

# Određivanje kemoterapeutika u sedimentu

---

**Mađor-Božinović, Ivana**

**Undergraduate thesis / Završni rad**

**2017**

*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:149:312133>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2025-04-02**



*Repository / Repozitorij:*

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Ivana Mađor-Božinović

**ZAVRŠNI RAD**

Zagreb, rujan 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Ivana Mađor-Božinović

**Određivanje kemoterapeutika u sedimentu**

**ZAVRŠNI RAD**

**Voditelj rada:** Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

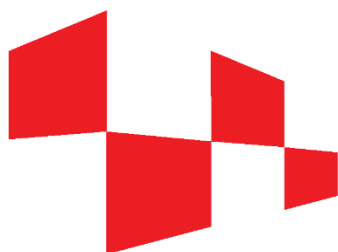
**Članovi ispitnog povjerenstva:** Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Dr. sc. Mirta Čizmić, asistent

Doc. dr. sc. Davor Dolar

Zagreb, rujan 2017.

Ovaj rad sufinancirala je Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-2353 i izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju, akademske godine 2016./2017. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



**HRZZ**

Hrvatska zaklada  
za znanost

*Zahvaljujem se mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na strpljenju,  
povjerenju, uloženom vremenu i prenesenom znanju.*

## **SAŽETAK RADA:**

### **Određivanje kemoterapeutika u sedimentu**

Kemoterapeutici su lijekovi prirodnog ili sintetskog podrijetla i koriste se za sprječavanje i liječenje bolesti kod ljudi i životinja. Zbog povećane potrošnje sve su više prisutni u okolišu, vodama, tlu i sedimentu u nekontroliranim količinama. O njima ne postoji dovoljno podataka da bi se dobio uvid u njihovo ponašanje i utjecaj na okoliš, stoga se smatraju "novim zagađivalima".

Farmaceutici ispitivani u ovom radu pripadaju različitim grupama farmaceutika prema djelovanju: antibiotici (cefдинир, nitrofurantoin), antiemetici (metoklopramid), antihelmintici ili antiparazitici (albendazol, febantel, prazikvantel) i kemoterapeutik (hidroksiklorokin).

Cilj rada je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije sedam farmaceutika metodom mućkanja iz sedimenta. Parametri koji su optimirani su vrsta otapala, utjecaj pH-vrijednosti, masa uzorka te vrijeme ekstrakcije. Ekstrakti su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD).

Najbolji rezultati postignuti su sa sustavima otapala metanol:heksan i aceton:metanol iz 0,7 grama uzorka sedimenta. Međutim, ova metoda se ne preporučuje za rutinsku analizu jer iskorištenja analiziranih farmaceutika ne prelaze 50 %.

#### **Ključne riječi:**

*kemoterapeutici, sediment, ekstrakcija mućkanjem, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD)*

## **ABSTRACT**

### **Determination of chemotherapeutic agents in sediment**

Chemotherapeutic agents are medicines of natural or synthetic origin and they are used for the prevention and treatment of diseases in humans and animals. Due to increased pharmaceutical consumption they are present in the environment, water, soil and sediment in uncontrollable quantities. There is no sufficient data to predict their behavior and the impact on the environment, therefore they are considered as "emerging contaminants".

Pharmaceuticals investigated in this study belong to the various groups of pharmaceuticals by their therapeutic effects: antibiotics (nitrofurantoin, cefdinir), antiemetics (metoclopramide), anthelmintics or antiparasitics (albendazole, febantel, praziquantel) and chemotherapeutic agent (hydroxychloroquine).

The aim of this study was to optimize the conditions for extraction of seven chemotherapeutic agents simultaneously by agitation from sediment. Parameters that were optimized are type of solvent, influence of the pH value, mass of the sample and time of the extraction. Extracts were analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD).

The best results were obtained with solvent systems methanol:hexane and acetone:methanol with 0,7 grams of the sediment sample. However, this method is not recommended for routine analysis because recoveries of the analyzed pharmaceuticals were not higher than 50 %.

#### **Key words:**

*chemotherapeutic agents, sediment, extraction by agitation, high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD)*

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. TEORIJSKI DIO .....</b>	<b>3</b>
<b>2.1. Farmaceutici .....</b>	<b>5</b>
2.1.1. Antibiotici .....	5
2.1.1.1. Cefdinir .....	5
2.1.1.2. Nitrofurantoin .....	5
2.1.2. Antiemetici .....	6
2.1.2.1. Metoklopramid .....	6
2.1.3. Antihelmintici .....	6
2.1.3.1. Albendazol .....	6
2.1.3.2. Febantel .....	6
2.1.3.3. Prazikvantel .....	7
2.1.4. Kemoterapeutici .....	7
2.1.4.1. Hidroksiklorokin .....	7
<b>2.2. Sediment .....</b>	<b>7</b>
<b>2.3. Metode pripreme čvrstog uzorka za kromatografsku analizu .....</b>	<b>8</b>
2.3.1. Klasične metode pripreme uzoraka .....	10
2.3.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće .....	10
2.3.1.2. Soxhlet ekstrakcija .....	10
2.3.1.3. Ultrazvučna ekstrakcija .....	11
2.3.2. Moderne metode pripreme uzoraka .....	12
<b>2.4. Kromatografska analiza .....</b>	<b>13</b>
2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	13
2.4.2. Detektor s nizom dioda .....	14
2.4.3. Pregled literature za istraživane farmaceutike .....	15
<b>3. EKSPERIMENTALNI DIO .....</b>	<b>22</b>
<b>3.1. Materijali .....</b>	<b>23</b>
3.1.1. Sediment [65] .....	23
3.1.2. Kemikalije .....	24
3.1.3. Farmaceutici .....	25
<b>3.2. Instrumenti, uređaji i pribor .....</b>	<b>26</b>
3.2.1. Analitička vaga .....	26
3.2.2. pH-metar .....	26
3.2.3. Mućkalica .....	27
3.2.4. Filtriranje .....	27
3.2.5. Laboratorijski rotacijski uparivač .....	28
3.2.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC) .....	28
<b>3.3. Metode rada .....</b>	<b>29</b>
3.3.1. Priprava standardne otopine kemoterapeutika .....	29
3.3.2. Priprava špikanog sedimenta .....	29
3.3.3. Ekstrakcija mućkanjem .....	29
3.3.4. Uparavanje uzorka .....	29
3.3.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	30
<b>4. REZULTATI I RASPRAVA .....</b>	<b>31</b>
<b>4.1. Kromatografsko određivanje farmaceutika .....</b>	<b>32</b>
<b>4.2. Optimizacija metode .....</b>	<b>32</b>
4.2.1. Utjecaj otapala .....	33
4.2.2. Utjecaj vremena ekstrakcije .....	37
4.2.3. Utjecaj mase uzorka .....	38
4.2.4. Utjecaj pH vrijednosti .....	39
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>40</b>
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>42</b>
6.1. Popis slika .....	49
6.2. Popis tablica .....	50
6.3. Popis simbola i kratice .....	50
<b>7. ŽIVOTOPIS .....</b>	<b>51</b>



## **1. UVOD**

"Nova zagađivala" podrazumijevaju spojeve kojima je proizvodnja i potrošnja u konstantnom povećavanju. Jednu od najvažnijih skupina novih zagađivala predstavljaju upravo farmaceutici koji se upotrebljavaju u humanoj i veterinarskoj medicini te sredstva za osobnu higijenu i kućanstvo koji su postali neophodni u današnjem modernom društvu. Dospijevaju u okoliš u nepoznatim količinama bilo zbog proizvodnih procesa, neprikladnim zbrinjavanjem neupotrijebljenih farmaceutskih proizvoda, nepotpunom obradom otpadnih voda ili putem tjelesnih izlučevina. Predstavljaju potencijalnu opasnost za ekosustav, a za njih ne postoji zakonska regulativa o ispuštanju u okoliš.

Da bi se procijenio utjecaj farmaceutika na ljude i okoliš neophodna je pogodna analitička metoda koja će omogućiti istovremeno određivanje čitavog niza farmaceutika. Stoga je potrebno razvijati i validirati analitičke metode i odgovarajuće uređaje sa što nižom granicom detekcije i identifikacije.

Svaki analitički proces sastoji se od uzorkovanja, pripreme uzorka, separacije, detekcije i analize rezultata, a svaki od ovih koraka utječe na kvalitetu dobivenog rezultata. U većini slučajeva koriste se kromatografske metode, ali one zahtijevaju vještu pripravu uzoraka.

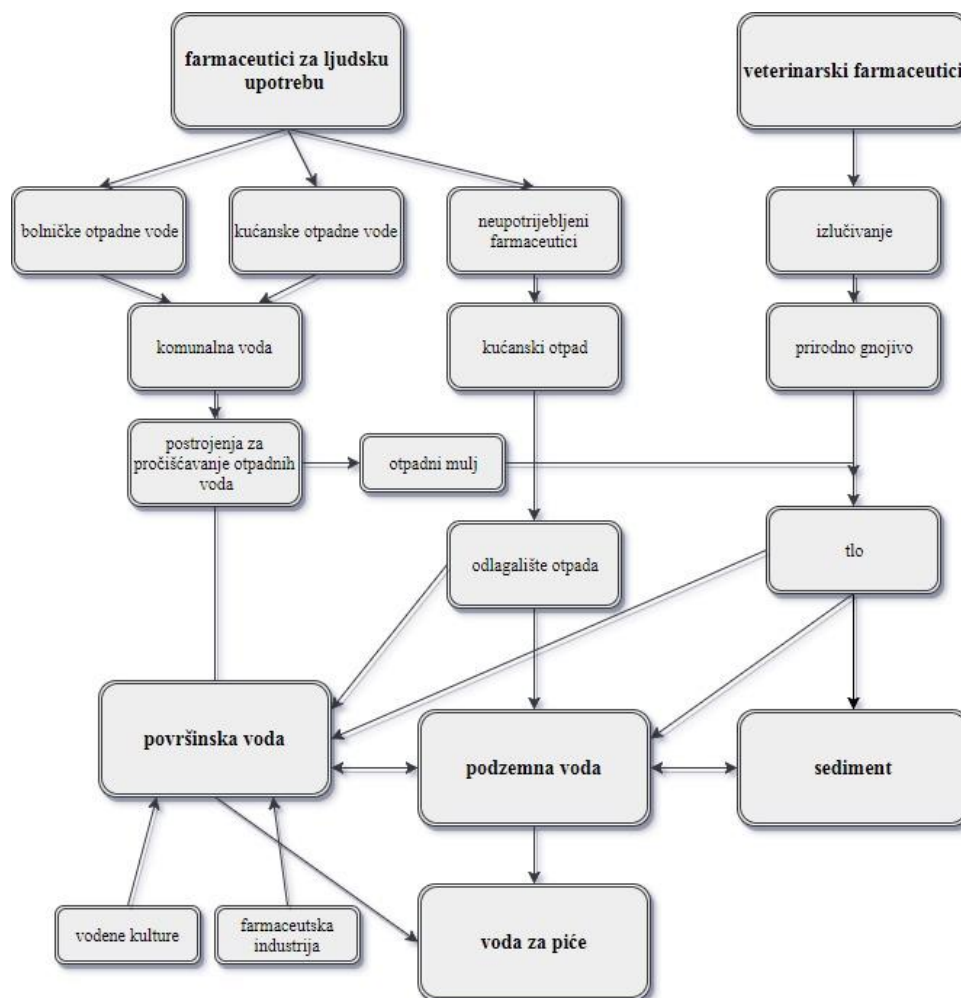
U ovom radu, za pripravu uzorka, korištena metoda ekstrakcije smjese sedam farmaceutika (cefdinir, nitrofurantoin, metoklopramid, albendazol, febantel, prazikvantel i hidroksiklorokin) iz sedimenta je ekstrakcija mućkanjem zbog jednostavnosti, brzine i niske cijene. Analiza je provedena pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) koja se pokazala kao vrlo učinkovita metoda kvalitativne i kvantitativne analize farmaceutika.

Cilj rada je pronaći optimalno ekstrakcijsko otapalo ili smjesu otapala i pritom postići maksimalno iskorištenje ekstrakcije farmaceutika.

## **2. TEORIJSKI DIO**

Kao rezultat ljudskog razvoja, onečišćenje okoliša uzrokovano upotrebom i ispuštanjem širokog spektra spojeva, doseglo je ozbiljne proporcije na globalnoj razini. Nekontrolirano ispuštanje farmaceutskih proizvoda za ljudsku ili veterinarsku medicinu u okoliš dovelo je do njihovog nakupljanja u sedimentu i tlu, što ih čini sekundarnim izvorima onečišćenja s potencijalno štetnim učinkom na ljudsko zdravlje i ekosustave. [1]

Na **Slici 1** shematski je prikazan tok farmaceutika, odnosno način na koji dopijevaju u okoliš i u konačnici u sediment. Zbog njihove povećane proizvodnje, nekontrolirane upotrebe, a nepoznatih posljedica za okoliš, postali su važan predmet znanstvenih istraživanja. [2] Velik broj objavljenih radova bio je prvenstveno usredotočen na njihovo pojavljivanje u vodama, hrani i biološkim uzorcima, a znatno manje na čvrste uzorke poput otpadnog mulja, tla, gnoja i pogotovo sedimenta. Razlog tome je složenost čvrstih uzoraka i utjecaj matrice koji može uzrokovati poteškoće u odvajanju i otkrivanju niskih razina farmaceutskih sredstava. Štoviše, čvrsti uzorci ne mogu se izravno analizirati, tako da je potrebno uložiti više napora na pripremu uzorka za analizu. [3]



**Slika 1.** Shematski prikaz toka farmaceutika u okolišu [4]

## **2.1. Farmaceutici**

Naziv *farmaceutici* obuhvaća sve terapijske lijekove namijenjene ljudima te veterinarske lijekove i dodatke prehrani. U Europskoj uniji u ljudskoj se medicini koristi oko 3000 različitih farmaceutski aktivnih spojeva. Potrošnja im je u konstantnom povećanju zbog povećanja broja stanovnika i duljine životnog vijeka, širenja tržišta, istjecanja patenata te novih dobnih skupina. Nakon upotrebe, velik dio farmaceutika ispušta se u otpadne vode nepromijenjen ili u obliku razgradnih produkata te na taj način dospijeva u površinske i podzemne vode. Iako su prisutni u niskim koncentracijama u okolišu, izazivaju zabrinutost zbog potencijalne dugoročne opasnosti za čovjeka i ekosustave. [5]

### **2.1.1. Antibiotici**

Antibiotici su lijekovi koji se primjenjuju za liječenje bakterijskih zaraznih bolesti. Oni su mikrobnim metaboliti niske molekulske mase koji pri niskim koncentracijama uništavaju bakterije ili sprječavaju njihovo razmnožavanje. Kao skupina, antibiotici uključuju tvari koje imaju molekulsku masu u rasponu od 150 do 500. Njihove molekule mogu se sastojati samo od ugljika i vodika ili češće od ugljika, vodika i dušika, a neke i od sumpora, fosfora ili halogenih elemenata. [6] Nažalost, sve veći broj bakterija razvija otpornost na danas raspoložive antibiotike. Ta se otpornost razvija djelomično zbog prekomjerne ili nepravilne uporabe. [7]

Antibiotici istraživani u radu su cefdinir i nitrofurantoin.

#### **2.1.1.1. Cefdinir**

Cefdinir je polusintetski cefalosporin i beta-laktamski antibiotik. [8] Koristi se za liječenje raznih bakterijskih infekcija kao što su bronhitis, upala pluća, infekcije kože, ušiju, grla i sinusa. Djeluje tako što uništava bakterije. [9] Najčešće nuspojave su proljev, glavobolja i mučnina. [10] Odobren je 1997. godine od strane američke Agencije za hranu i lijekove (FDA). [8]

#### **2.1.1.2. Nitrofurantoin**

Nitrofurantoin je polusintetski antibiotik koji je učinkovit protiv većine uzročnika infekcija mokraćnog sustava. [11] Djeluje tako što sprječava rast bakterija, ali točan mehanizam njegovog djelovanja je nepoznat. Uobičajene štetne reakcije su mučnina i povraćanje, a manje su vjerojatne kad se koristi u makrokristalnom obliku. [12]

### **2.1.2. Antiemetici**

Antiemetici su lijekovi koji se koriste protiv mučnine i povraćanja uzrokovanih bolešću kretanja, jutarnjim mučninama za vrijeme trudnoće, težim slučajevima gastroenteritisa i drugih infekcija. [13] Djeluju na centar za povraćanje u mozgu, na njegove živčane veze s periferijom i izravno na probavni trakt. Većina tih sredstava izaziva umor i pospanost te se ne smiju uzimati neposredno prije, ili za vrijeme vožnje. [14]

Antiemetik istraživan u ovom radu je metoklopramid.

#### **2.1.2.1. Metoklopramid**

Metoklopramid je prokinetički agens, odnosno dopamin D2 antagonist. [15] Koristi se za ublažavanje žgaravice i ubrzava zacjeljivanje čireva u jednjaku kod osoba koje imaju gastroezofagealnu refluksnu bolest (GERB), stanje u kojem povratni protok kiseline iz želuca uzrokuje žgaravicu i ozljede jednjaka. Metoklopramid se također koristi za ublažavanje simptoma uzrokovanih sporim pražnjenjem želuca kod osoba oboljelih od dijabetesa. [16]

### **2.1.3. Antihelmintici**

Antihelmintici su sredstva protiv glista i trakavica (helmita), crvolikih crijevnih nametnika u čovjeku i domaćim životinjama. Antihelmintici se koriste u kombinaciji sa sredstvima za čišćenje crijeva. Djeluju tako što omamljuju ili usmrćuju helminte. Ne postoji univerzalni anthelmintik koji bi djelovao na sve crijevne nametnike. [17]

Antihelmintici analizirani u radu su albendazol, febantel i prazikvantel.

#### **2.1.3.1. Albendazol**

Albendazol je antihelmintik širokoga spektra djelovanja iz grupe benzimidazola. Ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u sva tri njegova razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u samim parazitima te smanjeno stvaranje ATP-a. [18]

#### **2.1.3.2. Febantel**

Febantel spada u kemijsku skupinu probenzimidazola što znači da postaje aktivan tek kada se prevede u svoje aktivne metabolite (benzimidazole). Benzimidazoli su velika skupina lijekova koja se koristi u prevenciji bolesti domaćih životinja. Probenzimidazoli pokazuju nešto bolju topljivost u vodi od njihovih aktivnih metabolita. [19] Opasnost za ljude može predstavljati ako ljudi konzumiraju životinjske proizvode koji sadrže ostatke veterinarskih lijekova. [20]

### **2.1.3.3. Prazikvantel**

Ovaj antihelmintik koristi se za liječenje infekcija određenih parazita. Djeluje tako što ubija ili paralizira parazite, uzrokujući njihovo oslobađanje na stijenkama krvnih žila, tako da ih tijelo može prirodno ukloniti. [21] Nakon oralne primjene brzo se i skoro u cijelosti resorbira iz crijeva i metabolizira u jetri, te izlučuje mokraćom i u žuči. [22] Najčešće nuspojave prazikvantela su vrtoglavica, opći osjećaj slabosti, glavobolja i mučnina. [23]

### **2.1.4. Kemoterapeutici**

Naziv kemoterapeutik danas se najčešće upotrebljava kada se odnosi na liječenje malignih bolesti. To su lijekovi prirodnog ili sintetskog podrijetla, koji liječe zarazne bolesti, tako što oštećuju mikroorganizme u unutrašnjosti tijela, a pritom što manje djeluju otrovno na samog bolesnika. Taj način liječenja se zove kemoterapija. Mnoga sredstva djeluju samo u živom zaraženom organizmu, dok *in vitro* ne utječu na mikrobe, ili djeluju znatno slabije. [24] Jedan od njih upravo je hidrosiklorokin koji je analiziran u ovom radu.

#### **2.1.4.1. Hidrosiklorokin**

Hidrosiklorokin pripada skupini 4-amino-kinolin antimalarika. [25] Koristi se za liječenje ili prevenciju malarije, koja je česta u područjima kao što su Afrika, Južna Amerika i Južna Azija. Ovaj lijek ne djeluje protiv svih sojeva malarije. Hidrosiklorokin je također antireumatski lijek i koristi se za liječenje simptoma reumatoidnog artritisa i diskoidnog ili sistemskog eritemskog lupusa. Dugotrajno uzimanje hidrosiklorokina ili u visokim dozama može uzrokovati nepovratna oštećenja mrežnice oka. [26]

## **2.2. Sediment**

Sediment nastaje akumulacijom čvrstog materijala nastalog na površini ili pri samoj površini Zemlje određenim geološkim, fizikalnim, kemijskim i biološkim procesima. [27] Njegov postanak složen je i dugotrajan proces koji ima slijedeće faze:

- fizičko-kemijsko raspadanje ili trošenje starijih stijena (eruptivnih, sedimentnih i metamorfnih),
- transport čestica (gravitacijom, vodom, vjetrom, ledom),
- sedimentacija (taloženje),
- litifikacija ili okamenjivanje (diageneza). [28]

Prema načinu postanka i dominantnim procesima njegovog nastajanja izdvaja se pet osnovnih genetskih klasa sedimenata:

- klastični (terigeni) – šljunak i konglomerati, kršje i breče, pijesci i pješčenjaci, muljevi i muljnjaci, siltovi i siltiti, šejlovi, gline i glinjaci,
- biogeni, biokemijski i organski – vapnenci, rožnjaci, fosfati, ugljeni,
- kemijski – evaporiti, željezni sedimenti,
- vulkanoklastični – tufovi, vulkanski pepeo, ignimbriti,
- rezidualni – boksiti, lateriti. [27]

Klastični sedimenti sastoje se od fragmenata ili klasta drugih minerala i stijena te se zato i klasificiraju prema veličini zrna. [29] Razlikujemo krupno klastične (veće od 2 mm), srednje klastične (0,06-2 mm), sitnoklastične (< 0,06 mm). [28] Kemijski sedimenti ne nastaju zbog utjecaja atmosfere i erozije drugih stijena, nego se formiraju taloženjem minerala iz otopine (najčešće morska voda). Nastali talozi nazivaju se evaporiti (gips, halit, anhidrit). Biokemijski sedimenti se sastoje od materijala nastalih živim organizmima, mikroorganizmima te zato uključuju karbonatne minerale nastale djelovanjem organizama poput koralja, mekušaca, formanifera, koji prekrivaju morsko dno s naslagama kalcita koji kasnije može formirati vapnenac. [29]

### **2.3. Metode pripreme čvrstog uzorka za kromatografsku analizu**

Vrlo često uzorak je neprikladan za analizu. Razlog tome može biti složena priroda samog uzorka (različite interferencije), prevelika veličina uzorka za analizu, nepovoljan oblik i slično. Kako bi se prevladali navedeni problemi, potrebna je sofisticirana priprema uzorka. [30]

Analiza uzorka iz okoliša (voda, tlo, sediment, biološki materijal) obuhvaća ukupno pet narednih koraka:

- uzorkovanje,
- pripravu uzoraka,
- odjeljivanje analita,
- detekciju,
- procjenu mjernih podataka.

Svaki od tih koraka analitičkog procesa utječe na točnost i ponovljivost, s time da se poseban naglasak stavlja na pripravu uzorka. Ona mora biti usklađena s ciljem analize, uzimajući u



obzir instrumente kojima će se mjeriti i stupanj željene točnosti. Pritom se nastoji povećati selektivnost metode uklanjanjem interferencija iz matice uzorka, povećati koncentraciju analita da bi se dostigla granica kvantifikacije ili detekcije metode, prevesti analit u oblik najpogodniji za odjeljivanje i određivanje te osigurati otpornost i ponovljivost metode kako bi bila neovisna o promjeni matičnoga uzorka.

Moderne metode pripreve uzorka uglavnom se zasnivaju na ekstrakciji. Mogu se podijeliti na metode koje mogu zadržati analit te one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugog otapala. Također, dijele se i prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita: ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija čvrsto-tekuće ili ekstrakcija plinovito-tekuće. Izbor metode pripreve uzorka ovisi o njegovom agregacijskom stanju. Obzirom da je u ovom radu korišten sediment, riječ je o ekstrakciji iz čvrstog uzorka, a mogući načini pripreve prikazani su na **Slici 2**.

Ekstrakcija organskih sastojaka iz čvrstih uzoraka je proces u kojem se tvar desorbira iz matice uzorka i otapa u prikladnom otapalu. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o tri međuovisna čimbenika: topljivosti, prijenosu mase i matici uzorka. Matica uzorka ima značajan utjecaj na djelotvornost ekstrakcije analita. Topljivost analita ovisi o vrsti otapala te temperaturi i tlaku prilikom prijenosa analita iz uzorka u otapalo. Prijenosu analita pogoduju visoka temperatura i tlak, niska viskoznost otapala i mala veličina čestica. Izbor otapala ovisi o prirodi analita i matice uzorka. [31]



**Slika 2.** Načini pripreve čvrstog uzorka [31]

### 2.3.1. Klasične metode pripreme uzoraka

Klasične metode uključuju ekstrakciju čvrsto-tekuće, Soxhlet ekstrakciju i ultrazvučnu ekstrakciju (**Tablica 1.**). Postupak se provodi pri atmosferskom tlaku, uz grijanje ili djelovanje ultrazvuka pri čemu se troše velike količine organskih otapala, a ekstrakcija je dugotrajna. [32]

**Tablica 1.** Klasične metode pripreme čvrstih uzoraka i princip rada [33]

Metoda	Princip rada
ekstrakcija čvrsto-tekuće	Uzorak postavljen u zatvoreni spremnik, dodatak otapala koji otapa/ekstrahira/oslobađa željeni analit. Otopina odvojena od krutine filtracijom.
Soxhlet ekstrakcija	Uzorak postavljen u jednokratni porozni spremnik (cilindar). Svježe otapalo konstantno refluksira kroz cilindar i ispire analite koji se sakupljaju u tikvici.
homogenizacija (mućkanje)	Uzorak postavljen u miješalicu, dodano otapalo te je uzorak homogeniziran. Otapalo je uklonjeno za daljnji rad.
ultrazvučna ekstrakcija	Sitni usitnjeni uzorak je uronjen u ultrazvučnu kupelj s otapalom i izložen ultrazvučnom zračenju.

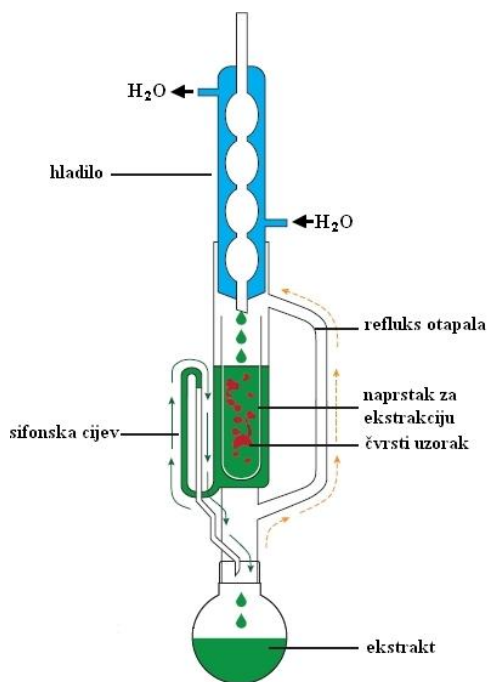
#### 2.3.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće

Ekstrakcija čvrsto-tekuće može se provoditi na razne načine (mućkanjem, ultrazvučnom i Soxhlet ekstrakcijom). Metoda mućkanja korištena je u ekstrakciji farmaceutika iz sedimenta u ovom radu. Uključuje dodatak otapala (na primjer organskog otapala za organske komponente i razrijeđenu kiselinu ili bazu za anorganske komponente) uzorku i zatim mućkanjem omogućava otapanje analita. Ova metoda je učinkovita ukoliko je analit dobro topljiv u korištenom otapalu i ukoliko je uzorak veoma porozan. Kako bi se postigao bolji kontakt čvrsto-tekuće, uzorci moraju biti fino usitnjeni. Zagrijavanje ili refluksiranje uzorka u vrućem otapalu može se koristiti da bi se ubrzao proces ekstrakcije. Jednom kad je analit uklonjen, netopiv sadržaj uklonjen je filtracijom ili centrifugiranjem. [33]

#### 2.3.1.2. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je najstariji oblik učinkovite ekstrakcije. Svježe, vruće otapalo konstantno je u kontaktu s uzorkom, kako bi se osigurala maksimalna topljivost analita. Pošto se ekstrahirani analit sakuplja u tikvici za vrenje, on mora biti stabilan pri temperaturi vrenja otapala korištenog za ekstrakciju. Razvoj metode stoga uključuje pronalazak prigodnog otapala. [34] Otapalo ili smjesa otapala koje se koriste za ekstrakciju moraju imati veliki afinitet prema analitu, mali afinitet prema uzorku, malu viskoznost i visoku hlapljivost tako da se lako uklanjaju iz ekstrahiranog uzorka.

Soxhlet ekstrakcija (**Slika 3.**) izvodi se tako da se pogodno otapalo upari, kondenzira i zatim propušta kroz usitnjeni i homogenizirani čvrsti uzorak koji se nalazi u naprstku za ekstrakciju. Otapalo se zatim vraća u tikvicu zajedno s ekstraktom.



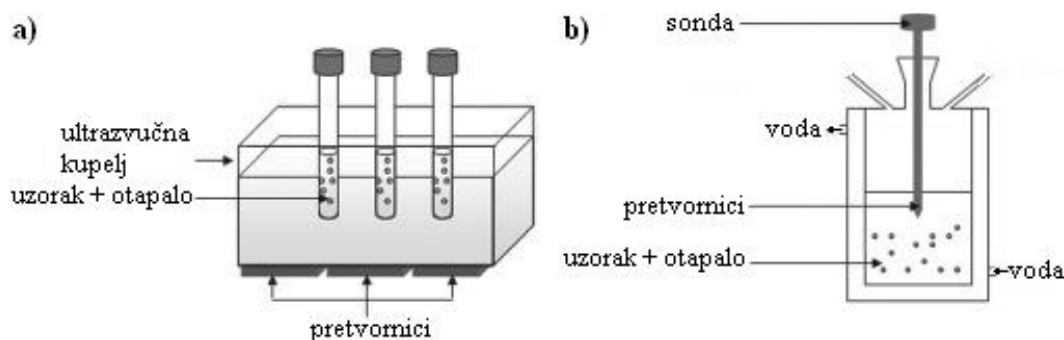
**Slika 3.** Aparatura za Soxhlet ekstrakciju [34]

Osnovni nedostaci Soxhlet ekstrakcije su dugo trajanje (10–24 h) i zagađenje okoliša zbog velike potrošnje organskih otapala (300 mL/uzorak). Zbog velikog volumena ekstrakta koji je jednak početnom volumenu otapala potrebno ga je koncentrirati najčešće uparavanjem. Problem velike količine otapala pokušao se riješiti uporabom automatizirane Soxhlet ekstrakcije. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija troši manje otapala, ali je taj volumen još uvijek velik (50–100 mL), a trajanje ekstrakcije dugo. Iskorištenje Soxhlet ekstrakcije je uglavnom između 50 i 100 % ovisno o ekstrahiranom spoju. Najčešće je korišteno za ekstrakciju različitih organskih spojeva, pesticida i polikloriranih bifenila iz uzoraka tla, sedimenata, biljnog i životinjskog tkiva te iz čvrstog otpada. [35]

### 2.3.1.3. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija, također poznata kao sonifikacija, koristi ultrazvučne valove kako bi osigurala kontakt između uzorka i otapala. Sonifikacija je relativno brza metoda, ali manje učinkovita u usporedbi s ostalim ekstrakcijskim tehnikama. [34] Pogodna je za grube, granularne uzorke. Moguća je izravna i neizravna metoda, a obje su prikazane na **Slici 4.** Izravna metoda koristi posebno dizajniranu inertnu sondu koja se postavlja u smjesu uzorka i

otapala, dok se neizravna metoda sastoji od spremnika za uzorke koji je uronjen u ultrazvučnu kupelj s otapalom. [36] Uzorak se kratko izlaže velikoj količini energije pri čemu se povisuje tlak. Frekvencija ultrazvuka koji se primjenjuje u ekstrakciji je 20-100 kHz što dovodi do kavitacije (stvaranje, rast i snažan raspad šupljina u tekućini). Ultrazvučnom ekstrakcijom smanjuje se volumen otapala (do 100 mL) i vrijeme ekstrakcije (10-45 min). Omogućuje ekstrahiranje velike mase uzorka (2-30 g). [31]



**Slika 4.** Ultrazvučna ekstrakcija: a) neizravna b) izravna metoda [37]

### 2.3.2. Moderne metode priprave uzoraka

Moderne metode priprave čvrstih uzoraka i njihov princip prikazane su u **Tablici 2**. One su brže, djelotvornije, troše manje organskih otapala, stoga manje zagađuju okoliš.

**Tablica 2.** Moderne metode priprave čvrstih uzoraka i princip rada [33]

Metoda	Princip rada
tlačna ekstrakcija otapalom	Uzorak postavljen u zatvoreni spremnik i zagrijan iznad točke vrenja, uzrokujući porast tlaka u spremniku. Ekstrahirani uzorak uklonjen i prebačen u bočicu za daljnju obradu.
automatizirana Soxhlet ekstrakcija	Kombinacija vrijućeg otapala i Soxhlet ekstrakcije. Uzorak u cilindru prvo je uronjen u vrijuće otapalo, a zatim slijedi klasična Soxhlet ekstrakcija/ ispiranje s reflusom otapala.
ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima	Uzorak postavljen u protočni spremnik kroz koji prolazi superkritični fluid. Nakon smanjenja tlaka, ekstrahirani analit sakupljen je u otapalu ili zaostao na adsorbensu (potrebna desorpcija i ispiranje otapalom).
mikrovalna ekstrakcija	Uzorak s otapalom postavljen u otvoreni ili zatvoreni spremnik. Zagrijavan je mikrovalnom energijom te se analit ekstrahira.

## 2.4. Kromatografska analiza

Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika. Kromatografski sustav čine dvije faze, pokretna i nepokretna. Ispitivani uzorak nalazi se u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske tehnike dijele se na:

- razdjelnu – ravnoteža se uspostavlja između dviju kapljevina, što znači da je i nepokretna faza kapljevina vezana na inertni nosač,
- adsorpcijsku – ravnoteža se uspostavlja između plina ili kapljevine u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa,
- afinitetnu – na površini čvrste faze nalaze se različite funkcionalne skupine, a vezanje nastaje zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze,
- kromatografiju isključenjem – nepokretna faza je materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, a separacija se zasniva na razlici u molekularnoj masi i obujmu.

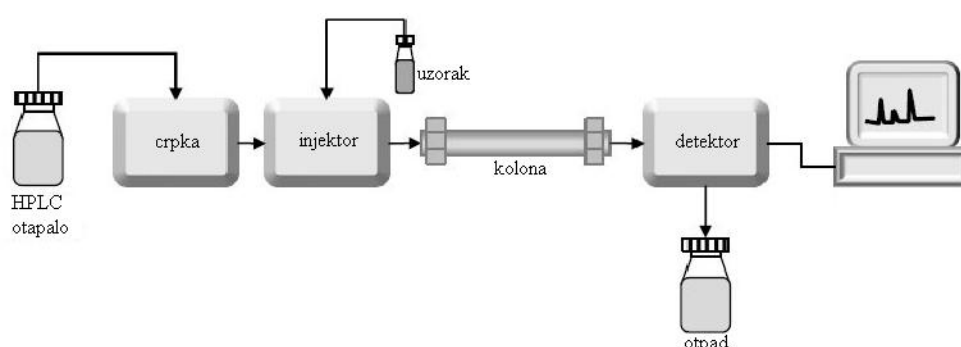
Uobičajeno je kromatografske tehnike nazivati prema sastavu pokretne faze pa govorimo o plinskoj i tekućinskoj kromatografiji te o fluidnoj kromatografiji u superkritičnim uvjetima. Rezultat separacije prikazuje se kromatogramom koji je zapis koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzoraka nakon završenog procesa separacije. Položaj mrlje ili kromatografske krivulje na kromatogramu pomaže u dokazivanju kvalitativnog sastava uzorka, a na temelju površine kromatografske krivulje, odnosno njezine visine, može se dobiti kvantitativna procjena.

U ovom radu za analizu farmaceutika korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti koja je danas najupotrebljivija kromatografska metoda. [38]

### 2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) razvijena je u kasnim 1960-ima. Danas je široko primjenjivana separacijska metoda za analizu uzorka i za pročišćavanje u različitim područjima uključujući farmaceutsku, biotehnološku, ekološku, polimernu i prehrambenu industriju. [39]

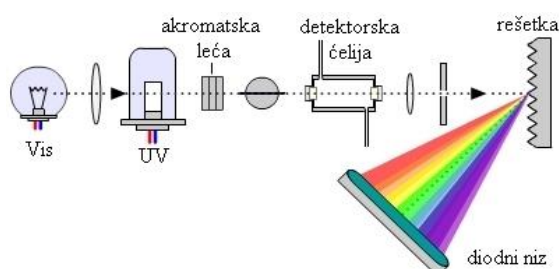
Osnovni dijelovi tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti su spremnici za otapala pokretne faze, crpka, injektor, kolona i detektor (**Slika 5**). Crpka ubacuje pokretnu fazu u stupac pod visokim tlakom stalnom brzinom (0,1-10 mL/min), a uzorak se automatskim dodavanjem unosi u sustav za injektiranje u kojoj se održava stalan tlak. Otapalo prolazi kroz injektor te nosi uzorak u kolonu u kojoj je obično cijev od nehrđajućeg čelika, duljine 50-250 mm, unutarnjeg promjera 2-4,6 mm, punjena česticama veličine 1,7-5  $\mu\text{m}$ . Za dulje trajanje kolone trebalo bi koristiti pretkolonu. [40] Prednosti HPLC metode su višekratna upotreba kolona, automatsko unošenje uzoraka, skraćeno trajanje analize te pospješena detekcija i kvantifikacija. [41]



**Slika 5.** Shematski prikaz tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti [42]

#### 2.4.2. Detektor s nizom dioda

Princip rada detektora s nizom dioda prikazan je na **Slici 6**. Svjetlost iz deuterijeve svjetiljke usmjerena je s prozirnóm lećóm tako da cijeli snop svjetla prolazi kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Na taj način se uzorak podvrgava svjetlu svih valnih duljina koje generira svjetiljka. Raspršena svjetlost iz rešetke usmjerena je na niz dioda. Niz može sadržavati stotine dioda i izlaz iz svake diode je računalo, a podaci su spremljeni na tvrdi disk. Spektar otopljene tvari može se dobiti tako da se otvori iz memorije izlaz za svaku diodu odnosno da dobijemo krivulju koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Nedostatak ovog tipa detektora je to što je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu dioda. [40]



**Slika 6.** Shematski prikaz rada detektora s nizom dioda [43]

### 2.4.3. Pregled literature za istraživane farmaceutike

Prije početka eksperimentalnog dijela rada pretražena je literatura unatrag 25 godina kako bi se uvidjeli optimalni uvjeti pripreme uzoraka i metode određivanja ispitivanih farmaceutika. Pregled literature prikazan je u **Tablici 3**.

**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike

Cefdinir (antibiotik)						
Uzorak	Priprava uzorka	Detektor	Kolona	Pokretna faza	God.	Ref.
-	Uzorak cefdinira otopljen u fosfatnom puferu (0,1 M, pH 7,0) i razrijeđen do 0,5 mg/mL.	UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	Tosoh TSKgel ODS-80Tm (75 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	citrat (33 mM): fosfatni pufer (pH 2,0):metanol-dioksan (36:4:1, v/v/v), 25 °C, protok namješten da vrijeme zadržavanja cefdinira bude 4 minute	1996.	[44]
-	100 mg cefdinira otopljeno u mobilnoj fazi u odmjerne tikvici od 100 mL.	RP-HPLC UV/Vid $\lambda = 285 \text{ nm}$	Purospher STAR RP18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	fosfatni pufer (pH 7,2):metanol (55:45, v/v), 25 °C, 1,0 mL/min	2009.	[45]
Ljudska plazma	Uzorak tretiran sa 600 $\mu\text{L}$ etanola, acetonitrila, metanola, 6 %-tne trikloroctene kiseline i/ili njihovim kombinacijama, miješan 5 min, centrifugiran 10 min pri 2500 x g na 4 °C.	RP-HPLC/UV $\lambda = 285 \text{ nm}$	Supelco Discovery HS C18 kolona (150 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ ), pretkolona Perkin Elmer C18 (30 mm x 4,6 mm, 10 $\mu\text{m}$ )	metanol: acetonitril (50:50, v/v), 0,05 % trifluorocetna kiselina (19:81, v/v), 50 °C, 2,0 mL/min	2011.	[46]
-	Cefdinir otopljen u otopini metanol:acetonitril (4:1, v:v). Dobivena otopina filtrirana kroz Nylon filter (veličina pora 0,45 $\mu\text{m}$ ).	DAD $\lambda = 286 \text{ nm}$	Waters RP Spherisorb C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	fosforna kiselina (pH 3,0): acetonitril: metanol (13:5:2, v/v/v), 25 °C, 1,0 mL/min	2011.	[47]
Dinar 125, Adwia	Usitnjenoj tableti Dinar 125 mase koja je ekvivalentna 100 mg cefdinira dodano 100 mL otopine kalijevog dihidrogenfosfata (pH 6,8). Otopina stavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta i nakon toga filtrirana.	DAD $\lambda = 214 \text{ nm}$	Chromolith Performance RP-18e (100 mm x 4,6 mm, 2 $\mu\text{m}$ )	metanol:25 mM kalijev dihidrogenfosfat (10:90, v/v, pH 3,0), 40 °C, 5,0 mL/min	2012.	[48]

**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike (nastavak I)

<b>Nitrofurantoin (antibiotik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>God.</b>	<b>Ref.</b>
-	100 mL vode centrifugirano pri 3500 x g tijekom 10 minuta. 50 mL uzorka ekstrahirano SPE kolonom (optimalni uvjeti SPE C18 500 mg/3 mL i kartuše kondicionirane 3 mL metanola i 3 mL vode). Nitrofurani eluirani s 5 mL metanola i upareni do suha pri 45 °C u struji dušika. Ostaci otopljeni mobilnom fazom te analizirani.	UV/Vid, $\lambda = 376$ nm, PAD, $\lambda = 250-400$ nm  LC-MS/MS	Luna Phenomenex C18 (250 mm x 4,6 mm, 5 $\mu$ m)  Luna Phenylhexyl (150 mm x 2,1 mm, 3 $\mu$ m)	acetonitril: 0,01 M natrijev acetat (pH 6,0), (250:750, v/v), 1,0 mL/min  acetonitril: amonijev acetat (pH 6,0), (300:700, v/v), 0,15 mL/min	2007.	[49]
Ljudska plazma	Alikvotima od 100 $\mu$ L plazme dodano je 150 $\mu$ L radne otopine (1000 ng/mL) i 25 $\mu$ L otopine amonijevog acetata (10 mmol/L). Kartuše kondicionirane s 1,0 mL metanola te 1,0 mL deionizirane vode i centrifugirane nakon svakog koraka na 1 minutu pri 1811 x g. Uzorci plazme također centrifugirani pri 1811 x g na 2 minute. Ispiranje provedeno s 1,0 mL deionizirane vode. Injektirano 5,0 $\mu$ L.	LC-MS/MS	Thermo Scientific BDS Hypersil C18 (100 mm x 4,6 mm, 5,0 $\mu$ m)	acetonitril (0,25 mmol/L): amonijev acetat (60:40, v/v), 4 °C, 0,5 mL/min	2013.	[50]
-	Standardna otopina pripremljena je otapanjem 0,0025 g nitrofurantoina u 10 mL dimetilformamida u odmjernoj tikvici od 100 mL. Razrjeđenjem pripremljene otopine u rasponu koncentracija 5-25 ppm. Fosfatni pufer pripremljen je otapanjem 6,8 g kalijevog dihidrogenfosfata u 500 mL deionizirane vode i 30 mL 0,1 M NaOH (pH namješten na 7,0).	UV $\lambda = 254$ nm	L1 (250 mm x 4,6 mm, 5,0 $\mu$ m)	acetonitril: kalijev dihidrogenfosfat (pH 3,3), (30:70, v/v), 1,0 mL/min	2013.	[51]



**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike (nastavak II)

<b>Metoklopramid (antiemetik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>God.</b>	<b>Ref.</b>
Pseća krv i ljudski urin	5,0 mL uzorka plazme (krv i urin) pomiješano s 9,0 mL vode i 1,0 mL 500 ng/mL standarda. Dodano 2,0 mL koncentriranog amonijevog hidroksida. Smjesa ekstrahirana dva puta s 10,0 mL kloroforma. Kloroform uklonjen s 5,0 mL 0,5 M HCl. Organska faza uklonjena nakon centrifugiranja. Vodena faza zalužena. Metoklopramid ekstrahiran s 5,0 mL kloroforma. Dobivena smjesa uparena, dodano 100 µL kloroforma.	UV $\lambda = 280 \text{ nm}$	silikagel M131 (150 mm x 0,5 mm)	metanol:kloroform :amonijev hidroksid konc. (70:30:0,5) 25 °C, 2,0 mL/min	1997.	[52]
Ljudska plazma	Uzorak plazme (0,4 mL) stavljen je u kivetu od 2,0 mL. Alikvoti od 50 µL standardne otopine prazosina (50 ng/mL) dodani svakom uzorku plazme te miješani električnom mješalicom. Plazma zatim zalužena dodavanjem 100 µL otopine NaOH (1 M). Nakon 30 sekundi miješanja smjesa ekstrahirana 1 mL etil acetata, miješana 3 minute te centrifugirana na 14,000 okr/min tijekom 5 minuta. Organski sloj uparen do suha pod strujom dušika (45 °C), ostatak otopljen u 50 µL pokretne faze, 5 µL injektirano.	LC-MS	Thermo Hypersil-Hypurity C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm)	40 mM amonijev acetat (pH 3,5): metanol:acetonitril (75:5:20), 200-250 °C, 1,5-10 mL/min	2010.	[53]

**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike (nastavak III)

<b>Albendazol (antihelmintik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>God.</b>	<b>Ref.</b>
-	15 mL standardne otopine albendazola i 15 mL standardne otopine ivermektina stavljeno je u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno smjesom otapala kloroform:metanol (70:30, v/v).	UV $\lambda = 245 \text{ nm}$	Nucleodur C18 RP (250 mm x 4,6 mm, 5,0 $\mu\text{m}$ )	acetonitril: metanol:voda, (60:30:10, v/v/v), 1,8 mL/min	2008.	[54]
-	Po deset tableta pojedinog lijeka smrvljeno je u prah. 50 mg albendazola (Zentel) i ostalih lijekova izvagano je i prebačeno u odmjernu tikvicu od 100 mL te nadopunjeno metanolom. Smjesa filtrirana 0,45 $\mu\text{m}$ -tarskim filterom. 5 mL pojedinog filtriranog uzorka razrijeđeno je na 25 mL mobilnom fazom B.	UV $\lambda = 254 \text{ nm}$	Nucleosil C8 (250 mm x 4,6 mm, 5,0 $\mu\text{m}$ )	A: 85%-tna fosforna kiselina:voda: acetonitril, (0,05:75:25, v/v/v), B: 85%-tna fosforna kiselina:voda:acetonitril, (0,05:50:50, v/v/v), pH 4,5 za obje faze namješten 15 %-tnom otopinom NaOH	2011.	[55]
-	25 mg pojedinog lijeka izvagano je i prebačeno u odmjernu tikvicu od 25 mL. Dodano je 15 mL metanola i otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta. Konačna koncentracija standardne otopine bila je 1000 $\mu\text{g/mL}$ . Radna otopina pripremljena je od 2,5 mL standardne otopine u odmjernoj tikvici od 25 mL te nadopunjena metanolom kako bi se postigla koncentracija od 100 $\mu\text{g/mL}$ .	UV/Vid $\lambda = 225 \text{ nm}$	Spinco Biotech (250 mm x 4,6 mm, 5,0 $\mu\text{m}$ )	acetonitril:voda (60:40, v/v), pH 3,2 namješten 10 %-tnom fosfornom kiselinom, 1,0 mL/min	2014.	[56]

**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike (nastavak IV)

<b>Febantel (antihelmintik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>God.</b>	<b>Ref.</b>
Janjeća plazma	U 2 mL plazme i 1 µg albendazola dodano je 200 µL amonijevog hidroksida i postignuta je pH vrijednost 11. Nakon dodatka 0,2 g natrijevog klorida i 5 mL dietil-etera, smjesa je ekstrahirana miješanjem (15 minuta) te je sakupljeno 4 mL seruma. Ekstrakcija ponovljena i narednih 5 mL dodano je prethodno sakupljenim 4 mL seruma, koji je zatim osušen pod strujom dušika na sobnoj temperaturi. Osušeni ostatak otopljen u 60 µL metanola u ultrazvučnoj kupelji tijekom 2 minute. 20 µL direktno je injektirano u HPLC uređaj.	UV $\lambda = 292 \text{ nm}$	Nucleosil 5 C18 (100 mm x 13 mm, 5 mm)	43 % acetonitrila i 57 % octene kiseline (1 %-tna), 0,9 mL/min	1993.	[57]
-	Standardne otopine pojedinog farmaceutika koncentracije 1 mg/mL pripremljene su zasebno koristeći smjesu acetonitril: metanol (50:50, v/v). Radne otopine filtrirane su kroz filtere od polivinilidenfluorida. Po 20 tableta pojedinog farmaceutika smrvljeno je, vagano te prebačeno u odmjernu tikvicu od 50 mL. 25 mL standardne otopine dodano je te su uzorci postavljeni u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta (30 okr/min). Uzorci su filtrirani kroz filter papir (veličina pora 0,28 µm) prije injektiranja.	HPLC-MS/MS	Waters Xbridge C8 kolona (50 mm x 2,1 mm, 5 µm), Waters XBridge C8 pretkolona (10 mm x 2,1 mm, 5 µm),	voda:acetonitril (15:85, v/v), uz dodatak 0,1 %-tne mravlje kiseline i 3 mmol/L amonijevog formijata, 20 °C, 200 µL/min	2013.	[58]

**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike (nastavak V)

<b>Prazikvantel (antihelmintik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>God.</b>	<b>Ref.</b>
-	25 mg pojedinog lijeka izvagano je i prebačeno u odmjernu tikvicu od 25 mL. Dodano je 15 mL metanola i otopina je stavljena u ultrazvučnu kupelj na 15 minuta. Konačna koncentracija standardne otopine bila je 1000 µg/mL. Radna otopina pripravljena je od 2,5 mL standardne otopine u odmjernoj tikvici od 25 mL te nadopunjena metanolom kako bi se postigla koncentracija od 100 µg/mL.	UV/Vid $\lambda = 225 \text{ nm}$	Spinco Biotech (250 mm x 4,6 mm, 5,0 µm)	acetonitril:voda (60:40, v/v), pH 3,2 namješten 10 %-tnom fosfornom kiselinom, 1,0 mL/min	2014.	[59]
-	Standardna otopina pripravljena je otapanjem 100 mg prazikvantela u smjesi acetonitril:voda (1:1, v/v) u odmjernoj tikvici od 100 mL. 10 tableta Distocid 600 mg izvagane su i smrvljene u fini prah. Masi praha ekvivalentnoj jednoj tableti dodano je 250 mL smjese acetonitril:voda (1:1, v/v). Smjesa je postavljena u ultrazvučnu kupelj na 10 minuta te filtrirana. Prvih 10 mL otopine je odbačeno, a narednih 2 mL razrijeđeno je na 100 mL istom smjesom otapala.	RP- HPLC/UV $\lambda = 210 \text{ nm}$	Caltrex AI, Kromasil Si (125 mm x 4,0 mm, 5 µm)	acetonitril:25 mM amonijev acetat (40:60, v/v), 30 °C, 1,0 mL/min	2017.	[60]

**Tablica 3.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike (nastavak VI)

<b>Hidroksiklorokin (kemoterapeutik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>God.</b>	<b>Ref.</b>
Krv i plazma	Uzorci krvi centrifugirani s natrij heparinom kao antikoagulantom na 1000 x g na 10 minuta. Plazmi dodano 0,5 mL 5 M NaOH i 100 µL standardne otopine (klorokin 0,01 mg/mL u metanolu). Zatim dodano 5 mL otopine heksan: dietileter (1:1, v:v). Dobivene otopine miješane te centrifugirane na 1000 x g 10 minuta.	UV/Vid $\lambda = 320$ nm	Chiral-AGP kolona (150 mm x 4,6 mm, 5 µm), Regis AGP pretkolona	0,03 M fosfatni pufer (pH 7,0): etanol:acetonitril (79:20:1, v/v/v) 25 °C, 0,9 mL/min	1992.	[61]
Urin	1 mL urina dodano 0,5 mL 5 M NaOH i 100 µL standardne otopine (klorokin 0,01 mg/mL u metanolu), a zatim 6 mL dietiletera. Otopina miješana 1 minutu te centrifugirana (1750 x g na 10 minuta).	UV/Vid $\lambda = 320$ nm	Chiral-AGP (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolona, Regis AGP pretkolona	0,03 M fosfatni pufer (pH 7,0): etanol:acetonitril (79:20:1, v/v/v) 25 °C, 0,9 mL/min	1993.	[62]
Mikrosomi jetre štakora	Svaki uzorak sastoji se od 500 µL mikrosomalne frakcije, 240 µL of kalijevog fosfata (100 mmol/L, pH 7,4) i 10 µL standardne otopine hidroksiklorokina. Uzorci za analizu na HPLC-u pripremaju se ekstrakcijom tekuće-tekuće s kloroformom.	UV/Vid $\lambda = 343$ nm	Chiralpak AD-RH (150 mm x 4,6 mm, 5 µm)	heksan:izopropanol (92:8, v/v) i 0,1 % dietilamin, 25 °C	2009.	[63]
Krv	100 µL uzorka krvi pomiješano sa 100 µL kalibracijske otopine i s 400 µL standardne otopine hidroksiklorokina (75 µg/mL u metanolu). Centrifugiranje na 10 min (13,000 okr/min) na 4 °C. 100 µL nastale otopine pomiješano sa 100 µL vode zakiseljene mravljom kiselinom (0,5 %).	LC-MS/MS	HypersilGold aQ (Thermo Fisher Scientific) (50 mm x 3 mm, 3 µm)	metanol zakiseljen s 0,1 % mravljom kiselinom, 10 °C, 0,5 mL/min	2014.	[64]

### **3. EKSPERIMENTALNI DIO**

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Sediment [65]

Postupak ekstrakcije farmaceutika napravljen je na uzorcima sedimenta iz mjesta Kupirovo (Ličko-senjska županija). Mehanički sastav sedimenta prikazan je u **Tablici 4**. Sediment je okarakteriziran kao pjeskovita ilovača.

**Tablica 4.** Mehanički sastav sedimenta

% krupni pijesak	% (prah, glina)	% glina	% prah	% sitni pijesak	TEKSTURA TLA
10,20	0,70	0,55	0,15	89,30	pjeskovita ilovača

Higroskopnost sedimenta, određena po *Mitscherlichu*<sup>1</sup>, prikazana je u **Tablici 5**. Teksturna oznaka sedimenta je pijesak.

**Tablica 5.** Higroskopnost sedimenta po *Mitscherlichu*

Uzorak	Masa prazne petrijeve / g	Petrijevka + uzorak / g	Petrijevka + uzorak nakon 24 h sušenja / g	% Hy
Sediment 1	56,4286	61,4291	61,263	3,43
Sediment 2	36,7344	41,7350	41,5721	3,37
Sediment 3	65,4151	70,4150	70,2475	3,47

Na temelju rezultata prikazanih u **Tablici 6** može se zaključiti da je ispitivani sediment neutralnog do bazičnog karaktera.

**Tablica 6.** pH reakcije sedimenta

Uzorak	pH			Klasifikacija sedimenta
Sediment, KCl, neprosijano	6,93	6,93	6,93	neutralni sediment
Sediment, KCl, prosijano	7,06	7,07	7,07	neutralni sediment
Sediment, H <sub>2</sub> O, neprosijano	8,19	8,19	8,19	bazični sediment
Sediment, H <sub>2</sub> O, prosijano	8,01	8,02	8,02	bazični sediment

Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 7** zaključuje se da je suma baza sposobnih za zamjenu vrlo visoka, maksimalni adsorpcijski kapacitet za baze također vrlo visok, a stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa izrazito visok.

<sup>1</sup> Eilhard Mitscherlich (Wilhelmshaven, 1794. – Schöneberg, 1863.), njemački kemičar

**Tablica 7.** Kapacitet i stanje zasićenosti adsorpcijskog kompleksa

Sediment	Suma baza sposobnih za zamjenu ( <i>S</i> ), mmol/100 g tla	Maksimalni adsorpcijski kapacitet za baze ( <i>T</i> ), mmol/100 g tla	Stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa bazama ( <i>V</i> ), %
	49,70	50,03	99,34
Klasifikacija	Vrlo visoka	Vrlo visoka	Vrlo visoka

Udio humusa u sedimentu određen je metodom po *Kochmanu*, a prema dobivenim rezultatima udjela humusa od 1,31 %, riječ je o slabo humoznom sedimentu.

Određivanjem karbonata ustanovljeno je da uzorak sedimenta sadrži značajan udio karbonata, što je i karakteristika sedimenata s pH-vrijednostima većim od 7 (**Tablica 8.**).

**Tablica 8.** Određivanje karbonata

Uzorak	V(NaOH)/mL	% CaCO <sub>3</sub>
Sediment	37,0	25,62
Slijepa proba	49,8	-

### 3.1.2. Kemikalije

U **Tablici 9** navedene su kemikalije koje su korištene u eksperimentalnom radu.

**Tablica 9.** Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

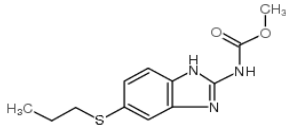
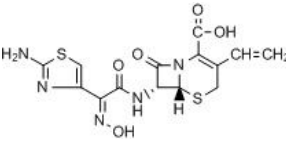
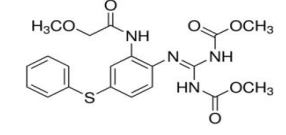
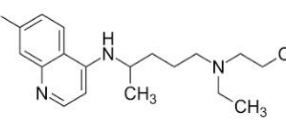
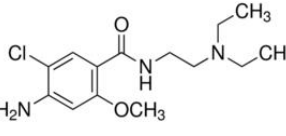
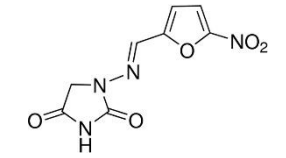
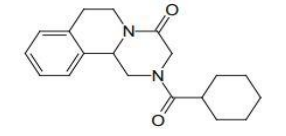
Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
1-Propanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	Kemika, Hrvatska
2-Propanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	Kemika, Hrvatska
Aceton	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	p.a.	GRAM-MOL, Hrvatska
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	HPLC	Fisher Chemical, UK
Dietil-eter	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	p.a.	Sigma–Aldrich, SAD
Diklormetan	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
Dinatrijev-hidrogenfosfat	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	p.a.	Kemika, Hrvatska
Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	GRAM-MOL, Hrvatska
Etil-acetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	p.a.	GRAM-MOL, Hrvatska
Fosfatni pufer (pH 4,01)	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub>	p.a.	Kefo, Slovenija
Fosfatni pufer (pH 7,00)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>		svježe pripremljen
Heksan	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub>	p.a.	Sigma–Aldrich, SAD
Kalijev-hidrogen-ftalat (pH 4,01)	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> KO <sub>4</sub>	p.a.	Kefo, Slovenija
Kloridna kiselina, 37 %-tna	HCl	p.a.	Sigma–Aldrich, SAD
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>	p.a.	Mallinckrodt Chemical, SAD
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	HPLC	J. T. Baker, Nizozemska
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	HPLC	Sigma–Aldrich, SAD
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	GRAM-MOL, Hrvatska



### 3.1.3. Farmaceutici

U eksperimentalnom radu korištena je smjesa od ukupno sedam farmaceutika. Fizikalno-kemijske karakteristike navedenih farmaceutika prikazane su u **Tablici 10**.

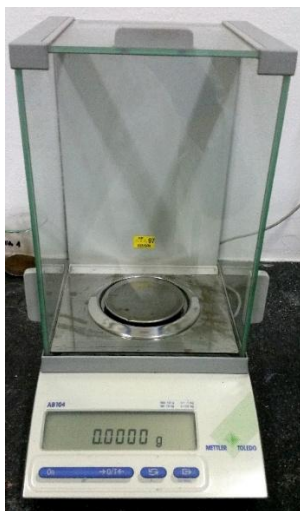
**Tablica 10.** Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanih farmaceutika

Farmaceutik	CAS broj	Molekulska struktura	Molarna masa, g/mol	Proizvođač	Konstante
<b>Albendazol</b> [C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S] (antihelminetik)	54965-21-8		265,33	Veterina 99 %	Log $K_{ow}$ = 265,33 $S$ (mg/L) = 3,14 $pK_a$ = 40,76
<b>Cefdinir</b> [C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> ] (antibiotik)	91832-40-5		395,41	Sigma-Aldrich ≥ 95 %	Log $K_{ow}$ = 1,47 $S$ (mg/L) = 180,1 $pK_a$ = 3,20; 7,45
<b>Febantel</b> [C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S] (antihelminetik)	58306-30-2		446,48	Veterina ≥99 %	Log $K_{ow}$ = 1,95 $S$ (mg/L) = 33,92 $pK_a$ = 9,48
<b>Hidroksiklorokin</b> [C <sub>18</sub> H <sub>26</sub> ClN <sub>3</sub> O] (kemoterapeutik)	118-42-3		335,87	Sigma-Aldrich ≥ 95 %	Log $K_{ow}$ = 3,03 $S$ (mg/L) = 197,6 $pK_a$ = 7,28; 9,76
<b>Metoklopramid</b> [C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub> ] (antiemetik)	364-62-5		299,80	Sigma-Aldrich ≥ 95 %	Log $K_{ow}$ = 1,69 $S$ (mg/L) = 71,25 $pK_a$ = 9,04
<b>Nitrofurantoin</b> [C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> ] (antibiotik)	67-20-9		238,16	Acros Organics 98%	Log $K_{ow}$ = -0,17 $S$ (mg/L) = 1382 $pK_a$ = 9,23
<b>Prazikvantel</b> [C <sub>19</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ] (antihelminetik)	55268-74-1		312,41	Veterina, ≥99 %	Log $K_{ow}$ = 2,42 $S$ (mg/L) = 88,38 $pK_a$ = -

## 3.2. Instrumenti, uređaji i pribor

### 3.2.1. Analitička vaga

Za vaganje farmaceutika i sedimenta korištena je analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, prikazana na **Slici 7**.



**Slika 7.** Analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska

### 3.2.2. pH-metar

Prilikom namještanja pH vrijednosti korišten je pH-metar Mettler Toledo, Seven Easy, Švicarska (**Slika 8**).



**Slika 8.** pH metar Mettler Toledo, Seven Easy, Švicarska [66]

### 3.2.3. Mućkalica

Špikani sediment usitnio se korištenjem tarionika i tučka (Slika 9.), a nakon dodatka određenog otapala, za ekstrakciju kemoterapeutika iz sedimenta korištena je mućkalica IKA, KS 3000i control, Njemačka (Slika 10.).



Slika 9. Usitnjavanje špikanog sedimenta u tarioniku



Slika 10. Mućkalica IKA, KS 3000i control, Njemačka [67]

### 3.2.4. Filtriranje

Nakon mućkanja, za filtriranje dobivene smjese, korištene su šprice volumena 5 mL, Becton Dickinson, BD Discardit II, Indija (Slika 11.), igle Becton Dickinson BD Microlance 3, Indija te najlonski filteri, FilterBio, Labex Ltd., Kina (Slika 12.), veličina pora 45  $\mu\text{m}$  i promjera 25 mm.



Slika 11. Šprica od 5 mL, Becton Dickinson BD Discardit II, Indija [68]



**Slika 12.** Filteri za šprice, FilterBio, Labex Ltd., Kina [69]

### 3.2.5. Laboratorijski rotacijski uparivač

Za uparavanje smjese korišten je rotavapor BÜCHI R-114, Švicarska (**Slika 13.**). Temperatura vodene kupelji za uparavanje (BÜCHI Waterbath B-480, Švicarska) je 40 °C.



**Slika 13.** Rotavapor BÜCHI R-114, Švicarska i vodena kupelj BÜCHI Waterbath B-480, Švicarska [70]

### 3.2.6. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

Nakon ekstrakcije uzorci su analizirani tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti Varian ProStar 500, Sjedinjene Američke Države, prikazanom na **Slici 14.** Instrument se sastoji od ProStar 330 detektora s nizom dioda (DAD), ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 500 termostatiranog držača kolone, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i osobnog računala s programom STAR 5.2. preko kojeg se upravlja HPLC-om, prikuplja i obrađuje podatke. Za analizu je korištena kolona InertSustain C18 (GL Sciences, Japan). Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina zrnaca je 5 µm.



**Slika 14.** Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, Varian ProStar 500, SAD

### **3.3. Metode rada**

#### **3.3.1. Priprava standardne otopine kemoterapeutika**

Standardna otopina smjese kemoterapeutika pripravljena je vaganjem 5 mg pojedinog kemoterapeutika. Smjesa se otopila metanolom HPLC čistoće u tikvici od 100 mL. Pripremljena otopina čuvana je u hladnjaku na temperaturi od 4 °C.

#### **3.3.2. Priprava špikanog sedimenta**

U posudici za vaganje, izvagano je 5 grama usitnjenog sedimenta. Trbušastom pipetom dodano je 5 mL standardne otopine smjese kemoterapeutika, a zatim graduiranom pipetom 7 mL metanola HPLC čistoće. Dobivena smjesa lagano se miješala kružnim pokretima, kako bi se homogenizirala. Smjesa je sušena na sobnoj temperaturi (25 °C) najmanje 24 h.

#### **3.3.3. Ekstrakcija mućkanjem**

Nakon što se osušio, špikani sediment vagan je u pojedinoj bočici. U svaku bočicu, trbušastom pipetom, dodano je 3 mL određenog otapala. Za pojedino otapalo ili smjesu otapala rađena su tri ponavljanja, uz slijepu probu. Uzorci su mućkani 30 minuta, 200 okr/min, na 30 °C. Odjeljivanje je provedeno korištenjem 5-mililitarskih šprica. Iglom je uklonjena tekuća faza, igla je odstranjena, stavljen je filter te je tekuća faza filtrirana u tikvicu s okruglim dnom.

#### **3.3.4. Uparavanje uzorka**

Tikvica s okruglim dnom učvršćena je na dno hladila na rotavaporu. Uzorci su upareni na temperaturi od 40 °C nekoliko minuta, ovisno o otapalu ili kombinaciji otapala. U tikvicu s okruglim dnom u kojoj se nalazio suhi ostatak, dodano je pipetom 1 mL metanola HPLC čistoće. Tikvica se ručno rotirala, uvijek isti broj ponavljanja te se sadržaj tikvice prelio u vijalicu.

### 3.3.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kvantifikacija i identifikacija farmaceutika u ekstraktima provedena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Volumen injektiranja je 30  $\mu$ L, tlak 20-25 atm, temperatura 20-25  $^{\circ}$ C. Analizirana je standardna otopina farmaceutika, slijepa proba (ekstrahiran sediment koji nije špikan standardnom smjesom farmaceutika) i ekstrakti. Standardna smjesa farmaceutika injektirana je šest puta, slijepa proba jedanput te ekstrakti tri puta. Prije i nakon analize uzoraka kolona se pere 65 %-tnim acetonitrilom jedan sat protokom od 0,5 mL/min. Volumen injektiranja acetonitrila je 10  $\mu$ L. Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu). Sastav pokretne faze tijekom snimanja kromatograma na HPLC-DAD kromatografskom sustavu prikazan je u **Tablici 11**. Brzina protoka pokretne faze je 0,5 mL/min.

**Tablica 11.** Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-DAD analizama

$t_R$ , min	protok, mL/min	A, %	B, %
0,00	0,5	100	0
2,30	0,5	92	8
6,00	0,5	90	10
11,00	0,5	70	30
15,00	0,5	40	60
18,00	0,5	5	95
28,00	0,5	5	95
28,06	0,5	100	0
30,00	0,5	100	0

Kromatogrami na HPLC-DAD kromatografskom sustavu snimani su na dvije valne duljine, 210 i 370 nm. Iz snimljenih kromatograma očitane su površine farmaceutika iz standardne otopine i uzoraka dobivenih špikanjem sedimenta. Na temelju očitanih površina izračunato je iskorištenje ekstrakcije kao omjer površine kromatografske krivulje analita u ekstraktu ( $A_{i,E}$ ) i površine kromatografske krivulje analita u standardu ( $A_{i,STD}$ ) kako je prikazano jednadžbom (1):

$$I/\% = \left( \frac{A_{i,E}}{A_{i,STD}} \right) \times 100 \quad (1)$$

## **4. REZULTATI I RASPRAVA**

Cilj ovog rada je ekstrakcija kemoterapeutika iz sedimenta. Metoda mućkanja odabrana je kao ekstrakcijska metoda zbog jednostavnosti, brzine i povoljne cijene. Ispitivao se utjecaj otapala, mase uzorka, vremena ekstrakcije i pH vrijednosti na iskorištenje ekstrakcije.

#### 4.1. Kromatografsko određivanje farmaceutika

Otapala za ekstrakciju i valne duljine za snimanje kemoterapeutika odabrane su na temelju ranijih istraživanja (**Tablica 3.**). Za lakšu identifikaciju kemoterapeutika korišteni su apsorpcijski spektri svakog kemoterapeutika koji su snimljeni na UV/Vid spektrofotometru Perkin Elmer, Lambda 35 u diplomskom radu J. Perčić [65]. Pri detekciji kemoterapeutika uz apsorpcijske spektre korištena su i vremena zadržavanja koja su prikazana u **Tablici 12** zajedno s valnim duljinama pri kojima su očitavane površine kromatografskih krivulja.

**Tablica 12.** Kvalitativni parametri za detekciju ispitivanih farmaceutika na kromatogramima dobivenim HPLC-DAD sustavom

Kemoterapeutik	$\lambda$ , nm	$t_R$ , min
Cefdinir	210	20,280
Nitrofurantoin	370	20,813
Metoklopramid	210	19,427
Albendazol	210	23,000
Febantel	210	25,560
Prazikvantel	210	24,387
Hidroksiklorokin	210	17,240

Na temelju očitanih rezultata (površina kromatografskih krivulja za standardnu smjesu otopine farmaceutika te površina kromatografskih krivulja ekstrahiranih kemoterapeutika iz uzoraka sedimenta mućkanjem) izračunata su iskorištenja ekstrakcije prema jednadžbi (1).

#### 4.2. Optimizacija metode

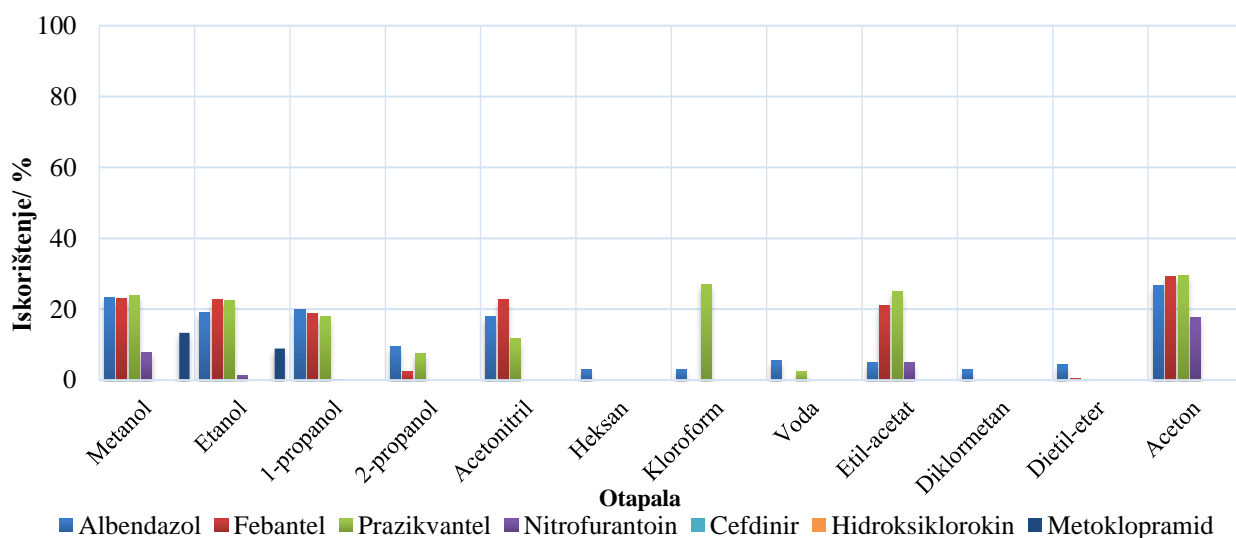
Optimizacija ekstrakcije metodom mućkanja s ciljem dobivanja što većih iskorištenja ekstrakcije kroz ukupno 11 eksperimenata provedena je obzirom na ekstrakcijsko otapalo, masu uzorka, vrijeme trajanja ekstrakcije te utjecaja pH vrijednosti. Svi eksperimenti izvedeni su s tri paralelna uzorka i slijepom probom.



### 4.2.1. Utjecaj otapala

Prvim eksperimentom ispitan je utjecaj 12 čistih otapala. Prema pretraženoj literaturi (**Tablica 3.**) i diplomskom radu J. Perčić [65] odabrana su sljedeća otapala: metanol (MeOH), etanol (EtOH), 1–propanol (1-PrOH), 2–propanol (2-PrOH), acetonitril (ACN), heksan (HEK), kloroform (KLO), voda (H<sub>2</sub>O), etil-acetat (EtAc), diklormetan (DCM), dietil-eter (DEE) i aceton (ACO).

U eksperimentu je špikano 5 g sedimenta s 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika te 7 mL metanola radi bolje homogenizacije. Ekstrakcija mućkanjem napravljena je pri 30 °C, 30 minuta i 200 okr/min. Rezultati ekstrakcije s čistim otapalima prikazani su na **Slici 15.**



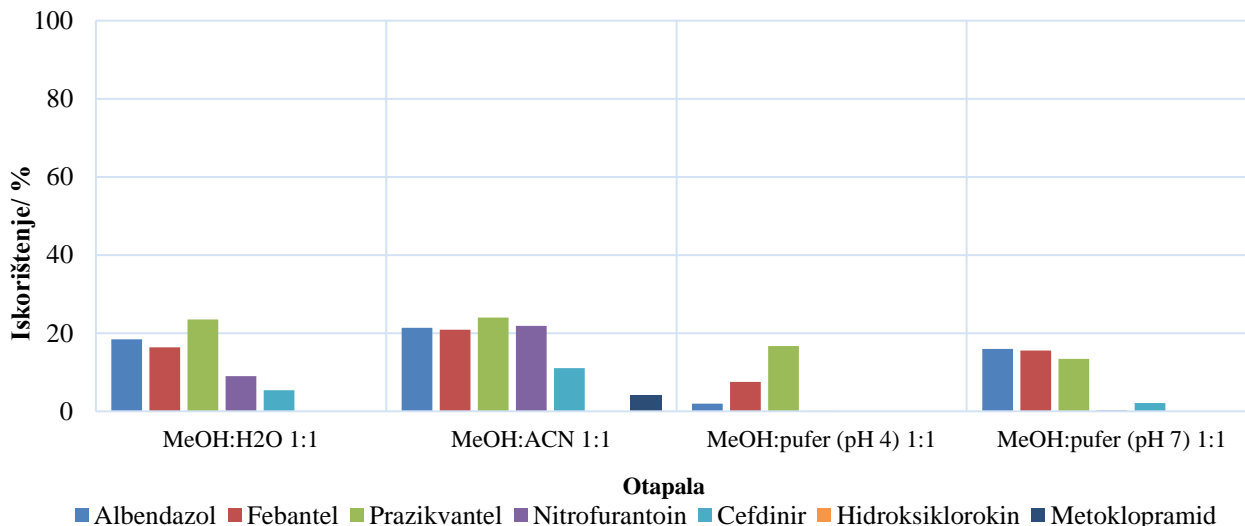
**Slika 15.** Iskorištenje ekstrakcije s čistim otapalima s 0,3 grama uzorka

Najboljim čistim otapalom pokazao se metanol koji je uspio ekstrahirati većinu farmaceutika osim cefdinira i hidroksiklorokina te aceton (nije ekstrahirao cefdinir, hidroksiklorokin i metoklopramid). Kao dobra ekstrakcijska otapala za antihelmintike pokazali su se etanol, 1-propanol i acetonitril s iskorištenjem oko 20 %. Najlošijim otapalom pokazao se heksan koji je ekstrahirao samo albendazol.

Na temelju rezultata prvog eksperimenta odabrani su dvokomponentni sustavi otapala za daljnje eksperimente: metanol:acetonitril, (1:1) (**Slika 16.**), aceton:metanol (**Slika 20.**) i aceton:acetonitril (**Slika 20.**) te prema diplomskom radu A. Čović sustav metanol:voda, (1:1) (**Slika 16.**). [71]

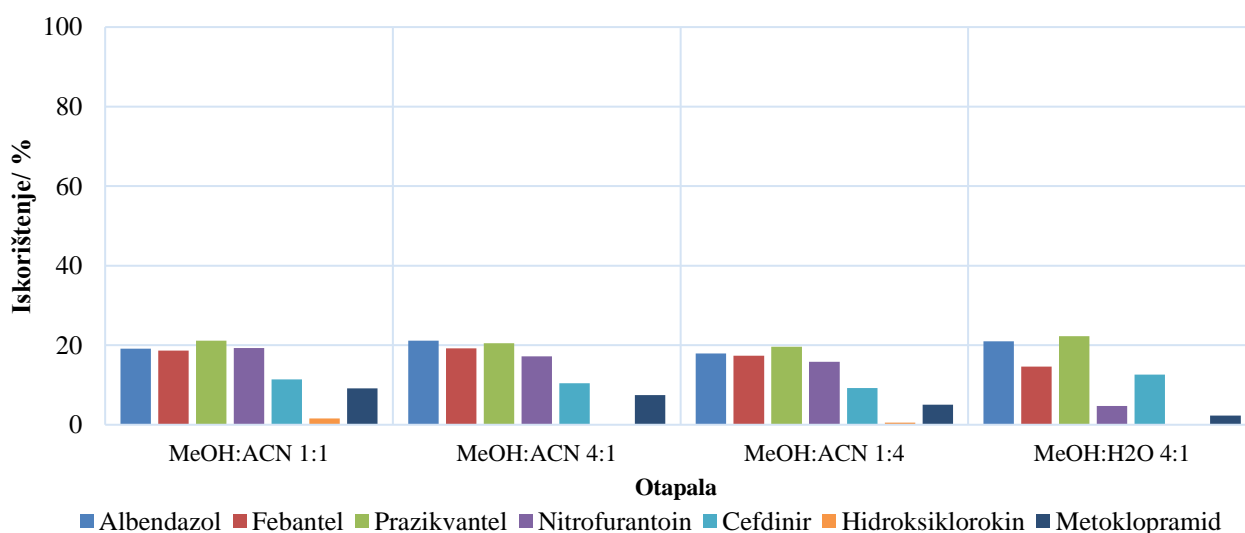
U drugom eksperimentu (**Slika 16.**) ekstrakcija je provedena upravo sa sustavima metanol:voda, (1:1) i metanol:acetonitril, (1:1) te metanol:pufer (pH 4), (1:1) i metanol:pufer (pH 7), (1:1). Sustavi s puferom pH vrijednosti 4 i 7 odabrani su na temelju pretrage literature za cefdinir. [44-48] Nijednim sustavom nisu ekstrahirani svi farmaceutici. Sustav metanol:voda

(1:1) pokazao je nešto lošije rezultate u odnosu na čisti metanol. Sustavom metanol:acetonitril (1:1) nije detektiran jedino hidroksiklorokin, dok je iskorištenje ekstrakcije na cefdiniru iznosilo oko 11 %. Sustav metanol:pufer (pH 7), (1:1) dao je bolje rezultate u odnosu na sustav s puferom pH vrijednosti 4, ali oni su i dalje nezadovoljavajući.



**Slika 16.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:voda, (1:1), metanol:acetonitril, (1:1), metanol:pufer (pH 4), (1:1) i metanol:pufer (pH 7), (1:1) s 0,3 grama uzorka

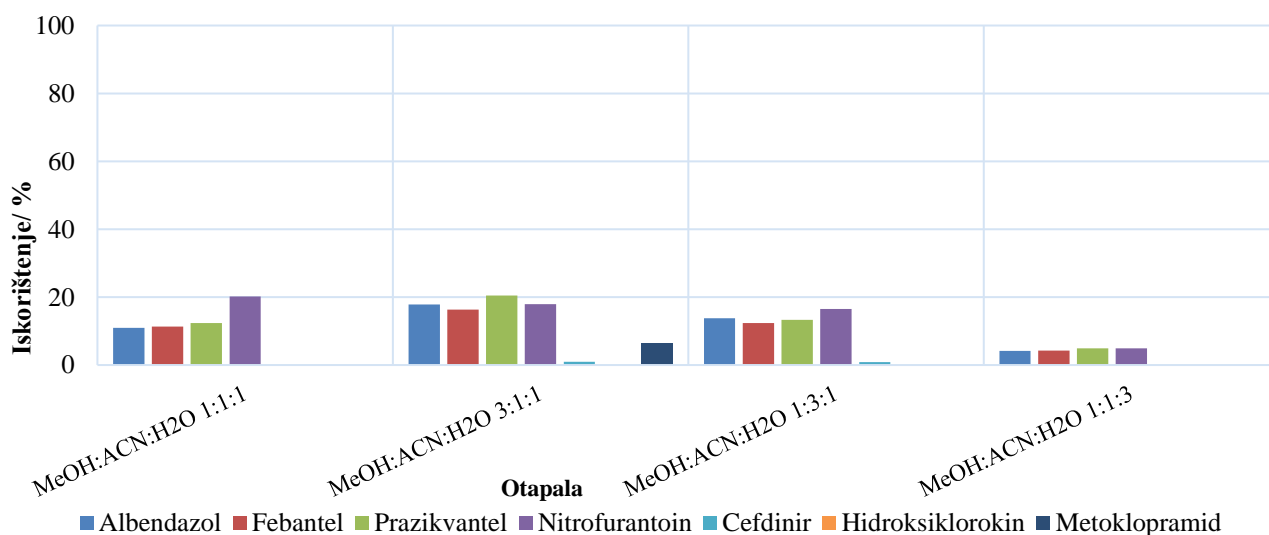
Trećim eksperimentom pokušao se utvrditi utjecaj udjela metanola odnosno acetonitrila (Slika 17.) na iskorištenje ekstrakcije. Korišteni omjeri su: 1:1, 4:1 i 1:4. Međutim, utvrđeno je da udio pojedine komponente kod ovih sustava ne utječe na iskorištenje ekstrakcije.



**Slika 17.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:acetonitril u omjerima 1:1, 4:1, 1:4 i sustavu metanol:voda, (4:1) s 0,3 grama uzorka

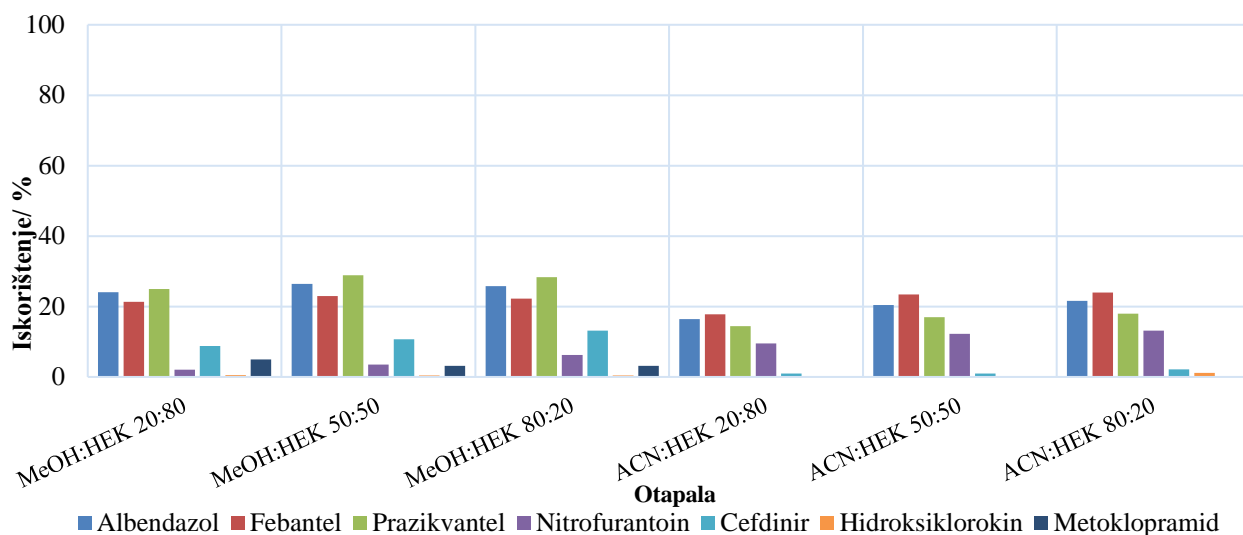
Također, provedena je ekstrakcija sustavom metanol:voda, (4:1), (**Slika 17.**). Usporedbom tog sustava i sustava metanol:voda, (1:1), (**Slika 16.**) uočljivo je da je sustav s omjerom 4:1 nešto bolji jer je uspješno ekstrahiran hidroksiklorokin te je iskorištenje na cefdiniru oko dva puta veće. Što se tiče iskorištenja na antihelminticima, nema značajne razlike.

U četvrtom eksperimentu prikazanom na **Slici 18** korišten je sustav s tri otapala: metanol, acetonitril i voda u omjerima: 1:1:1, 3:1:1, 1:3:1 i 1:1:3. Prva tri sustava pokazuju približno jednaka iskorištenja, dok je u sustavu s omjerom 1:1:3 iskorištenje ekstrakcije dva do četiri puta manje u odnosu na prva tri. Takvo ponašanje je očekivano jer se voda pokazala vrlo loša kao čisto otapalo. Nijedan od navedenih sustava nije ekstrahirao hidroksiklorokin, dok su cefdinir i metoklopramid jedva detektirani. Iskorištenje na metoklopramidu u sustavu metanol:acetonitril:voda, (3:1:1), iznosi oko 6 %.

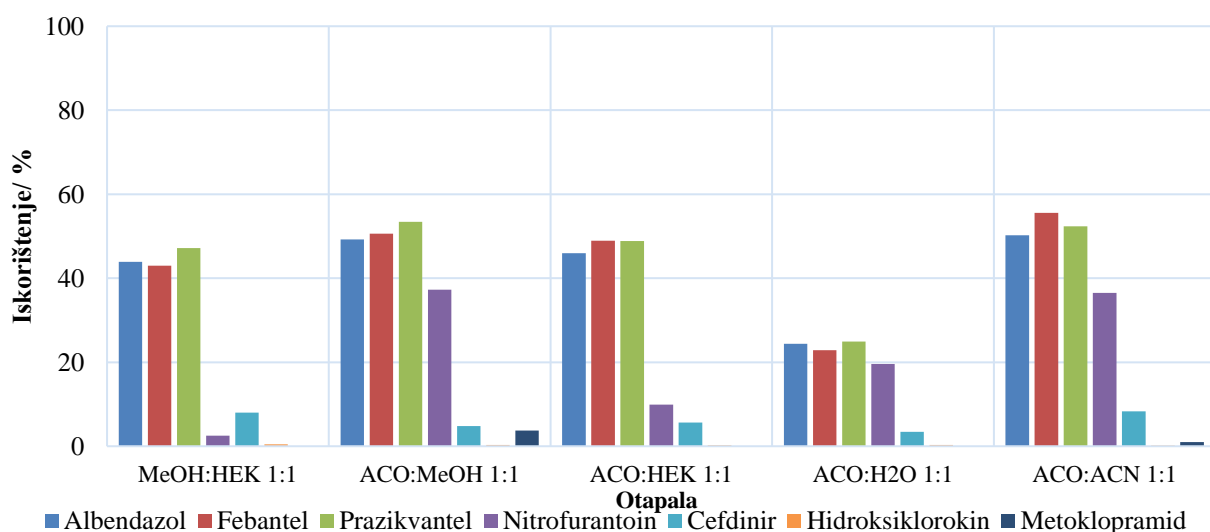


**Slika 18.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:acetonitril:voda u omjerima 1:1:1, 3:1:1, 1:3:1 i 1:1:3 s 0,3 grama uzorka

Na **Slici 19** prikazan je peti eksperiment. Sustavima metanol:heksan u svim omjerima postignuta je ekstrakcija svih farmaceutika. Iskorištenje u sustavu 50:50 za antihelmintike iznosi oko 30 % što predstavlja napredak u odnosu na prethodne eksperimente. Stoga je upravo taj sustav odabran za ispitivanje utjecaja mase uzorka i vremena trajanja ekstrakcije na iskorištenje ekstrakcije. Što se tiče sustava acetonitril:heksan, najbolja iskorištenja ostvarena su omjerom 80:20 što je i očekivano. Međutim, zanimljivo je da je upravo taj sustav dao nešto bolje rezultate od ekstrakcije acetonitrilom kao čistim otapalom, iako je čisti heksan uspio ekstrahirati samo albendazol.



**Slika 19.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:heksan i acetonitril:heksan u omjerima 20:80, 50:50 i 80:20 s 0,3 grama uzorka

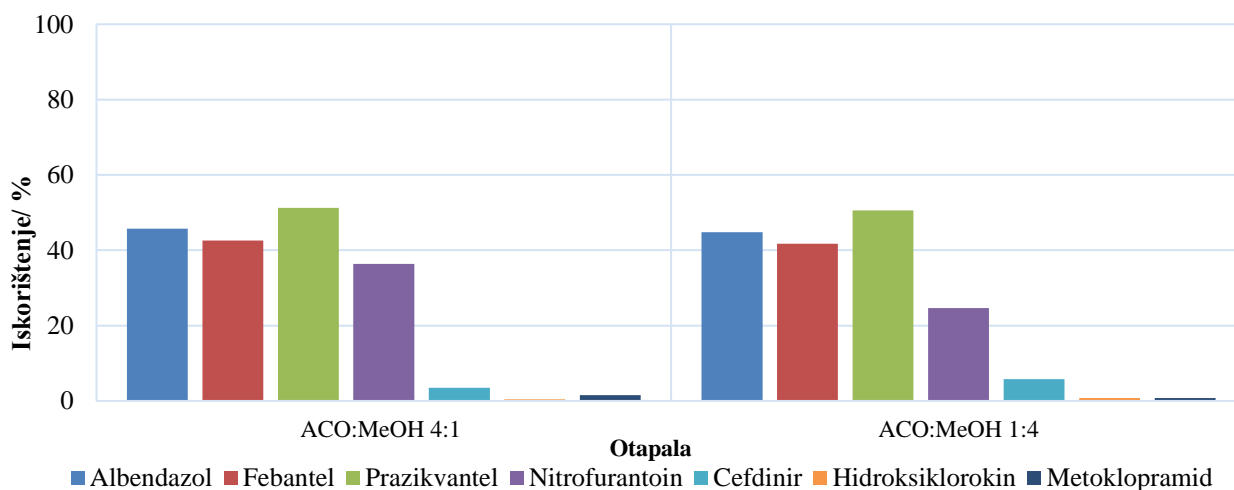


**Slika 20.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:heksan, (1:1), aceton:metanol, (1:1), aceton:heksan, (1:1), aceton:voda, (1:1) i aceton:acetonitril, (1:1) s 0,7 grama uzorka

Nakon što su ispitani utjecaji vremena mućkanja (**Slika 22.**) i mase uzorka (**Slika 23.**) na iskorištenje ekstrakcije, o čemu će se raspraviti u idućim poglavljima, proveden je osmi eksperiment (**Slika 20.**) sa sustavima koji su ostvarili najbolje iskorištenje (metanol:heksan, (1:1), aceton:metanol, (1:1), aceton:heksan, (1:1), aceton:voda, (1:1) i aceton:acetonitril, (1:1)), ali s masom uzorka od 0,7 grama. Dakle, prvih šest eksperimenata provedeno je s 0,3 grama sedimenta.

Najpogodniji sustav otapala za ekstrakciju antihelmintika je aceton:metanol u omjeru 1:1, a iskorištenje za sva tri iznosi oko 50 %. Najveće iskorištenje koje je postignuto za nitrofurantoin iznosi 37,25 % također u sustavu aceton:metanol, (1:1), dok je približno dobro iskorištenje ostvareno i u sustavu aceton:acetonitril, (1:1), (36,49 %). Cefdinir i hidroksiklorokin uspješno su detektirani u svim sustavima otapala, ali maksimalno iskorištenje za cefdinir iznosi oko 8 %, dok za hidroksiklorokin ne prelazi niti 1 %. Metoklopramid je detektiran samo u sustavima aceton:metanol, (1:1) i aceton:acetonitril, (1:1), a iskorištenje ne prelazi 4 %.

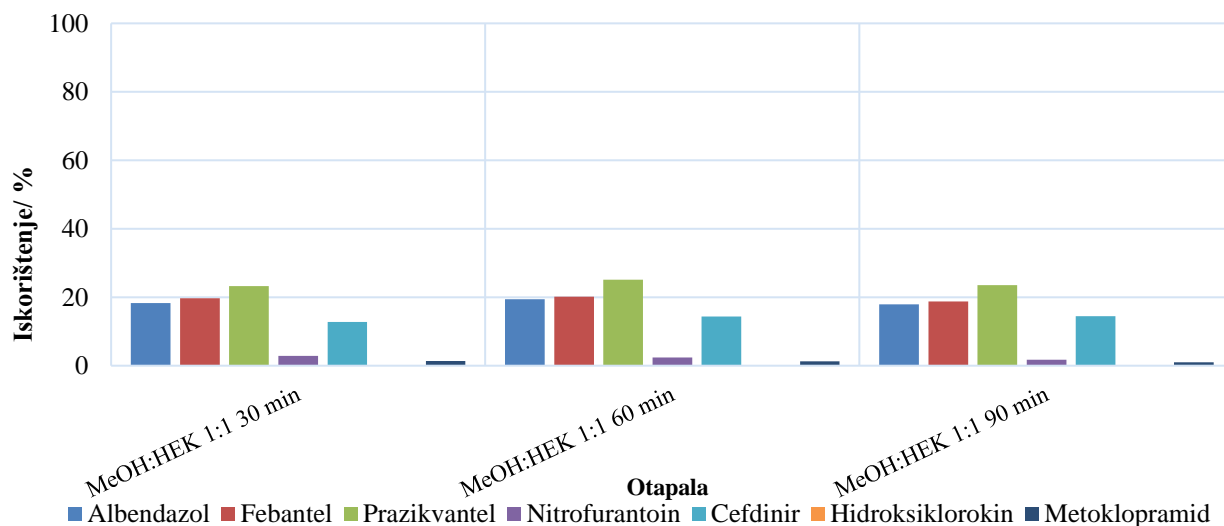
Devetim eksperimentom prikazanim na **Slici 21** utvrđeno je da udio pojedine komponente sustava otapala aceton:metanol značajno ne utječe na iskorištenje ekstrakcije, osim na nitrofurantoin. U sustavu 4:1 iskorištenje na nitrofurantoinu je oko 36 %, dok u sustavu s omjerom 1:4 iznosi oko 25 %. Treba istaknuti da se aceton u prvom eksperimentu pokazao kao nešto bolje čisto otapalo u odnosu na metanol.



**Slika 21.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima aceton:metanol, (4:1) i aceton:metanol, (1:4) s 0,7 grama uzorka

#### 4.2.2. Utjecaj vremena ekstrakcije

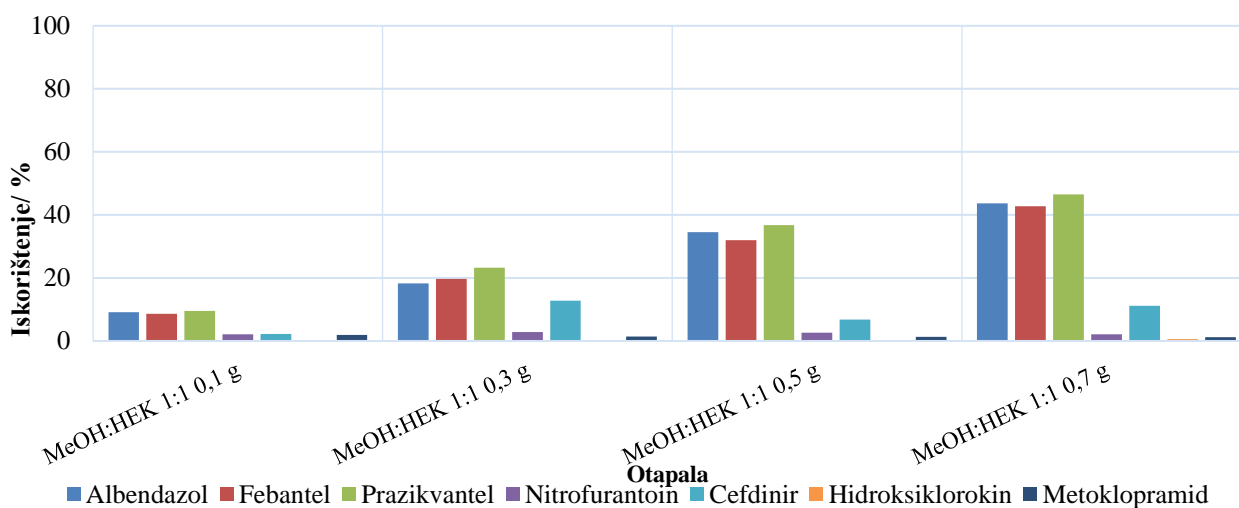
Na temelju dobivenih rezultata za šesti eksperiment prikazanih na **Slici 22** vidljivo je da vrijeme trajanja ekstrakcije ne utječe na iskorištenje ekstrakcije. Eksperiment je proveden sustavom otapala metanol:heksan u omjeru 1:1, pri 30, 60 i 90 minuta mućkanja uzoraka.



**Slika 22.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:heksan, (1:1) s 0,3 grama uzorka te vremenom trajanja ekstrakcije od: 30 min, 60 min i 90 min

#### 4.2.3. Utjecaj mase uzorka

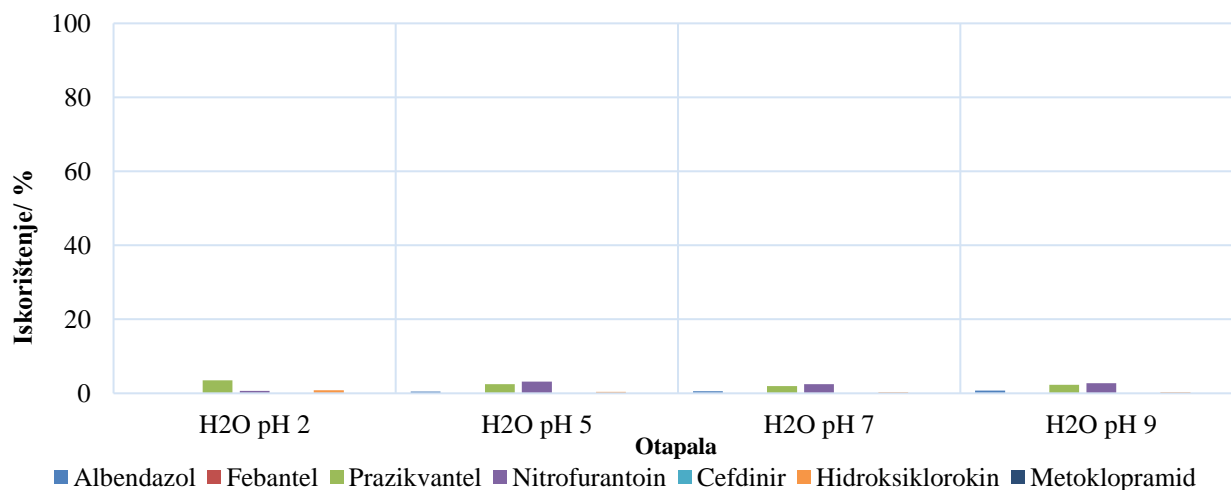
Na **Slici 23** prikazan je sedmi eksperiment kojim se ispitaio utjecaj mase uzorka na iskorištenje ekstrakcije. Eksperiment je proveden sustavom otapala metanol:heksan u omjeru 1:1, s 0,1 gram, 0,3 grama, 0,5 grama i 0,7 grama sedimenta. Najveća iskorištenja na antihelminticima i hidroksiklorokinu uspostavljena su sustavom s 0,7 grama sedimenta. Nitrofurantoin i cefdinir postigli su veće iskorištenje u sustavu s 0,3 grama, a metoklopramid u sustavu s 0,1 gram sedimenta. Međutim, radi se o vrlo malim razlikama (manjim od 1 %) u odnosu na sustav s 0,7 grama, koji je stoga odabran kao najpovoljniji.



**Slika 23.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:heksan, (1:1), s masom uzorka od: 0,1 gram, 0,3 grama, 0,5 grama i 0,7 grama

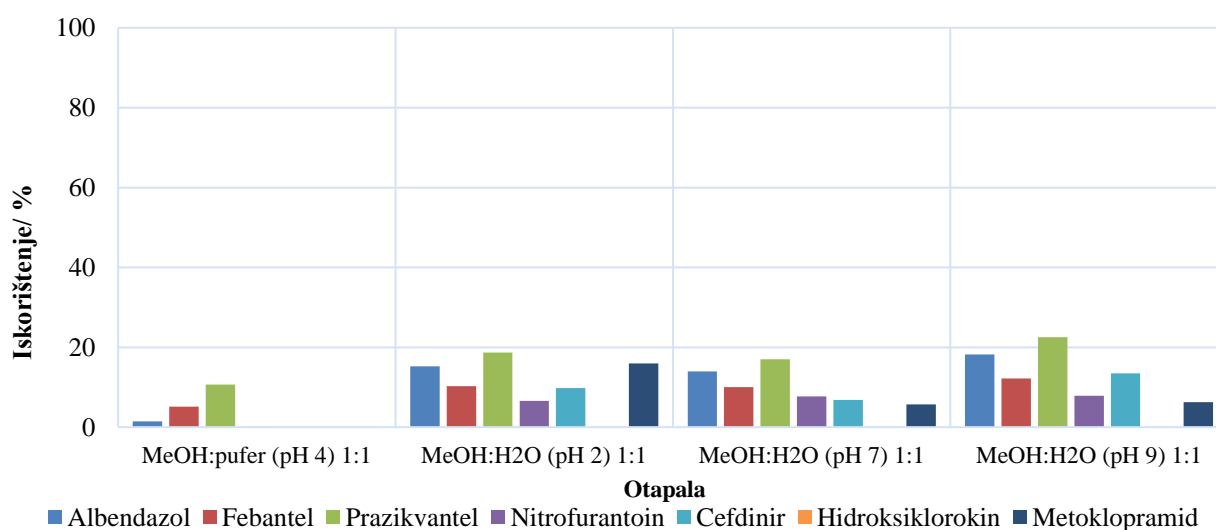
#### 4.2.4. Utjecaj pH vrijednosti

Cilj desetog eksperimenta, prikazanog na **Slici 24**, bio je utvrditi ovisnost iskorištenja ekstrakcije o pH vrijednosti vodene faze. Međutim, dobivena iskorištenja ne prelaze 5 % te utjecaj pH vrijednosti nije uočljiv. Deseti eksperiment je potvrda da je voda vrlo loše čisto otapalo.



**Slika 24.** Iskorištenje ekstrakcije s vodom kao čistim otapalom s 0,7 grama uzorka pri pH vrijednostima 2, 5, 7 i 9

Eksperiment prikazan na **Slici 25** proveden je prije ispitivanja utjecaja mase uzorka, ali je zbog jednostavnosti prikaza rezultata stavljen pred kraj rada. Korišten je sustav metanol:voda u omjeru 1:1 pri pH vrijednostima 2, 7 i 9. Svi farmaceutici ostvarili su najveće iskorištenje pri pH 9, osim metoklopramida kojemu iskorištenje pri pH 2 iznosi oko 17 % te hidroksiklorokina koji uopće nije detektiran ovim sustavom.



**Slika 25.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:voda, (1:1) s 0,3 grama uzorka pri pH vrijednostima 2, 7 i 9

## **5. ZAKLJUČAK**



Cilj rada bio je optimirati postupak ekstrakcije smjese sedam farmaceutika iz sedimenta koji je špikan ispitivanim farmaceuticima. Provedena je metoda ekstrakcije mućkanjem koja je popraćena kromatografskom analizom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda za smjesu farmaceutika. Ispitan je utjecaj otapala, mase uzorka, vremena ekstrakcije i pH vrijednosti na iskorištenje ekstrakcije.

Nakon provedenih eksperimenata može se zaključiti:

- Obzirom na provedene eksperimente s nizom čistih organskih otapala utvrđeno je da se najbolji rezultati dobivaju uporabom metanola.
- Najbolji sustav otapala za ekstrakciju svih farmaceutika je metanol:heksan i sustav aceton:metanol.
- Vrijeme trajanja mućkanja ne utječe na iskorištenje ekstrakcije.
- Povećanjem mase sedimenta povećava se iskorištenje ekstrakcije.
- Svi farmaceutici ostvarili su najveće iskorištenje pri pH 9, osim metoklopramida kojemu iskorištenje pri pH 2 iznosi oko 17 % te hidrosiklorokina koji uopće nije detektiran.
- Zbog loših rezultata obzirom na hidrosiklorokin trebalo bi ispitati druge vrste otapala i njihove smjese ili primijeniti modernije metode ekstrakcije.
- Konačno, ekstrakcija mućkanjem nije dobra metoda za rutinsku ekstrakciju farmaceutika iz sedimenta jer su dobivena iskorištenja ekstrakcije vrlo mala. Za bolje iskorištenje ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta trebalo bi isprobati neke od modernih metoda ekstrakcije.

## **6. LITERATURA**

- [1] **T. Radović, S. Grujić, A. Petković, M. Dimkić, M. Laušević**, Determination of pharmaceuticals and pesticides in river sediments and corresponding surface and ground water in the Danube River and tributaries in Serbia, *Environmental Monitoring and Assessment*, 187 (2015) 1.
- [2] **B. F. d. Silva, A. Jelić, R. López-Serna, A. A. Mozeto, M. Petrovic, D. Barceló**, Occurrence and distribution of pharmaceuticals in surface water, suspended solids and sediments of the Ebro river basin, Spain, *Chemosphere*, 85 (2011) 1331–1339.
- [3] **D. Drljača, D. Ašperger, M. Ferenčak, M. Gavranić, S. Babić, I. Mikac, M. Ahel**, Comparison of four extraction methods for the determination of veterinary pharmaceuticals in sediment, *Chromatographia*, 79 (2016) 209–223.
- [4] **T. Heberer**, Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data, *Toxicology Letters*, 131 (2002) 5-17.
- [5] **M. Petrović, V. Tomašić, J. Macan**, Zagađenje okoliša, u. M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, Zagreb, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, (2013) 75.
- [6] **G. Gallo, G. Lancini, F. Parenti**, Antibiotics: A Multidisciplinary Approach, Springer, Berlin, 1995., str. 1.
- [7] **Antibiotics**, <http://www.medicalnewstoday.com/articles/10278.php> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [8] **Cefdinir**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/cefdinir#section=Top> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [9] **Cefdinir**, <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a698001.html> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [10] **Cefdinir**, <https://www.drugs.com/cdi/cefdinir.html> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [11] **Nitrofurantoin**, <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-12-02-252.pdf> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [12] **Nitrofurantoin**, <http://www.msd-prirucnici.placebo.hr/msd-prirucnik/infektologija/bakterije-i-antibakterijski-lijekovi/nitrofurantoin> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [13] **Antiemetics**, <http://www.healthline.com/health/antiemetic-drugs-list#overview1> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [14] **Antiemetici**, <http://proleksis.lzmk.hr/8890/> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [15] **Metoclopramide**, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/metoclopramide#section=Top> (pristup 25. srpnja 2017.)

- [16] **Metoclopramide**, <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a684035.html> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [17] **Antihelmintici**, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2954> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [18] **Albendazol**, <http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> (pristup 25. srpnja 2017.)
- [19] **I. Kaselj**, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2012.
- [20] **S. C. Su, H. H. Chou, P. C. Chang, C. H. Liu, H. S. Chou**, Simultaneous determination of febantel, fenbendazole, oxfendazole and oxfendazolesulfone in livestock by matrix solid phase dispersion extraction technique and HPLC, *Journal of Food and Drug Analysis*, 3 (2004) 244-253.
- [21] **Praziquantel**, <http://www.webmd.com/drugs/2/drug-8873/praziquantel-oral/details> (pristup 26. srpnja 2017.)
- [22] **Prazikvantel**, <http://www.genera.hr/pro/hr/1620/#.WXhvPITyjIU> (pristup 26. srpnja 2017.)
- [23] **Praziquantel**, <https://www.drugs.com/cdi/praziquantel.html> (pristup 26. srpnja 2017.)
- [24] **Kemoterapeutici**, <http://www.narodnilijek.info/8029/medicinski-pojmovi-kemoterapeutici> (pristup 26. srpnja 2017.)
- [25] **A. Kar**, Medicinal Chemistry, New Age International, New Delhi, 2007., str. 538.
- [26] **Hydroxychloroquine**, <https://www.drugs.com/hydroxychloroquine.html>. (pristup 26. srpnja 2017.)
- [27] **Sediment**, [https://www.pmf.unizg.hr/\\_download/repository/sedimenti%5B5%5D.pdf](https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/sedimenti%5B5%5D.pdf) (pristup 26. srpnja 2017.)
- [28] **Sediment**, <http://e-ucenje.gfmo.ba/predmeti/attachments/article/691/5.%20PETROGRAFIJA.pdf> (pristup 27. srpnja 2017.)
- [29] **K. Tolić**, Sorpcija nitrofurantoina na prirodne sedimente, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
- [30] **B. M. Cullum, T. Vo-Dinh**, Sample Collection and Preparation of Liquid and Solids, u G. Gauglitz, T. Vo-Dinh, Handbook of Spectroscopy, Wiley-VCH, Weinheim, (2003) 17.
- [31] **D. M. Pavlović, D. Ašperger**, Priprava uzoraka za analizu, u M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, Zagreb, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, (2013) 140-165.
- [32] **I. Šimić**, Ultrazvučna ekstrakcija pesticida iz uzorka čaja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.

- [33] **M. Ferenčak**, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta mućkanjem, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2012.
- [34] **Agilent Technologies**, Sample Preparation Methods for Solid Samples, u *Sample preparation fundamentals for chromatography*, (2013) 181-195.
- [35] **D. Drljača, M. Mrđa**, Ultrazvučna ekstrakcija epikatehina i procijanidina B2 iz čokolade, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.
- [36] **D. Kou, S. Mitra**, Extraction of semivolatile organic compounds from solid matrices, u S. Mitra, *Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry*, New Jersey, John Wiley & Sons, (2003) 145-148.
- [37] **Ultrasound probe extraction**, [https://www.researchgate.net/profile/Farid\\_Chemat/publication/261476923/figure/fig2/AS:273097550987264@1442122938032/Figure-3-Laboratory-ultrasound-apparatus-a-ultrasonic-bath-and-b-ultrasonic-probe.png](https://www.researchgate.net/profile/Farid_Chemat/publication/261476923/figure/fig2/AS:273097550987264@1442122938032/Figure-3-Laboratory-ultrasound-apparatus-a-ultrasonic-bath-and-b-ultrasonic-probe.png) (pristup 7. kolovoza 2017.)
- [38] **M. Kaštelan-Macan**, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-218.
- [39] **F. Settle**, *Hanbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall, New Jersey 1997., str. 24-33; 147-153.
- [40] **A. J. M. Horvat**, Tehnike i metode kemijske analize okoliša, u M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, *Analitika okoliša*, Zagreb, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, (2013) 172-227.
- [41] **A. Braithwaite, F. J. Smith**, *Chromatographic Methods*, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2002., str. 258-261.
- [42] **HPLC scheme**, <http://laboratoryinfo.com/wp-content/uploads/2015/07/High-performance-liquid-chromatography-hplc.jpg> (pristup 8. kolovoza 2017.)
- [43] **Diode array detector scheme**, [http://alfresco.ubm-us.net/alfresco\\_images/pharma/2014/11/25/255f2f10-313e-49c8-bb24-fb34a333f6f5/TT1.jpg](http://alfresco.ubm-us.net/alfresco_images/pharma/2014/11/25/255f2f10-313e-49c8-bb24-fb34a333f6f5/TT1.jpg) (pristup 8. kolovoza 2017.)
- [44] **Y. Okamoto, K. Itoh, Y. Namiki, J. Matsushita, M. Fujioka, T. Yasuda**, Method development for the determination of cefdinir and its related substances by high-performance liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14 (1996) 739-748.
- [45] **M. V. Kumudhavalli, R. M. Chandira, B. Jayakar, S. Goswami, K. Abhiteja**, RP – HPLC determination of Cefdinir in bulk drug and solid dosage form, *Journal of Pharmacy Research*, 2 (2009) 1141-1143.

- [46] **A. Khan, Z. Iqbal, M. I. Khan, K. Javed, A. Khan, L. Ahmad, Y. Shah, F. Nasir**, Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma by RP-HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study, *Journal of Chromatography B*, 879 (2011) 2423-2429.
- [47] **P. Hamrapurkar, P. Patil, M. Phale, M. Gandhi, S. Pawar**, A developed and validated stability-indicating reverse-phase high performance liquid chromatographic method for determination of cefdinir in the presence of its degradation products as per, *Pharmaceutical Methods*, 2 (2011) 15-20.
- [48] **H. Hashem, A. A. Gouda, W. Hassan**, Development and validation of a rapid stability indicating chromatographic determination of cefdinir in bulk powder and dosage form using monolithic stationary phase, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 35 (2012) 1638-1648.
- [49] **K. Pietruszka, M. Olejnik, B. Sell**, Development and validation of a liquid chromatography method for determination of nitrofurans in water, *Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, Pulawy*, 2007., str. 267-270.
- [50] **D. S. Patel, N. Sharma, M. C. Patel, B. N. Patel, P. S. Shrivasta**, Quantitation of nitrofurantoin in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Acta Pharmaceutica*, 63 (2013) 141-158.
- [51] **I. T. Hanoon, H. H. Kharnoob**, Determination of nitrofurantoin in drug formulations by high performance liquid chromatography, *Kerbala Journal of Pharmaceutical Sciences*, 6 (2013) 164-178.
- [52] **L. Teng, R. B. Bruce, L. K. Dunning**, Metoclopramide metabolism and determination by high-pressure liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 66 (1997) 1615-1618.
- [53] **M. Yana, H. Li, B. Chenc, X. Liub, Y. Zhua**, Determination of metoclopramide in human plasma by LC-ESI-MS and its application to bioequivalence studies, *Journal of Chromatography B*, 878 (2010) 883-887.
- [54] **A. Waldia, S. Gupta, R. Issarani, B. P. Nagori**, Validated liquid chromatographic method for simultaneous estimation of albendazole and ivermectin in tablet dosage form, *Indian Journal of Chemical Technology*, 15 (2008) 617-620.
- [55] **A. Kulik, W. Bialecka, M. Podolska, B. Kwiatkowska-Puchniarz, A. Mazurek**, HPLC method for identification and quantification of benzimidazole derivatives in antiparasitic drugs, *Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research*, 68 (2011) 823-829.
- [56] **S. R. Shah, S. Dey, P. Pradhan, H. K. Jain, U. M. Upadhyay**, Method development and validation for simultaneous estimation of albendazole and praziquantel in bulk and in a synthetic mixture, *Journal of Taibah University for Science*, 8 (2014) 54-63.

- [57] **J. Landuyt, M. Debackere, F. Delbeke, Q. McKellar**, A High Performance Liquid Chromatographic Method for the Determination of Febantel and its Major Metabolites in Lamb Plasma, *Biomedical Chromatography*, 7 (1993) 78-81.
- [58] **F. L. D. Pontes, R. Pontarolo, F. R. Campos, J. C. Gasparetto, M. A. Cardoso, M. S. Piantavini, A. C. L. Badaro**, Development and validation of an HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of ivermectin, febantel, praziquantel, pyrantel pamoate and related compounds in fixed dose combination for veterinary, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6 (2013) 191-200.
- [59] **S. R. Shah, S. Dey, P. Pradhan, H. K. Jain, U. M. Upadhyay**, Method development and validation for simultaneous estimation of albendazole and praziquantel in bulk and in a synthetic mixture, *Journal of Taibah University for Science*, 8 (2014) 54-63.
- [60] **H. Hashem, A. E. Ibrahim, M. Elhenawee**, A rapid stability indicating LC-method for determination of praziquantel in presence of its pharmacopoeial impurities, *Arabian Journal of Chemistry*, 10 (2017) 35-41.
- [61] **J. Iredale, I. W. Wainer**, Determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in plasma using sequential achiral-chiral high performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography*, 573 (1992) 253-258.
- [62] **H. Fieger, J. Iredale, I. W. Wainer**, Enantioselective determination of hydroxychloroquine and its major metabolites in urine and the observation of a reversal in the (+)/(-)-hydroxychloroquine ratio, *Chirality*, 5 (1993) 65-70.
- [63] **C. Cardoso, P. Bonato**, Enantioselective metabolism of hydroxychloroquine employing rats, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45 (2009) 659-667.
- [64] **M. Soichota, B. Mégarbaneb, P. Houzéc, L. Chevillard, J. Fonsartc**, Development, validation and clinical application of a LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of hydroxychloroquine and its active metabolites in human whole blood, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 100 (2014) 131-137.
- [65] **J. Perčić**, Analiza kemoterapeutika u okolišu kromatografskim metodama, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
- [66] **pH metar Mettler Toledo**, [http://media.mt.com/dam/mt\\_ext\\_files/Product/Product/2/S20\\_SevenEasy\\_pH\\_US\\_eStore\\_Product-Product\\_1155894847959\\_files/SevenEasy\\_S20K\\_1\\_1155894847959\\_jpg.jpeg](http://media.mt.com/dam/mt_ext_files/Product/Product/2/S20_SevenEasy_pH_US_eStore_Product-Product_1155894847959_files/SevenEasy_S20K_1_1155894847959_jpg.jpeg) (pristup 24. srpnja 2017.)
- [67] **Mučkalica IKA, KS 3000i control**, [http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product\\_detail?iProduct=3940000](http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product_detail?iProduct=3940000) (pristup 24. srpnja 2017.)

- [68] **Becton Dickinson BD Discardit II**, <https://www.medisave.co.uk/bd-discardit-5ml-2-piece-eccentric-tip-syringe-box-of-100.html> (pristup 24. srpnja 2017.)
- [69] **FilterBio Labex Ltd**, <http://www.filter-bio.com/syringe-filter/disposable-syringe-filter/syringe-filter-nylon.html> (pristup 24. srpnja 2017.)
- [70] **Rotavapor Büchi R-114**,  
[http://hamiltoninstrument.com/index.php?route=product/product&product\\_id=243](http://hamiltoninstrument.com/index.php?route=product/product&product_id=243) (pristup 24. srpnja 2017.)
- [71] **A. Čović**, *Određivanje farmaceutika u aktivnom mulju*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.



## 6.1. Popis slika

<b>Slika 1.</b> Shematski prikaz toka farmaceutika u okolišu [4] .....	4
<b>Slika 2.</b> Načini priprave čvrstog uzorka [31].....	9
<b>Slika 3.</b> Aparatura za Soxhlet ekstrakciju [34] .....	11
<b>Slika 4.</b> Ultrazvučna ekstrakcija: a) neizravna b) izravna metoda [37].....	12
<b>Slika 5.</b> Shematski prikaz tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti [42] .....	14
<b>Slika 6.</b> Shematski prikaz rada detektora s nizom dioda [43] .....	14
<b>Slika 7.</b> Analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska.....	26
<b>Slika 8.</b> pH metar Mettler Toledo, Seven Easy, Švicarska [66] .....	26
<b>Slika 9.</b> Usitnjavanje špikanog sedimenta u tarioniku.....	27
<b>Slika 10.</b> Mućkalica IKA, KS 3000 i control, Njemačka [67].....	27
<b>Slika 11.</b> Šprica od 5 mL, Becton Dickinson BD Discardit II, Indija [68].....	27
<b>Slika 12.</b> Filteri za šprice, FilterBio, Labex Ltd., Kina [69].....	28
<b>Slika 13.</b> Rotavapor BÜCHI R-114, Švicarska i vodena kupelj BÜCHI Waterbath B-480, Švicarska [70].....	28
<b>Slika 14.</b> Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, Varian ProStar 500, SAD.....	29
<b>Slika 15.</b> Iskorištenje ekstrakcije sa čistim otapalima s 0,3 grama uzorka.....	33
<b>Slika 16.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:voda, (1:1), metanol:acetonitril, (1:1), metanol:pufer (pH 4), (1:1) i metanol:pufer (pH 7), (1:1) s 0,3 grama uzorka.....	34
<b>Slika 17.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:acetonitril u omjerima 1:1, 4:1, 1:4 i sustavu metanol:voda, (4:1) s 0,3 grama uzorka.....	34
<b>Slika 18.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:acetonitril:voda u omjerima 1:1:1, 3:1:1, 1:3:1 i 1:1:3 s 0,3 grama uzorka .....	35
<b>Slika 19.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:heksan i acetonitril:heksan u omjerima 20:80, 50:50 i 80:20 s 0,3 grama uzorka.....	36
<b>Slika 20.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:heksan, (1:1), aceton:metanol, (1:1), aceton:heksan, (1:1), aceton:voda, (1:1) i aceton:acetonitril, (1:1) s 0,7 grama uzorka.....	36
<b>Slika 21.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavima aceton:metanol, (4:1) i aceton:metanol, (1:4) s 0,7 grama uzorka.....	37
<b>Slika 22.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:heksan, (1:1) s 0,3 grama uzorka te vremenom trajanja ekstrakcije od: 30 min, 60 min i 90 min .....	38
<b>Slika 23.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:heksan, (1:1), s masom uzorka od: 0,1 gram, 0,3 grama, 0,5 grama i 0,7 grama.....	38
<b>Slika 24.</b> Iskorištenje ekstrakcije s vodom kao čistim otapalom s 0,7 grama uzorka pri pH vrijednostima 2, 5, 7 i 9.....	39
<b>Slika 25.</b> Iskorištenje ekstrakcije u sustavu metanol:voda, (1:1) s 0,3 grama uzorka pri pH vrijednostima 2, 7 i 9.....	39

## 6.2. Popis tablica

<b>Tablica 1.</b> Klasične metode pripreme čvrstih uzoraka i princip rada [33] .....	10
<b>Tablica 2.</b> Moderne metode pripreme čvrstih uzoraka i princip rada [33].....	12
<b>Tablica 3.</b> Pregled literature za ispitivane farmaceutike .....	15
<b>Tablica 4.</b> Mehanički sastav sedimenta.....	23
<b>Tablica 5.</b> Higroskopnost sedimenta po Mitscherlichu.....	23
<b>Tablica 6.</b> pH reakcije sedimenta .....	23
<b>Tablica 7.</b> Kapacitet i stanje zasićenosti adsorpcijskog kompleksa .....	24
<b>Tablica 8.</b> Određivanje karbonata .....	24
<b>Tablica 9.</b> Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija .....	24
<b>Tablica 10.</b> Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanih farmaceutika .....	25
<b>Tablica 11.</b> Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-DAD analizama.....	30
<b>Tablica 12.</b> Valne duljine pri kojima su očitane površine kromatografskih krivulja i vrijeme zadržavanja svakog farmaceutika za koncentraciju od 50 mg/L .....	32

## 6.3. Popis simbola i kratica

$A_{i,E}$  – površina kromatografske krivulje analita iz ekstrakta

$A_{i,STD}$  – površina kromatografske krivulje analita u standardnoj otopini

atm – atmosfera, mjerna jedinica za tlak

ATP – adenzin-trifosfat

CAS – jedinstveni identifikacijski broj određene kemijske tvari

DAD – detektor s nizom dioda (eng. *Diode array detector*)

GC – plinska kromatografija (eng. *Gas Chromatography*)

GERB – gastroezofagealna refluksna bolest

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*)

$I$  – iskorištenje ekstrakcije

IC – ionska kromatografija (eng. *ion chromatography*)

$K_{ow}$  – koeficijent razdjeljenja analita između oktanol i vode

$\lambda$  – valna duljina

LC – tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*)

MAE – ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (eng. *microwave assisted extraction*)

MS – spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*)

MSPD – ekstrakcija raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu (eng. *matrix solid phase dispersion*)

$pK_a$  – negativni logaritam konstante disocijacije kiseline

RPC – kromatografija obrnutih faza (eng. *reversed phase chromatography*)

$S$  – topljivost analita u vodi

SFE – ekstrakcija superkričnim fluidom (eng. *supercritical fluid extraction*)

SPE – ekstrakcija čvrstom fazom (eng. *solid phase extraction*)

$t_R$  – vrijeme zadržavanja otopljene komponente

UV/Vid – ultraljubičasto/vidljivo

## **7. ŽIVOTOPIS**

████████████████████ Osnovnu školu Dinka Šimunovića završila sam u Hrvacama. 2010. godine upisala sam Gimnaziju Dinka Šimunovića u Sinju koju završavam 2014. godine te iste godine upisujem Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Primijenjena kemija. Stručnu praksu odradila sam u Medicinsko-biokemijskom laboratoriju Vesna Romić u Sinju.

2016. godine pohađala sam radionicu „Osiguranje kvalitete antikorozivne zaštite (AKZ) premazima i prevlakama“ u trajanju od 5 sati koju je vodila prof. dr. sc. Sanja Martinez.

2017. obavljala sam dužnost demonstratorice na Zavodu za opću i anorgansku kemiju u sklopu kolegija Anorganska kemija. Iste godine prisustvovala sam radionici „Upoznajmo 3D tiskanje“ pod vodstvom doc. dr. sc. Domagoja Vrsaljka te 27-satnom stručnom seminaru „I love rock'n'oil“ u organizaciji studentske udruge BEST. Od samog osnutka članica sam Studentske sekcije HDKI-a.

Od stranih jezika služim se engleskim, u jeziku i pismu, te posjedujem DELF/DALF diplomu, na temelju položene A2 razine francuskog jezika. Aktivno koristim Microsoft Office programski paket te sam upoznata s radom u Matlabu.