

Hidrolitička razgradnja norfloksacina u okolišu

Grošić, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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:149:524364>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Karla Grošić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Karla Grošić

HIDROLITIČKA RAZGRADNJA NORFLOKSACINA U OKOLIŠU

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitne komisije: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

v. pred. dr. sc. Lidija Furač

Zagreb, rujan 2020.

*Zahvaljujem svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pomoći i savjetima koji su mi pomogli
tijekom izrade ovog rada.*

Zahvaljujem svojoj obitelji i prijateljima na pruženoj podršci i strpljenju.

SAŽETAK

Cilj ovoga rada bio je proučiti hidrolitičku razgradnju norfloksacina u okolišu. Proizvodnja i potrošnja farmaceutika sve više raste čime je njihova koncentracija u okolišu sve veća. Kada farmaceutik dođe u okoliš izložen je različitim čimbenicima iz okoliša koji mogu dovesti do njegove razgradnje prilikom čega mogu nastati toksični razgradni produkti. Iz tog razloga je veoma bitno promatrati razgradnju farmaceutika u okolišu. Na samom početku potrebno je utvrditi kako farmaceutici dolaze u okoliš i koji su mogući putevi njihove razgradnje u okolišu što je navedeno u općem djelu rada. Nakon toga slijedi pregled literature u kojem su opisani radovi u kojima je istražena hidrolitička razgradnja norfloksacina i drugih farmaceutika. Svaki članak proučava hidrolitičku razgradnju različitih farmaceutika uz različite eksperimentalne uvjete, primjenu različitih kromatografskih metoda za praćenje razgradnje te različitih načina detekcije.

Ključne riječi: hidrolitička razgradnja, farmaceutik, norfloksacin, razgradni produkti, okoliš, kromatografija

ABSTRACT

This thesis aimed to study hydrolytic degradation of norfloxacin in the environment. Production and consumption of pharmaceuticals is growing more and more whereby their concentration in the environment is bigger. When pharmaceuticals come in the environment they are exposed to different environmental factors which can lead to their degradation and results with toxic degradation products. Because of that, it is very important to monitor the degradation of pharmaceuticals in the environment. In the beginning it is needed to determine pharmaceutical pathways into the environment and possible ways of their degradation in the environment, which is stated in the general part in this thesis. After that, review of the literature investigating hydrolytic degradation of norfloxacin and other pharmaceuticals is presented. Each article study hydrolytic degradation of different pharmaceuticals with different experimental conditions, using different chromatographic methods for monitoring the degradation and different detection.

Keywords: hydrolytic degradation, pharmaceutical, norfloxacin, degradation products, environment, chromatography

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Farmaceutici u okolišu	2
2.2. Ponašanje farmaceutika u okolišu	5
2.2.1. Sorpcija	5
2.2.2. Biološka razgradnja	6
2.2.3. Hidrolitička razgradnja	7
2.2.4. Fotolitička razgradnja	7
3. PREGLED LITERATURE	11
3.1. Hidrolitička razgradnja farmaceutika u okolišu	11
3.2. Analitičke metode	18
4. OSVRT	25
5. ZAKLJUČAK	28
6. LITERATURA	29

1. UVOD

Farmaceutici su kompleksne molekule različitih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava koje se koriste u dijagnozi, liječenju i prevenciji bolesti kako kod ljudi tako i kod životinja. Postoje različiti načini kojima farmaceutici dospijevaju u okoliš. Jedan od glavnih izvora farmaceutika u okolišu su postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Također, u okoliš dospijevaju ispuštanjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda, nepropisnim odlaganjem neiskorištenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja. Na te načine farmaceutici dospijevaju u tlo, podzemne vode, površinske i pitke vode. Koncentracija farmaceutika u okolišu ovisi o njihovoj potražnji, potrošnji i ponašanju u okolišu. Stoga su antibiotici, u koje spadaju fluorokinoloni, detektirani širom svijeta u otpadnim vodama, sedimentima i tlu, te u vodama iz slavine i oceanima pri niskim koncentracijama u rasponu od ng L^{-1} do mg L^{-1} .

Dospijevanjem farmaceutika u okoliš može doći do strukturnih promjena koje su rezultat abiotičkih (hidroliza, fotoliza) i biotičkih (biorazgradnja pomoću bakterija i gljivica) procesa. Posljedica djelovanja navedenih procesa je smanjenje koncentracije početne molekule te nastanak novih spojeva

Važan abiotički proces razgradnje farmaceutika u prirodnim vodama je hidroliza, osobito za one farmaceutike koji su se pokazali otpornima na razgradnju mikroorganizmima. Također, može biti značajna za smanjenje koncentracije farmaceutika u okolišu. Literaturnih podataka o hidrolitičkoj stabilnosti farmaceutika odnosno nestabilnosti je vrlo malo. Stoga je cilj ovog rada dati pregled radova koji se bave ovom tematikom te njihova usporedba radi daljnjeg napretka istraživanja.

2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici u okolišu

Farmaceutici su spojevi koji se upotrebljavaju za liječenje ili sprječavanje bolesti ljudi i životinja te kao promotori rasta u veterinarskoj medicini [1]. Farmaceutici uključuju preko tisuću jedinstvenih i raznolikih kemijskih spojeva koji posjeduju različita svojstva od bioaktivnosti, polarnosti do optičke aktivnosti. Naime, uža definicija farmaceutika isključuje OTC lijekove (eng. *over-the-counter*, OTC), sredstva za dijagnostiku, nutricionističke i dijetalne dodatke, nedopuštene lijekove, kozmetiku ili lijekove koji nisu neophodni u medicinske svrhe i široku paletu proizvoda za osobnu njegu [2].

Posljedica upotrebe farmaceutika je njihova prisutnost u okolišu. U istraživanjima okoliša pozornost više nije usmjerena samo na konvencionalna prioritetna zagađivala (poput polikloriranih bifenila i policikličkih aromatskih ugljikovodika) nego i na spojeve koji su odnedavno prepoznati kao potencijalno štetni za okoliš. Jednu od najvažnijih skupina takvih zagađivala čine farmaceutici i sredstva za osobnu higijenu (eng. *pharmaceuticals and personal care products*, PPCP) [3]. PPCP-i ne uključuju samo izvorni oblik kemikalije nego i njene bioaktivne metabolite i razgradne produkte. Koncentracija PPCP-a u okolišu može značajno varirati ne samo između država, već i između različitih lokacija unutar države [2]. Iako prisutni u niskim koncentracijama, kontinuiran unos farmaceutika u okoliš kao vrlo kompleksnih smjesa može rezultirati većim koncentracijama, dugoročnim i negativnim utjecajima na vodene i kopnene organizme (npr. etinil-estradiol, β -estradiol i diklofenak) [1].

Farmaceutici se unose u okoliš putem izlučevina, nepropisnim odlaganjem neupotrijebljenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja te upotrebom u akvakulturi kao dodatak prehrani, čime se izravno unose u vodu [1]. Izvori farmaceutika mogu se podijeliti u dvije skupine:

- 1.) točkasti i
- 2.) difuzni.

Naime, točkasti izvori odnose se na zagađivala ispuštena sa specifične lokacije (npr. ispusti kao posljedica industrijskih aktivnosti) dok se difuzni izvori odnose se na nejasne izvore, tj. one koji se prostiru na većim površinama (npr. ispiranje tla u područjima u kojima se primjenjuju gnojiva) [4]. Najvećim izvorom farmaceutika u okoliš smatraju se postrojenja za obradu otpadnih voda. U nekim

slučajevima izmjerena je veća koncentracija farmaceutika na izlaznom toku postrojenja za obradu otpadnih voda nego na ulaznom toku, što se može povezati s pretvorbom metabolita u početni spoj. Prema tome, neučinkovitim uklanjanjem u postrojenjima za obradu otpadnih voda farmaceutici dopijevaju u okoliš putem vodenih tokova kao i putem aktivnog mulja [1]. U *tablici 1.* prikazane su koncentracije različitih farmaceutika u različitim uzorcima iz okoliša.

Tablica 1. Koncentracije nekih farmaceutika određenih u uzorcima iz okoliša

FARMACEUTIK	KONCENTRACIJA	MATICA	LITERATURA
Ciprofloksacin	249 - 405 ng L ⁻¹	otpadna voda iz kućanstva/Švicarska	[5]
Norfloksacin	45 - 120 ng L ⁻¹	otpadna voda iz kućanstva/Švicarska	[5]
Enrofloksacin	0.007 - 0.085 ng L ⁻¹	otpadna voda iz postrojenja za obradu otpadnih voda/Japan	[5]
Levofloksacin	0.981 ng L ⁻¹	otpadna voda iz postrojenja za obradu otpadnih voda/Japan	[5]
Ofloksacin	0.110 - 1 ng L ⁻¹	otpadna voda iz postrojenja za obradu otpadnih voda/USA	[5]
Klortetraciklin	2 - 17 µg mL ⁻¹	biljno tkivo	[6]
Sulfametazin	2 - 17 µg mL ⁻¹	biljno tkivo	[6]
Acetilsalicilna kis.	30 - 37.2 ng L ⁻¹	riječna voda /Rumunjska	[7]
Diklofenak	200 - 3600 ng L ⁻¹	obrađena kanalizacijska voda/Španjolska	[7]
Ibuprofen	100 - 1200 ng L ⁻¹	obrađena kanalizacijska	[7]

FARMACEUTIK	KONCENTRACIJA	MATICA	LITERATURA
		voda/Kanada	
Indometacin	30 - 430 ng mL ⁻¹	obrađena kanalizacijska voda /Kanada	[7]
Ketoprofen	9.6 ng mL ⁻¹	otpadna voda iz bolnice/Tajvan	[7]
Mefenamična kis.	4.45 - 396 ng mL ⁻¹	kanalizacijska voda/Japan	[7]
Naproksen	< 26 ng mL ⁻¹	voda za piće/ Slovenija	[7]
Paracetamol	610 ng mL ⁻¹	rijeka Sava/Srbija	[7]

Naime, antibiotici, u koje spadaju fluorokinoloni, detektirani su širom svijeta u otpadnim vodama, sedimentima i tlu, te u vodama iz slavine i oceanima s niskim koncentracijama u rasponu od ng L⁻¹ do mg L⁻¹ [5]. Kao što je vidljivo u *tablici 1*, koncentracije farmaceutika u vodenom okruženju su reda veličine ng mL⁻¹. Također, vidljivo je da se veće vrijednosti koncentracija mogu očekivati u otpadnim vodama, kanalizacijskim vodama i izlaznim strujama postrojenja za obradu otpadnih voda. Nešto manje vrijednosti koncentracija uočene su u uzorcima riječne vode, ovisno o lokaciji, te najmanje vrijednosti koncentracija u pitkoj vodi.

Norfloksacin je sintetički fluorokinolon antibiotske aktivnosti te širokog spektra djelovanja. Djeluje na način da inhibira aktivnost DNA giraze i na taj način blokira replikaciju bakterijske DNA [8]. Kao i svi farmaceutici, fluorokinoloni u okoliš ulaze putem izlučevina ili njegovim nepropisanim odlaganjem [1]. Ostatci fluorokinolona u okolišu, poput ciprofloksacina i norfloksacina, su zabrinjavajući jer mogu dovesti do razvoja otpornosti potencijalno patogenih bakterija na antibiotike. Norfloksacin je fluorokinolon koji se koristi u liječenju nekoliko bakterijskih bolesti, uključujući infekcije mokraćnog sustava kod ljudi, enteritis kod pasa i kronične respiratorne bolesti kod pilića [9]. Biorazgradnja, sorpcija, fotorazgradnja i hidroliza glavni su potencijalni putevi razgradnje farmaceutika u prirodnoj vodi. Međutim, treba imati na umu da ovi procesi (osim sorpcije) mogu dovesti ne samo do smanjenja koncentracije norfloksacina u okolišu, već i do njegove transformacije. Novonastali spojevi mogu biti toksičniji od samog norfloksacina [10].

2.2. Ponašanje farmaceutika u okolišu

Za procjenu ponašanja i sudbine farmaceutika u okolišu važno je poznavati njihova fizikalno-kemijska svojstva kao što su koeficijent razdiobe oktanol/voda (K_{ov}), koeficijent razdiobe (K_d), konstanta ionizacije (K_k) te koeficijent sorpcije na organski ugljik (K_{oc}). Navedena fizikalno-kemijska svojstva određuju sorpciju farmaceutika na tlo i sediment te procese koji vode do smanjenja koncentracije farmaceutika u okolišu [1]. Naime, farmaceutici prisutni u okolišu podliježu različitim procesima koji vode smanjenju njihove koncentracije [11], a oni se dijele na:

- 1.) abiotičke i
- 2.) biotička procese [1].

Pod biotičke procese ubraja se biorazgradnja pomoću bakterija i gljivica. Abiotička razgradnja podrazumijeva hidrolizu i fotolizu [11].

2.2.1. Sorpcija

Jedan od važnih procesa smanjenja koncentracije farmaceutika u vodenoj fazi je sorpcija. Postoje različiti mehanizmi sorpcije farmaceutika. Sorpcija farmaceutika na tlo i sediment ne ovisi samo o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima (K_d , K_{oc} , K_{ov} , K_k) nego i o tipu matice (udio organske tvari i minerala) kao i uvjetima okoliša (pH, temperatura) [1]. Ovisno o vrijednosti koeficijenata, različiti antibiotici imaju različite afinitete za sorpciju na čvrstu fazu, čime se određuje njihova pokretljivost u okolišu. Pokretljivost kroz tlo ukazuje na različito kretanje antibiotika kroz tlo do podzemnih voda te na njihovo rasprostranjivanje prilikom površinskih optjecanja [6]. Kako isti farmaceutici u različitim čvrstim uzorcima imaju različite vrijednosti K_d , za predviđanje njihova ponašanja u okolišu preporučuje se korištenje vrijednosti K_{oc} . Naime, sorpcija farmaceutika ne ovisi samo o postotku organske tvari nego i o ionskom obliku farmaceutika pri vrijednostima pH značajnima za okoliš. Kod promjene pH dolazi do protoniranja ili deprotoniranja ionizirajućih farmaceutika, time se mijenjaju njihova fizikalno-kemijska svojstva te sklonost sorpciji [1, 12]. Sorpcija farmaceutika na čvrstu maticu ovisi i o ionskoj jakosti, npr. fluorkinoloni koji mogu tvoriti komplekse s viševalentnim kationima [1]. Također, sorpcija spojeva uvelike ovisi o kemijskoj strukturi spoja. Neki farmaceutici sadrže planarne aromatske strukture koje su povoljne za interakcije s npr. slojevima minerala gline. Farmaceutici se mogu taložiti u obliku biofilma (kanalizacijske cijevi), flokulama mulja ili na suspendiranim česticama u rijekama i jezerima.

Ponašanje i učinci farmaceutika u takvim biokrutinama visoke gustoće i posebnim uvjetima još nije dovoljno istraženo. Dakle sorpcija spojeva ne ovisi samo o $\log K_{ow}$ već i o pH, redoks potencijalu, stereokemijskoj strukturi te prirodi sorbensa i sorbirane molekule [13].

2.2.2. Biološka razgradnja

Biološka razgradnja farmaceutika ovisi o mikroorganizama, konkretno o bakterijama i gljivicama. Gljivice su važne za razgradnju farmaceutika u tlu, dok su za njihovu biološku razgradnju u podzemnim i površinskim vodama odgovorne bakterije. Mikroorganizmi farmaceutike koriste kao izvor energije te kao gradivne blokove za svoj rast [1]. Osim kataboličke razgradnje pri kojoj se farmaceutici upotrebljavaju kao jedini izvor ugljika i energije, postoji i kometabolička razgradnja u prisutnosti prikladnog supstrata za rast (acetat, metanol, glukoza). Naime, svi navedeni supstrati ubrzavaju biološku razgradnju farmaceutika među kojima su huminske kiseline najpogodniji supstrat [14]. Koja će od dva navedena tipa biološke razgradnje, katabolička ili kometabolička, prevladavati ovisi o početnoj koncentraciji farmaceutika. Ako je koncentracija farmaceutika velika prevladava katabolička razgradnja, dok kad je koncentracija farmaceutika niska prevladava kometabolička razgradnja. Rezultat biološke razgradnje može biti djelomična razgradnja farmaceutika ili njihova potpuna mineralizacija do ugljikova dioksida i anorganskih soli poput sulfata i nitrata [1].

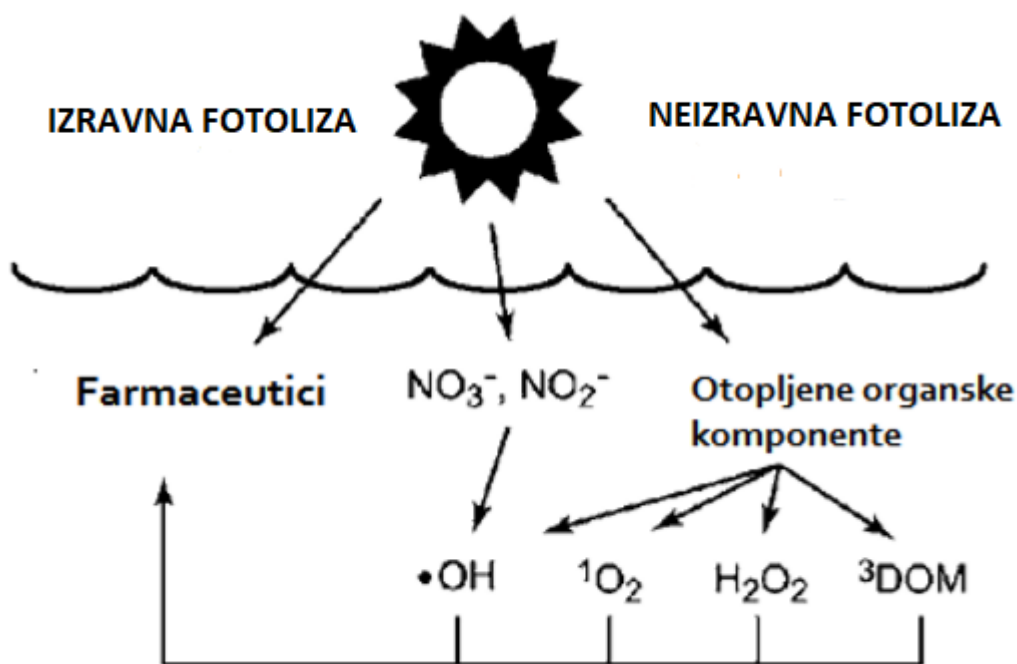
Kao što je već spomenuto u prethodnom tekstu, norfloksacin je sintetički fluorokinolon antibiotske aktivnosti. Ostatci fluorokinolona u okolišu, poput ciprofloksacina i norfloksacina, su zabrinjavajući jer mogu dovesti do razvoja otpornosti potencijalno patogenih bakterija na antibiotike. Iz tog razloga provede se istraživanja biološke razgradnje lijekova pomoću određenih bakterija. Uočeno je da norfloksacin brzo ulazi u mikrobakterijske stanice jednostavnom difuzijom. Također, otpornost sojeva bakterija može se djelomično objasniti njihovom sposobnosti da razgrađuju norfloksacina. Iz istraživanja je zaključeno da nekoliko *Mycobacterium sp* sojeva biološki razgrađuju norfloksacin N-acetilacijom te kod nekih i N-nitrazacijom. U konačnici je zaključeno da biološka razgradnja smanjuje antibakterijsko djelovanje norfloksacina [15].

2.2.3. Hidrolitička razgradnja

Još jedan važan abiotički proces razgradnje farmaceutika u prirodnim vodama je hidroliza, osobito za one koji su se pokazali otpornim na razgradnju mikroorganizmima [6]. Literaturnih podataka o hidrolitičkoj stabilnosti farmaceutika odnosno nestabilnosti je vrlo malo. Razgradnja hidrolizom pokazala se vrlo značajnom u slučaju β -laktamskih antibiotika gdje do otvaranja β -laktamskog prstena (npr. kod penicilina) može doći zbog hidrolize ili djelovanja β -laktamaze, enzima prisutnog kod bakterija [16]. Također, postoje znanstvena istraživanja o hidrolitičkoj stabilnosti sulfonamida. Naime, prema jednim istraživanjima navedeni antibiotici su hidrolitički stabilni, dok su prema drugima nestabilni. Prema preporukama Europske agencije za lijekove (eng. *European Medicines Agency*, EMA) i američke Uprave za hranu i lijekove (eng. *Food and Drug Administration*, FDA) laboratorijska ispitivanja za utvrđivanje hidrolitičke stabilnosti farmaceutika u vodi pri vrijednostima pH koja su značajna za okoliš (pH 4 - 9) trebala bi se provoditi prema postupku 111 OECD-a [1].

2.2.4. Fotolitička razgradnja

Ako farmaceutik pokaže otpornost na razgradnju hidrolizom i biološku razgradnju, još jedan način njihove razgradnje je abiotički proces fotoliza (fotolitička razgradnja). Fotolitička razgradnja je razgradnja molekule pri izlaganju Sunčevom zračenju. Ona može biti izravna koja se uglavnom javlja u čistim površinskim vodama ili neizravna. Naime, neizravna fotolitička razgradnja javlja se u zamućenim vodama, rijekama ili jezerima koja su u sjeni drveća ili ako su spojevi prekriveni sedimentom ili tlom te ne dolazi do razgradnje zbog nedostatka Sunčeve svjetlosti (*slika 1*) [1].

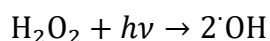
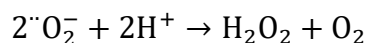
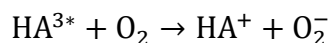
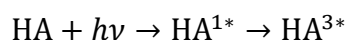


Slika 1. Izravna i neizravna fotoliza u vodenim sustavima [2]

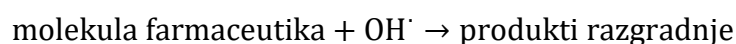
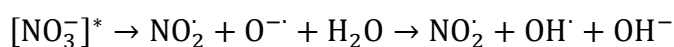
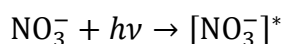
Farmaceutici posjeduju aromatske prstenove, π -konjugirane sustave, heteroatome te druge funkcionalne kromoforne skupine koje su odgovorne za apsorpiranje Sunčevog zračenja. Uz navedene skupine neki farmaceutici imaju skupine poput nitro, fenolnih i naftoksilnih koje su vrlo slične skupinama u pesticidima za koje je pokazano da su podložni fotolitičkoj razgradnji. Naime, ako se apsorpcijski spektar farmaceutika preklapa s apsorpcijskim spektrom Sunčevog zračenja tada je farmaceutik podložan fotolitičkoj razgradnji [17]. Prilikom apsorpcije fotona molekula prelazi u pobuđeno stanje u kojem se odvijaju različiti fizikalni i kemijski relaksacijski procesi nakon čega se vraća u početno stanje. Upravo oni procesi koji uzrokuju kemijsku promjenu u početnoj molekuli te time vode do smanjenja koncentracije su ključni za fotolitičku razgradnju farmaceutika [1].

Učinkovitost fotolitičke razgradnje ne ovisi samo o apsorpcijskom spektru nego i o njegovom kvantnom prinosu. Kvantni prinos (Φ) je omjer množine potrošenog reaktanta (početne molekule farmaceutika) ili nastalog produkta i množine apsorbiranih fotona. Vrijednosti kvantnog prinosa kreću se između 0 i 1. Vrijednosti između 0.0001 i 0.1 karakteristične su za spojeve koji se razgrađuju pod utjecajem Sunčeva zračenja u nekom razumnom vremenskom periodu (vrijeme poluraspada od nekoliko minuta do nekoliko dana) [1].

I sama struktura farmaceutika jako utječe na njegovu fotolitičku razgradnju. Farmaceutici koji pripadaju istoj skupini ili su slične strukture mogu se ponašati sasvim različito. Za farmaceutike koji apsorbiraju Sunčevo zračenje (290 – 800 nm) izravna fotolitička razgradnja predstavlja značajan put njihove razgradnje. Kako bi ispitali izravnu fotolitičku razgradnju provode se eksperimenti u deioniziranoj vodi u koju se dodaje određena koncentracija farmaceutika. Naime, zbog otopljenih organskih tvari i nitratnih iona fotolitička razgradnja u različitim uzorcima vode drukčija je nego fotolitička razgradnja u deioniziranoj vodi [1]. Glavni predstavnik otopljenih organskih tvari su huminske kiseline (HA). One apsorbiraju UV-zračenje u širokom području valnih duljina uzrokujući sporiju fotolitičku razgradnju farmaceutika. Huminske kiseline pod utjecajem UV-zračenja prelaze u pobuđeno stanje ($^3\text{HA}^*$). U tom stanju izravno reagiraju s molekulama farmaceutika te time ubrzavaju njihovu razgradnju ili reagiraju s kisikom prilikom čega stvaraju hidroksilne radikale ($^{\bullet}\text{OH}$) i druge reaktivne vrste poput superoksida (O_2^-) te singletnog kisika $\text{O}_2(^1\Delta_g)$ [1]:



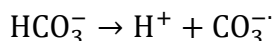
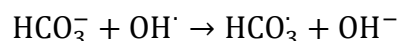
Nitritni ioni stvaraju vrlo reaktivne radikale $^{\bullet}\text{OH}$ ($> 280 \text{ nm}$), koji u konačnici reagiraju s molekulom farmaceutika [1, 18]:



Naime, za neizravnu fotolitičku razgradnju karakteristične su reakcije molekula farmaceutika s reaktivnim vrstama pri čemu dolazi do njihove razgradnje [1].

Za farmaceutike čiji se apsorpcijski spektri slabo preklapaju sa spektrom Sunčeva zračenja ili su otporni na izravnu fotolitičku razgradnju te imaju niski kvantni prinos, neizravna fotolitička razgradnja je važan proces njihove razgradnje. Ona se ispituje u prirodnim vodama ili sintetski pripremljenoj vodi [19].

Kako se prirodne vode razlikuju po sastavu i koncentraciji prisutnih tvari, važno je ispitati utjecaj koncentracije pojedinih sastojaka vode na fotolitičku razgradnju farmaceutika. Provođenjem znanstvenih istraživanja utvrđeno je da veće koncentracije nitrata i huminskih kiselina mogu rezultirati kraćim ili duljim vremenima poluraspada, ovisno o farmaceutiku koji se istražuje. Također, drugi anorganski ioni prisutni u prirodnim vodama, poput kloridnih, fosfatnih, sulfatnih i hidrogenkarbonatnih mogu utjecati na fotolitičku razgradnju farmaceutika. Tako hidrogenkarbonatni ioni vežu radikale $\cdot\text{OH}$, pri čemu nastaju radikali $\cdot\text{CO}_3^-$ koji su selektivniji i manje reaktivni od radikala $\cdot\text{OH}$ [1]:



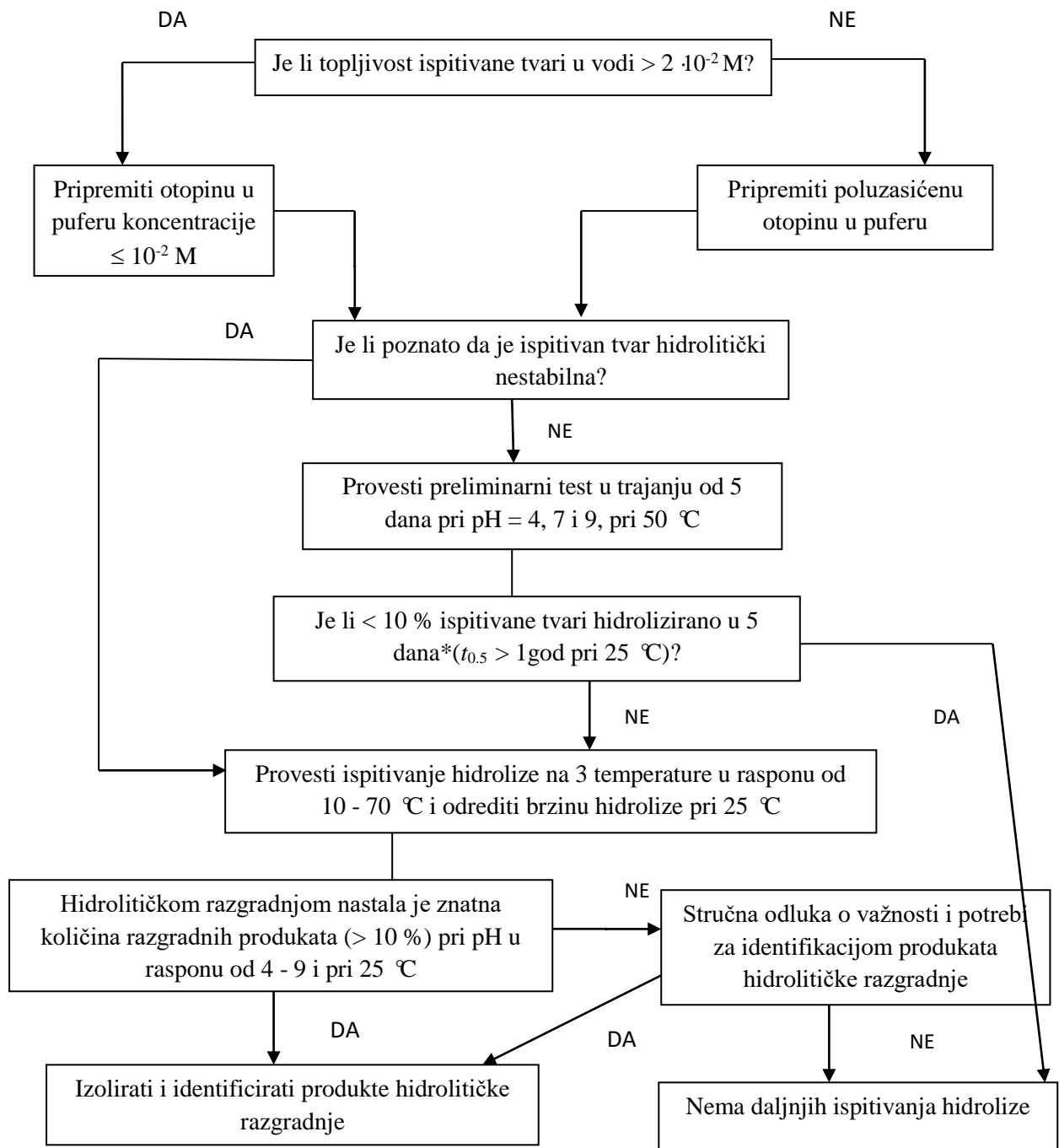
Brzina fotolitičke razgradnje farmaceutika može ovisiti i o koncentraciji samog farmaceutika te o pH-vrijednosti prirodnih voda. Općenito, povećanje koncentracije farmaceutika vodi smanjenju brzine fotolitičke razgradnje [1, 20]. Osim spomenutih čimbenika koji utječu na fotolitičku razgradnju farmaceutika u prirodnim vodama, vrlo važni čimbenici su i dubina vode, geografska širina, godišnje doba, vremenski uvjeti (sunčani i oblačni dani), intenzitet Sunčeva zračenja.

Fotolitička razgradnja farmaceutika može rezultirati stabilnijim i toksičnijim produktima u odnosu na početnu molekulu farmaceutika. Također, nakon potpune razgradnje početne molekule farmaceutika razgradni produkti ostaju prisutni u otopini, čime potencijalno mogu imati negativan učinak na okoliš. Iz tog razloga važno je identificirati i utvrditi strukture razgradnih produkata [1].

3. PREGLED LITEARATURE

3.1. Hidrolitička razgradnja farmaceutika u okolišu

Farmaceutici prisutni u površinskim vodama mogu biti podložni različitim procesima razgradnje. Jedan takav proces je hidroliza. Na *slici 2* shematski je prikazan postupak ispitivanja hidrolitičke razgradnje u vodenim sustavima s pH-vrijednostima karakterističnim za okoliš (pH 4 - 9) [21].



Slika 2. Shematski prikaz postupka ispitivanja hidrolitičke razgradnje [21]

(* Stupanj hidrolize ispitivane tvari od 10 % pri 50 °C odgovara vremenu poluraspada približno 30 dana, što je ekvivalentno vremenu poluraspada od približno 1 godina na 25 °C.)

U *tablici 2* prikazana je pregledana literatura u kojoj su opisana istraživanja vezana uz hidrolitičku razgradnju farmaceutika.

Tablica 2. Popis farmaceutika i eksperimentalni uvjeti obuhvaćeni u pregledu literature

FARMACEUTIK	KONCENTRACIJA	MATICA	EKSPERIMENTALNI UVJETI	LITERATURA
Kloramfenikol	5 mg L ⁻¹	površinska voda	pH 4 - 9 <i>t</i> = 25 °C, 50 °C i 60 °C	[22]
Florfenikol	5 mg L ⁻¹	površinska voda	pH 4 - 9 <i>t</i> = 25 °C, 50 °C i 60 °C	[22]
Spiramicin	5 mg L ⁻¹	površinska voda	pH 4 - 9 <i>t</i> = 25 °C, 50 °C i 60 °C	[22]
Tilozin	5 mg L ⁻¹	površinska voda	pH 4 - 9 <i>t</i> = 25 °C, 50 °C i 60 °C	[22]
Sulfonamidi (SA)	1 mg L ⁻¹	riječna voda	pH 4, 7 i 9 <i>t</i> = 20 °C, 40 °C, 50 °C i 70 °C	[23]
4 farmaceutika i 10 metabolita	10 mg L ⁻¹	površinska voda	pH 4 - 9 <i>t</i> = 20 °C, 50 °C i 70 °C	[24]
Amokscilin	0.1 Mm	otpadna voda	pH 3,7 i 11 <i>t</i> = 30 °C	[25]
Beta-blokatori	1 mg L ⁻¹	riječna voda	pH 4,7 i 9 <i>t</i> = 25 °C	[26]
Ceftiofur (CEF) Cefapirin (CEPA)	70 μM	površinske vode	pH 1 - 12.5 <i>t</i> = 22 ± 1 °C u tami	[27]

U članku autora *S. M. Mitchell* i sur. [22] utvrđena je brzina hidrolize i Arrheniusova konstanta kao funkcija pH i temperature za dva amfenikola (kloramfenikol i fluorfenikol) te dva mikrolida (spiramicin i tilozin). Brzina hidrolize antibiotika kvantificirana je u puferkim otopinama pri pH u rasponu od 4 - 9 i pri temperaturama od 25 °C, 50 °C i 60 °C, te su detektirani produkti hidrolitičke razgradnje. Analitička metoda koja se koristila za određivanje hidrolitičke razgradnje antibiotika je modificirana EPA HPLC/MS/MS metoda, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana sa spektrometrijom masa (eng. *high pressure liquid chromatography-tandem*

mass spectrometry, HPLC/MS/MS). Naime, svi ispitivani antibiotici ostali su stabilni i nisu se hidrolitički razgradili pri uvjetima tipičnim za vodene ekosustave. Kiselo i bazno katalizirana hidroliza odvija se pri povišenim temperaturama (50 °C – 60 °C). Vrijednost brzine hidrolize značajno se povećava ispod pH 5 i iznad pH 8. Također, iz podataka navedenih u *tablici 3* može se zaključiti da dolazi do porasta brzine hidrolize porastom temperature za 10 °C. Na temelju masa razgradnih produkata utvrđeno je da su sljedeće funkcionalne skupine bile podvrgnute hidrolizi: alkil fluoridi, amidi i ciklički esterski (laktonski) ostaci. Ovim istraživanjem dokazano je da amfenikolni i mikrolidni antibiotici nisu podložni hidrolitičkoj razgradnji. Rezultat toga je da su navedeni antibiotici prisutni u vodenim ekosustavima pri pH-vrijednostima tipičnim za prirodne vode [22].

Tablica 3. Vrijednosti konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) [22]

FARMACEUTIK	KONSTANTA BRZINE RAZGRADNJE (k)	VRIJEME POLURASPADA ($t_{1/2}$)	DETEKTIRANI RAZGRADNI PRODUKTI
Kloramfenikol	$k(25\text{ °C}) = 2554.9989\text{ d}^{-1}$ $k(50\text{ °C}) = 4436.000\text{ d}^{-1}$ $k(60\text{ °C}) = 2883.033\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(25\text{ °C}) = \text{nema razgradnje}$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = 407\text{ d}$ $t_{1/2}(60\text{ °C}) = 20.4\text{ d}$	1 produkt razgradnje
Florfenikol	$k(25\text{ °C}) = 834.999\text{ d}^{-1}$ $k(50\text{ °C}) = 4796.998\text{ d}^{-1}$ $k(60\text{ °C}) = 9640.015\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(25\text{ °C}) = \text{nema raz.}$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = \text{nema raz.}$ $t_{1/2}(60\text{ °C}) = 38.1\text{ d}$	5 produkata razgradnje (alkil fluoridni produkti)
Spiramicin	$k(25\text{ °C}) = 1162.999\text{ d}^{-1}$ $k(50\text{ °C}) = 7329.994\text{ d}^{-1}$ $k(60\text{ °C}) = 8920.014\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(25\text{ °C}) = \text{nema raz.}$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = \text{nema raz.}$ $t_{1/2}(60\text{ °C}) = 41.4\text{ d}$	3 produkta razgradnje
Tilozin	$k(25\text{ °C}) = 1162.999\text{ d}^{-1}$ $k(50\text{ °C}) = 7329.994\text{ d}^{-1}$ $k(60\text{ °C}) = 8920.014\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(25\text{ °C}) = \text{nema raz.}$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = \text{nema raz.}$ $t_{1/2}(60\text{ °C}) = 41.4\text{ d}$	3 produkta razgradnje (tilozin-aldol)

A. Białk-Bielińska i sur. [23] autori su prve studije u kojoj je istraživana hidrolitička stabilnost 12 sulfonamida prema smjernicama u priručniku OECD 111 [28, 29]. Ispitivanja su provedena pri pH-vrijednostima karakterističnim za okoliš (pH 4, 7 i 9). Provedeno je ispitivanje sljedećih sulfonamida: sulfagvanidin, sulfapiridin, sulfadiazin, sulfametoksazol, sulfatiazol, sulfamerazin, sulfisoksazol, sulfametazol, sulfadimidin, sulfametoksipiridazin i sulfakloropiridazin, sulfadimetoksin. Prvo su provedeni preliminarni testovi u roku od 5 dana za pH 4, 7 i 9 pri 50 °C. Analizirani su uzorci prvog i petog dana te je određen stupanj hidrolize (S). U slučaju kada je $S < 10\%$ zaključeno je da je uzorak hidrolitički stabilan, a za vrijednosti $S > 10\%$ uzorak je hidrolitički nestabilan te je provedena analiza razgrađenih uzoraka pri 20 °C, 40 °C i 70 °C. Svi ispitivani sulfonamidi hidrolitički su stabilni pri pH 9. Njih devet (osim sulfadiazina, sulfakloropiridazin i sulfametoksipiridazin) je hidrolitički stabilno pri pH 7, te su dva (sulfadiazin, sulfagvanidin) hidrolitički stabilna pri pH 4. Identificirana su tri produkta razgradnje, sulfanilna kiselina, sulfanilamid i anilin, iz kromatograma dobivenog HPLC analizom. Iz podataka prikazanih u *tablici 4* može se zaključiti da su sulfonamidi u tipičnim uvjetima okoliša (pH i temperatura) hidrolitički stabilni s dugim vremenom poluraspada ($t_{1/2}$) [23].

Tablica 4. Vrijednosti konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) za sulfonamide [23]

FARMACEUTIK	KONSTANTA BRZINE RAZGRADNJE (k)	VRIJEME POLURASPADA ($t_{1/2}$)	DETEKTIRANI RAZGRADNI PRODUKTI
Sulfadimetoksin	$k(20\text{ °C}) = 0.0027\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(20\text{ °C}) = 257\text{ d}$	sulfanilna kis. sulfanilamid anilin
Sulfadimidin	$k(20\text{ °C}) = 0.0038\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(20\text{ °C}) = 81\text{ d}$	sulfanilna kis. sulfanilamid anilin
Sulfamerazin	$k(40\text{ °C}) = 0.0085\text{ d}^{-1}$	$t_{1/2}(40\text{ °C}) = 182\text{ d}$	sulfanilna kis. sulfanilamid anilin

U članku autora *M. Tonski* i sur. [24] ispitana je hidrolitička stabilnost (prema OECD 111 priručniku [29]) četiri farmaceutika (karbamazepin, ibuprofen, tramadol, naproksen) i deset metabolita (10,11-dihidro-10-hidroksi karbamazepin, 10,11-dihidro-2-hidroksi karbamazepin, karbamazepin epoksid, 2-hidroksi ibuprofen, ibuprofen karboksil kiselina, O-desmetiltramadol, hidroksi metronidazol, N-acetilsulfametoksazol, 4'-hidroksi-diklofenak, O-desmetilnaproksen). Preliminarni test je pokazao da su hidrolitički nestabilni karbamazepin epoksid pri pH 4, hidroksi metronidazol pri pH 9 i 4'-hidroksi diklofenak pri pH 4 i 9. Navedeni metaboliti uključeni su u dalja ispitivanja te su određene konstante brzina razgradnje i vremena poluraspada pri temperaturama 20 °C, 50 °C i 70 °C. Također, određena je energija aktivacije za pH-vrijednosti u kojima su ovi spojevi hidrolitički nestabilni. Iz podataka navedenih u *tablici 5* može se zaključiti da s porastom temperature (20 °C – 70 °C) dolazi do porasta vrijednosti konstante brzine hidrolitičke razgradnje (k) te smanjenja vrijednosti vremena poluraspada ($t_{1/2}$) [24].

Tablica 5. Vrijednosti konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) [24]

FARMACEUTIK	KONSTANTA BRZINE RAZGRADNJE (k)	VRIJEME POLURASPADA ($t_{1/2}$)	DETEKTIRANI RAZGRADNI PRODUKTI
Karbamazepin epoksid	$k(20\text{ °C}) = 0.00352\text{ h}^{-1}$ $k(50\text{ °C}) = 0.09954\text{ h}^{-1}$ $k(70\text{ °C}) = 0.36498\text{ h}^{-1}$	$t_{1/2}(20\text{ °C}) = 197.04\text{ h}$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = 6.96\text{ h}$ $t_{1/2}(70\text{ °C}) = 1.90\text{ h}$	/
4'-hidroksi diklofenak	$k(20\text{ °C}) = /$ $k(50\text{ °C}) = 0.00114\text{ h}^{-1}$ $k(70\text{ °C}) = 0.01107\text{ h}^{-1}$	$t_{1/2}(20\text{ °C}) = /$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = 608.02\text{ h}$ $t_{1/2}(70\text{ °C}) = 62.62\text{ h}$	/
Metronidazol	$k(20\text{ °C}) = /$ $k(50\text{ °C}) = 0.00341\text{ h}^{-1}$ $k(70\text{ °C}) = 0.02537\text{ h}^{-1}$	$t_{1/2}(20\text{ °C}) = /$ $t_{1/2}(50\text{ °C}) = 203.35\text{ h}$ $t_{1/2}(70\text{ °C}) = 27.32\text{ h}$	/

U članku autora *K. Hirte* i sur. [25] provedeni su eksperimenti kojima je utvrđena hidrolitička razgradnja amokscilina (AMX) pri pH 3, 7 i 11 i stabilnost njegovih poznatih transformacijskih produkata (TP). Naime, ne samo brzina hidrolize već i struktura TP-a znatno ovise o pH-vrijednostima. Hidrolitička razgradnja TP-ova analizirana je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti vezanoj sa spektrometrijom masa visoke razlučivosti (eng. *ultra-high performance liquid chromatography-quadrupole time-of-flight mass spectrometry*, UHPLC-HR-QToF-MS). Identificirana su četiri TP-a amokscilina; AMX penicilna kiselina (TP1), AMX 2',5'-diketopiperazin (TP2), AMX penil-kiselina (TP3) te 3-(4-hidroksifelin) pirazinol (TP4), koji su bili prisutni pri pH 7. Prva tri TP-a nisu stabilna, ali su se transformirala u 23 nepoznata TP-a unutar tri do četiri tjedna. Preliminarno je identificirano sedam TP-a na temelju njihovih spektara masa, i gdje je to moguće, potvrđeno referentnim standardima, npr. penicilinamin disulfid, 2-[amino (karboksi) metil]-5,5-dimetil-1,3-tiazolidin-4-karboksilna kiselina i dehidroski-karboksilirana amokscilin penil-kiselina. Analizom uzoraka na ulazu i izlazu iz uređaja za pročišćavanje komunalnih otpadnih voda potvrđeno je da je TP1 dominantni TP u ulaznoj struji. Također, provođenjem eksperimenta predviđeno je 13 TP-a iz TP1, TP2 i TP3 u vodama pri pH 7, dok je predviđanje tih istih 13 TP-ova u površinskim vodama kompleksno [25].

Tablica 6. Vrijednosti konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) [25]

FARMACEUTIK	KONSTANTA BRZINE RAZGRADNJE (k)	VRIJEME POLURASPADA ($t_{1/2}$)	DETEKTIRANI RAZGRADNI PRODUKTI
Amokscilin (AMX)	$k(30\text{ °C}) = 0.0078\text{ h}^{-1}$ $k(30\text{ °C}) = 0.0048\text{ h}^{-1}$ $k(30\text{ °C}) = 0.103\text{ h}^{-1}$	/	AMX penicilna kiselina, AMX 2',5'-diketopiperazin, AMX penil-kiselina, 3-(4-hidroksifelin) pirazinol, 23 nepoznatih transformiranih produkata

U članku autora *J. Kumirska* i sur. [26] opisano je ispitivanje pokretljivosti i hidrolitičke stabilnosti u okolišu triju beta-blokatora: propranolola, metoprolola i nadolola. Navedeni beta-blokatori se najviše konzumiraju i otkrivaju u uzorcima iz okoliša te su zbog toga odabrani kao predstavnici ove skupine. Ciljevi istraživanja bili su procijeniti sorpcijski potencijal te mehanizam

sorpcije spojeva na tlo i minerala gline (kaolinit) te ispitati hidrolitičku stabilnost pri pH 4, 7 i 9 prema OECD 111 priručniku [29]. Naime, pretpostavljeno je da mehanizam izmjene iona, kao rezultat kompeticije za negativno nabijeno mjesto na površini tla između kationskih analita i drugih prisutnih kationa, igra ključnu ulogu u procesu sorpcije beta-blokatora. Provedena su ispitivanja sorpcije i desorpcije na različitim tlima i pri promjenjivim vanjskim uvjetima, kao što su pH i ionska jakost. Naime, od navedena tri beta-blokatora propranolol ima najveću vrijednost koeficijenta sorpcije (K_d) što rezultira najvećim afinitetom prema čvrstoj fazi u odnosu na vodenu fazu. Također, ispitivanja su dokazala da su navedeni beta-blokatori pokretni u čvrstoj fazi (tlu). Ispitivanjem hidrolitičke stabilnosti beta-blokatora dobiveni su rezultati koji ukazuju na visoku hidrolitičku stabilnost s vremenom poluraspada od godinu dana (*tablica 7*) [26].

Tablica 7. Vrijednosti stupnja hidrolize (S) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) [26]

FARMACEUTIK	STUPANJ HIDROLIZE (S , %)	VRIJEME POLURASPADA ($t_{1/2}$)	DETEKTIRANI RAZGRADNI PRODUKTI
Propranolol	$S(\text{pH} = 4) = 5.0\%$ $S(\text{pH} = 7) = 0.0\%$ $S(\text{pH} = 9) = 2.0\%$	S obzirom da je stupanj razgradnje $< 6\%$ u svim ispitivanim slučajevima, u skladu s OECD preporukama zaključeno je da je $t_{1/2}(25\text{ }^\circ\text{C}) > 1$ god.	/
Metoprolol	$S(\text{pH} = 4) = 2.0\%$ $S(\text{pH} = 7) = 0.0\%$ $S(\text{pH} = 9) = 0.0\%$		/
Nadolol	$S(\text{pH} = 4) = 1.9\%$ $S(\text{pH} = 7) = 4.8\%$ $S(\text{pH} = 9) = 8.0\%$		/

U članku autora *A. R. Riberio* i sur. [27] ispitivan je utjecaj pH na stabilnost dvaju veterinarskih antibiotika, ceftiofura (CEF) i cefapirina (CEPA), u vodenim otopinama. Ceftiofur i cefapirin su dva široko korištena veterinarska antibiotika koji su pokazali veliku hidrolitičku nestabilnost u alkalnim uvjetima te su se razgradili za nekoliko minuta pri $\text{pH} > 11$. U puferkim otopinama pri $\text{pH} 7$ i temperaturi $t = 22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$ oba antibiotika pokazuju umjerenu stabilnost uz $t_{1/2} = 3$ d za CEPA te $t_{1/2} = 1.4$ d za CEF (*tablica 8*). Provedeno je ispitivanje hidrolitičke stabilnosti navedenih antibiotika u uzorcima površinske vode rijeke Ruhr. Naime, eksperimenti su provedeni pri tri uvjeta, u tami, pri sobnoj temperaturi ($t = 22 \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$) te bez podešavanja ionske jakosti. Konačni uvjeti ispitivanja bili su sljedeći: $70\text{ }\mu\text{M}$ antibiotika u 0.04 M otopini pufera u trajanju od 70 minuta uz uzorkovanje svakih 14 minuta. Autori su zaključili da stabilnost ovisi i o matici. Iz

tablice 8 vidljivo je da je vrijeme polurazgradnje za CEF ($t_{1/2} = 14.7$ d) deset puta veće nego u puferskim otopinama pri pH 7, isto to vrijedi i za CEPA ($t_{1/2} = 4.2$ d). Također, iz tablice 8 vidljivo je kako su konstante brzine razgradnje za CEF i CEPA vrijednosti 10^{-4} s^{-1} što je manje u odnosu na ostale farmaceutike, odnosno brže se razgrađuju nego ostali farmaceutici [27].

Tablica 8. Vrijednosti konstante brzine razgradnje (k) i vremena poluraspada ($t_{1/2}$) [27]

FARMACEUTIK	KONSTANTA BRZINE RAZGRADNJE (k)	VRIJEME POLURASPADA ($t_{1/2}$)	DETEKTIRANI RAZGRADNI PRODUKTI
Ceftiofur (CEF)	$k(22 \text{ °C}) = 0.01 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2}(22 \text{ °C}) = 14.7 \text{ d}$ $t_{1/2}(\text{pH} = 7, 22 \text{ °C}) = 1.4 \text{ d}$	/
Cefapirin (CEPA)	$k(22 \text{ °C}) = 0.02 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$	$t_{1/2}(22 \text{ °C}) = 4.2 \text{ d}$ $t_{1/2}(\text{pH} = 7, 22 \text{ °C}) = 3 \text{ d}$	/

3.2. Analitičke metode

Farmaceutici mogu utjecati na kvalitetu vode, potencijalno ugroziti izvor pitke vode, ekosustav i ljudsko zdravlje s obzirom na to da se kontinuirano unose u okoliš [1]. Glavni problem pri razvoju analitičke metode su niske koncentracije farmaceutika u okolišu, stoga metode moraju biti vrlo osjetljive i selektivne. Osim farmaceutika u okolišu, prisutni su i njihovi produkti razgradnje nastali kao rezultat različitih biotičkih i abiotičkih procesa. Za određivanje farmaceutika u okolišu uglavnom se primjenjuju kromatografske metode [1]. Kromatografija je danas najčešće korištena separacijska tehnika koja pruža velike mogućnosti u istraživanju i praksi [30]. Kromatografija je fizikalno-kemijska tehnika odjeljivanja u kojoj se sastojci odjeljuju između dviju faza od kojih je jedna pokretna (mobilna), odnosno kreće se u određenom smjeru, dok je druga nepokretna (stacionarna). Kromatografski sustav sastoji se od pokretne i nepokretne faze te analita koji je tijekom kromatografskog procesa u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Zbog dinamičke ravnoteže ispitivane tvari dolazi do narušavanja ravnotežnog stanja, što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze [31]. Najčešće primjenjivanje metode su plinska (eng. *gas chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) vezane sa spektrometrijom masa (eng. *mass spectrometry*, MS) [30].

Naime, plinska kromatografija u analizi farmaceutika je prilično ograničena zbog fizikalno-kemijskih karakteristika spojeva, koji mogu biti polarni, nehlapljivi i u nekim slučajevima nestabilni pri povišenim temperaturama. Stoga se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti pokazala kao vrlo dobra tehnika za određivanje polarnih i termički nestabilnih farmaceutika i njihovih metabolita u uzorcima iz okoliša. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti vezana s UV detektorom ili s detektorom s nizom dioda pokazala se kao važna analitička metoda u kvantitativnoj analizi farmaceutika. Neke prednosti HPLC metoda su višekratna upotreba kolona, automatsko unošenje uzorka, skraćeno trajanje analize te detekcija i kvantifikacija koje se mogu postići upotrebom kontinuiranih protočnih detektora [32].

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (eng, *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC) slična je HPLC-u, jer je to tehnika koja se koristi za odvajanje različitih sastojaka uzorka. UHPLC koristi se pretežno za identifikaciju, kvantifikaciju i odvajanje komponenti smjese pomoću visokog tlaka koji pumpa otapalo kroz kolonu. U UHPLC-u se koristi nepokretna faza veličine čestica manje od 2 μm za razliku od HPLC-a koji je ograničen na veličinu čestica od 5 μm čime UHPLC osigurava bolje kromatografsko razlučivanje. Naime, manje čestice zahtijevaju veći tlak (100 MPa) što čini UHPLC tehniku vrlo efikasnom uz brzu analizu i veću razlučivost [33].

Važni detektori kod tekućinske kromatografije su spektrometar masa, spektrofotometrijski detektori u UV-VIS području elektromagnetskog zračenja, detektori na osnovi molekulske fluorescencije, indeksa loma, oni koji se temelje na raspršenju elektromagnetskog zračenja na isparenom uzorku te elektrokemijski detektori (konduktometrijski i amperometrijski) [34]. UV-VIS detektor koristi svjetlost za analizu uzoraka. Tako se mjerenjem apsorpcije svjetla uzorka na različitim valnim duljinama može identificirati analit. Postoje dvije vrste HPLC UV-VIS detektora, detektori s jednom konstantnom valnom duljinom te s promjenjivom valnom duljinom. Detektori s jednom konstantnom valnom duljinom mjere apsorpciju jedne valne duljine, dok detektori promjenjivih valnih duljina mjere apsorpciju više valnih duljina i stoga su osjetljiviji [35]. Spektrometrija masa (MS) analitička je tehnika koja ionizira kemijske spojeve i razvrstava ione na temelju njihovog omjera mase i naboja (m/z). Ona se koristi u mnogim područjima i primjenjuje se na čiste uzorke kao i složene smjese. Spektar masa je grafikon ionskog signala kao funkcija omjera mase i naboja te mjeri masu unutar uzorka. Ti se spektri upotrebljavaju za određivanje elementarnog ili izotopnog otiska uzorka, mase čestica i molekula te za razjašnjavanje kemijskih struktura molekula, kao što su peptidi i drugi kemijski spojevi [36].

Izravno mjerenje može biti otežano kod uzoraka iz okoliša jer su kompleksni i zbog velikog sadržaja interferencija kao i niske koncentracije farmaceutika. Iz navedenih razloga uzorci se pripremaju s ciljem prevođenja analita u oblik pogodan za analizu, uklanjanja interferencija, čime se povećava selektivnost metode, te koncentriranja analita u svrhu njegove lakše identifikacije i kvantitativnog određivanja. U tu svrhu najčešće se primjenjuje ekstrakcija čvrstom fazom (eng. *solid phase extraction*, SPE). U tablici 9 prikazan je pregled analitičkih metoda korištenih za praćenja hidrolitičke razgradnje farmaceutika u radovima navedenim u prethodnom poglavlju.

Tablica 9. Pregled analitičkih metoda za praćenja hidrolitičke razgradnje

FARMACEUTIK	ANALITIČKA METODA	KROMATOGRAFSKA KOLONA	POKRETNFAZA	DETEKTOR	LITERATURA
Kloramfenikol	modificirana EPA 1694 /HPLC MS/MS metoda	XDB-C18 (Agilent)	voda uz dodatak 0.1 % mravlje kiseline	MS/MS, trostruki kvadripol s ionizacijom elektroraspršenjem	[22]
Florfenikol	modificirana EPA 1694 /HPLC MS/MS metoda	XDB-C18 (Agilent)	voda uz dodatak 0.1 % mravlje kiseline	MS/MS, trostruki kvadripol s ionizacijom elektroraspršenjem	[22]
Spiramicin	modificirana EPA 1694 /HPLC MS/MS metoda	XDB-C18 (Agilent)	voda uz dodatak 0.1 % mravlje kiseline	MS/MS, trostruki kvadripol s ionizacijom elektroraspršenjem	[22]
Tilozin	modificirana EPA 1694 /HPLC MS/MS metoda	XDB-C18 (Agilent)	voda uz dodatak 0.1 % mravlje kiseline	MS/MS, trostruki kvadripol s ionizacijom elektroraspršenjem	[22]
Sulfonamidi	HPLC	Gemini C18-	gradijentno	UV-VIS, 270 nm	[23]

FARMACEUTIK	ANALITIČKA METODA	KROMATOGRAFSKA KOLONA	POKRETNOST FAZA	DETEKTOR	LITERATURA
		110A (Phenomenex)	eluiranje A: H ₂ O uz dodatak triflorooctene kiseline (TFA), pH = 3.5 B: acetonitril		
Karbamazepin, ibuprofen, tramadol, naproksen i metaboliti	HPLC, zasebna analiza svakog analita	Gemini C18 (Phenomenex)	Voda, 0.1 % HCOOH i 5 mM CH ₃ COONH ₄	UV-VIS	[24]
Amoksicilin	UHPLC	reverzno-fazna ACQUITY UHPLC HSS T3 kolona (Waters)	gradiejtno eluiranje A: destilirana voda + 5 mM amonijev acetat + 0.05 vol. % octena kiselina B: metanol + 5 mM amonijev acetat + 0.05 vol. % octena kiselina	kvadripol spregnut s analizatorom koji mjeri vrijeme leta (Q-TOF)	[25]
Beta-blokatori	HPLC	Onyx C18 –110A	MeOH:H ₂ O s	UV-VIS, 220 nm	[26]

FARMACEUTIK	ANALITIČKA METODA	KROMATOGRAFSKA KOLONA	POKRETNOST FAZA	DETEKTOR	LITERATURA
(propranolol, metoprolol, nadolol)		monolitna kolona (Phenomenex)	0.025 % TFA (A:B) nadolol: A:B = 30:70 (v/v) metoprolol: A:B = 30:70 (v/v) propranolol: A:B = 30:70 (v/v)		
Ceftiofur (CEF) Cefapirin(CEPA)	HPLC	/	/	DAD	[27]

U članku autora *S. M. Mitchell* i sur. [22] određivana je brzina hidrolize i Arrheniusova konstanta kao funkcija pH i temperature za dva amfenikola (kloramfenikol i fluorfenikol) te dva mikrolida (spiramicin i tilozin). Uzorci su analizirani modificiranom EPA HPLC/MS/MS metodom. Koncentracije antibiotika kvantificirane su korištenjem tekućinske kromatografije visoke učinkovitosti (HPLC) s reverzno-faznom C18 kromatografskom kolonom. Naime, vezani sustav tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti - spektrometrija masa predstavlja sustav koji je korišten za detekciju razgradnih produkata i određivanje njihovih m/z vrijednosti na temelju kojih su određene funkcionalne skupine podvrgnute hidrolizi [22].

Analitička metoda koja je korištena pri istraživanju opisanom u članku autora *A. Bialk-Bielińska* i sur. [23] je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV detektorom. Naime, istražena je hidrolitička stabilnost 12 sulfonamida prema OECD 111 priručniku [28,29] pri pH vrijednostima karakterističnim za okoliš (pH 4, 7, 9). Korištena je kromatografska kolona Gemini C18-110 A uz pokretnu fazu sastavljenu od A: voda s dodatkom TFA pri pH 3.5 i B: acetonitril. Dobiven je kromatogram iz kojeg su identificirani nastali produkti hidrolitičke razgradnje

sulfonamida koji su navedeni u *tablici 4*. Provođenje eksperimenta pri nižim temperaturama rezultira slabijom hidrolitičkom razgradnjom početnih uzoraka. Produkti takve hidrolitičke razgradnje, zbog nedovoljne osjetljivosti HPLC-UV metode, se neće moći detektirati. Iz tog razloga bolja metoda za analizu bi bila tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa koja bi omogućila identifikaciju svih produkata hidrolitičke razgradnje sulfonamida [23].

U članku autora *M. Tonski* i sur. [24] tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s UV-VIS detektorom primijenjena je za detekciju stupnja hidrolitičke razgradnje analita. Kao što je već navedeno u prethodnom poglavlju ispitivani su se sljedeći farmaceutici: karbamazepin, ibuprofen, tramadol, naproksen; te metaboliti: 10, 11-dihidro-10-hidroksi karbamazepin, 10, 11-dihidro-2-hidroksi karbamazepin, karbamazepin epoksid, 2-hidroksi ibuprofen, ibuprofen karboksil kiselina, O-desmetiltramadol, hidroksi metronidazol, N-acetilsulfametoksazol, 4'-hidroksi-diklofenak, O-desmetilnaproksen. Općenito, svaki analit analiziran je jednostavnom HPLC metodom s UV-VIS detektorom. C18 kromatografska kolona i tri različite pokretne faze primijenjene su za svaki test ispitivanja hidrolitičke razgradnje [24].

U članku autora *K. Hirte* i sur. [25] ispitana je hidrolitička razgradnja amokscilina pri pH 3, 7 i 11 te je utvrđena stabilnost njegovih TP-a. U tu svrhu provedena je analiza laboratorijskih uzoraka i uzoraka iz okoliša. Pri analizi laboratorijskih uzoraka, analiza amokscilina i njegovih TP-a provedena je pomoću tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti povezane s Q-TOF spektrometrom masa (UHPLC-HR-QTOF-MS). Kao kolona korištena je ACQUITY UHPLC HSS T3 reverzno-fazna kolona s pre-filtrom na 60 °C pri čemu je za pokretnu fazu korištena destilirana voda i metanol s 5 mM amonijevim acetatom i 0.5 vol. % octene kiseline. MS analiza provedena je ionizacijom elektroraspršenjem. Na isti način je provedena i analiza uzoraka iz okoliša. Utvrđena su četiri TP-a amokscilina, AMX penicilna kiselina (TP1), AMX 2',5'-diketopiperazin (TP2), AMX penil-kiselina (TP3) te 3-(4-hidroksifelin) pirazinol (TP4), koji su stabilni pri pH 7 [25].

U članku autora *J. Kumirska* i sur. [26] procijenjen je sorpcijski potencijal, mehanizam sorpcije spojeva na tlu i mineralima gline (kaolinit) te hidrolitička stabilnost. Pri određivanju hidrolitičke stabilnosti, ispitivanja su provođena u staklenim posudama pri sterilnim uvjetima i pH 4, 7 i 9. Prije i poslije razgradnje uzorci su analizirani HPLC-UV metodom. Kod ove metode korištena je C18 –110 A monolitna kromatografska kolona uz pokretnu fazu MeOH:H₂O s 0.025 % TFA (A:B) gdje je A = acetonitril i B = H₂O, 1 mM CH₃COONH₄, CH₃COOH. Za detekciju je korišten UV-VIS detektor. Uzorci s odabranim beta-blokatorima analizirani su korištenjem različitih

kromatografskih uvjeta kako bi se produljilo vrijeme zadržavanja analiziranih spojeva i omogućila detekcija potencijalnih produkata razgradnje [26].

U članku autora *A. R. Riberio* i sur. [27] ispitan je utjecaj pH na hidrolitičku stabilnost CEPA i CEF u vodenim otopinama, realnim uzorcima i u puferkim otopinama (pH 1 do 12.5). Pedeset μM svakog uzorka analizirano je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s DAD detektorom kako bi se pratilo smanjivanje početne koncentracije promatranih antibiotika. Budući da su preliminarni eksperimenti pokazali dulje vrijeme poluraspada za oba antibiotika (*tablica 8*) u realnim uzorcima nego u puferkim otopinama provedeno je automatizirano uzorkovanje i duže vrijeme trajanja eksperimenta [27].

4. OSVRT

Iako je hidroliza uz fotolizu jedan od najvažnijih abiotičkih procesa razgradnje farmaceutika u okolišu, postoji vrlo malo podataka o hidrolitičkoj stabilnosti, odnosno nestabilnosti farmaceutika. U ovom radu dat je pregled različitih članaka čija je glavna tematika hidrolitička razgradnja različitih farmaceutika u okolišu. Kao što je već spomenuto u prethodnim poglavljima proizvodnja i potrošnja farmaceutika sve više raste čime je njihova koncentracija u okolišu sve veća. Iz tog razloga je veoma bitno promatrati razgradnju farmaceutika u okolišu.

Samim ulaskom farmaceutika u okoliš dolazi do njihove daljnje razgradnje što u konačnici može rezultirati velikim brojem razgradnih produkata. Cilj navedenih članaka je određenim analitičkim metodama analizirati uzorke iz okoliša pri uvjetima što sličnijim okolišnim uvjetima kako bi se dobila realna slika sudbine farmaceutika u okolišu. Također, iz samih radova se može uočiti da razgradni produkti nastaju i mogu se detektirati određenim metodama ali ih je vrlo teško točno identificirati. Najčešće primjenjivana metoda analize je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti uz različite detektore kao npr. UV-VIS, MS/MS, DAD itd. Naime, primjena UV-VIS detektora omogućava identifikaciju osnovne molekule ispitivanog farmaceutika i njegovo kvantitativno određivanje, dok primjena MS detektora omogućava identifikaciju razgradnih produkata.

Eksperimenti su provedeni pri okolišnim uvjetima, odnosno pH-vrijednostima od 4 do 9 što odgovara pH-vrijednostima najčešćim u vodenim ekosustavima. Vrijednosti temperatura su najčešće u intervalu od 20 °C do 70 °C. U pregledanim radovima provedena su ispitivanja sljedećih farmaceutika:

- amfenikola (kloramfenikol i fluorfenikol)

- mikrolida (spiramicin i tilozin)

- sulfonamida (sulfagvanidin, sulfapiridin, sulfadiazin, sulfametoksazol, sulfatiazol, sulfamerazin, sulfisoksazol, sulfametiazol, sulfadimidin, sulfametoksipiridazin i sulfakloropiridazin, sulfadimetoksin)

- karbamazepin, ibuprofen, tramadol i naproksen te njihovih metabolita (10, 11-dihidro-10-hidroksi karbamazepin, 10, 11-dihidro-2-hidroksi karbamazepin, karbamazepin epoksid, 2-hidroksi

ibuprofen, ibuprofen karboksil kiselina, O-desmetiltramadol, hidroksi metronidazol, N-acetilsulfametoksazol, 4'-hidroksi-diklofenak, O-desmetilnaproksen)

- amokscilina

- beta-blikatora (propranolol, metoprolol i nadolol) te

- ceftiofura (CEF) i cefapirina (CEPA).

Prilikom proučavanja literature s tematikom hidrolitičke razgradnje farmaceutika u okolišu može se uočiti da ne postoje članci koji istražuju hidrolitičku razgradnju samog norfloksacina. Naime, proučavanjem članaka navedenih u radu te analitičkih metoda koje se koriste bilo bi moguće provesti istraživanje hidrolitičke razgradnje norfloksacina u okolišu.

Pri određivanju hidrolitičke razgradnje amfenikola i mikrolida korištena je modificirana EPA HPLC/MS/MS metoda [22]. Do hidrolitičke razgradnje farmaceutika dolazi pri višim temperaturama (50 °C - 60 °C). Detektirani su produkti hidrolitičke razgradnje u puferkim otopinama i na temelju omjera m/z utvrđeno je da su sljedeće funkcionalne skupine bile podvrgnute hidrolizi: alkil fluoridi, amidi i ciklički esterski (laktonski) ostaci. Ovim istraživanjem dokazano je da amfenikolni i mikrolidni antibiotici nisu podložni hidrolitičkoj razgradnji pri uvjetima tipičnim za vodene ekosustave.

Pri provođenju ispitivanja sulfonamida [23] utvrđeno je da su hidrolitički stabilni pri pH 9. Također, utvrđeno je da je njih devet (sulfagvanidin, sulfapiridin, sulfametoksazol, sulfatiazol, sulfamerazin, sulfisoksazol, sulfametiazol, sulfadimidin, sulfadimetoksin) hidrolitički stabilno pri pH 7, te su dva (sulfadiazin, sulfagvanidin) hidrolitički stabilna pri pH 4. Identificirana su tri produkta razgradnje, sulfanilna kiselina, sulfanilamid i anilin, iz kromatograma dobivenog HPLC-UV analizom. Može se zaključiti da su sulfonamidi u tipičnim uvjetima okoliša (pH i temperatura) hidrolitički stabilni s dugim vremenom poluraspada. U poglavlju o analitičkim metodama navedeno je kako zbog nedovoljne osjetljivosti HPLC-UV metode nije moguće detektirati razgradne produkte u slučaju slabije hidrolitičke razgradnje početnog uzorka. Iz tog razloga mogla bi se koristiti tekućinska kromatografija vezana sa spektrometrom masa koja bi omogućila detekciju i identifikaciju svih produkata hidrolitičke razgradnje sulfonamida.

Pri ispitivanju hidrolitičke stabilnosti četiri farmaceutika i deset metabolita [24] preliminarni test je pokazao da su hidrolitički nestabilni karbamazepin epoksid pri pH 4, hidroksi metronidazol

pri pH 9 i 4`-hidroksi diklofenak pri pH 4 i 9. Također, iz podataka navedenih u *tablici 5* može se zaključiti da s porastom temperature dolazi do porasta vrijednosti konstante brzine hidrolitičke razgradnje te smanjenja vrijednosti vremena poluraspada.

Pri ispitivanju hidrolitičke razgradnje amokscilina [25] utvrđeno je da dolazi do nastanka četiri TP-a (AMX penicilna kiselina (TP1), AMX 2`,5`-diketopiperazin (TP2), AMX penil-kiselina (TP3) te 3-(4-hidroksifelin)pirazinol (TP4)). Također, provedena je analiza hidrolitičke razgradnje tih TP-a UHPLC-HR-QTOF-MS-om te je utvrđeno da su oni prisutni pri pH 7. Prva tri TP-a nisu stabilna, ali su se transformirala u 23 nepoznata TP-a unutar tri do četiri tjedna. Ovim ispitivanjem dokazano je da ne samo brzina hidrolize već i struktura TP-a znatno ovise o pH-vrijednostima. Također, provođenjem eksperimenta predviđeno je 13 TP-a iz TP1, TP2 i TP3 u duplo destiliranim vodama (eng. *double distilled water*, DDW) pri pH 7, dok je predviđanje tih istih 13 TP-a u površinskim vodama kompleksno.

Kod beta-blokatora cilj istraživanja bio je procijeniti sorpcijski potencijal te mehanizam sorpcije spojeva na tlo i minerale gline (kaolinit) i ispitati hidrolitičku stabilnost [26]. Utvrđeno je da mehanizam izmjene iona igra ključnu ulogu u procesu sorpcije beta-blokatora. Također, utvrđeno je da od navedena tri beta-blokatora propranolol ima najveću vrijednost koeficijenta sorpcije (K_d) što rezultira najvećim afinitetom prema čvrstoj fazi u odnosu na vodenu fazu. Ispitivanja su dokazala da su navedeni beta-blokatori pokretni u čvrstoj fazi (tlu). U slučaju hidrolitičke stabilnosti dobiveni rezultati ukazuju na visoku hidrolitičku stabilnost s vremenom poluraspada od godinu dana.

Pri provođenju ispitivanja hidrolitičke stabilnosti CEF i CEPA [27] u uzorcima površinske vode rijeke Ruhr utvrđeno je da hidrolitička stabilnost također može ovisiti i o matici. Stoga je vrijeme polurazgradnje za CEF u riječnoj vodi ($t_{1/2} = 14.7$ d) deset puta veće nego u puferkim otopinama pri pH 7, isto to vrijedi i za CEPA ($t_{1/2} = 4.2$ d). Također, konstante brzine razgradnje za CEF i CEPA su reda veličine 10^{-4} s^{-1} što je manje u odnosu na ostale farmaceutike, odnosno brže se razgrađuju nego ostali farmaceutici.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih istraživanja hidrolitičke stabilnosti različitih farmaceutika može se zaključiti da hidrolitička stabilnost ovisi o temperaturi i matici. Stoga porastom temperature i pri alkalnim uvjetima dolazi do porasta vrijednosti konstante brzine hidrolitičke razgradnje. Također, točna identifikacija razgradnih produkata je kompleksna što je vidljivo i u većini radova. Jedino što se može zaključiti je da struktura razgradnih produkata također ovisi o pH-vrijednostima. Konačni zaključak ovog rada je da je većina farmaceutika stabilna pri uvjetima karakterističnim za okoliš te da nema navedenih podataka o njihovoj toksičnosti.

Može se zaključiti da je HPLC metoda najčešće primjenjivana analitička metoda koja se koristi za praćenje hidrolitičke razgradnje. Iz radova je vidljivo da se eksperimenti provode pri pH-vrijednostima i temperaturama karakterističnim za okoliš radi dobivanja što realnije slike o ponašanju farmaceutika u okolišu. Najčešće primjenjivani detektori su UV-VIS i MS detektori. Primjena UV-VIS detektora omogućava identifikaciju osnovne molekule ispitivanog farmaceutika i njegovo kvantitativno određivanje, dok primjena MS detektora omogućava identifikaciju razgradnih produkata.

6. LITERATURA

- [1] M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 (2016) 471–482.
- [2] Analysis fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, Comprehensive analytical chemistry, M. Petović, D. Barcelo (ur.), Elsevier, Amsterdam, 2007, str. 91-128.
- [3] B. A. Boxall, M. A. Rudd, B. W. Brooks, D. J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J. P. Staveley, T. Verslycke, G. T. Ankley, K. F. Beazley, S. E. Belanger, J. P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P. C. DeLeo, S. D. Dyer, J. F. Ericson, F. Gagne, J. P. Giesy, T. Gouin, L. Hallstrom, M. V. Karlsson, D. G. J. Larsson, J. M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. McLaughlin, M. E. McMaster, R. D. Meyerhoff, R. Moore, J. L. Parrott, J. R. Snape, R. Murray-Smith, M. R. Servos, P. K. Sibley, J. O. Straub, N. D. Szabo, E. Topp, G. R. Tetrealt, V. L. Trudeau, G. V. Der Kraak, Pharmaceuticals and personal care products in the environment: What are the big questions?, Env. Health. Perspect. 120 (2012) 1221–1229.
- [4] K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the environment, University Medical Center Freiburg, Freiburg, 2008, str. 43-59.
- [5] V. M. F. Frade, M. Dias, A. C. S. C. Teixeira, M. S. A. Palma, Environmental contamination by fluoroquinolones, Braz. J. Pharm. Sci. 50 (2014) 41-54. [6] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, Chemosphere, 75 (4) (2009) 417–434.
- [6] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part I, Chemosphere, 75 (4) (2009) 417–434.
- [7] L. H. M. L. M. Santos, A. N. Araujo, A. Fachini, A. Pena, Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment, J. Hazard. Mater. 175 (2009) 45-95.
- [8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Norfloxacin#section=2D-Structure> (29.4.2020)
- [9] L. H. Sumano, C. L. Ocampo, G. W. Brumbaugh, R. E. Lizarraga, Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers, Br. Poult. Sci. 39 (1998) 42–46.
- [10] B.I. Escher, K. Fenner, Recent advances in environmental risk assessment of transformation products, Environ. Sci. Technol. 45 (2011) 3835–3847. [11] K. Kümmerer, The presence of

pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *J. Environ. Manage.* 90 (8) (2009) 2354–2366.

[11] K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *J. Environ. Manage.* 90 (8) (2009) 2354–2366.

[12] T. L. Ter Laak, W. A. Gebbink, J. Tolls, The effect of pH and ionic strength on the sorption of sulfachloropyridazine, tylosin, and oxytetracycline to soil, *Environ. Toxicol. Chem.* 25 (2006) 904–911.

[13] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment – A review – Part II, *Chemosphere*, 75 (4) (2009) 435–441.

[14] B. Xu, D. Mao, Y. Luo, L. Xu, Sulfamethoxazole biodegradation and biotransformation in the water-sediment system of the natural water, *Bioresour. Technol.* 102 (2011) 7069–7076.

[15] M. D. Adjei, T. M. Heinze, J. Deck, J. P. Freeman, A. J. Williams, J. B. Sutherland, , Transformation of the antibacterial agent norfloxacin by environmental mycobacteria, *Appl. environ. microbiol.* 72 (2006) 5790–5793. [16] R. Alexy, K. Kummerer, Antibiotics for Human Use, u T. Reemtsma, M. Jekel (ur.), Organic pollutants in the water cycle – properties, occurrence, Analysis and environmental relevance of polar compounds, WILEY-VCH, Weinheim, 2006., str. 65–86.

[16] R. Alexy, K. Kummerer, Antibiotics for Human Use, u T. Reemtsma, M. Jekel (ur.), Organic pollutants in the water cycle – properties, occurrence, Analysis and environmental relevance of polar compounds, WILEY-VCH, Weinheim, 2006., str. 65–86.

[17] A. L. Boreen, W. A. Arnold, K. McNeill, Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment: A review, *Aquat. Sci.* 65 (2003) 320–341.

[18] L. Tong, P. Eichhorn, S. Perez, Y. Wang, D. Barcelo, Photodegradation of azithromycin in various systems under simulated and solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts, *Chemosphere* 83 (2011) 340–348.

[19] S. Babić, M. Periša, I. Škorić, Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere* 91 (2013) 1635–1642.

[20] D. Prabhakaran, P. Sukul, M. Lamshoft, M. A. Maheswari, S. Zuhlke, M. Spiteller, Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems, *Chemosphere* 77 (2009) 739–746.

- [21] OECD (2004), Test No. 111: Hydrolysis as a function of pH.
- [22] S. M. Mitchell , J. L. Ullman, A. L. Teel, R. J. Watts, Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin, *Chemosphere* 134 (2015) 501-511.
- [23] A. Białk-Bielińska , S. Stolte, M. Matzke, A. Fabiańska, J. Maszkowska, M. Kołodziejska, B. Liberek, P. Stepnowski, J. Kumirska, Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions, *J. Hazard. Mater.* 221-222 (2012) 264-274.
- [24] M. Tonski, J. Dołzonek, P. Stepnowski, A. Białk-Bielinska, Hydrolytic stability of selected pharmaceuticals and their transformation products, *Chemosphere* 236 (2019) 2-8.
- [25] K. Hirte, B. Seiwert, G. Schüürmann, T. Reemtsma, New hydrolysis products of the beta-lactam antibiotic amoxicillin, their pH-dependent formation and search in municipal wastewater, *Water Res.* 88 (2016) 880-888.
- [26] J. Kumirska, M. Caban, A. Puckowski, P. Stepnowski, Beta-blockers in the environment: Part I. Mobility and hydrolysis study, *Sci. Tot. Envir.* 493 (2014)1112-1121.
- [27] A. R. Riberio, H. V. Lutze, T. C. Schmidt, Base-catalyzed hydrolysis and speciation-dependent photolysis of two cephalosporin antibiotics, ceftiofur and cefapirin, *Water Res.* 134 (2018) 253-260.
- [28] EPA 712-C-08-012, Fate, Transport and transformation test guidelines OPPTS 835.2120. Hydrolysis 2008.
- [29] OECD guidelines for the testing of chemicals, Hydrolysis as a function of pH. Paris, France: Organization for economic, cooperation and development; 2000.[30] M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-237.*
- [30] M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-237.*
- [31] T. Bolanča, Š. Ukić: *Ionska kromatografija: Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2013.*
- [32] A. Braithwaite, F. J. Smith, *Chromatographic methods, Kluwer academic publishers, Norwell, 2002., str. 258-26.*

- [33] <https://www.eag.com/techniques/chromatography/ultra-high-performance-liquid-chromatography-uhplc/> (20.7.2020)
- [34] M. Kaštelan-Macan i M. Petrović: Analitika okoliša, Hinus i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
- [35] <https://www.biocompare.com/Lab-Equipment/13036-HPLC-UV-Detector-UV-Visible-HPLC-Detectors/> (20.7.2020)
- [36] <https://www.kobis.hr/prodajni-program/spektrometrija/masena-spektrometrija/lc-ms/> (22.7.2020)