

Utjecaj sastava vode na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina

Josić, Elena

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:400993>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Elena Josić

**Utjecaj sastava vode na fotolitičku razgradnju
hidroksiklorokina**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Sandra Babić
2. izv. prof. dr. sc. Irena Škorić
3. dr.sc.Martina Biošić

Zagreb, rujan 2018.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 „Sudbina farmaceutika u okolišu i tijekom naprednih postupaka obrade vode“



Zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sandri Babić na predloženoj temi, stručnom vodstvu i potpori, kao i na strpljivosti i susretljivosti tijekom izrade ovog rada.

Također se zahvaljujem mag. cheming. Dariju Dabiću na pomoći pri eksperimentalnom dijelu rada i korisnim savjetima. Veliko hvala na motivaciji i prenesenom znanju tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem se i svim ostalim članovima Zavoda za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Naposljetku hvala mojoj obitelji koja mi je omogućila školovanje i bila mi potpora, utjeha i radost te Filipu i svim dragim prijateljima koji su uvelike pomogli u izradi ovog rada.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu

SAŽETAK

Sve većom upotrebom farmaceutika povećava se njihova prisutnost u okolišu gdje se, zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava, mogu nalaziti u vodama ili se vežu na tlo i sediment. Kada dođu u okoliš, farmaceutici podliježu različitim procesima: biološkoj razgradnji, te hidrolizi i fotolizi. Za farmaceutike koji nisu podložni biološkoj razgradnji ni hidrolizi, najznačajniji put razgradnje predstavlja direktna i indirektna fotoliza. Rezultat navedenih procesa vodi smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih spojeva koji mogu biti više ili manje stabilni i toksični u odnosu na početnu molekulu farmaceutika, stoga se nameće potreba za ispitivanjem ponašanja farmaceutika kako bi se na adekvatan način smanjio negativan utjecaj u okolišu.

U ovom radu ispitana je fotolitička razgradnja antimalarika hidroksiklorokina (HCQ) u puferskim otopinama različitih pH-vrijednosti. Izravna fotolitička razgradnja hidroksiklorokina ispitana je djelovanjem umjetne Sunčeve svjetlosti u MilliQ vodi pri pH-vrijednostima 5, 7 i 8. Ispitivanje neizravne fotolitičke razgradnje HCQ-a provedeno je u prirodnim vodama i modelnim otpadnim vodama. U tu svrhu pripremljene su otopine hidroksiklorokina (10 mg L^{-1}) u modelnoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije, modelnoj komunalnoj otpadnoj vodi, riječnoj i morskoj vodi. U ispitivanim uvjetima ustanovljeno je da fotolitička razgradnja HCQ-a slijedi reakciju prvog reda uz koeficijent determinacije veći od 0,99. Uzorci su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti vezanom s detektorom s nizom dioda. Određene su konstante brzine reakcije, te vremena poluraspada koji ovise o eksperimentalnim uvjetima. Rezultati ispitivanja pokazali su da pH-vrijednost utječe na brzinu fotolitičke razgradnje HCQ-a koja je brža pri višim pH-vrijednostima. Također, matica uzorka vode utječe na brzinu fotolitičke razgradnje HCQ-a, najbrža razgradnja uočena je u riječnoj vodi, što se može pripisati prisutnim otopljenim organskim tvarima.

Ključne riječi: fotolitička razgradnja, hidroksiklorokin, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, farmaceutici, antimalarik

ABSTRACT

The use of pharmaceuticals increases their presence in the environment where they can be present in aqueous phase or bound to soil and sediment due to various physical-chemical properties. Once in the environment, pharmaceuticals are subjected to different processes such as biodegradation, hydrolysis or photolysis. For pharmaceuticals that are not subject to biodegradation or hydrolysis, the most significant degradation route is direct and indirect photolysis. The result of these processes leads to a reduction in concentration of pharmaceuticals and the formation of new compounds that may be more or less stable and toxic compared to the initial molecule. Therefore, to prevent the negative effects to the environment and human health due to the presence of pharmaceuticals in the environment, it is important to investigate their environmental behavior.

In this paper, the photolytic degradation of antimalarial pharmaceutical hydroxychloroquine (HCQ) was tested in buffer solutions of different pH-values. Direct photolytic degradation of HCQ was tested by under artificial Sunlight in MilliQ water at pH-values 5, 7 and 8. Examination of indirect photolytic degradation of HCQ was carried out in natural waters and model wastewaters. Hydroxychloroquine solutions (10 mg L^{-1}) were prepared for this purpose in the model wastewater of the pharmaceutical industry, modeled municipal wastewater, river and sea water. In the investigated conditions it was found that photolytic degradation of HCQ followed the first order reaction with a coefficient of determination higher than 0.99. The samples were analysed using high performance liquid chromatography coupled to diode array detector. Values of reaction rate constants and half-life times vary depending on experimental conditions. The results of the research have shown that photolytic degradation was the fastest at higher pH values. In addition, photolytic degradation of HCQ was influenced by matrix composition; the faster degradation was obtained in river water, probably due to the presence of dissolved organic compounds.

Key words: photolytic degradation, hydroxychloroquine, high performance liquid chromatography, pharmaceuticals, antimalarial

SADRŽAJ

1. UVOD	8
2. OPĆI DIO	9
2.1 Farmaceutici	9
2.2 Antireumatici i antimalarici	11
2.2.1 Hidroksiklorokin	11
2.3 Farmaceutici u okolišu	13
2.3.1 Razgradnja farmaceutika u okolišu	13
2.4 Kromatografija	17
2.4.1 Osnovni teorijski principi kromatografije	20
2.4.2 Teorija brzine	23
2.4.3 Tekućinska kromatografija	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1 Materijali	27
3.1.1 Kemikalije	27
3.1.2 Hidroksiklorokin	27
3.2 Instrumenti	29
3.2.1 Elektronička analitička vaga	29
3.2.2 Suntest CPS+	29
3.2.3 Spektrofotometar	30
3.2.4 pH-metar	30
3.2.5 Tekućinski kromatograf vezan s DAD detektorom	31
3.3 Metode rada	31
3.3.1 Priprema temeljne i radne standardne otopine hidroksiklorokina	31
3.3.2 Priprema otopina hidroksiklorokina različitih pH-vrijednosti	32
3.3.3 Priprema modelnih uzoraka otpadne vode	32
3.3.4 Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina	32
3.3.5 HPLC-DAD analiza	33
4. REZULTATI I RASPRAVA	34
4.1 Izravna fotolitička razgradnja hidroksiklorokina	34
4.2 Utjecaj pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina	35
4.3 Utjecaj matice uzorka na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina	37

5.	ZAKLJUČAK.....	41
6.	LITERATURA	42

1. UVOD

Farmaceutici se koriste u humanoj i veterinarskoj medicini, akvakulturi u svrhu sprječavanja (profilakse) ili liječenju različitih bolesti. Nekoliko stotina različitih antibiotskih i antimikoznih tvari koristi se u liječenju ljudi te u veterinarskoj medicini. Do 2002. g. procijenjena potrošnja antibiotika u cijelom svijetu iznosila je između 100.000 i 200.000 tona godišnje. Tijekom 1996. godine korišteno je oko 10.200 tona antibiotika u Europskoj Uniji, od kojih je približno 50% primijenjeno u veterinarskoj medicini i kao promotori rasta [1]. Američki proizvođači stoke koriste oko 11.200 tona antimikrobnih lijekovi za poboljšanje rasta stoke, svinja i peradi. Prema podacima koje je objavila Europska Federacija za zdravlje životinja (*European Federation Of Animal Health, 2001.*), 1999. godine upotrijebljeno je ukupno 13.216 tona antibiotika koji se koriste u Europskoj uniji i Švicarskoj, od kojih je 65% korišteno u humanoj medicini [2]. Pretpostavlja se da će do 2020. godine potrošnja lijekova globalno dosegnuti 4.500 milijardi doza, 24% više nego u 2015. godini. Istodobno, 50% svjetske populacije konzumirat će više od jedne doze dnevno. Očekuje se da će upotreba lijekova najviše porasti u državama u razvoju, što uključuje Kinu, Brazil, Indiju, Rusiju i Indoneziju. Uspoređujući globalnu potrošnju lijekova, prednjače SAD, zemlje EU (Njemačka, Italija, Francuska i Španjolska), Japan, Kanada, Južna Koreja i Australija, s ukupnim tržištem od 1.400 milijardi dolara do 2020. godine [3]. Lunenfeld i Strutton [4] navode da je 20. stoljeće bilo stoljeće rasta stanovništva, dok je 21. stoljeće stoljeće starenja, uz potrošnju antihipertenziva, antikancerogenih, antidepresiva, antidijabetika i lijekova za snižavanje kolesterola, za više nego dvostuko. S obzirom na to da se farmaceutici koriste u velikim količinama već desetljećima, unazad 20-tak godina znanstvenici istražuju njihovu prisutnost u okolišu te utjecaj na okoliš i žive organizme u njemu, kako bi se procijenio potencijalni rizik uzrokovan prisutnošću farmaceutika u okolišu. Sve je veći broj studija koje opisuju utjecaj, puteve unošenja farmaceutika u okoliš i njihovu postojanost u okolišu, ali unatoč tome ne može se u potpunosti razjasniti njihova sudbina u vodenom okolišu. Svojstva i učinci farmaceutika koji su poželjni prilikom terapije, suprotno tome mogu nepovoljno djelovati na organizme prisutne u okolišu. Provedena istraživanja tijekom posljednjih deset godina ukazuju da su farmaceutici prisutni u komunalnoj otpadnoj vodi, bolničkim izlaznim vodama, te površinskim i podzemnim vodama [5].

Farmaceutici dospijevaju u okoliš na različite načine. Njihova karakteristika je da ne moraju biti postojani da bi uzrokovali negativne učinke budući da se kontinuirano unose u okoliš ("pseudopostojani") [6].

2. OPĆI DIO

2.1 Farmaceutici

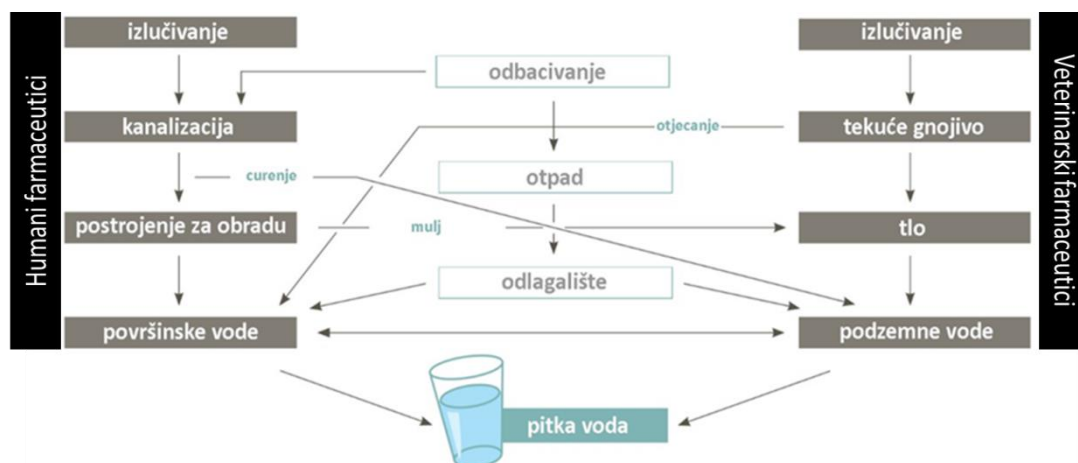
Farmaceutici su tvari ili smjese tvari koje se u određenim količinama i pod određenim uvjetima koriste za sprječavanje, ublažavanje ili liječenje raznih bolesti kod ljudi i životinja [7]. To su spojevi koji se upotrebljavaju kao promotori rasta u veterinarskoj medicini. U ljudskoj medicini koristi se oko 3.000 različitih farmaceutski aktivnih spojeva koji se razvrstavaju u različite kategorije, ovisno o kriteriju (npr. terapijsko djelovanje ili kemijska struktura) (tablica 1).

Tablica 1: ATK klasifikacija farmaceutika prema djelovanju [8]

Lijekovi za liječenje probavnog sustava i metabolizma	preparati koji se koriste u stomatologiji, antacidi, H ₂ blokatori, inhibitori protonske pumpe, lijekovi za funkcionalne gastrointestinalne poremećaje, antiemetici, laksativi, antidijaroici, anoreksici, digestivi, antidijabetici, vitamini, minerali, ostali lijekovi za poremećaje metabolizma
Lijekovi za liječenje bolesti krvi i krvotvornih organa	antitrombotici, antihemoragici, antianemici, zamjene za krv i perfuzijske otopine, ostali lijekovi za krv i krvotvorne organe
Lijekovi za liječenje bolesti kardiovaskularnog sustava	srčani glikozidi, antiaritmici, srčani stimulatori, vazodilatatori, alprostadil, trimetazidin, antihipertenzivi, diuretici, periferni vazodilatatori, vazoprotektivi, beta-blokatori, blokatori kalcijevih kanala, inhibitori angiotenzin-konvertirajućeg enzima (ACE inhibitori), antagonisti angiotenzina II, hipolipemici
Lijekovi za liječenje bolesti kože - dermatici	antimikotici - dermatici, emolijenti i protektivi, lijekovi za liječenje rana i ulkusa, antipruritički, antipsorijatički, antibiotici i kemoterapeutici - dermatici, kortikosteroidi – dermatici, antiseptici i dezinficijensi, lijekovi za liječenje akni, ostali dermatološki preparati
Lijekovi za liječenje bolesti urogenitalnog sustava i spolni hormoni	ginekološki antiinfektivni i antiseptici, ostali ginekološki lijekovi, spolni hormoni, lijekovi mokraćnog sustava
Hormoni	hipofizni i hipotalamički hormoni i analozi, kortikosteroidi, lijekovi za liječenje bolesti štitnjače, glikogenolitički hormoni, hormoni s utjecajem na metabolizam kalcija
Antiinfektivni	antibiotici, ostali antimikrobnici, antimikotici, lijekovi za liječenje tuberkuloze i lepre, antivirusni, cjepiva
Lijekovi za liječenje zloćudnih bolesti i imunomodulatori	citostatici, endokrina terapija zloćudnih bolesti, imunostimulatori, imunosupresivi
Lijekovi za liječenje bolesti koštano-mišićnog sustava	antireumatici, lokalni antireumatici, mišićni relaksansi, lijekovi za liječenje gihta, lijekovi za liječenje bolesti kostiju, ostali preparati za liječenje bolesti mišića i kostiju
Lijekovi za liječenje bolesti živčanog sustava	anestestici, kokain, opioidni analgetici, heroin, analgoantipiretici, antimigrenici, antiepileptici, antiparkinsonici, antipsihotici, anksiolitici, hipnotici i sedativi, antidepresivi, psihostimulansi, amfetamini, MDMA, lijekovi protiv demencije, lijekovi za liječenje ovisnosti, lijekovi protiv vrtoglavice, psihozomimetici
Antiparazitski	antiprotozoici, antihelmintici, ektoparazitski, insekticidi i repelenti
Lijekovi za liječenje bolesti respiratornog sustava	dekongestivi, lijekovi za liječenje bolesti grla, antiastmatski, ekspektoransi, antitusici, antihistaminici
Oftalmici i otolotici	oftalmici, otolotici
Ostali lijekovi	ostali terapijski preparati, dijagnostici, kontrastna sredstva

Farmaceutici su razvijeni kako bi u malim dozama postigli određene farmakološke i fiziološke učinke no zbog svojih svojstava često uzrokuju nenamjerne negativne posljedice po živi svijet. Porastom broja stanovnika, produljenjem njihovog životnog vijeka i razvojem industrije dolazi do povećanja potrošnje farmaceutika te do potrebe za njihovim stalnim unapređenjem. Tako se razvijaju moderni farmaceutici čija je molekulska masa manja od 500

g mol^{-1} , umjereno su topljivi u vodi i liofilni kako bi bili bioraspoloživi i biološki aktivni. Nakon primjene farmaceutici se izlučuju kroz jetru ili bubrege kao smjesa osnovnog spoja i metabolita koji je obično polarniji i hidrofilniji od izvorne molekule farmaceutika [9]. Takva smjesa osnovnog spoja i metabolita farmaceutika može doći u okoliš (slika 1).



Slika 1. Shema dospijevanja farmaceutika u okoliš i pitke vode [10]

Farmaceutici u otpadnoj vodi recipijentata, a onda i u vodi nakon obrade, prisutni su u vrlo niskim koncentracijama (mg L^{-1} ili $\mu\text{g L}^{-1}$), a u postrojenjima za obradu otpadne vode se djelomično uklanjaju ili se uopće ne uspiju ukloniti [11]. Također, fizikalno-kemijska svojstva (dobra topljivost u vodi i slaba razgradivost) nekih farmaceutika omogućuju prolaz kroz prirodne filtre i postrojenja za obradu voda te na taj način ugrožavaju sustav opskrbe pitkom vodom. Nepotpuno uklanjanje u postrojenjima za obradu otpadnih voda navodi se kao glavni put njihova ispuštanja u okoliš [12]. Unatoč tome što su farmaceutici prvenstveno namijenjeni liječenju živih bića, metaboliti i razgradni produkti mogu pokazati znatnu toksičnost pri vrlo niskim koncentracijama [13].

Farmaceutici se mogu naći u ispuštima nakon obrade otpadne vode, površinskim i podzemnim vodama te tlu. Premda su detektirane koncentracije farmaceutika općenito niske, raste zabrinutost zbog mogućeg dugoročnog utjecaja na ljude i vodeni ekosustav uslijed trajne izloženosti tim spojevima. Isto tako zbog povećanja konzumacije farmaceutika, njihova će se koncentracija u vodenim ekosustavima stalno povećavati [10].

Farmaceutici ne moraju biti postojani u okolišu kako bi uzrokovali negativne učinke jer se kontinuirano unose u okoliš kao rezultat proizvodnog procesa, odlaganja neupotrijebljenih farmaceutičkih proizvoda ili kao izlučevine [12].

2.2 Antireumatici i antimalarici

Antimalarici su lijekovi koji se, osim za liječenje malarije, učinkovito primjenjuju za liječenje autoimunih reumatskih bolesti poput sistemskog lupusa (lat. *lupus erythematosus*). Antireumatski lijekovi su sredstva koja se koriste u terapiji upalnog artritisa, reumatoidnog, idiopatskog, psorijatičnog reumatitisa te ankilozantnog spondilitis. Uobičajeno su se koristili aspirin, nesteroidni protuupalni lijekovi i kortikosteroidi. Međutim, pokazano je da oni imaju malu učinkovitost u liječenju upalnog artritisa, te mogu dovesti do razaranja tkiva te teške invalidnosti. "Antireumatski lijekovi koji mijenjaju bolest" (eng. *disease-modifying anti-rheumatic drugs*, DMARD) glavni su oslonac terapije reumatoidnog artritisa jer mijenjaju ishod stanja i poboljšavaju kvalitetu života bolesnika s reumatoidnim artritisom. Prvi DMARD-ovi bili su zlatni pripravci koji su se prvi puta koristili 1930-ih. Učinkovitije i bolje podnošljive tvari istraživane su 1950-ih i 1960-ih, uključujući metotreksat, hidroksiklorokin, sulfasalazin, penicilamin, azatioprin i tiopurine. Suvremeni DMARD-ovi uključivali su moćne imunosupresivne spojeve malih molekula kao što su leflunomid, ciklosporin, takrolimus i mikofenolat [14].

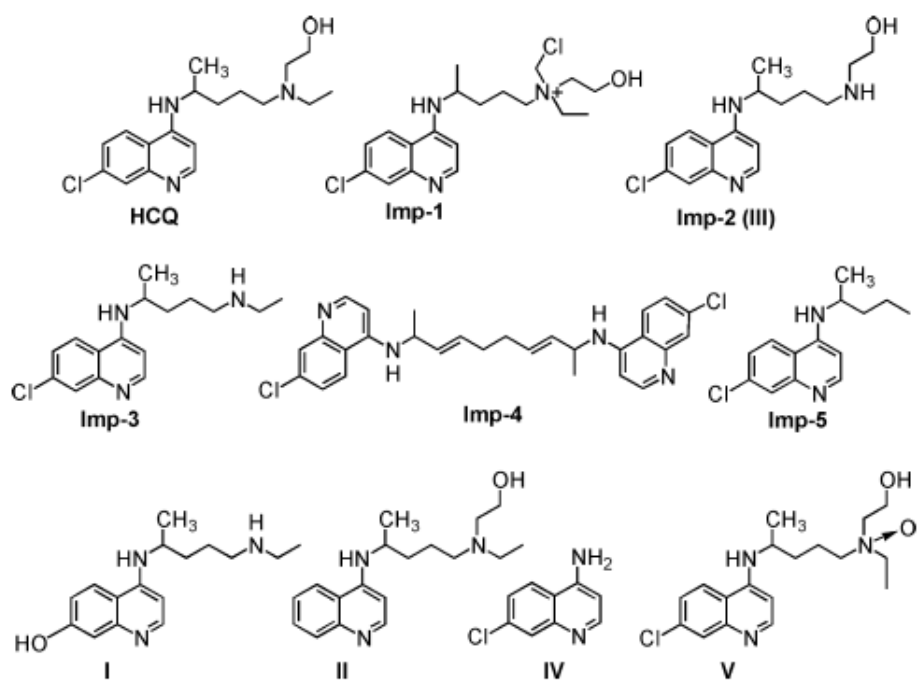
2.2.1 Hidroksiklorokin

Hidroksiklorokin (HCQ), 2-[N-4-{(7-klorkinolin-4-il)amino}pentil-N-etil]amino-etanol, (slika 2) je lijek koji se koristi u liječenju nekoliko oblika malarije, kao i sistemskog lupusa i reumatoidnog artritisa [15]. Hidroksiklorokin ima antitrombotsko, kardiovaskularno, antimikrobno i antineoplastično djelovanje, što ga čini potencijalno vrijednim za liječenje bolesnika sa sustavnim vaskulitisom (upala krvnih žila) koji su u opasnosti od infekcija, malignosti i tromboze [16]. Hidroksiklorokin je sintetiziran 1946. godine kao alternativa toksičnom klorokinu u liječenju malarije. Tijekom godina, HCQ je također pokazao blagotvorne učinke na druge kronične autoimune poremećaje poput lupusa i Q-groznice. Osim toga, pokazalo se da HCQ senzibilizira stanice raka na zračenje i kemoterapiju [17].

Hidroksiklorokin se veže na proteine plazme i metabolički aktivna tkiva uključujući jetru, slezenu, pluća i nadbubrežne žlijezde, gdje se dugotrajnom primjenom akumulira, dosežući koncentracije od 6.000-80.000 puta više od razine u plazmi. Također, u znatnim količinama pohranjuje se i u epidermi, 100-200 puta većim koncentracijama od onih u plazmi. Uz upotrebu hidroksiklorokina, veže se nekoliko toksičnih nuspojava, HCQ uzrokuje promjene u pigmentaciji kože i izbjeljivanje kose, a dugoročnom uporabom utječe na rožnicu i retinu oka.

Retinopatija inducirana hidroksiklorokinom povezan je s primljenim dozama. Pretpostavlja se da je djelovanje hidroksiklorokina na kožu i oči posljedica fototoksične reakcije [18].

Dongre i suradnici [19] identificirali su dva razgradna produkta hidroksiklorokina, kvaternizirani HCQ (I) i deetilirani HCQ (II) (slika 2).



Slika 2. Struktura hidroksiklorokina (HCQ), njegovih nečistoća i produkata razgradnje [14]

Ustanovljeno je da nakon 5 sati izloženosti izopropilne alkoholne otopine HCQ sulfata lampi jačine 120 W dolazi do razgradnje do *N*-dehidroksietiliranog HCQ (III), dimernog HCQ (IV) i deaminiranog HCQ (V). Otkriveno je da HCQ nije podložan hidrolitičkoj, oksidativnoj i toplinskoj razgradnji, dok su kod fotolitičke razgradnje identificirana četiri nova razgradna produkta. HCQ je stabilan u 0,1, 2 i 5 M vodenim otopinama HCl kao i u otopini NaOH pri 85 °C nakon 24 h. U lužnatom mediju nađeno je šest razgradnih fotoprodukata (I-VI), što upućuje da je HCQ osjetljiv na fotolizu u alkalnom mediju. Studija je pokazala da su UV apsorpcijski spektri razgradnih produkata III-VI slični spektru HCQ. Pretpostavlja se da razgradnja HCQ do produkata III-VI nije uključivala nikakve promjene u osnovnom kromoforu HCQ, ali su strukture I i II popraćene malim promjenama u benzenoidnom kromoforu, odnosno 7-klorkinolinskom prstenu [15].

2.3 Farmaceutici u okolišu

Ljudi i životinje mogu više ili manje opsežno metabolizirati farmaceutike. Nakon primjene, farmaceutici za humanu uporabu ili njihovi metaboliti izlučuju se, putem urina ili fekalija, u komunalne otpadne vode i dostižu do postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Ne-metabolizirana frakcija se izlučuje kao aktivni spoj [5]. Da bi se procijenila izloženost i učinci pojedinog farmaceutika na organizme u vodama, važno je poznavanje količine emisije i sudbine spoja u okolišu [20].

Najveća koncentracija farmaceutika u okolišu primijećena je u blizini 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. Neučinkovitim uklanjanjem u postrojenjima za obradu otpadnih voda farmaceutici dopijevaju u okoliš putem vodenih tokova kao i putem aktivnog mulja [6].

Izravno pražnjenje, posebno od prerade peradi, prerade mesa i akvakulture, kao i od kućnih ljubimaca (npr. akvarija) može pridonijeti povećanju ukupne koncentracije farmaceutika u kanalizaciji i površinskoj vodi.

Općenito, koncentracije su više u bolničkom efluentu, niže u gradskim otpadnim vodama, a najniže u površinskim, podzemnim i morskim vodama. Koncentracije izmjerene u rijekama blizu poljoprivrednog područja su mnogo više, što ukazuje na unos farmaceutika otjecanjem s poljoprivrednih površina tretiranih muljem iz postrojenja za obradu voda. Tvari koje se koriste u uzgoju riba mogu ući u sediment, što rezultira visokim lokalnim koncentracijama u vodama i sedimentu. Analize tla pokazale su da različiti spojevi ostaju u tlu nekoliko mjeseci nakon primjene gnojiva. Neke farmaceutike apsorbira povrće kao što su korijenje mrkve (gomolji), lišće lisca i kukuruza. Najviše koncentracije u biljnom tkivu pronađene su u kukuruzu i zelenoj salati, te krumpiru [5].

2.3.1 Razgradnja farmaceutika u okolišu

Farmaceutici podliježu abiotičkim i biotičkim procesima razgradnje pri čemu se smanjuje njihova koncentracija ili nastaju novi spojevi koji mogu biti više ili manje stabilni i toksični u odnosu na početnu molekulu [5]. Abiotički procesi razgradnje uključuju hidrolizu, fotolizu te oksidaciju, dok biotička razgradnja podrazumijeva razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama [6]. Farmaceutici koji se primjenjuju oralno, u pravilu su otporni na hidrolizu. To

upućuje na mehanizam izravne i neizravne fotolize kao primarni put za njihovu abiotičku razgradnju u površinskim vodama. Izravna fotoliza kemijskih spojeva uzrokovana je izravnom apsorpcijom Sunčeve svjetlost, dok neizravna fotoliza uključuje prirodne fotosenzibilizatore, kao što su nitrati i huminske kiseline. Pod utjecajem Sunčevog zračenja, spojevi koji se nalaze u prirodi, mogu stvoriti jake oksidacijske vrste kao što su hidroksilni i kisikovi radikali. Huminske kiseline apsorbiraju Sunčevo zračenje te efektom filtriranja mogu smanjiti brzinu fotorazgradnje drugih organskih spojeva prisutnih u vodenom okolišu. Dodatni faktor koji snažno utječe na brzinu fotorazgradnje su dnevne i sezonske promjene u intenzitetu Sunčevog zračenja [20]. Koncentracija farmaceutika ili njegovih metabolita u okolišu ovisi o otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju, te afinitetu vezanja na čvrste tvari pri čemu se akumuliraju u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode.

Razgradnjom farmaceutika u okolišu, osnovna molekula razgrađuje se na manje strukturne jedinice, pri čemu nastaju transformacijski ili razgradni produkti. Razgradni produkti mogu imati drugačija fizikalno-kemijska svojstva od osnovne molekule i biti manje ili više toksični u odnosu na osnovnu molekulu jer nastaju njenim cijepanjem, dok transformacijski produkti nastaju promjenama u strukturi, a početna molekulska masa ostaje ista [6].

Biorazgradnja je poželjan proces pri kojem bakterije i gljivice razgrađuju organsku tvar do anorganskih soli, ugljikovog dioksida i vode pri aerobnim uvjetima. Ukoliko se postigne potpuna mineralizacija ne nastaju toksični produkti [20], no u suprotnom nastaju produkti biorazgradnje koji mogu biti toksičniji i stabilniji od osnovne molekule te se akumulirati u okolišu. Bakterije i gljivice su organizmi koji najbolje razgrađuju farmaceutike. Gljivice su važne za biorazgradnju farmaceutika u tlu, a bakterije za njihovu razgradnju u vodi, dok se razgradnja antibiotika bakterijama ne može postići jer su antibiotici dizajnirani kako bi djelovali protiv bakterija. Treba napomenuti da rezultati bio- ili fotorazgradnje ovise o uvjetima kao što su temperatura, sastav matrice, zemljopisna širina itd.[5]. Neki farmaceutici imaju tendenciju sorpcije na tlo, sediment ili suspendirane čestice te se mogu akumulirati u tlu i sedimentu. Sorpcijom farmaceutika ne dolazi do promjene njihove strukture, ali se smanjuje farmaceutska aktivnost u okolišu [20]. Ako farmaceutik nije podložan sorpciji i hidrolizi te je osjetljiv na Sunčevu svjetlost, fotolitička razgradnja može biti značajan put njegove razgradnje u okolišu [8].

2.3.1.1 Fotolitička razgradnja farmaceutika u okolišu

Ako je tvar fotoosjetljiva, fotoliza je značajan put njegove eliminacije u okolišu. Fotoliza se uglavnom odvija u čistoj vodi. Fotokemijska razgradnja može imati važnu ulogu kao dodatni put eliminacije zagađivala u površinskoj ili otpadnoj vodi. Učinkovitosti procesa ovisi o intenzitetu i učestalosti svjetlosti. Do fotolize neće doći kada su spojevi prisutni u mutnoj vodi, ako su potok, rijeka, ili jezero zasjenjeni drvećem ili ako su spojevi u tlu i kanalizacijskim cijevima, zbog slabe izloženosti svjetlu. Također, brzina fotorazgradnje može se razlikovati ovisno o sezoni i zemljopisnoj širini. Učinkovitost procesa razgradnje ovisi o uvjetima u okolišu kao što su pH, tvrdoća vode, vrsta matrice, lokacija, sezona i zemljopisna širina. Nepotpuna fototransformacija i razgradnja mogu dovesti do nastajanja više ili manje stabilnih ili više ili manje toksičnih spojeva.

Fotolitička razgradnja farmaceutika u okolišu može biti izravna ili neizravna. U prvom slučaju molekule izravno apsorbiraju Sunčevu svjetlost i pretvaraju se u produkte kada se nestabilna molekula u pobuđenom stanju razgrađuje. U drugom slučaju, do fotorazgradnje dolazi kada tvari uobičajeno prisutne u prirodnoj vodi, kao što su otopljene organske tvari (eng. *dissolved organic matter*, DOM), apsorbiraju Sunčevu svjetlost i stvaraju reaktivne kisikove vrste (eng. *reactive oxygen specie*, ROS) koje mogu oksidirati farmaceutik. Otopljene organske tvari su značajni fotosenzibilizatori neizravne fotolize. Reaktivne kisikove vrste su molekule i ioni kisika koji imaju nesporen elektron, primjerice triplet-stanje DOM, singlet kisik, hidroksil i karbonat radikali, što ih čini iznimno reaktivnim [21].

Ako je energija fotona dovoljna da prekine specifičnu kemijsku vezu ili na neki drugi način inducira kemijsku reakciju, tada će povećani intenzitet svjetlosti ubrzati kemijsku reakciju. Ako je energija potrebna za pokretanje reakcije veća od energije fotona za svjetlo određene valne duljine, neće doći do kidanja kemijske veze, bez obzira na intenzitet. Zbog veće količine energije koju posjeduju fotoni na kraćim valnim duljinama, ultraljubičasto svjetlo je učinkovito u razgradnji mnogih spojeva. Energija svjetlosti koja uzrokuje kemijske reakcije, mora se prvo prenijeti u kemijski sustav, a svjetlost se mora apsorbirati. Dokaz apsorpcije svjetlosti u prirodnim vodama često je vidljiv ljudskim okom. Boja jezera ili rijeke, koja se vidi iznad površine, dijelom je rezultat selektivne apsorpcije određenih valnih duljina. Apsorpcijom svjetlosti atomom ili molekulom, dolazi do prelaska elektrona iz osnovnog stanja u pobuđeno stanje. O₂ u osnovnom stanju, ima dva elektrona s nesporenim spinovima, čineći ga tripletom. Apsorpcijom svjetlosti iz tripleta prelazi u singlet. Pobuđeni atom ili molekula može tada izgubiti energiju jednim od procesa:

- Energija se može izgubiti kao toplina u procesu unutarnje pretvorbe.
- Elektroni mogu izgubiti energiju elektromagnetskog zračenja povratkom u osnovno stanje, u procesu fluorescencije.
- Elektroni mogu prijeći u stanje tripleta; između singleta i tripleta, okretanje elektrona je obrnuto. Stanje tripleta obično postoji dulje od pobuđenog stanja, a može se vratiti u osnovno stanje procesom fosforescencije.
- Energija može pokrenuti kemijsku reakciju unutar molekule, u procesu direktne fotorazgradnje. Uobičajeni primjeri su fotodisocijacija H_2O_2 u $\text{OH}\cdot$ ili Cl_2 u $\text{Cl}\cdot$. (fotorazgradnja označava razgradnju organskog spoja, dok fotodisocijacija označava cijepanje anorganske molekule).
- Energija se može prenijeti na drugu molekulu.

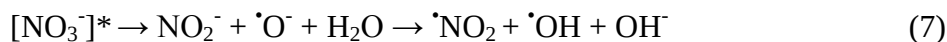
Izravna fotoliza odvija se samo s molekulama koje su sposobne apsorbirati svjetlosnu energiju, te se stoga javlja kod spojeva koji imaju dvostruke veze koje apsorbiraju svjetlost između ugljikovih atoma, kao u alkenima ili aromatskim prstenovima, iako druge strukture također mogu apsorbirati fotone. Čak i one tvari koje ne apsorbiraju svjetlost mogu se razgraditi neizravnom fotolizom, gdje biljni pigmenti ili humusne tvari, apsorbiraju fotone i potom prenose energiju jer služe kao kromofori [22].

Huminske kiseline apsorbiraju UV-zračenje u širokom spektru valnih duljina, što uzrokuje sporiju izravnu fotolizu farmaceutika, no prelaskom u pobuđeno stanje ubrzavaju razgradnju farmaceutika reagirajući s kisikom i stvarajući hidroksilne radikale ($\cdot\text{HO}$), superoksid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) i molekule singletnog kisika ($^1\text{O}_2$) [6]:



Neizravna fotoliza se također može pojaviti kada se visoko reaktivne vrste (koje najčešće sadrže kisik) stvaraju fotokemijski i potom napadaju i razgrađuju kemijske spojeve. Jedna od najznačajnijih vrsta su hidroksilni radikali, $\text{OH}\cdot$, koji se mogu formirati kroz nekoliko procesa. U jednom procesu, kromofor apsorbira svjetlost i reagira s vodom te nastaje vodikov peroksid (H_2O_2). H_2O_2 se raspada na dva hidroksilna radikala apsorpcijom drugog fotona dovoljne energije ($\lambda < 335 \text{ nm}$). H_2O_2 također može reagirati s Fe^{2+} da bi formirao $\text{OH}\cdot$, Fe^{3+} i

OH⁻ u Fenton reakciji. OH[•] također može nastati fotolizom nitratnog iona (NO₃⁻) [6]:



•OH je iznimno snažan oksidans u vodi i zraku koji može uzrokovati razgradnju mnogih organskih spojeva. Druga reaktivna vrsta, molekula singletnog kisika (¹O₂), nastaje interakcijom svjetlosti s kromoforom i otopljenom organskom tvari [22].

2.3.1.2 Kinetika fotolitičke razgradnje

Brzinu razgradnje farmaceutika, odnosno vrijeme unutar kojega će se razgraditi polovica početne količine ispitivanog spoja (tzv. vrijeme poluraspada, $t_{1/2}$) moguće je odrediti proučavanjem kinetike fotolitičke razgradnje. S obzirom da se fotolitičke reakcije mogu opisati modelom reakcija prvog reda, koncentracija ispitivanog spoja smanjuje se proporcionalno s vremenom:

$$\frac{dc}{dt} = k \cdot c \quad (8)$$

gdje je: c - koncentracija početnog spoja, t - vrijeme provođenja eksperimenta, k - konstanta brzina reakcije.

Integriranjem izraza (8) dobije se izraz:

$$c = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (9)$$

$$\ln\left(\frac{c_t}{c_0}\right) = -k \cdot t \quad (10)$$

gdje je c_0 početna koncentracija spoja pri $t = 0$, a c_t koncentracija u vremenu t .

Konstantu brzine reakcije moguće je odrediti iz jednadžbe pravca, kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c/c_0)$ o t .

Vrijeme poluraspada spoja ($t_{1/2}$) moguće je odrediti iz izraza:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (11)$$

2.4 Kromatografija

Kromatografija je fizikalna tehnika odjeljivanja u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna faza i kreće se u određenom smjeru. Začetnik kromatografije je M. Cvet, koji je dao današnji naziv toj tehnici, ali se ona šire počela primjenjivati tek 1930. godine. Instrumentalna tekućinska kromatografija počela se

razvijati nakon 1965. godine. Zahvaljujući svojoj širokoj primjenjivosti i učinkovitosti, kromatografija je danas jedan od najvažnijih analitičkih tehnika, čija se načela primjenjuju u znanstvenim istraživanjima i rutinskim analizama uzoraka u okolišu, biomedicinskim ispitivanjima, forenzičkoj analizi, ispitivanju čistoće lijekova, praćenju reaktanata i produkata organske sinteze itd. Kromatografski sustav čine nepokretna i pokretna faza te ispitivana tvar koja se tijekom kromatografskoga procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Zbog narušavanja ravnotežnog stanja ispitivana tvar putuje s pokretnom fazom, zadržavajući se s vremena na vrijeme u nepokretnoj fazi. Da bi došlo do razlučivanja sastojaka ispitivane smjese, nepokretna faza mora selektivno i različito dugo zadržavati sastojak smjese [23].

Kromatografske se tehnike s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze mogu podijeliti na [24]:

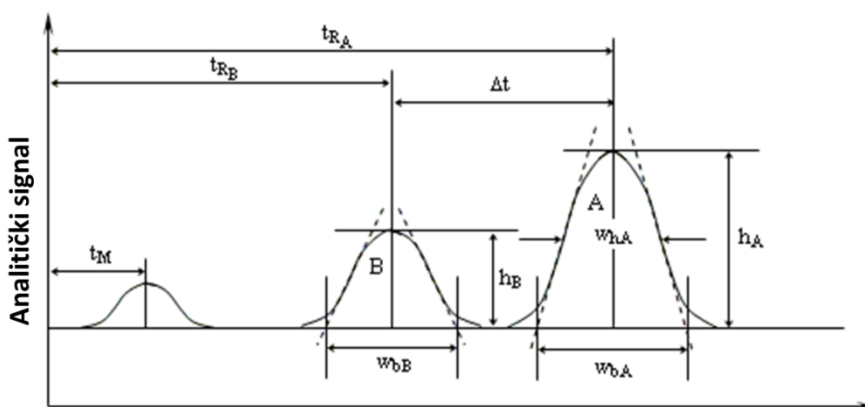
- Razdjelnu kromatografiju, kada se ravnoteža uspostavlja između pokretne i nepokretne faze (tekućina ili fluid u supekritičnim uvjetima) i tekuće nepokretne faze vezane za inerten čvrsti nosač.
- Adsorpcijsku kromatografiju u kojoj se ravnoteža uspostavlja između tekućine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa.
- Ionsko-izmjenjivačku kromatografiju u kojoj dolazi do izmjene iona analiziranog spoja s ionima nepokretne faze.
- Afinitetnu kromatografiju u kojoj do vezanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze.
- Kromatografija isključenjem po veličini, u kojoj je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, a odjeljivanje molekula zbiva se zbog razlike u molekulskoj masi i obujmu.

Podjela kromatografskih tehnika moguća je i na temelju sastava pokretne faze. U *plinskoj kromatografiji* pokretna faza je inerten plin, a u *tekućinskoj kromatografiji* to je tekućina male viskoznosti, dok je u *fluidnoj kromatografiji* pokretna faza fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka.

Nepokretna faza može biti tekuća ili čvrsta. Ako je gusto pakirana u kromatografskom stupcu riječ je o kromatografiji u stupcu, a ako je kao tanak homogeni film nanesen na inertnu

podlogu ili je podloga specijalno pripremljen papir, govorimo o plošnoj kromatografiji koju predstavljaju tankoslojna kromatografija i kromatografija na papiru. S obzirom na način razvijanja razlikujemo plošne i diferencijalne kromatograme. U plošnim kromatogramima sastojci uzorka prelaze različite udaljenosti u istom vremenu pa se oni po završetku odjeljivanja detektiraju na nepokretnoj fazi. Kromatografijom na stupcu dobivaju se diferencijalni kromatogrami. Svi sastojci prelaze isti put, ali se zbog specifičnih interakcija s nepokretnom fazom, na izlazu iz stupca pojavljuju i detektiraju u različitim vremenima. Kao i u ostalim instrumentalnim tehnikama, i kvantitativnu kromatografsku analizu treba provesti umjeravanjem, tj. usporedbom s odgovarajućim referentnim tvarima, najčešće unutarnjim i vanjskim standardom [24].

U kromatografiji u stupcu određuje se vrijeme zadržavanja t_R , tj. vrijeme od trenutka unošenja uzorka do njegova maksimalnog odziva. Sve molekule pokretne faze jednako dugo putuju kroz kolonu, a to se vrijeme naziva zadržanim vremenom, t_M . U kromatografiji u stupcu to je vrijeme zadržavanja pokretne faze, tj. vrijeme potrebno da molekula pokretne faze prođu kroz kolonu. Na slici 3 prikazana su vremena zadržavanja sastojaka A i B, širine njihovih kromatografskih krivulja na baznoj liniji, w_{bA} i w_{bB} te visine h_A i h_B .



Slika 3. Kromatogram smjese sastojaka A i B [25]

Kvantitativna analiza u kromatografiji provodi se na temelju visine ili površine kromatografske krivulje razlučenih sastojaka. Procjenjivanje na temelju visine moguće je samo u pravilnoj krivulji koja slijedi normalnu razdiobu. Budući da na oblik krivulje utječu brojne varijable, poput temperature kolone, sastava i brzine protoka pokretne faze i injektiranoga obujma uzorka, preporučuje se mjerenje površine. Učinkovitost kromatografskog razlučivanja ovisi o duljini stupca, promjeru čestica punila i radnom tlaku koji određuje brzinu protoka pokretne faze. Na odjeljivanje utječe i temperatura. Povišena temperatura poboljšava difuznost uzorka i

reducira viskoznost pokretne faze u tekućinskoj kromatografiji, time se poboljšavaju kinetički parametri, a mijenja se i selektivnost. Kromatografsko odjeljivanje posljedica je afiniteta analita prema nepokretnoj fazi; što je on veći, analit se dulje zadržava. Proces u kojem se kromatografirana tvar uravnotežuje između pokretne i nepokretne faze naziva se kromatografsko razvijanje. U kromatografiji u stupcu danas je uglavnom riječ o razvijanju ispiranjem pri čemu se razlučeni sastojci detektiraju pri izlazu iz stupca. Kromatogram je zapis analitičkog signala u ovisnosti o vremenu razvijanja ili obujma eluata [24].

2.4.1 Osnovni teorijski principi kromatografije

Konstanta ravnoteže

Konstanta ravnoteže K je glavni fizikalno kemijski parametar kromatografije. Još se naziva omjerom raspodjele ili koeficijentom raspodjele te se definira kao:

$$K = \frac{c_s}{c_M} \quad (12)$$

gdje je c_s koncentracija sastojka u nepokretnoj fazi, a c_M je koncentracija sastojka u pokretnoj fazi. Velika vrijednost koeficijenta raspodjele označava veći afinitet sastojka prema nepokretnoj fazi i snažnije će se vezati za fazu u odnosu na sastojak koji ima manju vrijednost koeficijenta raspodjele. Sastojak s nižom vrijednosti K biti će brže eluiran s kolone.

Djelotvornost kromatografske kolone

Na uspješnost razlučivanja komponenta uzorka na kromatografskoj koloni utječe razlika vremena zadržavanja komponenti ispitivanog uzorka, što je ona veća odjeljivanje je bolje. Isto tako, što je širina osnovice kromatografske krivulje veća slabije je odjeljivanje.

Teorijski odsječci

Martin i Synge predložili su kromatografsku kolonu kao skup odsječaka, a u svakom od njih dolazi do uspostavljanja ravnoteže. Broj odsječaka jednak je:

$$N = \frac{L}{H} \quad (13)$$

gdje je L duljina punila u koloni, a H visina teorijskog odsjeka. Veći broj odsječaka odnosno niža visina odsjeka predstavlja veću djelotvornost kolone jer se više puta uspostavila ravnoteža te je kromatografska krivulja uža. Tijekom kromatografskog procesa analit putuje

kroz kromatografski stupac pri čemu dolazi do kontinuiranog širenja kromatografske zone. Ta linearna disperzija (σ_1) mjeri se varijancijom σ_1^2 i povećava se s udaljenosti. Kada ta udaljenost postane jednaka ukupnoj duljini stupca L , varijanca iznosi [26] :

$$\sigma_L^2 = H \cdot L \quad (14)$$

Budući da se vremena zadržavanja najčešće bilježe u jedinici vremena, pogodnije je standardno odstupanje izraziti jedinicom vremena, dijeleći ga s linearnom brzinom gibanja [26]:

$$\tau = \frac{\sigma}{v} = \frac{\sigma \cdot t_r}{L} \quad (15)$$

Iz poznatog odnosa visine i broja teorijskih odsječaka, broj teorijskih odsječaka promatrane komponente čija je širina kromatografske krivulje jednaka w , a vrijeme zadržavanja t_r jednak je:

$$N = 16 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{1/2}}\right)^2. \quad (16)$$

Koristeći se širinom kromatografske krivulje u polovici visine, broj i visinu teorijskih odsječaka moguće je izračunati prema sljedećim izrazima [27]:

$$N = 5,54 \cdot \left(\frac{t_r}{w_{1/2}}\right)^2 \quad (17)$$

$$H = \frac{L \cdot w_{1/2}^2}{5,54 \cdot t_r^2} \quad (18)$$

Vrijeme zadržavanja

Vrijeme zadržavanja, t_R definira se kao vrijeme između injektiranja uzorka i odziva odnosno pojave signala na detektoru.

Volumen pokretne i nepokretne faze

Volumen pokretne faze, V_M , izražava se kao:

$$V_M = t_M \cdot F \quad (19)$$

gdje je F protok pokretne faze. Volumen čvrste faze, V_S , može se dobiti tako da se od ukupnog volumena oduzme volumen pokretne faze.

Faktor zadržavanja

Za optimizaciju kromatografskog odjeljivanja važan je faktor zadržavanja koji predočuje omjer vremena koje promatrana komponenta uzorka provede u nepokretnoj fazi u odnosu na vrijeme koje provede u pokretnoj fazi. Faktorom zadržavanja opisuje se brzina gibanja analita u koloni. Za komponentu A faktor zadržavanja definira se kao umnožak koeficijenta raspodjele s omjerom volumena nepokretne i pokretne faze.

$$k'_A = K_A \cdot \frac{V_S}{V_M} \quad (20)$$

Faktor odjeljivanja

Faktor odjeljivanja (faktor selektivnosti), α izračunava se za dvije komponente uzorka te predočuje omjer njihovih faktora zadržavanja. U brojniku se uvijek piše faktor zadržavanja dulje zadržane komponente tako da je vrijednost faktora odjeljivanja uvijek veća od 1.

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (21)$$

Na kraju se dolazi do izraza koji pokazuje da je faktor odjeljivanja jednak omjeru prilagođenih vremena zadržavanja više i manje zadržavane komponente.

$$\alpha = \frac{k'_A}{k'_B} = \frac{\frac{t_r(B)-t_m}{t_m}}{\frac{t_r(A)-t_m}{t_m}} = \frac{t'_r(B)}{t'_r(A)} \quad (22)$$

S obzirom na to da je faktor zadržavanja proporcionalan koeficijentu raspodjele, faktor odjeljivanja i koeficijent raspodjele mogu se povezati u izrazu:

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (23)$$

Faktor odjeljivanja jednak je omjeru koeficijenta raspodjela više (B) i manje zadržavane komponente (A).

Razlučivanje

Razlučivanje između dviju kromatografskih krivulja komponenata A i B, R_S kvantitativna je mjera njihova odjeljivanja i može se izračunati primjenom izraza:

$$R_S = \frac{2 \cdot \{(t_r)_B - (t_r)_A\}}{w_A + w_B} \quad (24)$$

gdje je B duže zadržana komponenta. Što je R_S veći, to je uspješnije odjeljivanje dviju komponenata. S obzirom da je razlučivanje mjera uspješnosti odjeljivanja, za kvantitativnu

analizu R_s vrijednost mora biti veća od 1,5. Također, iz jednadžbe se može zaključiti da se razlučivanje može povećati povećavajući razliku u vremenima zadržavanja, odnosno smanjujući širinu kromatografskih krivulja. To se može postići smanjivanjem vremena koje komponente provode u pokretnoj fazi ili da se promjenom eksperimentalnih uvjeta promjeni vrijeme zadržavanja samo jedne komponente.

2.4.2 Teorija brzine

U nastojanju da se što kvalitetnije opiše širenje kromatografske zone, veliku važnost ima teorija brzine prolaska tvari kroz kolonu (engl. *rate theory*), koja uzima u obzir varijable poput protoka, veličine čestica punila, neidealnog punjenja kolona, te brzine prijenosa tvari između faza. Prema Van Deemter-ovoj jednadžbi općenit razlog nastajanja i širenja zone ili visine teoretskog odsječka (H) leži u kombiniranom djelovanju triju efekata pri linearnoj brzini protoka (slika 4):

$$H = A + B \cdot \frac{1}{u} + C \cdot u \quad (25)$$

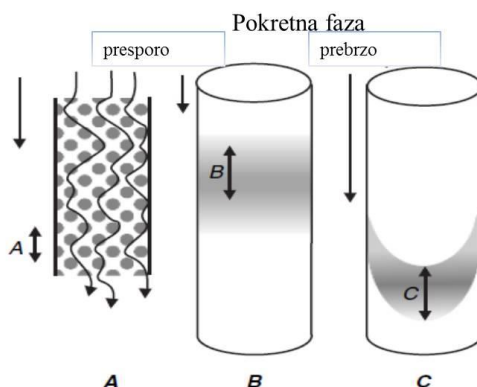
gdje je:

A - vrtložna difuzija (engl. *eddy diffusion*)

B - uzdužna difuzija (engl. *longitudinal diffusion*)

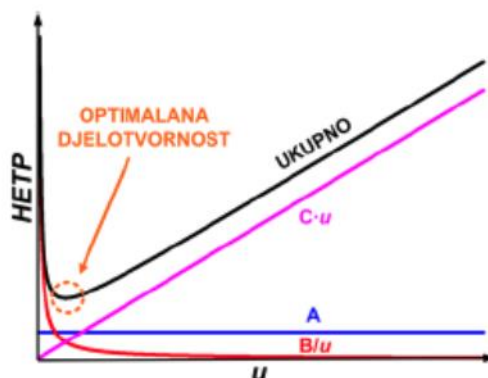
C - otpor međufaznom prijenosu tvari

u – linearna brzina protoka.



Slika 4. Vrtložna difuzija (A), uzdužna difuzija (B) i otpor prijenosu mase (C) [26]

Na slici 5 dan je grafički prikaz Van Deemterove jednadžbe iz kojeg je vidljivo da se najmanje širenje zone (najmanja visina teoretskog odsječka H), a time i najveća kromatografska učinkovitost postiže u točki kada su sumarni uzroci širenju zone (A , B i C) minimalni, te navedena točka određuje optimalni protok pokretne faze [28].



Slika 5. Van Deemterova krivulja [28].

Povećanjem brzina protoka dolazi do gubitka učinkovitosti, no isti učinak uzrokuje i premala brzina protoka [27]:

$$u_{opt} = \sqrt{\frac{B}{C}} \quad (26)$$

Veličina čestica (promjer d_p), njihova dimenzija i uniformnost pakiranja mogu biti uzrok različitih duljina putova koji uzrokuju širenja kromatografske zone i neodgovarajuće razmjene između dvije faze. To rezultira turbulentnim gibanje ili tzv. Eddy-evom difuzijom. Član B povezan je s uzdužnom molekularnom difuzijom u stupcu. Ovaj pojam je posljedica entropije jer sustav teži spontano prema maksimalnim stupnjevima slobode [26]. Tijekom prolaska kroz kolonu otopljeni komponenta simetrično će difundirati oko centralne mase tvari pri čemu dolazi do gubitka oštine kromatografske krivulje [28]. Član C , koji se odnosi na otpor međufaznom prijenosu otopine između dviju faza, postaje dominantan kada je brzina protoka previsoka. Lokalna turbulencija unutar pokretne faze i koncentracijski gradijent može usporiti proces uspostavljanja ravnoteže [26]. U realnim sustavima, uslijed inertnosti prijenosa tvari, komponente ipak za međufazni prijelaz utroše određeno vrijeme. Toliko dugo dok se komponente nalaze u koloni postoji njihova stalna preraspodjela između pokretne i nepokretne faze [28].

2.4.3 Tekućinska kromatografija

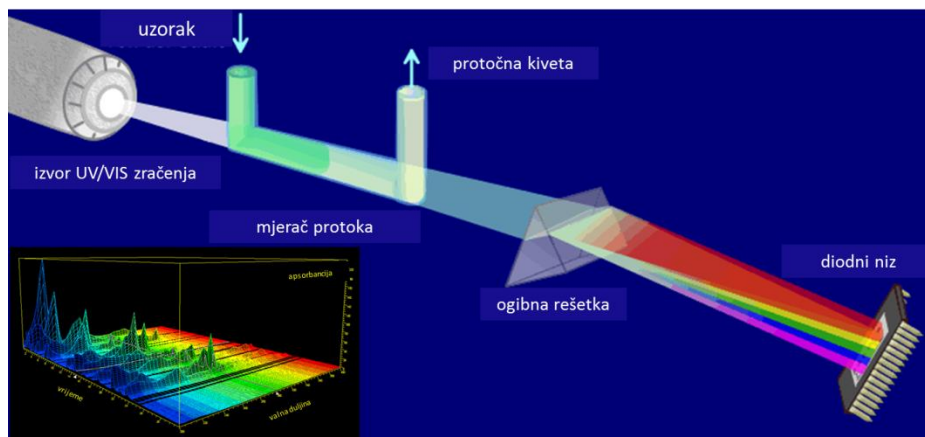
U tekućinsku kromatografiju svrstavamo tankoslojnu kromatografiju (eng. *thin layer chromatography*, TLC), tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC), kromatografiju ultra visoke djelotvornosti (eng. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC), ionsku kromatografiju (eng. *ion chromatography*, IC), i kromatografiju isključenjem po veličini (eng. *size exclusion chromatography*, SEC). Razvojem tehnologije pojavljuju se kromatografski uređaji sve boljih sposobnosti odjeljivanja i mogućnosti detekcije sve nižih koncentracija ispitivanih tvari. Osnovni konstrukcijski dijelovi tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti su spremnici za otapala pokretne faze, crpka, injektor, po mogućnosti predkolona, kolona i detektor.

Crpka ubacuje pokretnu fazu u stupac pod visokim tlakom stalnom brzinom ($0,1-10 \text{ mL min}^{-1}$), a uzorak se automatskim dodavanjem unosi u sustav za injektiranje, tzv. petlju (obujam $5-500 \mu\text{L}$) u kojoj se održava stalan tlak. Otapalo prolazi kroz injektor te nosi uzorak u kolonu koja je obično cijev od nehrđajućega čelika, duljine $50-250 \text{ mm}$, unutarnjeg promjera $2-4,6 \text{ mm}$, punjena česticama veličine $1,7-5 \mu\text{m}$, a najčešće 4 ili $5 \mu\text{m}$. Za produljenje trajanja kolone dobro je rabiti predkolonu [24].

U rješavanju analitičkog problema HPLC-om u pravilu se prvo pristupa eluiranju kromatografijom obrnutih faza. Odjeljivanje se postiže izokratnim eluiranjem u kojem je sastav pokretne faze stalan, a ukoliko ne dolazi do željenog odjeljivanja primjenjuje se gradijentno eluiranje u kojem se sastav pokretne faze postupno mijenja. Moć pokretne faze može se modificirati promjenom pH-vrijednosti ili dodavanjem reagensa koji tvori ionski par s analitom. U oba slučaja nastoji se pokretnoj fazi stvoriti neutralne kemijske vrste koje stupaju u interakciju s nepolarnom nepokretnom fazom. Da bi se promijenila polarnost analita i povećala osjetljivost određivanja, analit se može derivatizirati pogodnom kemijskom reakcijom. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti rabi se za odjeljivanje i određivanje polarnih i nepolarnih nehlapljivih spojeva u farmaceutskoj, biokemijskoj, forenzičkoj, kliničkoj i industrijskoj praksi. Važna je njezina primjena u određivanju štetnih tvari u hrani, tlu, zraku, industrijskim procesima i drugim otpadnim vodama [24].

2.4.3.1 Detektor s nizom dioda

Spektrometri s nizom dioda (slika 6) omogućuju snimanje spektra sastojaka u UV/VIS području.



Slika 6. UV/VIS detekcija, spektrometar s nizom dioda [29-30]

Apsorbancija se prikazuje u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini. Detektor s nizom dioda (engl. *diode array detector*, DAD) omogućava dobivanje dodatnih kvalitativnih informacija jer se u svakoj snimljenoj točki eluiranja (za svako vrijeme zadržavanja) daje cjelokupni snimljeni UV/VIS spektar (ne samo apsorbancija za maksimum apsorpcije). U procesu mjerenja, polikromatsko elektromagnetsko zračenje prolazi kroz uzorak gdje se odvijaju interakcije pri svim valnim duljinama, a zatim se simultano mjeri apsorbancija pri svim valnim duljinama upotrebom detektora s nizom dioda (slika 6). Svaka je od dioda zadužena za mjerenje apsorbancije pri određenoj valnoj duljini, za razliku od UV/VIS detektora koji ima jednu mjernu i jednu referentnu diodu. Postoje dvije glavne prednosti upotrebe DAD detektora:

- Moguće je snimiti cjelokupan spektar svakog od prisutnih (i kromatografski razdvojenih) sastojaka uzorka zasebno te odrediti pripadne maksimume apsorbancije što pri kvantitativnom određivanju povećava osjetljivost metode.
- Rješava se problem čistoće kromatografske krivulje. Vrlo često nije moguće iz oblika kromatografske krivulje vidjeti jesu li sastojci uzorka istovremeno eluirali iz kolone [24].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

Kao analitički standard korišten je hidroksiklorokin sulfat visoke čistoće (> 98%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) i LGC standard (Luckenwalde, Njemačka). Anorganske soli korištene u eksperimentima su reagensi analitičkog stupnja čistoće proizvođača Kemika (Zagreb, Hrvatska). MilliQ voda pripremljena je Millipore Simplicity UV sustavom (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA). Korišten je acetonitril za HPLC (J. T. Baker, Deventer, Nizozemska). Za podešavanje pH-vrijednosti vode korištene su vodene otopine natrijevog hidroksida ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) i sumporne kiseline ($c = 0,01 \text{ mol L}^{-1}$). Natrijev fosfat (monobazni i dibazni), borna kiselina, sumporna kiselina i natrijev hidroksid korišteni su za pripremu 10 mM puferских otopina (pH 5–9). U tablici 2. prikazane su kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, njihove molekulske formule, čistoća i proizvođači.

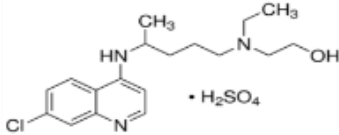
Tablica 2. Popis kemikalija

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Limunska kiselina-monohidrat	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$	p.a	Gram-Mol, Hrvatska
L(+)Askorbinska kiselina	$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$	p.a	Gram-Mol, Hrvatska
Saharoza	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	p.a	Gram-Mol, Hrvatska
di-Natrijev hidrogenfosfat dihidrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	p.a	Merch, Njemačka
Mravlja kiselina	CH_2O_2	p.a	Gram-Mol, Hrvatska
Acetonitril	CH_3CN	p.a	Fisher Scientific, UK
Mesni ekstrakt	/	za mikrobiologiju	Sigma Alderich, USA
Kalcijev klorid dihidrat	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	99%	Sigma Alderich, USA
Magnezijev sulfat	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	p.a	Kemika, Hrvatska
Pepton	/	za mikrobiologiju	Sigma Alderich, USA
Kalijev hidrogenfosfat	K_2HPO_4	p.a	Fisher Scientific, UK
Urea	/	za mikrobiologiju	Sigma Alderich, USA
Natrijev fosfat	NaH_2PO_4	p.a	Tvornica lijekova, Zagreb

3.1.2 Hidroksiklorokin

Tijekom rada ispitivana je fotolitička razgradnja hidroksiklorokina, CAS broj 797-36-04 (Sigma-Alderich, Njemačka) čistoće 99%. Fizikalno-kemijska svojstva hidroksiklorokina prikazana su u tablici 3.

Tablica 3. Fizikalno kemijska svojstva hidroklorokina

Generičko ime	Hidroklorokin sulfat
Grupa farmaceutika	antimalarik, antireumatik
Strukturna formula	
Molekulska formula	C ₁₈ H ₂₈ ClN ₃ O ₅ S
CAS BROJ	747-36-4
Molarna masa (g/mol)	433.95
IUPAC	2-[N-4-{(7-klorokinolin-4-il)amino}pentil-N-etil]amino-etanola
Talište °C [31]	89-91
Topljivost u vodi (mg/mL) [31]	0,0261
Logaritam konstante ionizacije baze <i>pK_b</i> [31]	9,76
Logaritam konstante ionizacije kiseline <i>pK_a</i> [31]	9,76

3.1.3. Uzorci vode

Uzorci vode (riječna i morska voda) prikupljeni su s tri različita mjesta u Hrvatskoj (Zagreb-2 lokacije i Brijuni) u kojima hidroklorokin nije bio prisutan. Sastav morske i riječne vode prikazan je u tablici 4.

Tablica 4. Kemijska karakterizacija morske i riječne vode

(mg/L)	F ⁻	Cl ⁻	SO ₄ ²⁻	Br ⁻	NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻	Na ⁺	NH ₄ ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺
Morska voda	-	2200	3900	66	0,4	0,26	11000	1,5	440	1500	438
Riječna voda	0,066	7,6	12	-	0,22	5,5	5,5	0,03	1,5	13	61

3.2 Instrumenti

3.2.1 Elektronička analitička vaga

Za precizno mjerenje mase standarda korištena je elektronička analitička vaga XS204 DeltaRange (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) i vaga AB104 (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska).



Slika 7. Vaga XS204



Slika 8. Vaga AB104

Model XS204 DeltaRange prikazan na slici 7, s obzirom na veću osjetljivost koristi se za odvage do 10 mg. Specifikacije vage: maksimalni kapacitet: 220 g, očitavanje: 0,1 mg, minimalna odvaga ($U=1\%$, $s=2$): 8 mg, područje tare: 0 - 220 g, ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg. Vaga AB104 (slika 8) čije su specifikacije: maksimalni kapacitet: 110 g, očitavanje: 0,1 mg, područje tare: 0 - 110 g, ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg, korištena je za odvage veće od 500 mg.

3.2.2 Suntest CPS+

Fotolitička razgradnja uzoraka provodila se u Suntest CPS+ uređaju (Atlas, Linsengericht, Njemačka) prikazanom na slici 9, koji je opremljen ksenonovom lampom. Spektar elektromagnetskog zračenja sličan je Sunčevom zračenju raspona valne duljine 300 - 800 nm. Moguće je podesiti temperaturni raspon, intenzitet zračenja ($250 - 765 \text{ W m}^{-2}$) i vrijeme izlaganja zračenju.



Slika 9. Suntest CPS+ uređaj

3.2.3 Spektrofotometar

Za određivanje apsorpcijskih spektara korišten je dvozračni UV/VIS spektrofotometar (slika 10) LAMBDA 35 (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, SAD). Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Spektrofotometar se sastoji od izvora zračenja, monokromatora i detektora. Monokromator je tako izveden da je moguće mijenjati valnu duljinu zračenja koje propušta. Bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini nastaje spektar.



Slika 10. Dvozračni UV/VIS spektrofotometar

3.2.4 pH-metar

pH-vrijednosti uzoraka mjerene su uz pomoć pH-metra S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska), raspona vrijednosti: 0 – 14, rezolucije: 0,01 pH i temperaturnog raspona: 5 °C - 105 °C. Prije mjerenja provedena je kalibracija puferima poznate pH-vrijednosti otopine te su potom mjerene pH-vrijednosti ispitivanih otopina.



Slika 11. pH-metar S20 SevenEasy

3.2.5 Tekućinski kromatograf vezan s DAD detektorom

Promjena koncentracije hidroksiklorokina praćena je pomoću HPLC-DAD (Waters 2795 Alliance HPLC sustava s 2996 DAD detektorom) koji je prikazan na slici 12. HPLC sustav sastoji se od kućišta s postoljem za otopine za pokretnu fazu, binarne i kvartarne pumpe, automatskog dodavača uzorka, kanala (A, B, C, D) i termostatisirane komore za kolone te detektora s nizom dioda.



Slika 12. Waters 2795 Alliance HPLC sustava s 2996 DAD detektorom

3.3 Metode rada

3.3.1 Priprema temeljne i radne standardne otopine hidroksiklorokina

Kao analitički standard korišten je hidroksiklorokin sulfat visoke čistoće ($> 98\%$) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Pripremljena je temeljna standardna otopina (TSO) hidroksiklorokina koncentracije 1000 mg L^{-1} . Za pripremu otopine odvagano je $10,0 \text{ mg}$ hidroksiklorokina i otopljeno u 10 mL MilliQ vode. Za pripremu radne standardne otopine

(RSO) koncentracije 10 mg L^{-1} , 2,5 mL otopine koncentracije 1000 mg L^{-1} preneseno je u odmjernu tikvicu od 250 mL, te nadopunjeno MilliQ vodom do oznake.

3.3.2 Priprema otopina hidroksiklorokina različitih pH-vrijednosti

Pripremljene su otopine hidroksiklorokina (10 mg L^{-1}) različitih pH-vrijednosti u rasponu 5-8, u svrhu praćenje utjecaja pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju. Otopina pH-vrijednosti 8 pripremljena je miješanjem 500 μL otopine HCQ-a (10000 mg L^{-1}) u tikvici od 50 mL koja je nadopunjena vodom do oznake te se potom pH podešavao do željene vrijednosti dodavajući 0,1 M NaOH i 0,01 M H_2SO_4 . Otopina pufera pH- vrijednosti 5 pripremljena je otapanjem 0,4202 g limunske kiseline monohidrata u 180 mL vode, pH-vrijednost otopine podešen je dodatkom 0,1 M NaOH ili 0,01 M HCl. Otopina hidroksiklorokina pH vrijednosti 5 pripremljena je miješanjem 500 μL otopine HCQ-a (10000 mg L^{-1}) u tikvici od 50 mL koja je nadopunjena otopinom pufera do oznake.

3.3.3 Priprema modelnih uzoraka otpadne vode

Pripremljene su modelna komunalna otpadna voda i modelna otpadna voda farmaceutske industrije. Modelna komunalna otpadna voda pripremljena je otapanjem 1,5 mg uree, 5,5 mg ekstrakta mesa, 8 mg peptona, 1 mg $\text{MgSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$, 2 mg $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$, 7 mg K_2HPO_4 u 500 mL vode iz slavine. Modelna otpadna voda farmaceutske industrije pripremljena je otapanjem 25 mg limunske kiseline, 15 mg askorbinske kiseline, 115 mg Na_2HPO_4 , 50 mg saharoze u 500 mL vode iz slavine. Ukupni organski ugljik (TOC) modelne komunalne otpadne vode iznosio je 10 mg mL^{-1} , a TOC modelne otpadne vode farmaceutske industrije iznosio je $0,547 \text{ mg mL}^{-1}$.

3.3.4 Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina

Početna masena koncentracija HCQ-a u ispitivanim otopinama bila je 10 mg L^{-1} . Otopine HCQ-a ozračivane su u 50 mL kvarcnim posudama. Visina otopine iznosila je 3 cm, a udaljenost između svjetiljke i površine otopine 14 cm. U redovitim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti od 300 μL i analizirani pomoću HPLC-DAD. U svim eksperimentima korištena su tri paralelna uzorka te kontrolni uzorka. Kontrolni uzorci bili su zaštićeni od zračenja aluminijskom folijom. Prije eksperimenata fotolitičke razgradnje provjerena je pH-vrijednost pripremljenih otopina kako bi se osiguralo da početna vrijednost pH ostane ista. Eksperimenti fotolitičke razgradnje provedeni su u Suntest CPS+ uređaju. Tijekom

eksperimenta intenzitet zračenja održavan je na 500 W m^{-1} , a temperatura na 25°C .

3.3.5 HPLC-DAD analiza

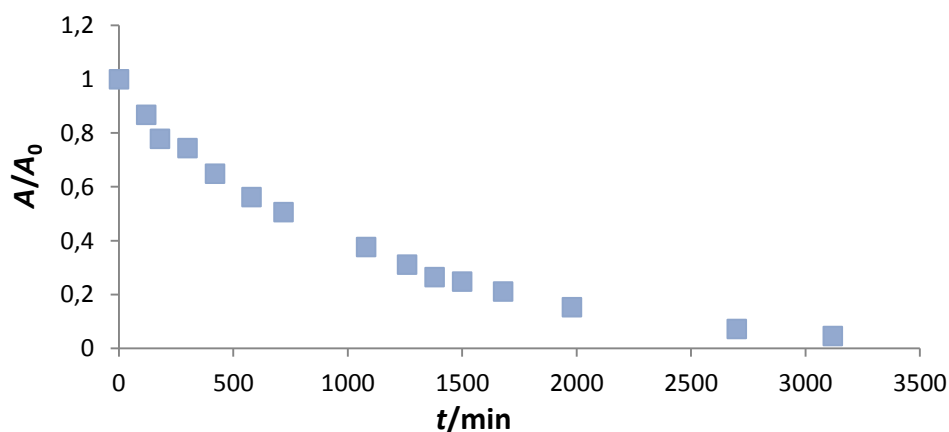
Da bi se odredila brzina fotolitičke razgradnje HCQ-a i njegovih fotorazgradnih produkata, uzorci su analizirani pomoću HPLC-DAD. Separacija hidroksiklorokina i njegovih razgradnih produkata u uzorcima provedena je na Kinetex C18 kromatografskoj koloni. Dimenzije kolone su $150 \text{ mm} \times 4,6 \text{ mm}$, dok promjer čestica unutar kolone iznosi $5 \mu\text{m}$. Analiza je provedena korištenjem 0,1%-tne mravlje kiseline u MilliQ vodi (eluens A) i 0,1%-tne mravlje kiseline u acetonitrilu (eluens B) uz gradijentno eluiranje. Brzina protoka iznosila je $0,5 \text{ mL min}^{-1}$, a temperatura kromatografske kolone 40°C . Vrijeme analize iznosilo je 20 minuta. Gradijentno eluiranje započelo je s 94 % eluens A tijekom 8 minuta, pa se linearno smanjivalo do 50% tijekom 15 minuta. Tijekom sljedećih pet minuta, volumen eluensa A je linearno povećan na 94%. Vrijeme uravnoteženja kromatografske kolone bilo je 5 min., a volumen injektiranja $20 \mu\text{L}$. Svi spojevi su detektirani na valnoj duljini od $343,4 \text{ nm}$.

4. REZULTATI I RASPRAVA

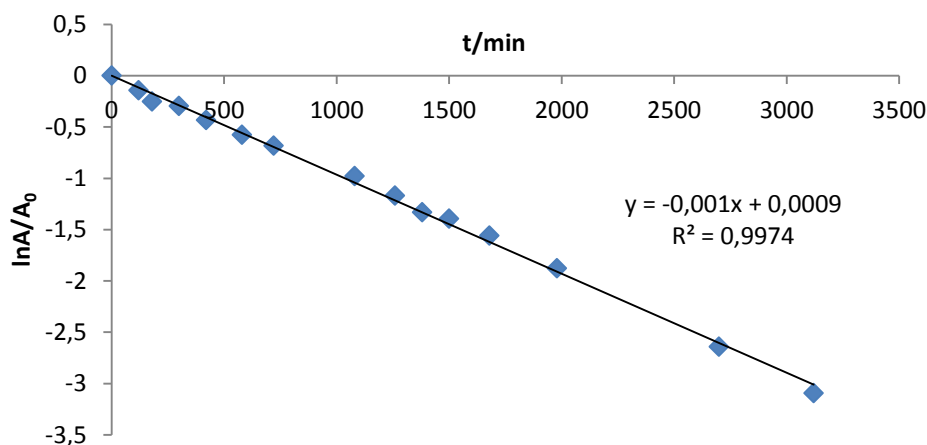
U ovom radu ispitivana je fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u MilliQ vodi pri različitim pH vrijednostima (pH 5, 7 i 8), prirodnim vodama: riječnoj i morskoj vodi, te modelnim otpadnim vodama: komunalnoj otpadnoj vodi i otpadnoj vodi farmaceutske industrije. Promjena koncentracije HCQ-a praćena je kao promjena površine ispod kromatografskog pika. Kao pokazatelj promjene koncentracije ispitivanog analita korišten je omjer A/A_0 , gdje je A_0 površina ispod pika početne otopine prije fotolitičke razgradnje, a A površina ispod pika nakon određenog vremena (t) izlaganja ispitivane otopine umjetnom Sunčevom zračenju.

4.1 Izravna fotolitička razgradnja hidroksiklorokina

Izravna fotolitička razgradnja ispitana je s otopinom hidroksiklorokina u MilliQ vodi koncentracije 10 mg L^{-1} . Na slici 13 prikazana je promjena koncentracije hidroksiklorokina u ovisnosti o duljini izlaganja umjetnom Sunčevom zračenju. Iz slike je vidljivo da je HCQ podložan izravnoj fotolitičkoj razgradnji. Iz ovisnosti $\ln(A/A_0)$ o vremenu (t) (slika 14) uz korištenje jednadžbe 10, određena je konstanta brzine reakcije koja iznosi $0,001 \text{ min}^{-1}$ uz koeficijent determinacije $R^2=0,9974$. Vrijeme poluraspada, izračunato prema jednadžbi 11, iznosi 11,55 sati.



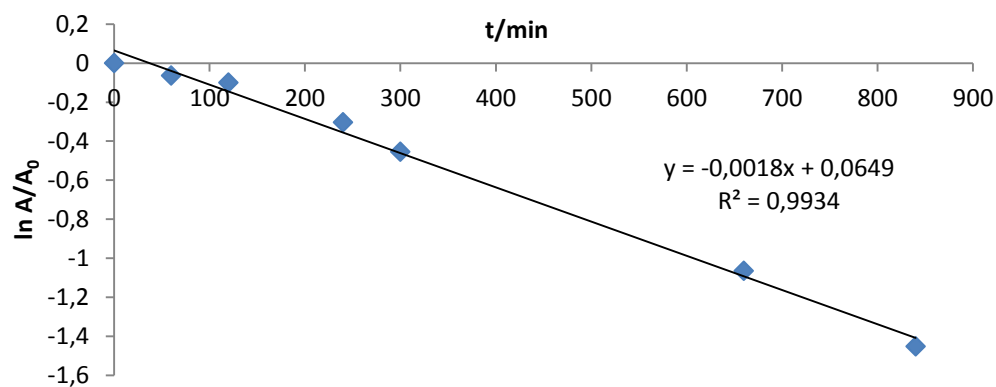
Slika 13. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u MilliQ vodi



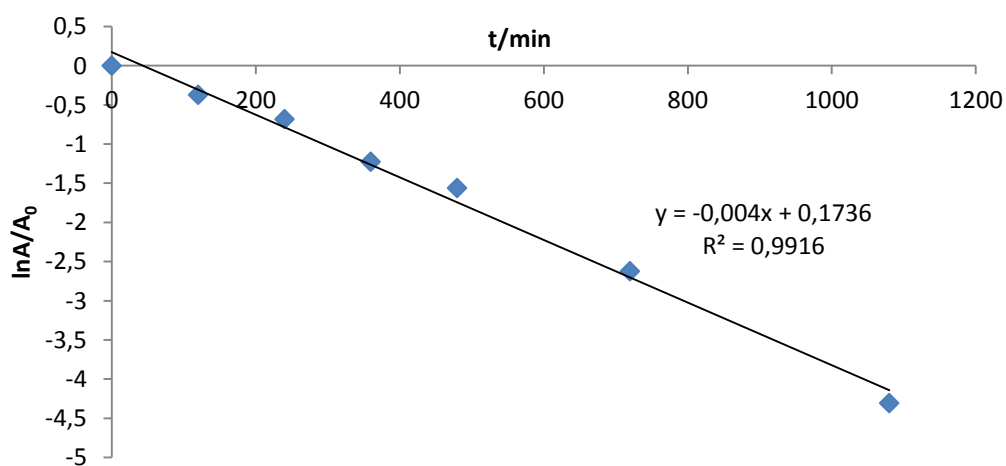
Slika 14. Ovisnosti $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina u MilliQ vodi

4.2 Utjecaj pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina

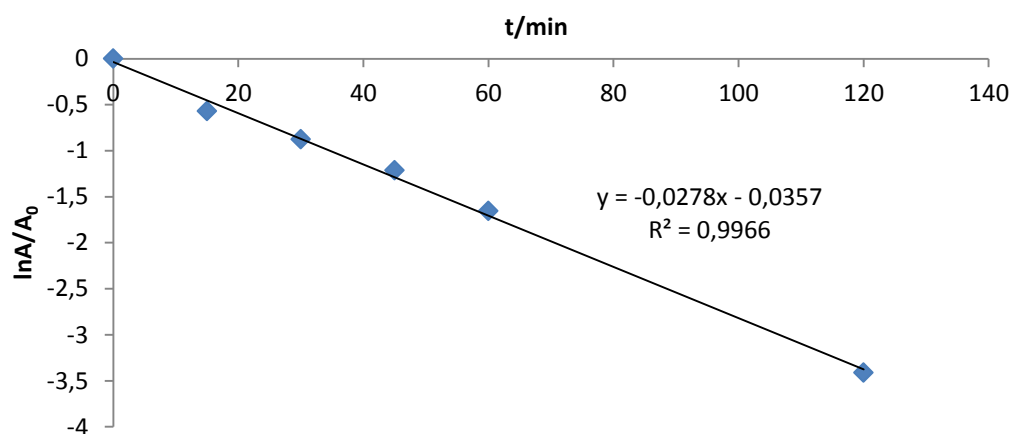
U svrhu istraživanja utjecaja pH-vrijednosti na brzinu fotolitičke razgradnje HCQ-a, pripremljene su otopine pufera pH-vrijednosti 5, 7 i 8 s koncentracijom HCQ 10 mg L^{-1} . S obzirom da je najčešći raspon pH-vrijednost prirodnih voda između 5-9, uzimane su spomenute vrijednosti kao polaznica za istraživanje utjecaja aktiviteta H^+ iona na brzinu fotolitičke razgradnje. Kinetika fotolitičke razgradnje HCQ-a prikazana kao ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu vidljiva je na slikama 15-17. Konstante brzine razgradnje (k) HCQ-a u otopinama pufera pri pH 5, pH 7 i pH 8 te vremena poluraspada ($t_{1/2}$) prikazana su u tablici 5. Razgradnja hidroksiklorokina (10 mg L^{-1}) u MilliQ vodi pri pH 5, pH 7 i pH 8 prikazana na slici 18 ukazuje da je najbrža razgradnja u puferu pH 8, dok se smanjenjem pH-vrijednosti proces razgradnje usporava.



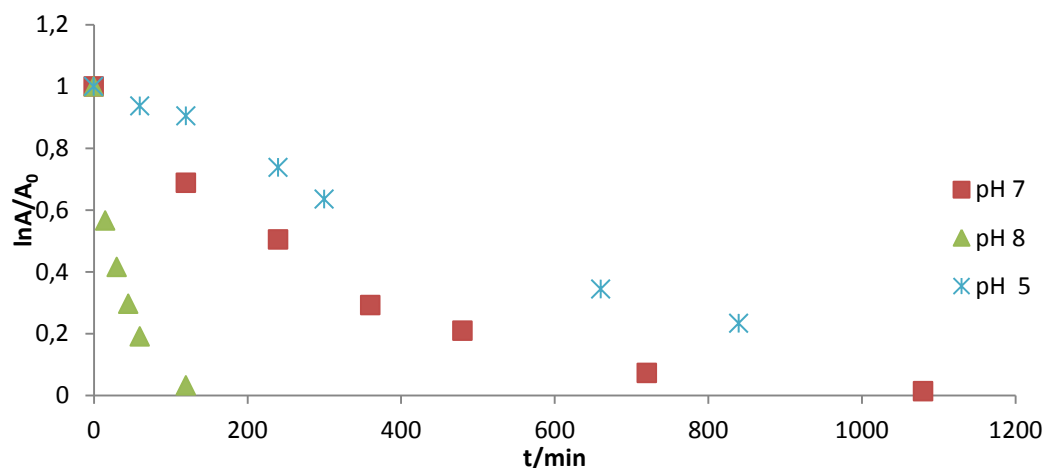
Slika 15. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u puferu pH 5



Slika 16. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u puferu pH 7



Slika 17. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u puferu pH 8



Slika 18. Razgradnja hidroksiklorokina (10 mg L^{-1}) u MilliQ vodi pri pH 5, pH 7 i pH 8

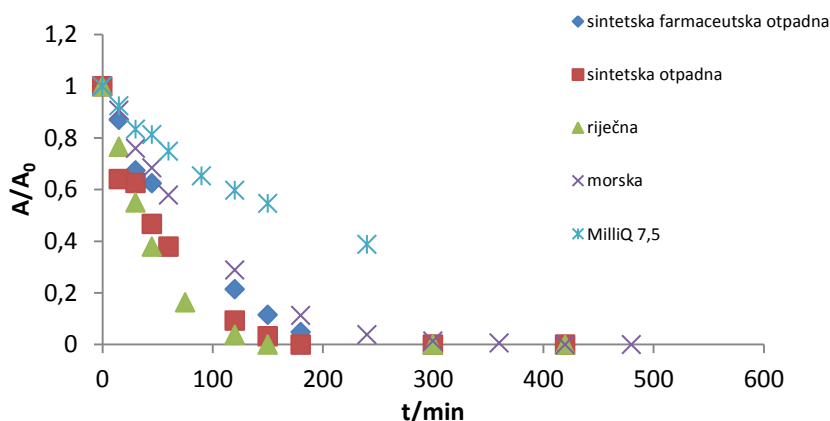
Tablica 5 potvrđuje utjecaj pH-vrijednosti kao što je već spomenuto u tekstu. Vidljivo je da povećanjem pH-vrijednosti raste brzina razgradnje hidroksiklorokina, odnosno smanjuje se vrijeme poluraspada. Najbrža razgradnja ostvarena je pri pH-vrijednosti 8, s konstantom brzine razgradnje $0,0278 \text{ min}^{-1}$. Vrijeme poluraspada iznosilo je 24,9 minuta.

Tablica 5. Konstante brzine razgradnje hidroksiklorokina i vremena poluraspada za različite pH-vrijednosti

	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$
MiliQ pH 5	0,0018	385,1	6,4
MiliQ pH 7	0,0040	173,3	2,9
MiliQ pH 8	0,0278	24,9	0,4

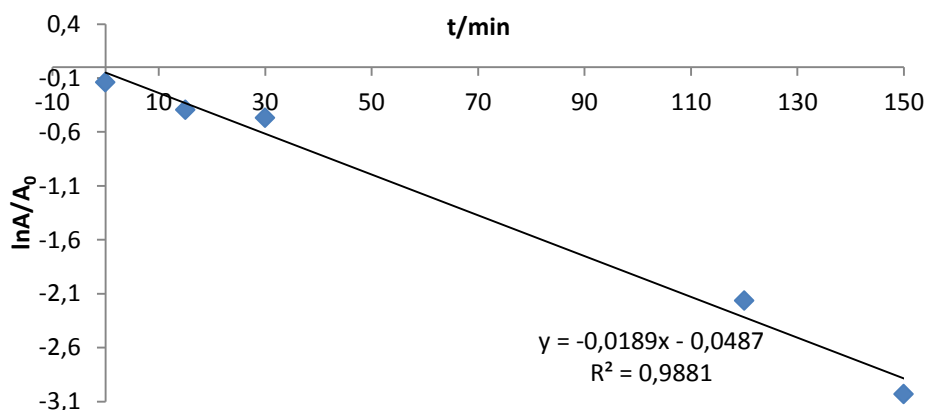
4.3 Utjecaj matice uzorka na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina

Ispitivanjem fotolitičke razgradnje HCQ-a u različitim uzorcima voda uočeno je drukčije ponašanje. Ispitivanje neizravne fotolitičke razgradnje HCQ-a provedeno je u prirodnim vodama i modelnim otpadnim vodama. U tu svrhu pripremljene su otopine hidroksiklorokina (10 mg L^{-1}) u modelnoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije, modelnoj komunalnoj otpadnoj vodi, riječnoj i morskoj vodi. S obzirom da je pH-vrijednost svih uzoraka voda iznosila 7,5, prikazana je usporedba brzine razgradnje u MilliQ vodi pri pH 7,5 (slika 19). Promjena koncentracije HCQ-a praćena je kao promjena površine ispod kromatografske krivulje (A/A_0).

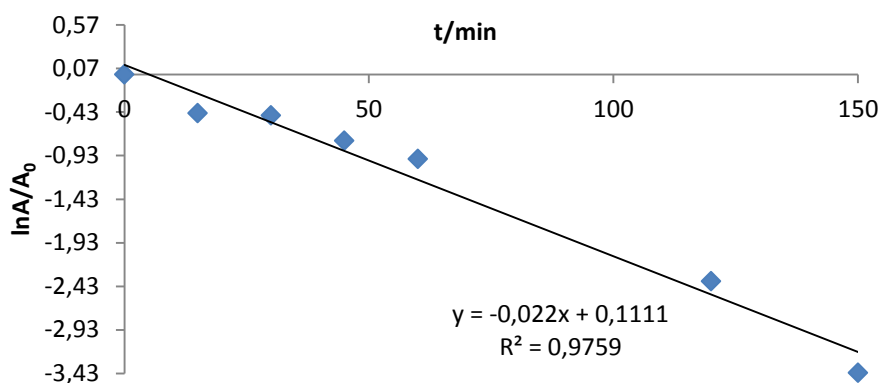


Slika 19. Razgradnja hidroksiklorokina u modelnoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije, modelnoj komunalnoj otpadnoj vodi, riječnoj, morskoj i MilliQ vodi pri pH-vrijednosti 7,5

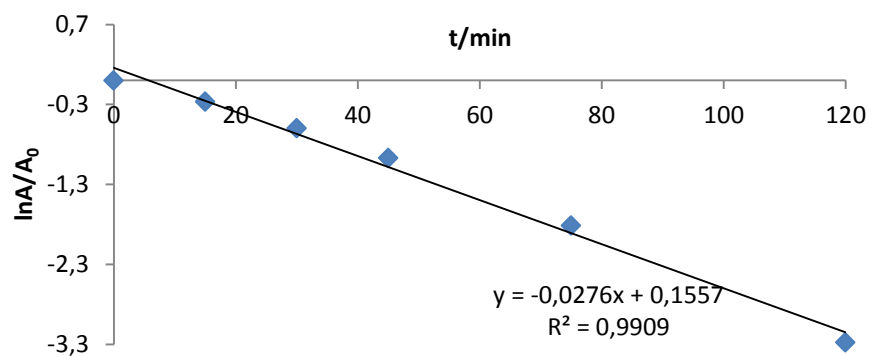
Da bi se odredila kinetika fotolitičke razgradnje HCQ-a rezultati su prikazani kao ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu što je prikazano na slikama 20-23.



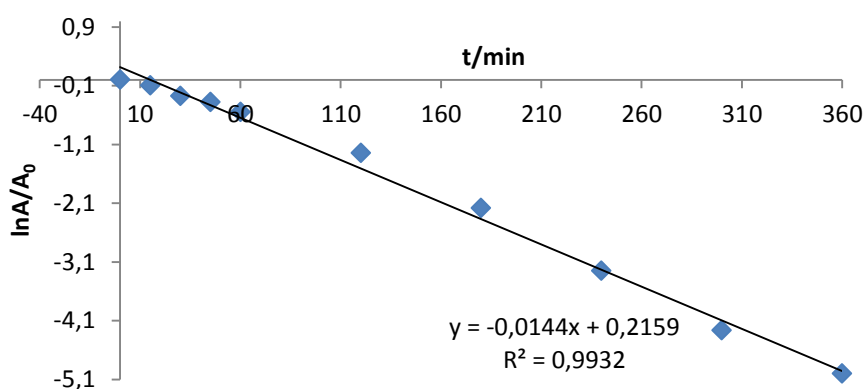
Slika 20. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u modelnoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije



Slika 21. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u modelnoj komunalnoj otpadnoj vodi



Slika 22. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u riječnoj vodi



Slika 23. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnje hidroksiklorokina u morskoj vodi

U tablici 6 vidljivo je da je najveća brzina razgradnje HCQ-a u riječnoj vodi ($k=0,0276 \text{ min}^{-1}$), koju potom slijedi modelna komunalna otpadna voda ($k=0,022 \text{ min}^{-1}$), zatim modelna otpadna voda farmaceutske industrije ($k=0,0189 \text{ min}^{-1}$). Najsporija razgradnja s vremenom poluraspada $t_{1/2} = 48,135 \text{ min}$ ustanovljena je u morskoj vodi.

Tablica 6. Konstante brzine razgradnje hidroksiklorokina i vremena poluraspada u različitim uzorcima voda

	$k \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$
Modelna otpadna voda farmaceutske industrije	0,0189	36,7
Modelna komunalna voda	0,0220	31,5
Riječna voda	0,0276	25,1
Morska voda	0,0144	48,1
MilliQ voda	0,0039	177,7

Navedeni rezultati ukazuju da sastav matice uzorka vode utječe na brzinu fotolitičke razgradnje HCQ-a. Na slici 19 možemo uočiti da je proces fotorazgradnje HCQ-a najbrži u riječnoj vodi, što se može pripisati prisutnim otopljenim organskim tvarima. S obzirom da riječna voda sadrži veću koncentraciju nitrata (tablica 4) u odnosu na morsku vodu, moguć je i potencijalni utjecaj nitrata.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitana je izravna i neizravna fotolitička razgradnja antimalarika i antireumatika hidroksiklorokina. U okviru rada ispitan je utjecaj pH-vrijednosti (pH 5, 7 i 8) na brzinu fotorazgradnje. Neizravna fotolitička razgradnja ispitana je u riječnoj i morskoj prirodnoj vodi, te u modelnoj komunalnoj otpadnoj vodi i modelnoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije s koncentracijom HCQ 10 mg L^{-1} .

Ispitana je kinetika razgradnje te je ustanovljeno da fotolitička razgradnja HCQ slijedi reakciju prvog reda uz koeficijent determinacije (R^2) veći od 0,99. Također, određene su konstante brzine razgradnje te vremena poluraspada HCQ u svim ispitivanim vodama.

Ispitivanjem utjecaja pH-vrijednosti na brzinu razgradnje, uočeno je da s povećanjem pH-vrijednosti raste konstanta brzine reakcije, a sukladno tome smanjuje se vrijeme poluraspada koje je najmanje pri pH-vrijednosti 8 te iznosi 24,9 minute. Povećanjem pH-vrijednosti otopina raste udio deprotoniranih molekula HCQ što doprinosi bržoj razgradnji.

Rezultati pokazuju da sastav matice uzorka vode utječe na brzinu fotolitičke razgradnje te je najbrža razgradnja postignuta u riječnoj vodi. Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti da je hidroksiklorokin podložan fotolitičkoj razgradnji, no potrebno je učiniti daljnja istraživanja utjecaja pojedinih sastavnica matice uzorka (huminskih kiselina, klorida, fosfata, nitrata) kako bi podrobnije mogli opisati ponašanje ispitivanog farmaceutika u okolišu.

6. LITERATURA

1. R. Wise, Antimicrobial resistance: priorities for action. *J. Antimicrob. Chemoth.* 49 (2002) 585-586.
2. K. Kümmerer, Significance of antibiotics in the environment, *J. Antimicrob. Chemoth.* 52 (2003) 5-7.
3. <http://www.pharmtech.com/global-drug-spending-look-ahead-0> (pristupljeno 6.7.2018)
4. B. Lunenfeld, P. Stratton, The clinical consequences of an ageing world and preventive strategies, *Best. Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 27 (2013) 643-665.
5. K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment, *Chemosphere* 75 (2009) 417-434.
6. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kem. Ind.* 65 (9-10) (2016) 471-482.
7. Y. Zhang, S. U. Geisen, C. Gal, Carbamazepine and diclofenac: Removal in wastewater treatment plants and occurrence in water bodies, *Chemosphere* 73 (2008) 1151-1161.
8. https://hr.wikipedia.org/wiki/ATK_klasifikacija (pristupljeno 2. kolovoza 2018)
9. R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere*, 50 (2003) 1319-1330.
10. http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2012/pharmaceuticals/en/ (pristupljeno 22. svibnja 2018)
11. J. C. Colmenares, R. Luque, J. M. Campelo, F. Colmenares, Z. Karpiński, A. A. Romero, Nanostructured photocatalysts and their applications in the photocatalytic transformation of lignocellulosic biomass: An overview, *Materials* 2 (2009) 2228-2258.
12. A. Cesaro, V. Naddeo, V. Belgiorno, Wastewatert by combination of advanced oxidation processes and conventional biological Systems, *Bioremediation and biodegradation*, 4 (2013) 4-8.
13. F. Dinkel, T. Kagi, T. Wintgens, M. Dazio, R. Hochstrat, LCA of advanced wastewater treatment to remove micropollutants, prezentacija na 7th International conference on Life Cycle Management, Bordeaux, 2015.
14. <https://livertox.nih.gov/AntirheumaticAgents.htm> (pristupljeno 22. svibnja 2018)

15. B. Saini, G. Bansal, Characterization of four new photodegradation products of hydroxychloroquine through LC-PDA, ESI-MSⁿ and LC-MS-TOF studies, *J. Pharm. and Biomed. Anal.* 84 (2013) 224-231.
16. A. Casian, S. Sangle, D. P. D'Cruz, New use for an old treatment: Hydroxychloroquine as a potential treatment for systemic vasculitis, 17 (2018) 660-664.
17. S. Y. Chhonker, R. L. Sleightholm, J. Li, D. Oupicky, J. Daryl, Simultaneous quantitation of hydroxychloroquine and its metabolites in mouse blood and tissues using LC–ESI–MS/MS, *J. Chromatogr. B* 1 (2018) 320-327.
18. H. Hjorth Tonnesen, A. L. Grislingaas, S. O. Woo, J. Karlsen, Photochemical stability of antimalarials. I. Hydroxychloroquine, *Int. J. Pharm.* 43 (1988) 215-219.
19. V. G. Dongre, P. D. Ghugare, P. Karmuse, D. Singh, A. Jadhav, A. Kumar, Identification and characterization of process related impurities in chloroquine and hydroxychloroquine by LC/IT/MS, LC/TOF/MS and NMR, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 873-879.
20. D. D. Fatta-Kassinos, M. I. Vasquez, K. Kummerer, Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes-degradation, elucidation of by products and assessment of their biological potency, *Chemosphere*, 85 (2011) 693-709.
21. M. Wawryniuk, A. Pietrzak, G. Nałęcz-Jawecki, Evaluation of direct and indirect photodegradation of mianserin with high-performance liquid chromatography and short-term bioassays, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 115 (2015) 144-151.
22. H. F. Hemond, E. J. Fechner, *Chemical fate and transport in the environment*. 3. izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2015, str. 75-218.
23. M. Kaštelan Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str.122-137.
24. A. J. M Horvat, Instrumentalne tehnike odjeljivanja, u M. Kaštelan-Macan i M. Petrović (ur.), *Analitika okoliša, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije*, Zagreb, 2013, str. 206-217.
25. https://www.google.hr/search?q=kromatogram&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwiitNH_reDbAhXD66QKHaiNCecQ_AUICigB&biw=1280&bih=590#imgrc=ngDKtjMZAMhmZM: (pristupljeno 20. lipnja 2018.)

26. F. Rouessac, A. Rouessac, General aspects of chromatography u: Chemical Analysis: Modern Instrumentation Methods and Techniques, John Wiley & Sons, Chicester, 2007, str. 3-29.
27. Nj. Radić, L. Kukoč Modun, Kromatografija u: Uvod u analitičku kemiju, Školska knjiga Zagreb, 2016, str. 639-649.
28. T. Bolanča, Š. Ukić, Ionska kromatografija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015, str 111-115.
29. https://www.google.hr/search?q=dad+detektor&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjXp8qZtODbAhVDJJoKHSJLBrUQ_AUICigB&biw=1280&bih=540#img=c=sUwnN-KB9UGAuM (pristupljeno 18. srpnja 2018.)
30. https://www.google.hr/search?q=dad+detektor&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjXp8qZtODbAhVDJJoKHSJLBrUQ_AUICigB&biw=1280&bih=540#img=c=QsQN6hrYi7TfQM (pristupljeno 18. srpnja 2018)
31. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01611> (pristupljeno 18. srpnja 2018.)