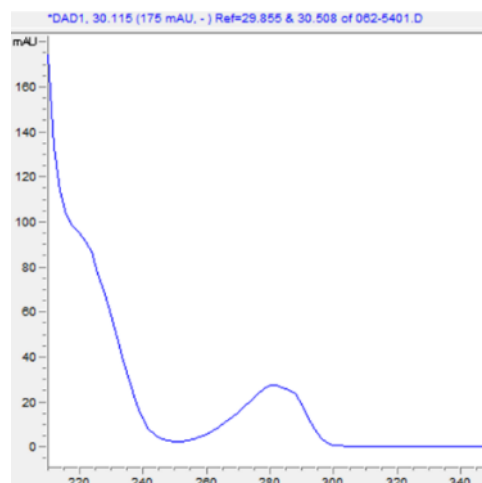
Slika 3.17. Apsorpcijski spektar torasemida



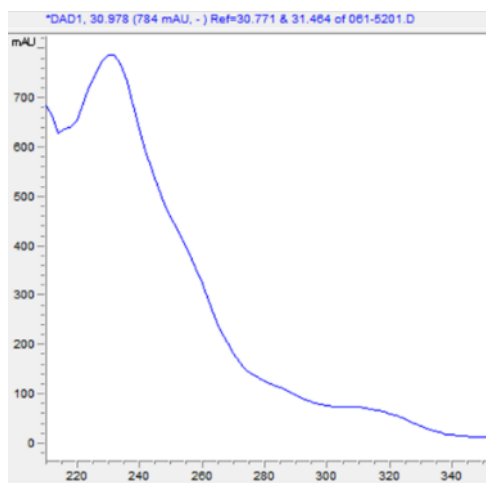
Slika 3.18. Apsorpcijski spektar karbamazepina



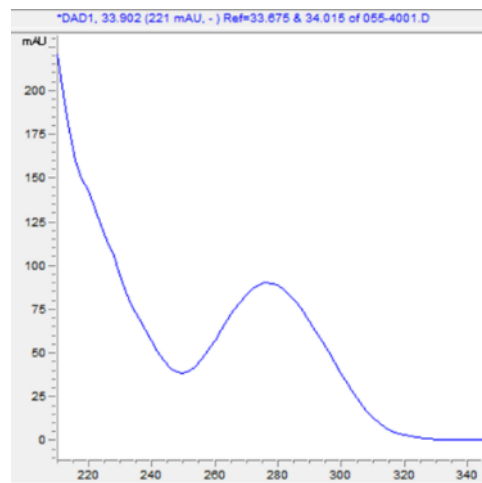
Slika 3.19. Apsorpcijski spektar deksametazona



Slika 3.20. Apsorpcijski spektar β -estradiola



Slika 3.21. Apsorpcijski spektar diazepamama



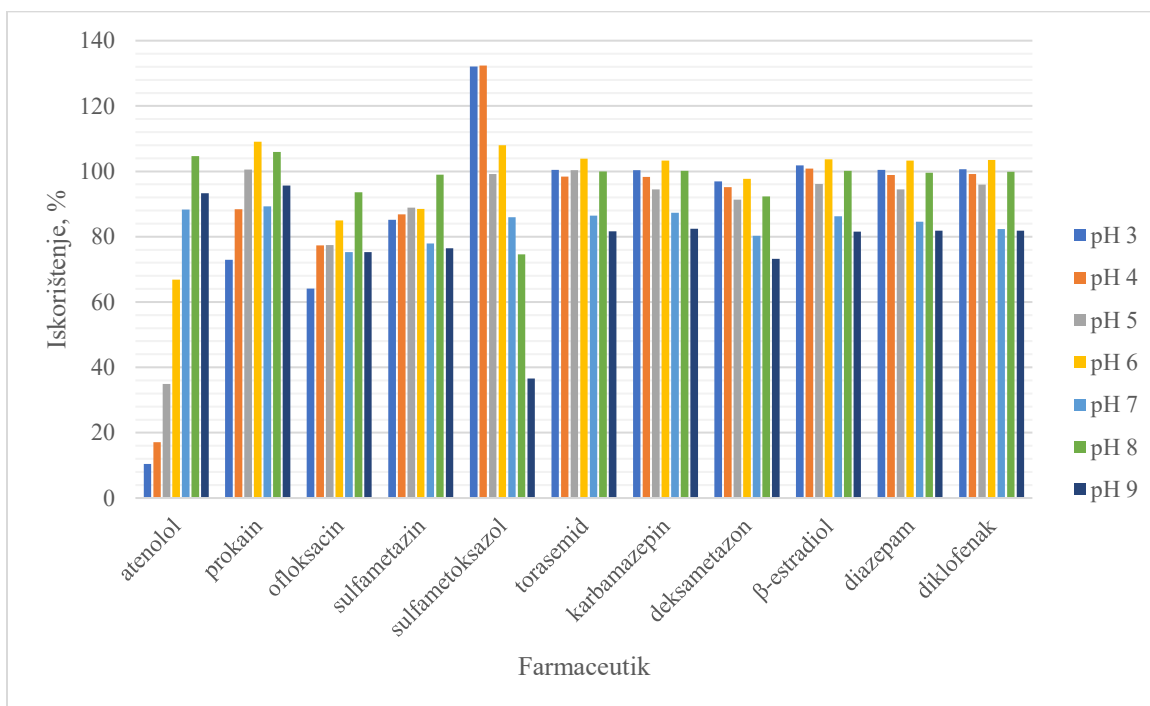
Slika 3.22. Apsorpcijski spektar diklofenaka

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIZACIJA METODE

4.1.1. Određivanje optimalnog pH vode

Stabilnost farmaceutika u stanicama živih bića i okolišu ovisi o tome nalaze li se u protoniranom ili deprotoniranom obliku te uvelike ovisi o pH vrijednosti [45], stoga je ispitan utjecaj pH vrijednosti vode na učinkovitost ekstrakcije smjese dvanaest farmaceutika različitih fizikalno-kemijskih karakteristika. Dobiveni rezultati prikazani su grafički (Slika 4.1.) i tablično (Tablica 4.1).



Slika 4.1. Utjecaj pH vrijednosti vode na iskorištenje ekstrakcije

Tablica 4.1. Iskorištenje ekstrakcije farmaceutika iz vode pri različitim pH vrijednostima vode

pH	Iskorištenje, % (n=3)						
	3	4	5	6	7	8	9
atenolol	10,42±7,21	17,09±6,87	34,93±5,38	66,84±7,49	88,34±2,91	104,67±2,96	93,26±4,28
prokain	72,96±6,41	88,40±3,03	100,56±8,44	109,05±3,95	89,26±3,14	105,93±4,16	95,65±5,28
ofloksacin	64,13±8,66	77,30±5,81	77,46±5,99	84,99±4,02	75,26±7,85	93,58±5,72	75,30±8,22
sulfametazin	85,15±0,69	86,83±3,04	88,94±5,51	88,54±6,92	77,92±3,99	98,98±4,85	76,44±0,16
sulfametoksazol	132,13±1,48	132,41±9,48	99,14±6,60	107,99±6,35	85,97±0,70	74,63±5,29	36,63±9,55
torasemid	100,41±0,61	98,36±2,53	100,40±1,29	103,93±3,26	86,49±5,03	99,98±3,87	81,65±7,06
karbamazepin	100,40±0,87	98,26±2,77	94,49±7,38	103,28±3,38	87,36±4,67	100,20±3,63	82,43±6,68
deksametazon	96,95±0,97	95,21±2,88	91,37±6,95	97,69±3,35	80,30±4,67	92,28±5,19	73,21±10,12
β-estradiol	101,87±1,12	100,85±3,20	96,16±7,96	103,68±3,80	86,22±5,21	100,16±2,65	81,53±5,01
diazepam	100,43±0,98	98,84±2,67	94,51±7,82	103,30±3,40	84,62±6,12	99,56±3,87	81,85±7,70
diklofenak	100,66±1,50	99,18±2,66	95,93±7,23	103,45±3,34	82,33±5,56	99,86±4,19	81,84±7,16

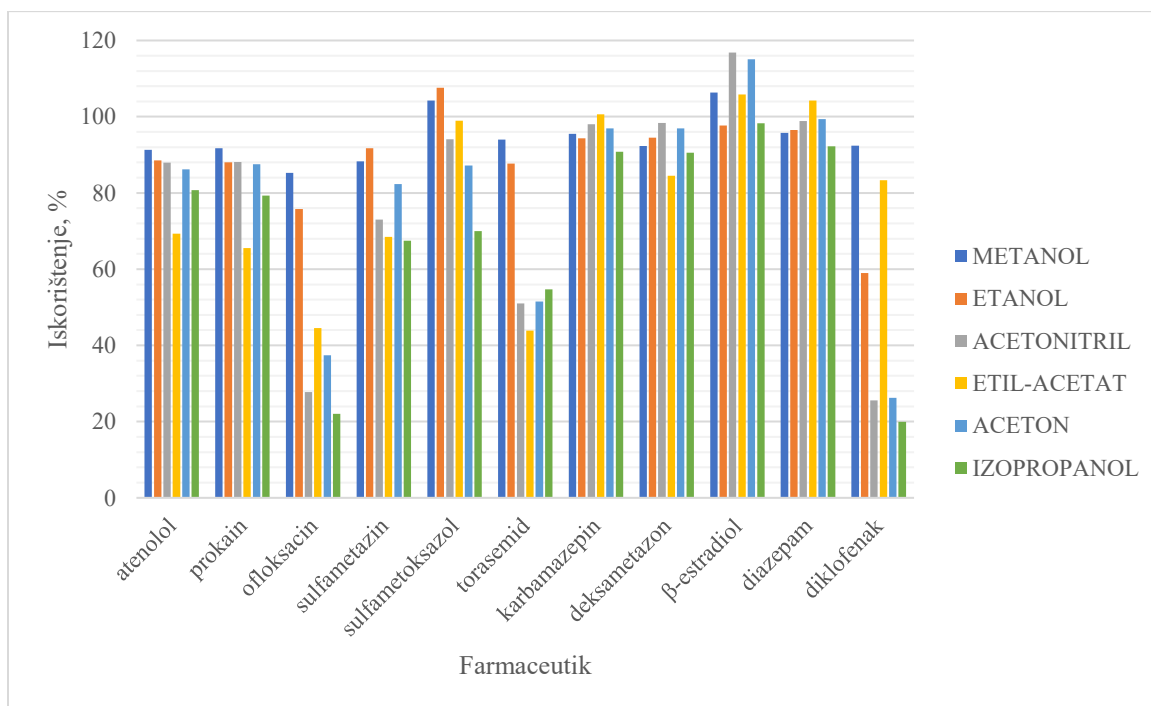
Na osnovu danog grafičkog i tabličnog prikaza rezultata pokazalo se da svaki od ispitivanih farmaceutika, izuzev sulfametoksazola, ima zadovoljavajuće iskorištenje (90 – 110 %) pri pH-vrijednosti vode koja iznosi 8. Atenolol, ofloksacin i sulfametazin pokazuju najveća iskorištenja u blago lužnatom području, a prokain u rasponu pH-vrijednosti od 5 do 9. Torasemid, karbamazepin, deksametazon, β-estradiol, diazepam i diklofenak pokazuju isti trend porasta, odnosno pada učinkovitosti; iskorištenja su zadovoljavajuća u kiselom području, nešto manja u neutralnom području, u blago lužnatom području pri pH = 8 pokazuju zadovoljavajuće vrijednosti te ponovno opadaju povećanjem lužnatosti pri pH = 9. Sulfametoksazol pokazuje najveće vrijednosti učinkovitosti isključivo u kiselom području (pH = 5-6).

Iskorištenja ostvarena na atenololu, prokainu, ofloksacinu i sulfametoksazolu pri pH vrijednostima unutar izraženo kiselog područja (pH = 3-5) ne zadovoljavaju kriterij točnosti. Nadalje, promatranjem iskorištenja u neutralnom i lužnatom području jasno je kako su manje zadovoljavajući rezultati dobiveni pri pH-vrijednostima od 7 i 9; u neutralnom području jedino prokain pokazuje približno zadovoljavajuće iskorištenje, a pri pH = 9 atenolol i prokain. Na osnovu navedenoga, i zadovoljavajućih RSD vrijednosti ($\leq 10\%$) za provedbu daljnjih eksperimenata korištena je voda s narinutom pH-vrijednošću 8.

4.1.2 Određivanje optimalnog otapala za eluiranje

Idući korak pri optimiranju metode bio je odabir otapala za eluiranje. Načelno se otapala biraju prema kriteriju najvišeg indeksa polarnosti. On se određuje posebno za svaki sorbens i definiran je eluotropskom serijom otapala. Omogućuje smanjivanje utroška potrebnog otapala i povećava učinak koncentracije sorbensa. Na izbor otapala utječu interakcije između polarnih funkcionalnih skupina i sorbensa koje mijenjaju topljivost analita. [46]

Pri prethodno izabranoj pH vrijednosti uzorka vode (pH 8), ispitivan je učinak metanola, etanola, izopropanola, acetona, etil-etera i acetonitrila na iskorištenje ekstrakcije. Dobivena iskorištenja su prikazana grafički (Slika 4.2.) i tablično (Tablica 4.2.).



Slika 4.2. Utjecaj uporabe različitih otapala za eluiranje na iskorištenje ekstrakcije

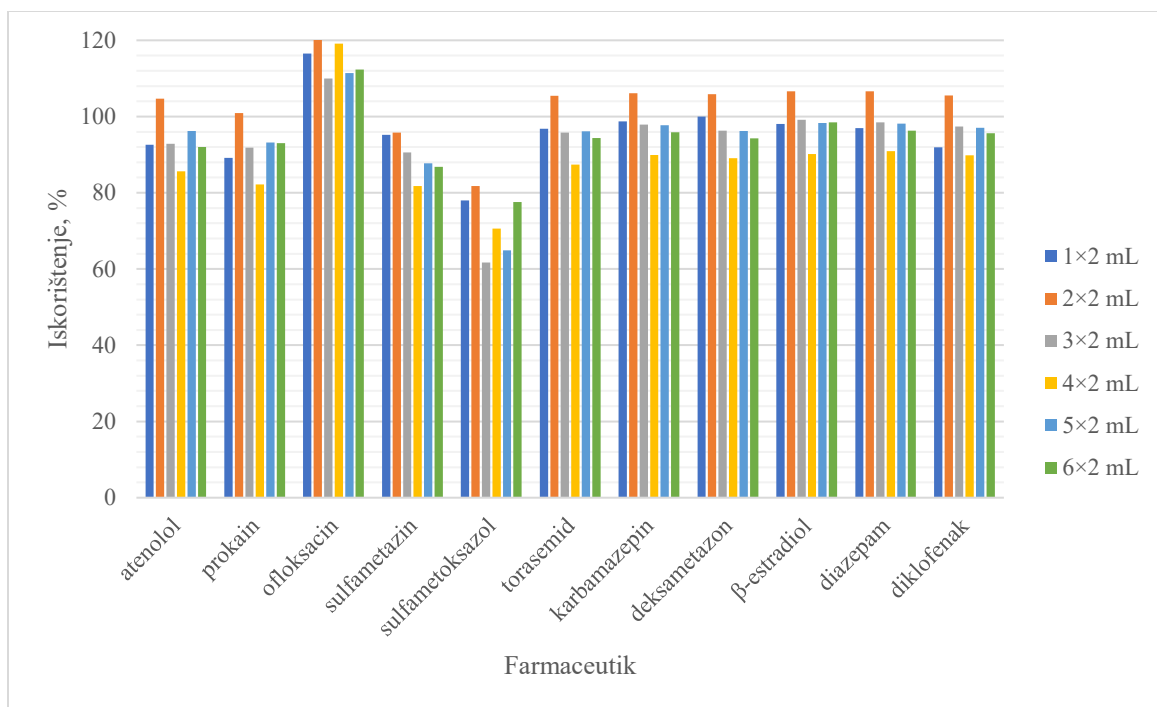
Tablica 4.2. Iskorištenje ekstrakcije pri uporabi različitih otapala za eluiranje

OTAPALO	Iskorištenje, % (n=3)					
	METANOL	ETANOL	ACETONITRIL	ETIL-ACETAT	ACETON	IZOPROPANOL
atenolol	91,29±4,60	88,52±1,53	87,94±0,75	69,32±6,41	86,21±2,47	80,71±4,80
prokain	91,69±1,55	88,04±2,90	88,15±1,75	65,55±36,01	87,52±1,29	79,27±6,62
ofloksacin	85,28±12,26	75,80±2,25	27,74±13,70	44,58±24,90	37,40±5,33	22,07±6,80
sulfametazin	88,26±2,85	91,69±5,25	73,03±2,10	68,47±28,33	82,33±0,56	67,44±3,31
sulfametoksazol	104,22±5,74	107,59±6,81	94,08±2,86	98,95±8,32	87,18±4,28	70,00±3,76
torasemid	94,03±2,84	87,73±1,80	51,04±0,27	43,86±23,66	51,48±5,24	54,71±5,98
karbamazepin	95,53±2,81	94,37±2,34	97,99±0,94	100,62±2,72	96,91±1,33	90,84±3,51
deksametazon	92,34±1,95	94,49±2,20	98,36±1,18	84,54±15,27	96,97±1,40	90,57±3,46
β-estradiol	106,33±7,02	97,71±2,85	116,86±8,23	105,82±10,17	115,11±1,97	98,26±6,77
diazepam	95,74±2,41	96,51±2,14	98,86±0,74	104,27±3,88	99,40±2,58	92,27±3,42
diklofenak	92,38±1,53	58,96±2,50	25,53±4,53	83,32±14,21	26,20±10,19	19,95±9,77

Metanol se pokazao kao najbolje otapalo za eluiranje smjese jer su iskorištenja za sve komponente osim ofloksacina i sulfametazina u intervalu od 90 do 110 %. Ofloksacin i sulfametazin su pokazali lošiju iskoristivost pri ekstrakciji uz sva korištena otapala. Etil-acetat je polučio najlošije rezultate što potvrđuju relativno niski stupnjevi iskorištenja za gotovo sve farmaceutike osim karbamazepina, β-estradiola i diazepama uz velike vrijednosti RSD (za prokain čak 30 %)

4.1.3. Određivanje optimalnog volumena otapala za eluiranje

Nakon izabrane optimalne pH vrijednosti uzorka vode i optimalnog otapala za eluiranje, pristupilo se izboru optimalnog volumena izabranog otapala za eluiranje. U tu svrhu ispitan je utjecaj korištenja različitih volumena otapala za eluiranje s ciljem određivanja što manjeg mogućeg volumena kako bi se povećala ekonomska isplativost ekstrakcije čvrstom fazom. Dodatno je značajno smanjiti investicijske troškove zbog potrebe regeneracije otapala iz ekoloških razloga. Ispitana su iskorištenja ekstrakcije dodavanjem od 1 do 6 obroka od po 2 mL odabranog otapala. Iskorištenja su prikazana grafički (Slika 4.3.) te tablično (Tablica 4.3.).



Slika 4.3. Utjecaj uporabe različitih volumena otapala za eluiranje na iskorištenje ekstrakcije

Tablica 4.3. Iskorištenja ekstrakcije pri različitim volumenima odabranog otapala za eluiranje

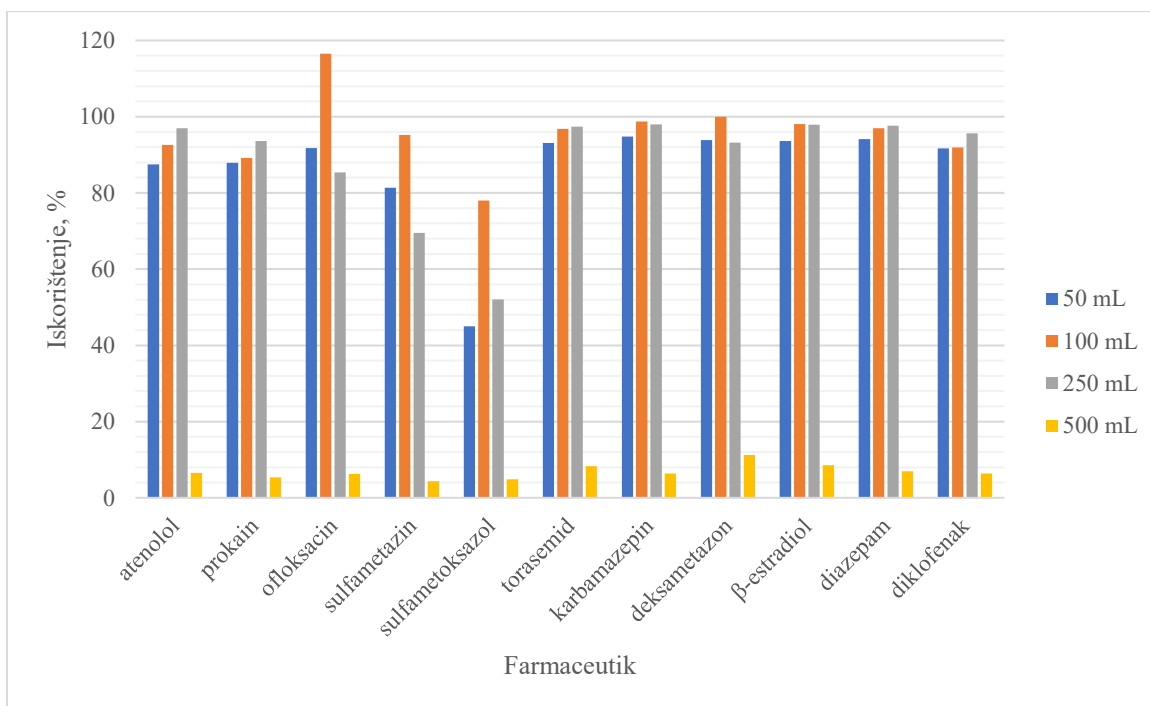
V	Iskorištenje, % (n=3)					
	1×2 mL	2×2 mL	3×2 mL	4×2 mL	5×2 mL	6×2 mL
atenolol	92,57±2,37	104,68±4,34	92,82±5,95	85,60±3,11	96,18±2,93	91,98±2,08
prokain	89,12±0,20	100,88±3,62	91,84±6,84	82,21±2,35	93,19±4,33	93,06±5,34
ofloksacin	116,53±7,24	125,11±6,07	109,97±6,50	119,14±4,97	111,44±4,38	112,32±5,92
sulfametazin	95,23±3,47	95,79±10,59	90,58±5,93	81,80±2,37	87,73±2,98	86,84±3,32
sulfametoksazol	78,01±4,92	81,78±8,72	61,71±6,05	70,62±2,63	64,86±14,80	77,60±2,94
torasemid	96,76±0,92	105,41±2,50	95,76±5,59	87,38±3,03	96,11±2,65	94,33±2,97
karbamazepin	98,75±1,60	106,16±1,10	97,86±5,41	89,92±3,37	97,73±2,71	95,90±2,24
deksametazon	99,96±1,00	105,87±2,63	96,31±5,68	89,04±2,82	96,25±2,79	94,30±4,00
β-estradiol	98,09±0,83	106,66±3,38	99,11±5,10	90,15±4,05	98,28±2,83	98,49±6,14
diazepam	96,99±1,48	106,66±3,09	98,48±4,90	90,90±3,42	98,15±2,57	96,27±2,75
diklofenak	91,89±1,73	105,53±2,63	97,39±5,44	89,82±3,24	97,06±2,49	95,61±3,42

Korištenjem 2 obroka po 2 mL metanola osigurano je iskorištenje u intervalu vrijednosti od 95 % do 107 % uz ofloksacin i sulfametoksazol kao izuzetke te je za daljnje korake pri optimiranju

ekstrakcijske metode korišteno po 2x 2 mL metanola za ispiranje farmaceutika nakon ekstrakcije. Dobiveni rezultat je iznimno povoljan zbog male potrošnje organskog otapala te manjih troškova zbrinjavanja otpada. Pri odabranom volumenu ofloksacin pokazuje iskorištenje od 125 % što može upućivati na utjecaj matice. Sulfametoksazol ostvaruje iskorištenje od 81 % jer za njegovu učinkovitu ekstrakciju su potrebni drugi uvjeti zbog različitih svojstava u odnosu na ostale farmaceutike u smjesi.

4.1.4. Određivanje optimalnog volumena uzorka vode

Pri dosadašnjim setovima eksperimenata korišteno je 100 mL izvorske vode u koje je dodano 1 mL standardne otopine smjese farmaceutika, a u ovom koraku optimiranja je ispitano koliko utjecaj razrjeđenja dodatka standardne otopine doprinosi stupnju iskorištenja procesa. Ekstrakcija je provedena korištenjem 50 mL, 100 mL, 250 mL i 500 mL izvorske vode uz sve prethodno određene optimalne uvjete (pH 8, 2x 2 mL metanola). Rezultati ispitivanja su vidljivi grafički (Slika 4.4.) i tablično (Tablica 4.4.).



Slika 4.4. Utjecaj uporabe različitih volumena vode na iskorištenje ekstrakcije

Tablica 4.4. Iskorištenja ekstrakcije pri korištenju različitih volumena vode

V	Iskorištenje, % (n=3)			
	50 mL	100 mL	250 mL	500 mL
atenolol	87,44±4,10	92,57±2,37	97,01±3,62	6,53±55,36
prokain	87,94±3,89	89,12±0,20	93,60±0,29	5,41±62,71
ofloksacin	91,73±3,21	116,53±7,24	85,35±1,07	6,33±48,59
sulfametazin	81,39±6,77	95,23±3,47	69,53±6,60	4,37±65,40
sulfametoksazol	44,96±0,09	78,01±4,92	52,03±2,29	4,83±64,28
torasemid	93,09±4,07	96,76±0,92	97,39±3,99	8,32±58,97
karbamazepin	94,78±3,61	98,75±1,60	97,94±1,98	6,39±58,71
deksametazon	93,83±3,00	99,96±1,00	93,20±0,83	11,21±21,27
β-estradiol	93,62±0,52	98,09±0,83	97,92±3,24	8,55±32,88
diazepam	94,13±4,16	96,99±1,48	97,61±3,51	6,95±53,99
diklofenak	91,70±4,29	91,89±1,73	95,63±3,93	6,36±60,64

Zadovoljavajuća iskorištenja postignuta su korištenjem 100 mL i 250 mL izvorske vode. Odabrani volumen je 100 mL u svrhu smanjivanja potrošnje izvorske vode i samim time vremena trajanja ekstrakcije. Najmanja iskorištenja su ostvarena pri uporabi 500 mL vode. Višestruka začepljenja cjevčica za SPE instrument i dugotrajnost ekstrakcije dodatni su nedostaci korištenja većeg volumena vode što je potvrđeno velikim vrijednostima RSD na temelju ponavljanja u tri eksperimenta.

4.2. VALIDACIJA METODE

Opisanim serijama eksperimenata određeni su optimalni uvjeti za ekstrakciju smjese dvanaest farmaceutika. Za ekstrakciju čvrstom fazom korištena je kolona Oasis HLB kroz koju je propuštan 100 mL izvorske vode pH vrijednosti 8 uz dodatak 1 mL standardne otopine smjese farmaceutika. Nakon ekstrakcije farmaceutici su eluirani dvama obrocima od po 2 mL metanola.

Međurazrjeđenjima pripremljenim prema shematskom prikazu (Slika 3.8.) ispitane su iduće značajke: linearnost, granice detekcije i kvantifikacije, ponovljivost i obnovljivost. Navedeni parametri su prikazani u Tablici 4.5.

Linearno područje metode za svaki farmaceutik je određeno uporabom deset standardnih otopina u koncentracijskom intervalu od 0,01 mg L⁻¹ do 5 mg L⁻¹. Razrjeđivanjem na 100 mL izvorske vode u ekstrakciji pri optimalnim uvjetima postignute su koncentracije od 0,0001 mg L⁻¹ do 0,05 mg L⁻¹. Izračivanjem baždarnih dijagrama za svaki farmaceutik određena je funkcijska ovisnost odziva površine ispod krivulje kromatograma o masenoj koncentraciji analita te je procijenjeno linearno područje.

Tablica 4.5. Parametri validacije metode određivanja farmaceutika u vodi

Farmaceutik	Linearno područje, mg L ⁻¹	Funkcija ovisnosti	R ²	GD, mg L ⁻¹	GK, mg L ⁻¹
atenolol	0,001 - 0,05	A = 7687,3γ + 4,5206	0,9984	0,0005	0,001
prokain	0,00025 - 0,05	A = 15410γ + 36,285	0,9874	0,00025	0,00025
ofloksacin	0,0005 - 0,05	A = 15132γ + 13,411	0,9990	0,00025	0,0005
sulfametazin	0,0005 - 0,05	A = 21105γ + 20,919	0,9923	0,00025	0,0005
sulfametoksazol	0,001 - 0,05	A = 9649,6γ + 6,5344	0,9953	0,0005	0,001
torasemid	0,00025 - 0,05	A = 20785γ + 94,483	0,9820	0,00025	0,00025
karbamazepin	0,00025 - 0,05	A = 53607γ + 113,93	0,9884	0,00025	0,00025
deksametazon	0,0005 - 0,05	A = 29446γ + 73,647	0,9894	0,00025	0,0005
β-estradiol	0,0005 - 0,05	A = 11781γ + 67,234	0,9774	0,00025	0,0005
diazepam	0,00025 - 0,05	A = 81930γ + 281,06	0,9868	0,0001	0,00025
diklofenak	0,00025 - 0,05	A = 25869γ + 57,508	0,9889	0,0001	0,00025

Korelacijski koeficijent (R²) za svaki farmaceutik iznosi približno 1 što je potvrda linearnosti u određenom rasponu koncentracija. Najmanji R² iznosio je 0,9774 za β-estradiol.

U Tablici 4.6. su prikazana iskorištenja ekstrakcije za svaki farmaceutik iz smjese na tri različite koncentracije unutar linearnog dinamičkog područja. Za potvrdu točno određenog linearnog područja iskorištenja ne bi smjela previše oscilirati od prosječne vrijednosti što potvrđuje glavnina farmaceutika. Značajnija odstupanja od prosječnih iskorištenja pokazuju ofloksacin, sulfametazin i torasemid pri nižim koncentracijama te β-estradiol pri srednjoj odabranoj koncentraciji.

Tablica 4.6. Iskorištenja farmaceutika na tri različite koncentracije unutar linearnog područja

Farmaceutik	Koncentracija, mg L ⁻¹	Iskorištenje ± RSO, % (n=3)
atenolol	0,005	93,46±12,85
	0,01	107,05±9,49
	0,02	99,00±3,86
prokain	0,005	93,01±0,81
	0,01	109,04±6,49
	0,02	103,11±1,97
ofloksacin	0,01	110,71±17,53
	0,02	108,10±5,65
	0,05	88,40±5,85
sulfametazin	0,005	96,20±13,27
	0,02	97,74±3,38
	0,05	73,53±3,97
sulfametoksazol	0,005	80,94±10,26
	0,01	75,86±12,32
	0,02	73,81±14,64
torasemid	0,0025	119,29±1,75
	0,005	105,07±5,72
	0,02	100,08±2,47
karbamazepin	0,005	91,57±1,34
	0,01	107,45±3,30
	0,02	99,06±2,44
deksametazon	0,005	91,24±1,21
	0,01	93,16±19,17
	0,02	98,74±2,11
β-estradiol	0,005	87,23±3,85
	0,01	121,67±7,34
	0,02	99,09±3,66
diazepam	0,005	111,00±4,47
	0,01	109,68±20,25
	0,02	100,18±3,80
diklofenak	0,005	106,02±16,95
	0,01	104,18±4,06
	0,02	95,73±1,67

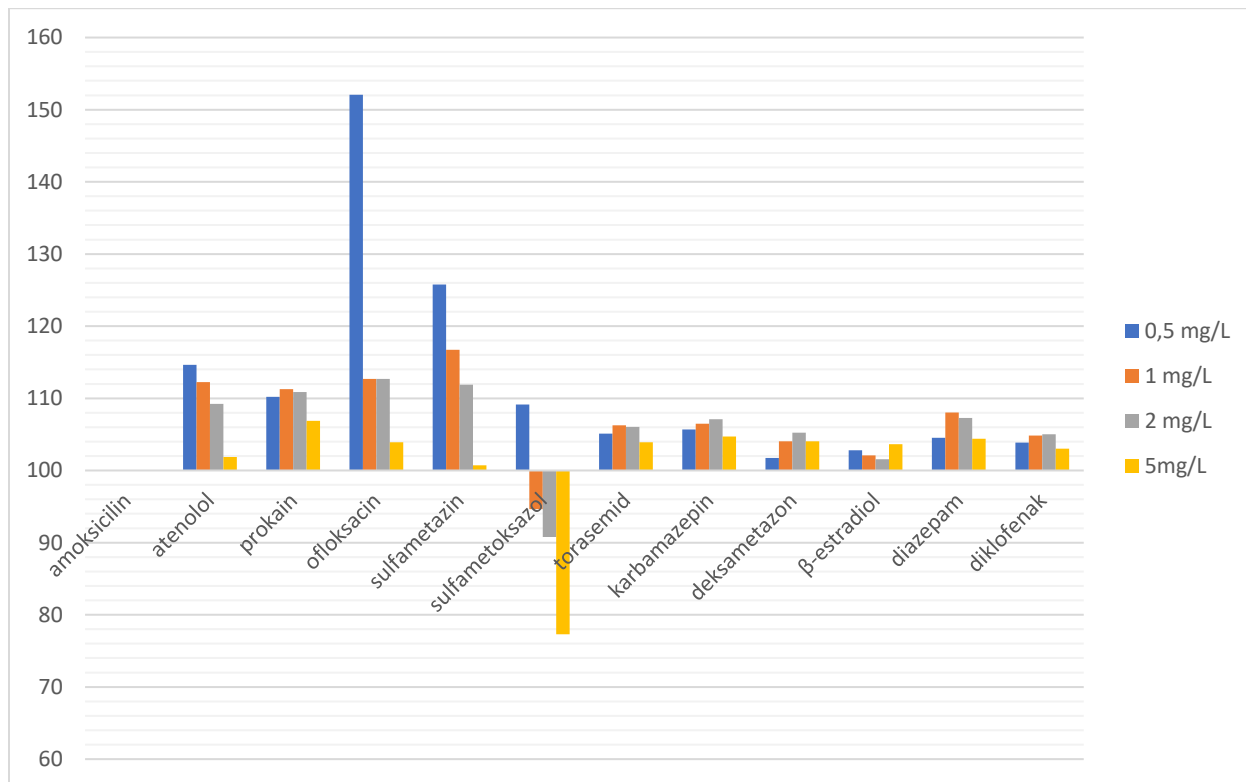
Preciznost razvijene metode je izražena relativnim standardnim odstupanjem (RSO) preko ponovljivosti i obnovljivosti. Ponovljivost je određena s devet ponavljanja eksperimenata u istome danu, a obnovljivost se procijenila na temelju osamnaest ponovljenih mjerenja provedenim kroz dva različita dana. Ponovljivost i obnovljivost su ispitivane pri koncentracijama 1 mg L⁻¹ i 2 mg L⁻¹. Izračunate vrijednosti relativnog standardnog odstupanja su prikazane u Tablici 4.7. Manje vrijednosti odstupanja su dobivene pri koncentraciji od 2 mg L⁻¹ gdje je najveće odstupanje pri ponovljivosti 7,49%, a pri obnovljivosti 13,63%. Najveće relativno standardno odstupanje određeno pri koncentraciji 1 mg L⁻¹ za ponovljivost iznosi 9,39%, a za obnovljivost 14,29%.

Tablica 4.7. Preciznost iskazana kao ponovljivost i obnovljivost

Farmaceutik	Ponovljivost, RSO, %		Obnovljivost, RSO, %	
	1 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹	1 mg L ⁻¹	2 mg L ⁻¹
atenolol	6,16	6,40	14,29	8,37
prokain	3,84	6,69	13,28	6,75
ofloksacin	7,00	7,49	10,50	7,32
sulfametazin	4,65	5,68	7,04	11,60
sulfametoksazol	9,39	7,32	11,61	13,63
torasemid	3,65	5,66	10,65	10,48
karbamazepin	3,70	6,15	13,96	10,43
deksametazon	3,74	5,47	4,94	7,16
β-estradiol	3,96	6,41	7,77	9,07
diazepam	3,85	5,77	10,19	10,54
diklofenak	3,96	5,80	10,07	6,72

4.3. UTJECAJ MATICE

Utjecaj matice može uzrokovati poteškoće pri detektiranju analita što negativno utječe na točnost i preciznost metode. Može doći do prikazivanja većeg ili manjeg signala odziva u odnosu na stvarnu vrijednost. Ispitan je signal analita prisutan u izvorskoj vodi uspoređivanjem sa signalom odziva analita iz standardnih otopina pri koncentracijama 0,5 mg L⁻¹, 1 mg L⁻¹, 2 mg L⁻¹ i 5 mg L⁻¹. Dobiveni rezultati su računski obrađeni i prikazani na Slici 4.5.



Slika 4.5. Grafički prikaz utjecaja matice

Vidljivo je kako utjecaj matice opada s porastom koncentracije standardne otopine za većinu farmaceutika, najjasnije na primjeru atenolola, ofloksacina i sulfametazina. Za torasemid, karbamazepin, deksametazon, β-estradiol, diazepam i diklofenak može se zaključiti da je doprinos matice zanemariv budući da su njihova iskorištenja u intervalu 100 ± 10 %. Najveći utjecaj matice se pokazuje kod ofloksacina i sulfametazina pri najmanjoj koncentraciji pri čemu je došlo do povećanja signala. Sulfametoksazol jedini pokazuje smanjenje signala uslijed utjecaja matice na koncentracijama od 1 mg L^{-1} , 2 mg L^{-1} , što je također unutar intervala 100 ± 10 %, te najveću supresiju pri 5 mg L^{-1} ($>20\%$).

4.4. PRIMJENA METODE NA OTPADNIM VODAMA

Optimirana i validirana metoda primijenjena je na dva uzorka bolničkih otpadnih voda. Prvi uzorak (OV1) je otpadna voda prije procesa pročišćavanja (točka uzorkovanja 1), a drugi uzorak (OV2) predstavlja otpadnu vodu nakon pročišćavanja (točka uzorkovanja 4 prema shematskom prikazu WWTP-a prikazanog na slici 3.2). Provedene su tri serije eksperimenata metodom standardnog dodatka. Prva serija su čiste otpadne vode bez dodatka standardne otopine, a u drugoj i trećoj seriji dodavane su standardne otopine koncentracija 0,5 mg L⁻¹ i 1 mg L⁻¹. Određene koncentracije su uspoređene s granicama detekcije i granicama kvantifikacije koje su prethodno utvrđene u procesu validiranja SPE-HPLC-DAD metode. Rezultati su prikazani u Tablici 4.8.

Tablica 4.8. Koncentracije određivanih farmaceutika u otpadnim vodama

Koncentracija farmaceutika u uzorku, mg L ⁻¹				
Farmaceutik	GD, mg L ⁻¹	GK, mg L ⁻¹	OV1	OV2
atenolol	0,0005	0,001	<GK	<GK
prokain	0,00025	0,00025	0,00041	<GD
ofloksacin	0,00025	0,0005	0,00495	0,00161
sulfametazin	0,00025	0,0005	0,00027	<GK
sulfametoksazol	0,0005	0,001	<GD	<GK
torasemid	0,00025	0,00025	<GD	0,00046
karbamazepin	0,00025	0,00025	0,00512	0,00211
deksametazon	0,00025	0,0005	n.d.	<GK
β-estradiol	0,00025	0,0005	<GD	n.d.
diazepam	0,0001	0,00025	0,00034	0,00035
diklofenak	0,0001	0,00025	n.d.	0,00127

Prvi uzorak otpadne vode je bogatiji farmaceuticima koji su obrađivani u ovom radu shodno činjenici da je riječ o bolničkoj otpadnoj vodi prije obrade za ispust u javne prijamnike. Atenolol je detektiran u oba uzorka otpadnih voda, ali je dobivena vrijednost premala da bi se omogućila kvalitativna analiza atenolola. Sulfametazin u drugom uzorku otpadnih voda je detektiran, no koncentracija je manja od granice kvantifikacije dok je koncentracija prokaina određena u drugom uzorku otpadnih voda manja od granice detekcije. Sulfametoksazol u OV1 ima vrijednost manju od granice detekcije, a u OV2 manju od granice kvantifikacije. β-estradiol u OV2 nije uopće

detektiran dok je u OV1 imao vrijednost koncentracije manju od granice detekcije. Njegovo ponašanje može se predvidjeti uzevši u obzir da je OV2 prošla dodatne procese pročišćavanja. Deksametazon i diklofenak nisu detektirani u OV1, ali ih pronalazimo u OV2 za što je mogući uzrok miješanja bolničke otpadne vode s komunalnom otpadnom vodom (točka 2 na slici 3.2) čime je došlo do povećanja početne koncentracije ta dva farmaceutika na ulazu u postrojenje za obradu voda. To povećanje se može očekivati i u slučaju drugih farmaceutika budući da ljudi izvan bolnica u svom svakodnevnom životu također konzumiraju neke lijekove kao dio svakodnevne terapije te ti farmaceutici završavaju u komunalnim otpadnim vodama. Ipak, kod drugih ispitivanih farmaceutika tijekom ove analize se to ne uočava iz razloga što u uzorkovanom periodu ti lijekovi (deksametazon i diklofenak) možda nisu bili dio bolničkih otpadnih voda. Treba napomenuti da tijekom miješanja bolničke otpadne vode s komunalnom otpadnom vodom može doći i do razrijeđenja početne koncentracije nekog farmaceutika ukoliko se taj farmaceutik ne koristi izvan bolničkog sustava (bar ne u ispitivanom periodu) čime se njegova koncentracija zbog povećanja volumena smanjuje. U navedenom WWTP (Slika 3.2.) bolnička i komunalna otpadna voda miješaju se u omjeru 75% : 25%. Naravno, treba napomenuti da svaki od ispitivanih farmaceutika (kao i oni koji ovom studijom nisu obuhvaćeni) prolaze kroz različite procese razgradnje i interakcija s komponentama matice uzorka (kakva je otpadna voda) što u konačnici može dovesti do povećanja, ali i smanjenja njegovog signala kao posljedica utjecaja kompleksne matice otpadnih voda.

Glavnina farmaceutika se nalazi u tragovima u dvama uzorcima otpadnih voda. Značajnije koncentracije su određene za ofloksacin i karbamazepin koji su imali i znatno veće odzive u prvoj seriji eksperimenata bez dodatka standardne otopine. U prilog tome ide činjenica da je prema popisu najčešće preporučivanih farmaceutika za 2020. godinu u SAD-u karbamazepin na 185. mjestu s preko 2,8 miliona izdanih recepta, a ofloksacin je na istoj listi na 242. mjestu s nešto više od 1,8 miliona recepta. [47]

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu je razvijena metoda za simultano određivanje dvanaest farmaceutika od kojih se svaki odlikuje različitim fizikalnim i kemijskim karakteristikama zbog čega je cilj bio razviti optimalnu metodu za određivanje smjese amoksicilina, atenolola, prokaina, ofloksacina, sulfametazina, sulfametoksazola, torasemida, karbamazepina, deksametazona, β -estradiola, diazepam i diklofenaka. Razvijena metoda nije se pokazala učinkovitom za amoksicilin jer se DAD nije pokazao kao dovoljno dobar detektor.

Uzorci su pripremljeni ekstrakcijom čvrstom kolonom korištenjem Oasis HBL kolone volumena 60 mL. Određeni optimalni radni uvjeti za izolaciju analita su 100 mL izvorske vode podešene na pH vrijednost 8 uz metanol kao otapalo za eluiranje koji se koristi u dva obroka od po 2 mL.

Vrijednosti regresijskog koeficijenta (R^2) u intervalu od 0,9774 prema 0,9990 potvrđuju linearnost metode. Granice detekcije i granice kvantifikacije se nalaze između 0,0001 i 0,0005 mg L⁻¹. Preciznost metode je određena ispitivanjem ponovljivosti u tri serije po tri eksperimenta pri koncentracijama od 1 mg L⁻¹ i 2 mg L⁻¹ te obnovljivosti u dva različita dana pri istim koncentracijama. Pri koncentraciji od 2 mg L⁻¹ najveća vrijednost relativnog standardnog odstupanja (RSO) iznosila je 7,49% za ponovljivost te 13,63% za obnovljivost. Za koncentraciju 1 mg L⁻¹ najveće RSO za ponovljivost je 9,39%, a za obnovljivost 14,29%. Relativna standardna odstupanja za ponovljivost su manja od 10%, a za obnovljivost su manja od 15% čime je potvrđena uspješnost primjene metode za detekciju smjese farmaceutika. Učinkovitost ekstrakcije pri različitim koncentracijskim nivoima unutar linearnog područja za većinu farmaceutika iznosi 100±10 %. Izuzetak su torasemid i β -estradiol.

Osim spomenutih izvedbenih značajki validacije, ispitan je utjecaj matice. Načelno se može zaključiti da je utjecaj matice sve manji s porastom koncentracija standardne otopine. Kod sulfametazina i ofloksacina je vidno povećanje signala kao produkt utjecaja matice. Iskorištenja su većinom u intervalu 100±10 %. Pozitivnu devijaciju pokazuju atenolol, sulfametazin i ofloksacin pri 0,5 mg L⁻¹ dok sulfametoksazol ima značajnu negativnu devijaciju pri 5 mg L⁻¹ (ispod 80%).

HPLC-DAD analizom pripremljenih uzoraka određeni su farmaceutici u dva uzorka otpadnih voda prije i nakon procesa obrade. Najveća vrijednost je određena za karbamazepin u prvom uzorku otpadne vode te je iznosila 0,00512 mg L⁻¹. Neki farmaceutici nisu uopće detektirani u određenim

uzorcima otpadnih voda dok su određene koncentracije za neke farmaceutike bile manje od granica detekcije ili kvantifikacije određenih pri validaciji metode.

Sumarno se može zaključiti kako razvijena, optimirana i validirana metoda omogućuje brzu i za većinu farmaceutika učinkovitu detekciju i kvantifikaciju u uzorcima realnih voda. Amoksicilin i sulfametoksazol zahtijevaju dodatna istraživanja za pospješivanje učinkovitosti separacijske tehnike.

6. LITERATURA

- [1] Fernandes, J. P., Almeida, C. M. R., Salgado, M. A., Carvalho, M. F., Mucha, A. P., Pharmaceutical compounds in aquatic environments— occurrence, fate and bioremediation prospective, *Toxics*, **9** (2021) 257
- [2] Masood, A. S., Ali, Md. S., Manzar, M. S., Khan, N. A., Khan, A. H., Current situation of pharmaceutical wastewater around the globe , u *The Treatment of Pharmaceutical Wastewater*, Elsevier sci., 2023., str. 19–52.
- [3] Fakhre, N. H., Qader, A., Spectrophotometric determination of amoxiciline, **28** (2015) 3
- [4] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Amoxicillin> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [5] Li, K., Chen, M., Chen, L., Zhao, S., Xue, W., Han, Z., Han, Y., Synthesis of g-C₃N₄ Derived from Different Precursors for Photodegradation of Sulfamethazine under Visible Light, *Processes*, **11** (2023) 528
- [6] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethazine> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [7] Roedel, M. M., Nakada, S. Y., Penniston, K. L, Sulfamethoxazole-induced sulfamethoxazole urolithiasis: a case report , *BMC Urol.*, **21** (2021) 133
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Sulfamethoxazole> (pristup 19. lipnja 2023.)
- [9] Al-Ghamdi, A. F., A study of adsorptive stripping voltammetric behavior of ofloxacin antibiotic in the presence of Fe(III) and its determination in tablets and biological fluids , *J. Saudi Chem. Soc.*, **13** (2009) 235–241.
- [10] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Ofloxacin> (pristup 19. lipnja 2023.)
- [11] Kumar, A., Raorane, C. J., Rawar, D., Prajapati, P., Raj, R., Kumar, D., Kim, S., Raj, V., Kushwaha, S., Atenolol Ameliorates Skeletal Muscle Atrophy and Oxidative Stress Induced by Cast Immobilization in Rats, *Biomedicines*, **11** (2023) 1269
- [12] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Atenolol> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [13] Sturrock, J. E., Nunn, J. F., Cytotoxic effects of procaine, lignocaine and bupivacaine, *Br. J. Anaesth.*, **51** (1979) 273-281.
- [14] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Procaine> (pristup 18. lipnja 2023.)

- [15] Dhanraj Ramteke, H., Rajesh Menon, R., Torasemide for the treatment of heart failure, *Int J. Sc. Res.*, **10** (2021) 27–30.
- [16] Li, Y., Li, L., Guo, Z., Zhang, S., Comparative effectiveness of furosemide vs torasemide in symptomatic therapy in heart failure patients: A randomized controlled study protocol, *Medicine (Baltimore)*, **100** (2021) 24661
- [17] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Torseamide> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [18] Woźniakiewicz, A., Wietecha-Posłuszny, R., Determination of carbamazepine and its main metabolite in human hair by capillary electrophoresis and liquid chromatography techniques, both coupled with mass spectrometry , *J. Pharm. Anal.*, **1** (2023) 100009.
- [19] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/2554> (pristup 19. lipnja 2023.)
- [20] Yeganeh, M. ostali, Use of dexamethasone in acute rhabdomyolysis in LPIN1 deficiency, *Mol. Genet. Metab. Rep.*, **35** (2023) 100961.
- [21] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Dexamethasone> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [22] Lakshmi, N. J., Bhattacharjya, R., Tiwari, A., Impact of 17-β estradiol on growth and metabolism of marine diatom *Thalassiosira weissflogi* , *Environ. Adv.*, **9** (2022) 107-119.
- [23] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Estradiol> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [24] Lamaczová, A., Malina, T., Marsalkova, E., Odehnalova, K., Opatrilova, R., Přibilová, P., Zezulka, Š., Marsálek, B., Anxiety in Duckweed–Metabolism and Effect of Diazepam on *Lemna minor* , *Water J.*, **14** (2022) 1484
- [25] Alrahi, M., Al-Lami, M., Abdulsahib, E., Preparation and characterization of diazepam loaded nanomicelles for pediatric intravenous dose adjustment , *Int. J. Pharm. Res.*, **13** (2020) 2275-2286.
- [26] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diazepam> (pristup 18. lipnja 2023.)
- [27] Mkaddem, H., Rosales, E., Pazos, M., Ben Amor, H., Sanromán, M. A., Meijide, J., Anti-inflammatory drug diclofenac removal by a synthesized MgAl layered double hydroxide , *J. Mol. Liq.*, **359** (2022) 119207
- [28] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Diclofenac> (pristup 18. lipnja 2023.)

- [29] Li, X., Wang, B., Liu, F., Yu, G., Occurrence and Removal of Pharmaceutical Contaminants in Urine: A Review, *Water (Switzerland)*, **15** (2023) 1517
- [30] Kock, A., Glanville, H. C., Law, A. C., Stanton, T., Carter, L. J., Taylor, J. C., Emerging challenges of the impacts of pharmaceuticals on aquatic ecosystems: A diatom perspective, *Sci. Total Environ.*, **878** (2023) 162939
- [31] www.halmed.hr (pristup 18. lipnja 2023.)
- [32] De Koning, S., Janssen, H. G., Brinkman, U. A. T.; Modern methods of sample preparation for GC analysis , *Chromatographia*, **69** (2009) 18994839.
- [33] Sharma, S., Singh, N., Ankalgi, A. D., Rana, A., Ashawat, M. S. Modern Trends in Analytical Techniques for Method Development and Validation of Pharmaceuticals: A Review , *JDDT*, **11** (2021) 121–130.
- [34] grupa autora, *Analitika okoliša*, ur. M. Kaštelan-Macan M. Petrović, HINUS Fakultet kemijskog inženjerstva tehnologije, Zagreb, 2013., str. 75-86, 140-167, 206-215, 346-349.
- [35] Badawy, M. E. I., El-Nouby, M. A. M., Kimani, P. K., Lim, L. W., Rabea, E. I., A review of the modern principles and applications of solid-phase extraction techniques in chromatographic analysis , *Anal Sci.*, **38** (2022) 1457–1487.
- [36] Vranković, L., Delaš, I., Stojević, Z., Analiza metilnih estera masnih kiselina u materijalu biološkog porijekla metodom plinske kromatografije, *Hrvatski veterinarski vjesnik*, **26** (2018) 3-4
- [37] Teonata, N., Wijaya, V. A., Vitaloka, V. S., Attamimi, M. T., Kartikawati, M., An introduction to different types of gas chromatography, *Journal Sains dan Terapan Kimia*, **15** (2021) 8
- [38] grupa autora, A review on high performance liquid chromatography (HPLC), *IJRTI*, **5** (2016) 22-28.
- [39] Czaplicki, S., *Chromatography in Bioactivity Analysis of Compounds*, *Column Chromatography*, **4** (2012) 99-122.

- [40] Jaicharoensub, J., Sakpakdeejaroen, I., Panthong, S., Validation of HPLC method for quantitative determination of active compounds in Thai traditional herbal medicine to treat gastrointestinal disease, *Talanta*, **7** (2023) 100227
- [41] Gašljević, V., Validacija i mjerna nesigurnost, *Biochem. Med.*, **20** (2010) 57-63.
- [42] Gutierrez Pulpeiro, M., Advanced processes for the removal of organic micropollutants from wastewater by addition of powdered carbon to membrane bioreactor, Doktorska disertacija, University of Ferrara, Ferrara, Italija
- [43] https://www.mt.com/at/de/home/phased_out_products/Laboratory_Weighing/Analytical_Balances/XA_Analytical_Balance/XA_105_DU.tabs.documents.html (pristup 19. lipnja 2023.)
- [44] https://www.mt.com/us/en/home/phased_out_products/PhaseOut_Ana/S20_pH_meter.html (pristup 19. lipnja 2023.)
- [45] Hillman, T., Archives of Proteomics and Bioinformatics Commentary Antibiotics, Efflux, and pH , 2022.
- [46] van der Berg, C., Venter, G., van der Westhuizen, F. H., Erasmus, E., Development and validation of LC-ESI-MS/MS methods for quantification of 27 free and conjugated estrogen-related metabolites , *Anal. Biochem.*, **590** (2020) 113531
- [47] <https://clincalc.com/DrugStats/Top300Drugs.aspx> (pristup 19. srpnja 2023.)

7. ŽIVOTOPIS

Stjepan Jozinović rođen je 27. ožujka 2001. godine u Žepču u Bosni i Hercegovini. Godine 2016. završava Osnovnu školu „Fra Grga Martić“ u Ozimici te upisuje Opću gimnaziju u Katoličkom školskom centru „Don Bosco“ u Žepču. Preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu upisuje 2020. godine. Od stranih jezika aktivno se koristi engleskim u govoru i pisanju, španjolskim u govoru te osnovama njemačkog jezika.