

Proučavanje sudbine peptidnih lijekova u okolišu

Ivanković, Klaudija

Undergraduate thesis / Završni 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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:641550>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Klaudija Ivanković

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, lipanj 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Klaudija Ivanković

PROUČAVANJE SUDBINE PEPTIDNIH LIJEKOVA U OKOLIŠU

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić
dr. sc. Marko Rožman

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić
dr. sc. Martina Biošić
prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, lipanj 2018.

Hvala mentorima, prof. dr. sc. Sandri Babić zbog tople komunikacije i podrške u svakom segmentu te dr. sc. Marku Rožmanu na prenesenom znanju.

Posebna zahvala asistentu Dariu Dabiću, mag. chem. na svakom razgovoru i što je uvijek bio tu kada zagusti. Što je prije svega, uvijek bio prijatelj!

Zahvala i cijelom Zavodu za analitičku kemiju, naročito divnim tehničarkama, Slavici i Tanji bez kojih bi dan u labosu bio tmuran. Tehničarke za poželjeti!

Hvala mojim roditeljima, Josipi i Brani Ivanković, koji su izrazito utjecali na mene, moje izbore i na ono što sam danas! Kada su bili podrška, a naročito kada je ona izostala, stvorili su jaču, odgovorniju i odlučniju verziju mene kojoj je sada samo nebo granica. Svakako, hvala i mojoj braći, Anti i Bruni, od kojih sam i zbog kojih sam puno naučila. Kojima sam uvijek nastojala biti uzor te se nadam da sam bar dijelom u tome uspjela!

Hvala mojim prijateljima, naročito Dori Kamenečki i Marku Jagetiću koji su bili uz mene tokom ove tri godine. Svašta smo prošli zajedno, što ćemo tek proći, pitanje je... nadam se i dalje zajedno!

Za kraj, no vjerojatno najbitnije, hvala mom Marku! Hvala ti na svemu što si napravio za mene u ovih gotovo 7 godina. Hvala ti što moje uspone doživljavaš kao svoje, ali i padove. Što svaki osmijeh i suzu, šalu i zabrinutost mogu podijeliti s tobom. Zabrinutost je tada duplo manja, a osmijesi mnogobrojno veći! Hvala ti što si tu!

„Be less curious about people and more curious about ideas.“

~ Marie Curie ~

SAŽETAK

Peptidni lijekovi su nova generacija lijekova koja svoju ekspanziju na tržištu tek očekuje zbog dokazanih velikih prednosti u odnosu na dosadašnje lijekove. Općepoznati problem zagađenja okoliša konvencionalnim lijekovima zbog velike konzumacije i neadekvatnog odlaganja, mogao bi uskoro postati i problemom peptidnih lijekova. Dodatna problematika peptidnih lijekova u okolišu jest njihova izrazita biološka aktivnost. S obzirom da se radi o velikim molekulama koje sadrže kromoforne skupine, postoji mogućnost fotolitičke razgradnje, što dovodi do dodatne zabrinutosti po pitanju njihovih razgradnih produkata. U ovom radu ispitana je fotolitička razgradnja glikopeptidnog antibiotika vankomicina koji je trenutno najkorišteniji lijek iz skupine peptidnih lijekova zbog čega je izabran kao predstavnik. Fotolitička razgradnja pod utjecajem umjetnog Sunčevog zračenja praćena je u dvije vodene matrice, ultračistoj i izvorskoj vodi. Rezultati ukazuju da je vankomicin podložan fotolitičkoj razgradnji te da mu je vrijeme poluraspada oko 100 minuta. Analizom podataka nije uočena statistički značajna razlika između brzina fotodegradacije vankomicina u ultračistoj i izvorskoj vodi.

Ključne riječi: vankomicin, peptidni lijekovi, fotolitička razgradnja

SUMMARY

Peptide pharmaceuticals represent a new generation of pharmaceuticals which are expected to expand in the following years due to their great advantages over the currently used ones. As a consequence of excessive use and inadequate disposal, peptide pharmaceuticals could soon become the new lingering pollution problem, meeting the same well known fate of conventional pharmaceuticals. Peptide pharmaceuticals are known for their pronounced biological activities, which lead to additional threats to the environment. Their large molecular structures containing chromophores are likely to experience photolytic degradation, raising uncertainty about its byproducts. The main focus of this thesis is the photolytic degradation of the world's most used peptide pharmaceutical, the vancomycin glycopeptide antibiotic. Photolytic degradation of vancomycin induced by artificial sunlight has been monitored in ultrapure and spring water matrices. Results have shown vancomycin to be prone to photolytic degradation, with its half-life of 100 minutes. After further analysis, there is no significant speed difference in vancomycin photodegradation between ultrapure and spring water.

Key words: vancomycin, peptide pharmaceuticals, photolytic degradation

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. LIJEKOVI	2
2.1.1. GLIKOPEPTIDNI LIJEKOVI.....	2
2.1.2. VANKOMICIN	3
2.2. LIJEKOVI U OKOLIŠU	4
2.2.1. SUDBINA LIJEKOVA U OKOLIŠU.....	5
2.3. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA LIJEKOVA.....	6
2.3.1. KINETIKA FOTOLITIČKE RAZGRADNJE	6
2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA	7
2.4.1. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI.....	8
2.4.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI.....	9
2.5. SPEKTROMETRIJA MASA.....	11
2.5.1. IONIZACIJA.....	12
2.5.2. ANALIZATORI MASA.....	13
2.5.3. SPREGNUTA SPEKTROMETRIJA MASA	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. MATERIJALI.....	15
3.1.1. VANKOMICIN	15
3.1.2. KEMIČALIJE	16
3.1.3. UZORCI VODE.....	16
3.2. INSTRUMENTI.....	17
3.2.1. UREĐAJ ZA FILTRACIJU	17
3.2.2. SUNTEST CPS+.....	17
3.2.3. TEKUĆINSKI KROMATOGRAF VEZAN SA SPEKTROMETROM MASA	18
3.3. METODA RADA.....	18
3.3.1. PRIPREMA RADNIH OTOPINA	18
3.3.2. OSVJETLJAVANJE OTOPINA	19
3.3.3. ANALIZA VEZANIM SUSTAVOM UHPLC-MS.....	19
4. REZULTATI I RASPRAVA	21
4.1. OPTIMIRANJE UVJETA UHPLC ANALIZE.....	21
4.2. OPTIMIRANJE UVJETA MS ANALIZE.....	22
4.3. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA VANKOMICINA	23
5. ZAKLJUČAK.....	26
6. LITERATURA.....	27
7. ŽIVOTOPIS.....	30

1. UVOD

Farmaceutska industrija pripada kategoriji industrija koje bilježe veliki porast od sredine prošlog stoljeća pa sve do danas, a trend će se zasigurno nastaviti i u budućnosti. Podaci Agencije za lijekove i medicinske proizvode (*HALMED*) u Republici Hrvatskoj pokazuju da je u 2016. godini prosječna potrošnja lijekova u jednom danu iznosila 1.045,88 dnevnih doza na 1000 stanovnika, što je porast od gotovo 5% u usporedbi s prethodnom, 2015. godinom (998,56 dnevnih doza dnevno na 1000 stanovnika) [1]. Uzevši u obzir broj stanovnika Republike Hrvatske iz 2016. godine [2], na godišnjoj razini radi se o oko 1593,5 milijuna dnevnih doza lijekova.

Iz navedenog je jasno kako se radi o velikoj i kontinuiranoj proizvodnji te potrošnji lijekova koji u konačnici završavaju u okolišu. Farmaceutski aktivna tvar se nakon primjene i metabolizma izlučuje iz tijela kao osnovna molekula ili kao smjesa osnovne molekule i metabolita. Nadalje, putem otpadnih voda farmaceutski aktivna tvar i njeni metaboliti dolaze u okoliš. Zbog nepostojanja adekvatnih postrojenja za obradu otpadnih voda, komunalne i industrijske otpadne vode glavni su put ulaska navedenih spojeva u okoliš [3-5]. Konstantnim unosom, s još uvijek nepoznatim utjecajem na okoliš, farmaceutski aktivne tvari se ubrajaju u skupinu „novih zagađivala“ za koje nije zakonom propisana maksimalno dopuštena koncentracija u okolišu [6, 7].

U novije vrijeme, s razvojem industrije i znanosti dolazi do pronalaska novih vrsta liječenja i lijekova, a jedna od takvih novosti su i peptidni lijekovi, koji su za razliku od dosadašnjih lijekova velike molekule (do oko 50 aminokiselina) te složene strukture s izrazitom biološkom aktivnosti. Trenutno se na tržištu nalazi oko 60 vrsta peptidnih lijekova, dok je preko 640 peptidnih lijekova na kliničkim i prekliničkim ispitivanjima [8]. Iako se još uvijek radi o relativno maloj količini, tržište peptidnih lijekova raste nekoliko puta brže od tržišta konvencionalnih lijekova, pa se sukladno tome u skoroj budućnosti očekuje njihov pritisak na okoliš [9]. Stoga je izrazito važno istražiti njihov potencijalni utjecaj na okoliš, jer se radi o biološki aktivnim spojevima, a u nekim slučajevima i novim antibioticima, zbog čega postoji opravdana bojazan od razvitka rezistentnih bakterija. S time u vidu, svrha ovog rada je doprinijeti razumijevanju sudbine peptidnih lijekova u okolišu. U ovom radu proučava se kinetika fotolitičke razgradnje vankomicina kao predstavnika peptidnih lijekova.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. LIJEKOVI

Zakon o lijekovima Republike Hrvatske, izdan u Narodnim Novinama, definira lijek kao tvar ili mješavinu tvari koja se može upotrijebiti ili primijeniti na ljudima u svrhu obnavljanja, ispravljanja ili prilagodbe fizioloških funkcija farmakološkim, imunološkim ili metaboličkim djelovanjem ili za postavljanje medicinske dijagnoze [10]. Lijek može sadržavati jednu ili više farmaceutski aktivnih (djelatnih) tvari, pomoćne tvari, aditive, razne anorganske soli i druge organske tvari poput šećera, mirisa, bojila itd. Okosnica lijeka je farmaceutski aktivna tvar (engl. *active pharmaceutical ingredient*, API), odnosno djelatna tvar koja je najčešće složena organska molekula koju se osim u lijekovima, može pronaći i u raznim kozmetičkim preparatima, veterinarskim pripravcima, dodacima prehrani i sl.

Postoji više različitih podjela lijekova, neke od njih su prema molekulskoj masi, području djelovanja, kemijskoj strukturi, mehanizmu djelovanja i dr. Najčešća podjela objedinjuje kemijska svojstva, način primjene te terapijski učinak pa lijekove dijeli na: analgetike i protuupalne lijekove, antihistaminike, diuretike, antidepresive, antibiotike, antiepileptike, regulatore masnoća u krvi, regulatore tlaka, hormone, steroide, antitumorske lijekove te β -blokatore [3, 6, 7].

2.1.1. GLIKOPEPTIDNI LIJEKOVI

Peptidni lijekovi su lijekovi čija je okosnica, to jest farmaceutski aktivna tvar, građena od peptida, odnosno niza do oko 50 aminokiselina. Razvoj peptidnih lijekova započeo je dvadesetih godina prošloga stoljeća razvojem inzulina za liječenje dijabetesa. Prednost peptidnih lijekova jest izrazita selektivnost i efikasnost te mogućnost unutarstaničnih efekata. Zbog svoje biološke osnove, peptidni lijekovi su sigurni te ih tijelo dobro podnosi, što pokazuju i slučajevi intolerancije koji su rijetki. S obzirom da se radi o nizu aminokiselina, molekulske mase peptidnih lijekova su velike pa se takvi lijekovi teško resorbiraju putem probavnog sustava oralnom konzumacijom. Stoga se peptidni lijekovi primjenjuju parenteralno, odnosno direktno u tjelesnu tekućinu putem injekcija [8, 11, 12].

Glikopeptidi su vrsta peptida na koje su vezani ugljikohidratni lanci, glikani. Glikopeptidni lijekovi su novija vrsta antibiotika bakteriostatskog i baktericidnog djelovanja, što znači da inhibiraju množenje bakterija te izazivaju smrt bakterijskih stanica. Koriste se kod metaboličkih i kardiovaskularnih bolesti te onkologiji, najčešće za liječenje infekcija prouzročenih aerobnim i anaerobnim gram-pozitivnim bakterijama kao što su stafilokoki (zajedno s meticilin rezistentnim stafilokokima, *MRSA*), streptokoki, enterokoki, *Corynebacterium spp.*, *Bacillus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *L. monocytogenes*, *Clostridium spp.*, *Actinomyces spp.* Nerijetko se koriste i kao alternativni izbor u slučaju rezistencije na antibiotik prvog izbora.

Glikopeptidni lijekovi inhibiraju sintezu bjelančevina ireverzibilnim vezanjem na podjedinicu ribosoma. Takvim vezanjem ribosom ne može vršiti translaciju glasničke RNK (mRNK) tokom sinteze proteina što dovodi do smrti bakterijske stanice. Drugi mogući mehanizam jest pogrešno čitanje genetskog koda, pa sintezom nastaju neupotrebljive bjelančevine koje ne vrše svoju funkciju kao enzimi ili strukturni dijelovi bakterijske stanice zbog čega stanica umire. Glikopeptidi se uglavnom izlučuju nepromijenjeni putem bubrega [8, 11, 12].

Tržište peptidnim lijekovima 2011. godine je u Sjedinjenim Američkim Državama vrijedilo 14,1 milijardu dolara, a predviđeni rast vrijednosti u 2018. godini je 25,4 milijarde dolara. Američka Agencija za hranu i lijekove (FDA) do sada je odobrila oko 60 vrsta peptidnih lijekova, dok je otprilike 140 peptidnih lijekova trenutno na kliničkim ispitivanjima, a njih više od 500 na prekliničkim ispitivanjima [8]. Takvi iznosi govore o velikoj vrijednosti tržišta, ali i skorašnjoj široj primjeni te sve većoj potrošnji ove vrste lijekova. S vremenom će peptidni lijekovi postati sve dostupniji, a samim time i prisutniji u okolišu.

2.1.2. VANKOMICIN

Vankomicin je jedan od najvažnijih glikopeptidnih lijekova koji su trenutno u primjeni. Djelotvoran je protiv većine gram-pozitivnih koka i bacila, a često se koristi kod infekcija koje su opasne po život. Nakon primjene, većinom se izlučuje u obliku mikrobiološki aktivne tvari (približno 75 - 90% u roku od 24 sata) putem bubrega. Izlučivanje putem žuči je neznatno (manje od 5% doze).

Nalazi se na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije te njegova cijena po intravenoznoj dozi iznosi 1,70 do 6,00 dolara u zemljama razvijenog svijeta [6, 12, 13]. Prema

podacima iz 2016. godine, potrošnja vankomicina u Republici Hrvatskoj iznosila je 0,04 dnevne doze na 1000 stanovnika u jednom danu. Vankomicin je najkorišteniji lijek iz grupe glikopeptidnih lijekova u Republici Hrvatskoj zbog čega je odabran kao predstavnik glikopeptida za ispitivanje fotolitičke razgradnje u ovome radu [1]. Iako je prema podacima riječ o relativno maloj količini antibiotika koji se koristi i u konačnici završava u okolišu, potrebno je imati u vidu već spomenuto očekivano povećanje tržišta i razvitak ove vrste lijekova zbog čega je bitno istražiti moguće utjecaje i prije nego do njih dođe. Osim povećanja tržišta i konzumacije, opravdano je u budućnosti očekivati povećanje koncentracije u okolišu i zbog relativno brze eliminacije, a s druge strane slabe sposobnosti metaboličke razgradnje peptida u ljudskom organizmu [8, 11].

2.2. LIJEKOVI U OKOLIŠU

Donedavno se smatralo da prisustvo lijekova, odnosno farmaceutski aktivnih spojeva, u okolišu nije štetno za ekosustav pa im se nije davao veliki značaj, no njihova prekomjerna proizvodnja te često i nepotrebna potrošnja izazivaju zagađenje i ugrožavanje okoliša, ali i ozbiljne zdravstvene posljedice za čovjeka. Danas se farmaceutski aktivni spojevi, prema Europskoj Komisiji, ubrajaju u „nova zagađivala“, odnosno spojeve koji potencijalno mogu dovesti do ozbiljnog narušavanja ekosustava. Europska komisija nalaže redovno testiranje uzoraka vode (izvorska voda, razne otpadne vode i sl.) te praćenje i izvještavanje o koncentracijama zagađivala koji se nalaze na listi opasnih i potencijalno opasnih, kao i novih spojeva koji još nisu uvedeni na spomenute liste [14].

Posljednjih godina provodi se i sve veći broj laboratorijskih istraživanja u svrhu razumijevanja ponašanja farmaceutski aktivnih spojeva izloženih raznim simuliranim uvjetima iz okoliša. Bez obzira na zabrinutost, zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš još uvijek ne postoji, a samim time niti posebna briga farmaceutskih tvrtki, bolničkih centara, farmi i sličnih središta koji su trenutno najveći izvori otpuštanja lijekova u okoliš. Osim navedenih, koncentraciji lijekova u okolišu doprinosi i svaki organizam koji konzumira lijek zbog nemogućnosti potpune metaboličke razgradnje aktivne tvari, ali i neadekvatno odlaganje neiskorištenih lijekova. S druge strane, postojeća postrojenja za obradu voda nisu prilagođena uklanjanju takvih spojeva iz vode, a istovremeno su farmaceutski aktivne tvari u sve široj primjeni, od klasične primjene u humanoj i životinjskoj medicini do kozmetike, biotehnologije i dr. [3, 4, 6, 7, 15-18].

Farmaceutski aktivni spojevi su zagađivala čija se koncentracija u okolišu mjeri u $\mu\text{g/L}$ i ng/L [4, 18, 19, 20]. S obzirom da se radi o biološki aktivnim spojevima, i najmanja količina u okolišu ima potencijalno negativno djelovanje. Osim niske koncentracije i biološke aktivnosti, bitno je spomenuti da su to često ionski spojevi vrlo dobro topljivi u vodi. Nakon ulaska u okoliš, farmaceutski aktivna molekula može podleći raznim kemijskim i fizikalnim procesima što određuje njenu sudbinu u okolišu [3, 4, 21].

2.2.1. SUDBINA LIJEKOVA U OKOLIŠU

Nakon primjene lijeka, farmaceutski aktivna tvar se izlučuje iz tijela kao osnovna molekula ili smjesa osnovne molekule i metabolita te takva dolazi u okoliš u kojem može biti izložena raznim procesima razgradnje. Općenito, procesi strukturnih promjena spojeva mogu biti abiotički i biotički. Biotički procesi su oni gdje dolazi do promjene u strukturi kao posljedica djelovanja živih organizama, poput biotransformacije i biodegradacije, dok su abiotički procesi oni procesi u kojima ne sudjeluju živi organizmi, primjerice adsorpcija, fotoliza i hidroliza. Sudbina lijekova u okolišu određena je njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima te uvjetima u okolišu. Svojstva poput koeficijenta razdiobe *n*-oktanol-voda (K_{ow}), koeficijenta razdiobe (K_D), konstante ionizacije (K_k) te koeficijenta sorpcije na organski ugljik (K_{oc}) važna su da bi se moglo predvidjeti hoće li se neki farmaceutski aktivni spoj više zadržavati u vodi ili u tlu. Brojni uvjeti u okolišu utječu na njihovo ponašanje: klima, pH-vrijednost i komponente prisutne u vodi i sedimentu (sastav matrice) itd.

Rezultat biotičke razgradnje farmaceutski aktivne tvari je djelomična ili potpuna mineralizacija do ugljikova dioksida i anorganskih soli, ali samo mali dio se može razgraditi na takav način. Češći su abiotički procesi razgradnje koji uključuju sorpciju, hidrolizu, fotolizu, oksidaciju i redukciju. Takvim procesima razgradnje nastaju novi spojevi, tj. razgradni i transformacijski produkti. Transformacijski produkti nastaju promjenom u strukturi početne molekule, dok molekulska masa ostaje nepromijenjena. S druge strane, prilikom razgradnje dolazi do cijepanja početne molekule i nastajanja dva ili više spojeva s drugačijom molekulskom masom [3, 6, 7, 15, 16].

2.3. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA LIJEKOVA

Jedan od glavnih abiotičkih procesa koji pridonosi smanjenju koncentracije lijekova u okolišu je fotoliza. Fotoliza je reakcija transformacije i/ili razgradnje kemijske tvari izazvana elektromagnetskim zračenjem, primjerice izlaganjem Sunčevom zračenju. Za fotolizu farmaceutski aktivnih spojeva u vodi u okolišu značajno je površinsko Sunčevo zračenje. Fotoliza u kojoj sama molekula apsorbira zračenje uzrokujući promjene u njevoj strukturi ili razgradnje, naziva se izravnom fotolizom. Neki spojevi nisu podložni fotolizi, ali mogu sudjelovati u fotolitičkoj reakciji druge molekule (primjerice huminskih kiselina) pa se takva fotoliza naziva neizravnom.

Sunčevo zračenje sastoji se od ultraljubičastog zračenja (UV) u rasponu od 280 nm do 400 nm te vidljivog dijela spektra (VIS) od 400 nm do 700 nm. Da bi došlo do izravne fotolize, spoj mora biti podložan istoj, odnosno mora moći apsorbirati Sunčevo zračenje, a tu sposobnost imaju molekule koje sadrže kromofore. Kromofori su funkcijske skupine ili dijelovi molekule koji sadrže dvostruke ili trostruke veze, odnosno koje imaju sposobnost apsorpcije elektromagnetskog zračenja, kao što su aromatski prsteni, karbonilne skupine, heteroatomi i dr. Mjera koja pokazuje koliko određeni kemijski spoj apsorbira zračenje, odnosno podliježe fotolitičkoj reakciji naziva se molarni apsorpcijski koeficijent te ovisi o valnoj duljini. Količina tvari koja će podlijeći fotolizi ovisit će o nizu faktora kao što su pH medija, vremenskim uvjetima, intenzitetu Sunčeva zračenja, tvrdoći i dubini vode, koncentraciji tvari, ali i o drugim sastojcima vode (matrici) koji mogu inhibirati ili katalizirati fotolizu [21-23].

2.3.1. KINETIKA FOTOLITIČKE RAZGRADNJE

U kontroliranom, zatvorenom sustavu moguće je pratiti fotolizu farmaceutski aktivnog spoja te time dobiti uvid u samu kinetiku fotolize. Praćenjem kinetike fotolitičke razgradnje farmaceutski aktivne tvari dobiva se informacija o životnom vijeku lijekova u vodi u okolišu, što je vrijedna informacija s obzirom na spomenutu problematiku. Većina fotolitičkih reakcija ponaša se kao reakcija prvog reda koja opisuje brzinu reakcije kao linearno smanjenje koncentracije tvari u vremenu:

$$\frac{d[c]}{d[t]} = -k \cdot [c] \quad (1)$$

gdje je c koncentracija spoja, t je vrijeme provođenja eksperimenta, a k konstanta brzine razgradnje. Integriranjem izraza (1) dobije se izraz (2):

$$c_t = c_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

$$\ln \frac{c_t}{c_0} = -k \cdot t \quad (3)$$

U navedenom izrazu c_0 je početna koncentracija spoja prije početka provedbe eksperimenta, a c_t koncentracija u vremenu t . Konstantu brzine razgradnje moguće je odrediti iz jednadžbe pravca, kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c_t/c_0)$ o vremenu. Vrijeme poluraspada spoja ($t_{1/2}$) predstavlja vrijeme u kojem se koncentracija lijeka smanjila na polovinu svoje početne vrijednosti, a moguće ga je odrediti iz sljedećeg izraza [23]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4)$$

2.4. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika temeljena na razlikama sorpcije tvari. Ujedno je i najraširenija analitička metoda koja se primjenjuje u rutinskim analizama uzoraka i raznim istraživanjima. Kromatografski sustav čine pokretna i nepokretna faza te ispitivani spoj. Ovisno o odabiru pokretne faze, razlikujemo plinsku kromatografiju (engl. *gas chromatography*, GC), tekućinsku kromatografiju (engl. *liquid chromatography*, LC) i fluidnu kromatografiju pri superkričnim uvjetima (engl. *supercritical fluid chromatography*, SFC).

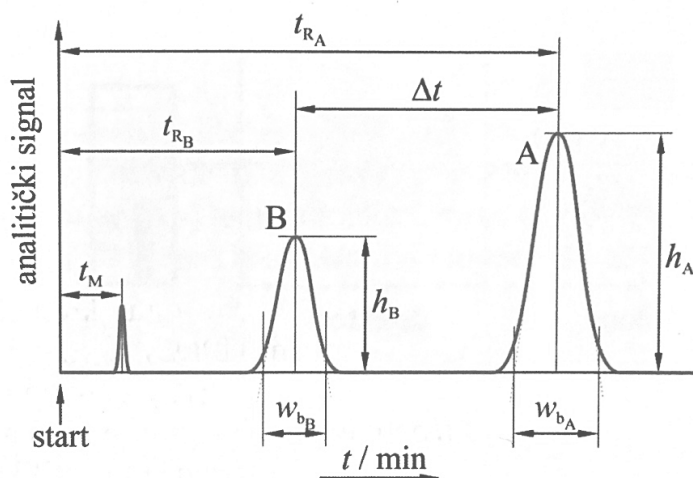
Kromatografska analiza započinje injektiranjem uzorka, tj. ispitivanog spoja ili smjese spojeva u pokretnu fazu. Zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava pojedinih tvari u uzorku, tvari će preferirati više pokretnu ili nepokretnu fazu te će doći do različite raspodjele tvari između dvije faze. Nepokretna faza najčešće je porozni materijal velike specifične površine, a njegov izbor ovisi o prirodi ispitivanog spoja. Odabir nepokretne i pokretne faze je vrlo bitan i razlikuje se od uzorka do uzorka, s obzirom da je cilj u što kraćem vremenskom periodu što bolje razdvojiti komponente uzorka.

Zbog potrebe za preciznim određivanjem vrlo niskih koncentracija farmaceutski aktivnih tvari u okolišu, za njihovo određivanje koristi se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti. Da bi kromatografska analiza bila pouzdana, najčešće se rezultati uspoređuju s odgovarajućim referentnim tvarima te unutarnjim ili vanjskim standardom [6, 24-26].

2.4.1. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je moderna inačica tekućinske kromatografije. HPLC tehnika zbog učinkovitosti razdvajanja različitih spojeva kao što su proteini, polimeri, vitamini, lipidi, aminokiseline, steroidi i farmaceutici ima široku primjenu u proizvodnji, istraživanju, medicini i sl. Glavna razlika između LC i HPLC tehnika jest u tlaku koji se primjenjuje pri analizi.

Prije početka same analize, kroz kromatografsku kolonu propušta se pokretna faza. Kada se uspostavi stacionarno stanje unutar kolone, započinje separacija sastojaka uzorka na način da se uzorak unosi u pokretnu fazu prije ulaza u kolonu. Pokretna faza može se sastojati od jednog ili više otapala koja moraju biti visoke čistoće. Otapala koja se mogu koristiti su voda, razni puferi, organska otapala i dr. Najčešće se koriste smjese organskih i anorganskih otapala, primjerice voda i acetonitril. Sastav pokretne faze koja prolazi kolonom može biti konstantan tokom cijele separacije (izokratno eluiranje) ili promjenjiv (gradijentno eluiranje) gdje dolazi do potpunog miješanja oba otapala prije ulaska u samu kolonu. Kromatografska kolona je glavni dio kromatografskog sustava na kojem se odvija separacija sastojaka ispitivanog uzorka. Na izlazu kolone postavljen je detektor koji detektira separirane sastojke ispitivanog uzorka redoslijedom kako izlaze iz kolone, a informaciju šalje računalu na kojem nastaje kromatogram (Slika 1.). Mogu se koristiti različiti detektori, kao što su refrakcijski detektor, UV/VID detektori, spektrometar masa i dr.



Slika 1. Parametri kromatografske krivulje [7]

Kromatogram je grafički prikaz odziva instrumenta u vremenu. Poznavanjem kromatograma referentnih uzoraka, odnosno vremena zadržavanja pojedinih sastojaka te odziva instrumenta, moguće je napraviti identifikaciju nepoznatog uzorka. Integracijom površine ispod dobivenih kromatografskih krivulja moguće je odrediti kvantitativni sastav ispitivanog uzorka. Parametri kvantifikacije kromatografske krivulje su visina pika krivulje (h) i površina pod pikom (A), dok je kvalitativni parametar vrijeme zadržavanja (t_R) i odziv detektora. Vrijeme zadržavanja predstavlja vrijeme od trenutka unošenja uzorka do trenutka maksimalnog odziva na kromatografskoj krivulji. Ostali parametri su zadržano vrijeme od trenutka injektiranja, prilagođeno vrijeme zadržavanja, širenje kromatografske zone, separacijski faktor, razlučivanje i protok određen Darcyevim zakonom. Zadržano vrijeme od trenutka injektiranja tvari predstavlja vrijeme od injektiranja do trenutka detekcije, dok prilagođeno vrijeme govori o vremenu koje je tvar provela vezana uz nepokretnu fazu. Separacijski faktor (α) i razlučivanje (R_s) pokazuju sposobnost odjeljivanja sastojaka u koloni uzevši u obzir vrijeme zadržavanja odnosno širinu kromatografske krivulje. Širenje kromatografske vrpce ukazuje na učinkovitost kromatografske separacije, a uzroci širenja su otpori pri prijenosu mase u obje faze, brzina protoka kroz nepokretnu fazu, uzdužna difuzija te nepredvidljiva sorpcija i desorpcija molekula. Učinkovitost separacije može se izraziti brojem i visinom teorijskih tavana. Prema teoriji tavana, kromatografska kolona je podijeljena na određeni broj tavana (n) koji imaju svoju visinu (engl. *height equivalent to theoretical plate*, *HETP*). Što je manja visina tavana, odnosno veći broj tavana, separacija je bolja [6, 24-27].

Prednosti HPLC metode su višestruke: automatiziran proces, višestruka upotreba kolone, brzina analize te mogućnost povezivanja s drugim instrumentima. S druge strane, samo razvijanje metode za uzorak koji čini smjesa tvari nije jednostavno te iziskuje veliko iskustvo.

2.4.2. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA ULTRA VISOKE DJELOTVORNOSTI

Na tržištu postoje različite kromatografske kolone koje mogu varirati u duljini, promjeru i punjenju, s ciljem postizanja što boljeg razlučivanja i skraćivanja vremena analize. Jednu od modifikacija kromatografskih kolona provela je i tvrtka *Waters*, 2004. godine, a to je da su kromatografske kolone napunili s malim ($< 2 \mu\text{m}$) poroznim česticama.

Smanjenjem čestica punila kromatografske kolone dobiva se bolje razlučivanje, odnosno bolja separacija tvari. Ova korelacija povezana je van Deemterovom jednačbom koja daje empirijsku ovisnost protoka pokretne faze i učinkovitosti kolone. Ujedno, to je temeljno načelo tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultra high performance liquid chromatography*, UHPLC). Van Deemterova jednačba glasi:

$$HETP = A + B/v + (C_S + C_M) \cdot v \quad (5)$$

gdje je *HETP* visina teorijskih tavana, odnosno učinkovitost kolone, *A* prinos vrtložne difuzije, *B* prinos uzdužne difuzije, *C_s* i *C_m* su prinosi zbog prijenosa mase u nepokretnoj i pokretnoj fazi, a *v* je linearna brzina protoka pokretne faze. S pretpostavkom da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost će ovisiti o duljini kolone, promjeru čestica punjenja, radnom tlaku i temperaturi.

Da bi se povećala učinkovitost separacije, potrebno je smanjiti visinu teorijskih tavana, odnosno povećati broj tavana. Korištenjem čestica manjeg promjera, smanjuje se visina tavana u kromatografskoj koloni pa će tako smanjenjem veličine čestica tri puta (sa 5 μm na 1,7 μm), učinkovitost i razlučivanje porasti tri puta. Odnosno, UHPLC analizom s kolonom koja je punjena česticama 3 puta manjeg promjera u odnosu na HPLC kolonu, moguće je koristiti 3 puta kraće kolone, pri čemu se i protok povećava 3 puta, a analiza je 9 puta brža uz razlučivanja kao kod HPLC analize. Korištenje manjih čestica zahtijeva znatno veće tlakove od onih koji se koriste kod HPLC sustava [6, 24, 26-29]. Usporedba je dana u **Tablici 1.**

Tablica 1. Usporedba HPLC i UHPLC tehnike [6]

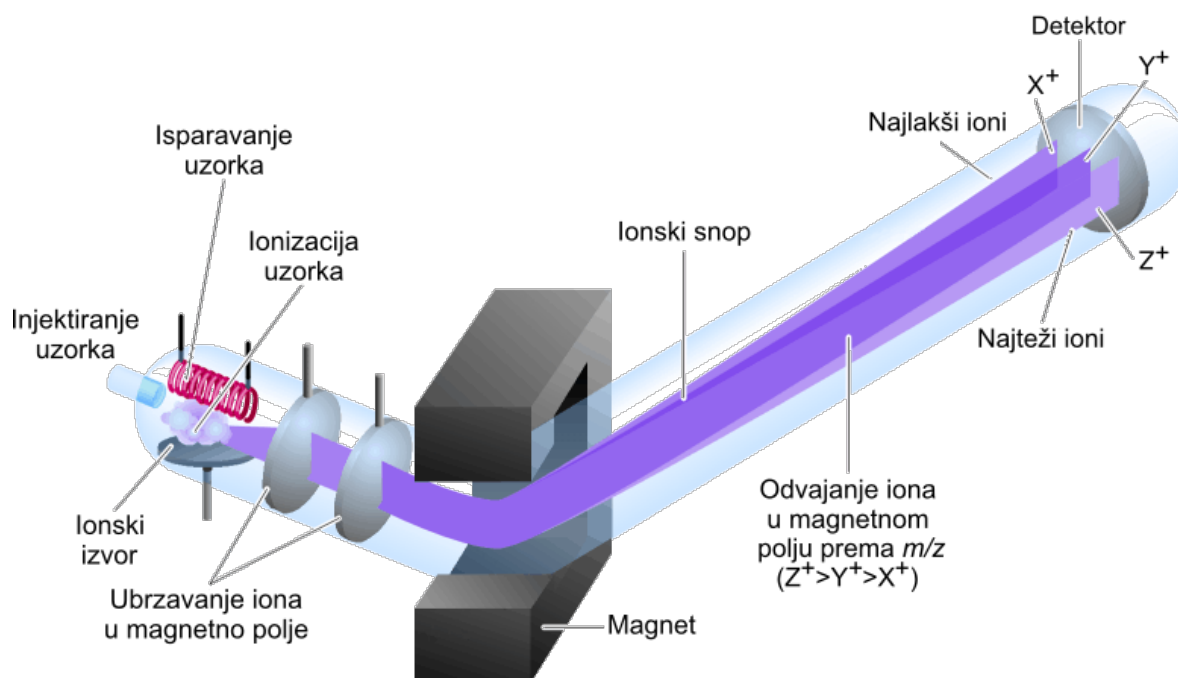
	HPLC	UHPLC
Promjer čestica punila	3 - 5 μm	manje od 2 μm
Tlak	35 - 40 MPa	130,5 MPa
Dimenzije kolone	150 x 3,2 mm	150 x 2,1 mm
Temperatura kolone	30 °C	65 °C
Injektirani volumen	5 mL	2 mL

Najveća razlika UHPLC metoda naspram HPLC jest izvođenje analize pri znatno višim tlakovima, što je nedostatak jer visoki tlakovi smanjuju životni vijek kolone. Ipak, zbog veće razlučivosti, osjetljivosti i ubrzanja analize, UHPLC metode nalaze veliku primjenu, naročito u detekciji metabolita lijekova.

2.5. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je tehnika kemijske analize koja daje informaciju o masi i strukturi molekula te izotopnom omjeru atoma u uzorku, a koristi se i za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava tvari, proučavanje ponašanja iona u vakuumu, te kvalitativno i kvantitativno određivanje sastava smjesa. Veliku primjenu nalazi u detekciji, identifikaciji i kvantifikaciji organskih molekula, kao što su farmaceutski aktivne tvari. Naročito je primjenjiva kod određivanja tragova u uzorcima zbog vrlo niske granice dokazivanja (10^{-12} g), preciznosti u određivanju masa, dobre ponovljivosti i mogućnosti analize smjesa, što je čini odličnim detektorom za kromatografski sustav.

MS uređaj sastoji se od sustava za unošenje uzoraka, ionskog izvora, analizatora masa i detektora (**Slika 2.**). Molekule uzorka prevode se u plinsku fazu te ioniziraju u ionskom izvoru, a zatim se u analizatoru razdvajaju na temelju omjera mase i naboja (m/z). U konačnici, detektor registrira broj molekula za svaku vrijednost omjera mase i naboja te ispisuje spektar masa, odnosno grafičku ovisnost intenziteta o omjeru mase i naboja [7, 25, 30-33].

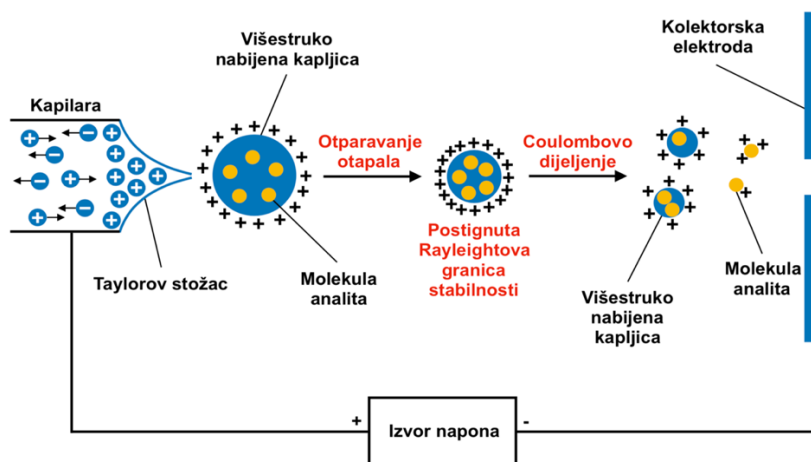


Slika 2. Shematski prikaz sektorskog spektrometra masa [34]

2.5.1. IONIZACIJA

Postupak ionizacije podrazumijeva prevođenje uzorka u plinsku fazu te njegovu ionizaciju. Ionizacija se provodi na razini atoma ili na molekulskoj razini, ovisno o zadanoj količini energije ionizacije i svojstvima uzorka, pa kao produkt ionizacije razlikujemo molekulske ione i fragmente. Najčešće korištene tehnike ionizacije su elektroraspršenje i ionizacija potpomognuta matricom uz desorpciju laserskim zračenjem.

Elektroraspršenje je često korišten način ionizacije (engl. *electrospray ionisation*, ESI), a najčešće se koristi u vezanim sustavima HPLC-MS. Elektroraspršenje se provodi s tekućim uzorcima i omogućava analizu molekula bez obzira na njihovu veličinu i naboj, a pogodan je i za termički nestabilne tvari. Ionizacija započinje tako da se otopina uzorka injektira kroz kapilaru koja predstavlja elektrodu pod visokim naponom. Primijenjeni napon može biti pozitivan ili negativan, a zbog nastalog gradijenta električnog polja dolazi do razdvajanja naboja na površini tekućine. Na vršku igle na površini tekućine formira se maglica uparenog otapala. Kada otopina postigne ravnotežu između odbojnih Coulombovih sila naboja na površini i napetosti površine tekućine, kapljice koje sadrže višak pozitivnog ili negativnog naboja odvajaju se s vrha igle. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Potom se te kapljice provode kroz struju dušika, što dovodi do isparavanja otapala i smanjivanja kapljica. Nakon što se kapljice smanje toliko da se svi ioni nalaze na površini kapljica, sile Coulombovog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili razbiju na manje. Postupak traje sve dok u kapljici ne ostane samo jedna ionizirana molekula (**Slika 3.**) [7, 25, 30, 33, 35, 36].



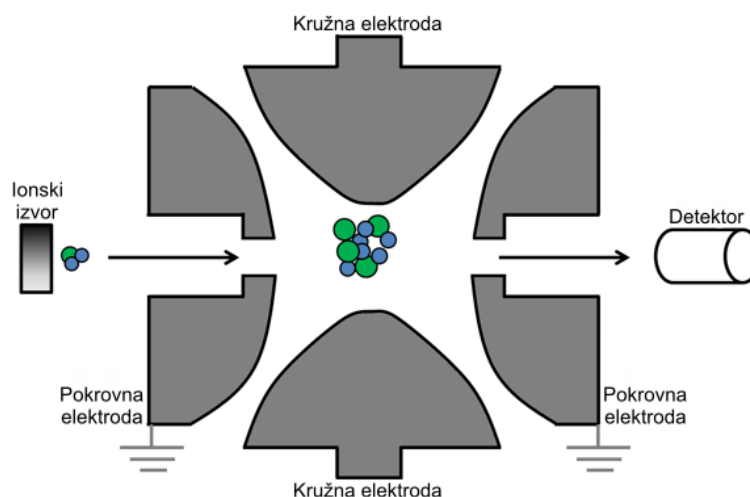
Slika 3. Shematski prikaz ionizacije elektroraspršenjem [37]

Prednost ionizacije elektroraspršenjem je nedestruktivnost metode i mogućnost stvaranja višestruko nabijenih iona. Glavni nedostatak ionizacije elektroraspršenjem je utjecaj matrice uzorka i pH-vrijednosti.

2.5.2. ANALIZATORI MASA

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja nastale ione u vakuumu na temelju omjera mase i naboja. Vrste analizatora masa su magnetni, kvadripolni analizator, analizator s ionskom stupicom, analizator masa ionsko ciklotronske rezonancije te njihove kombinacije. Analizatori masa razlikuju se prema načinu primjene magnetnog i(ili) električnog polja za postizanje razdvajanja iona. Ioni nastali ESI ionizacijom najčešće se razdvajaju kvadripolnim analizatorima i analizatorima s ionskom stupicom.

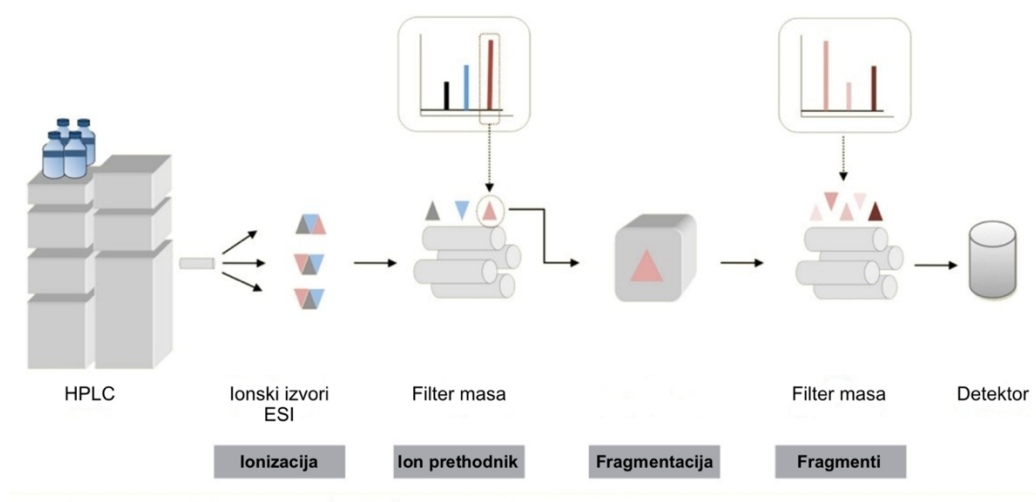
Analizatori masa s ionskom stupicom mogu biti linearni (engl. *linear ion trap*, LIT) ili orbitalni (engl. *Orbitrap*), a koriste se oscilirajućim električnim poljem kako bi uhvatili ione u stupicu u dvije ili tri dimenzije. Trodimenzionalni linearni analizator masa s ionskom stupicom sastoji se od tri elektrode od kojih je jedna kružna te zajedno čine prostor ionske stupice (**Slika 4.**). Ioni u tom prostoru su uhvaćeni djelovanjem elektromagnetskog polja, nakon čega slijedi selekcija i izbacivanje iona na osnovi njihove mase. Selektirane mase se potom kvantificiraju detektorom, najčešće elektronskim pojačalima ili mikrokanalnim pločama. Ako se radi o spregnutoj spektrometriji mase, selektirane mase mogu se iznova fragmentirati [7, 25, 33, 37].



Slika 4. Shematski prikaz analizatora s ionskom stupicom [7]

2.5.3. SPREGNUTA SPEKTROMETRIJA MASA

Spregnuta spektrometrija masa (MS^n) je slijedni proces izbora masa (**Slika 5.**). Analize u spregnutoj spektrometriji masa mogu biti spregnute prostorno ili vremenski. Prostorno spregnute analize zahtijevaju zasebne analizatore masa u svakom stupnju analize dok vremenski spregnute analize sve stupnjeve analize provode u istom analizatoru, ali ne istovremeno. Analizatori masa s ionskom stupicom su vremenski spregnuti analizatori. Nastali ioni u ionskom izvoru ulaze u analizator masa, gdje se u prvom stupnju izdvaja željeni ion. Kako bi nastalo više fragmentnih iona potrebno je provesti raspad prouzročen sudarom. Drugim riječima ioni ubrzani radiofrekventnim poljem sudaraju se s molekulama inertnog plina dajući fragmentne ione. Nakon raspada odabranog iona prethodnika, nastalim fragmentnim ionima se određuju omjeri m/z te ih se kvantificira na detektoru [7, 31, 33, 37].



Slika 5. Shematski prikaz spregnute spektrometrije masa [38]

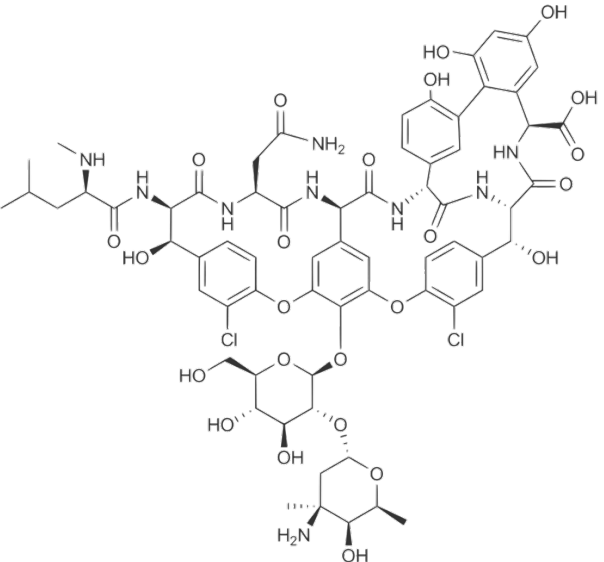
3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. VANKOMICIN

U ovom radu praćena je fotolitička razgradnja glikopeptidnog antibiotika vankomicina, čije su informacije i fizikalno-kemijska svojstva prikazane u **Tablici 2**.

Tablica 2. Vankomicin

NAZIV	Vankomicin
STRUKTURA	
MOLEKULSKA FORMULA	$C_{66}H_{75}Cl_2N_9O_{24}$
MOLEKULSKA MASA, g/mol	1449.265
pK_a [39]	2,6; 7,2; 8,6; 9,6; 10,5; 11,7
CAS BROJ	1404-90-6
VRSTA LIJEKA	Glikopeptidni antibiotik

3.1.2. KEMIČALIJE

Kemikalije koje su korištene za izradu eksperimentalnog dijela ovog rada navedene su u **Tablici 3.** zajedno s informacijama o njihovoj molekularnoj formuli, čistoti i proizvođaču.

Tablica 3. Popis korištenih kemikalija

NAZIV KEMIČALIJE	MOLEKULARNA FORMULA	ČISTOTA	PROIZVOĐAČ
Amonij formijat	CH ₅ NO ₂	HPLC/MS	Fisher Chemical, UK
Metanol	CH ₃ OH	HPLC/MS	Fisher Chemical, UK

3.1.3. UZORCI VODE

Fotolitička razgradnja praćena je u dvije matrice, ultraćistoj (MiliQ) vodi i u izvorskoj vodi. Korištena izvorska voda uzorkovana je 20. listopada 2016. u 19:45 h na izvoru Vrelo u Fućinama (Republika Hrvatska) i profiltrirana je prije provoćenja eksperimenata. Pri 25 °C pH-vrijednost izvorske vode iznosila je 5,07, a elektrićna provodnost iznosila je 35,09 µS/cm. Izvorska voda sadrţi 1,7 mg/L Cl⁻ iona, 7,8 mg/L NO₃⁻ iona, 1,9 mg/L SO₄²⁻ iona i 0,2622 mg/L NPOC (engl. *non-purgeable organic carbon*). TOC (engl. *total organic carbon*) je izraţen kao NPOC [6].

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. UREĐAJ ZA FILTRACIJU

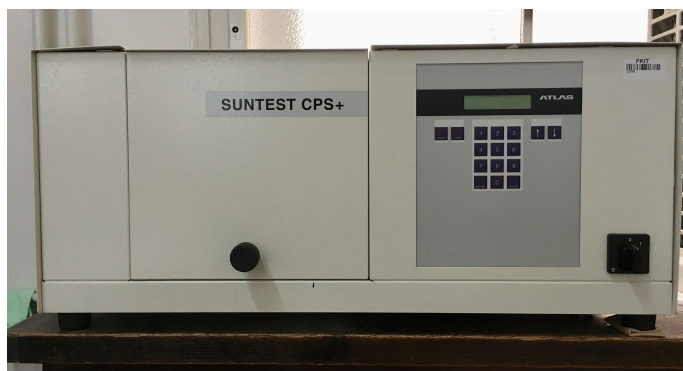
Za filtraciju izvorske vode korišten je PALL Life Sciences uređaj za filtraciju (Washington, SAD) (**Slika 6.**) uz polipropilenske membranske filtre (GH Polypro, 47 mm, 0,45 μm). Izvorska voda profiltrirana je prije provođenja eksperimenata kako bi se uklonile eventualne krute čestice.



Slika 6. Pall Life Science uređaj za filtraciju

3.2.2. SUNTEST CPS+

Za osvjetljavanje otopina vankomicina korišteno je umjetno Sunčevo zračenje uređajem Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht, Njemačka) (**Slika 7.**). Sustav umjetnog Sunčevog zračenja čine optički filtri, ksenonova lampa kao izvor zračenja i ogledala. Parametri koji se mogu podešavati su temperatura unutar ispitne komore, intenzitet zračenja i vrijeme izlaganja uzorka.



Slika 7. Suntest CPS+, Atlas

3.2.3. TEKUĆINSKI KROMATOGRAF VEZAN SA SPEKTROMETROM MASA

Analiza uzoraka provedena je pomoću amaZon ETD spektrometra masa s 3D ionskom stupicom (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka) povezanim s Ultimate 3000 RSLCnano tekućinskim kromatografom ultravisoke djelotvornosti (Dionex, Amsterdam, Nizozemska) (**Slika 8.**).



Slika 8. UPLC-MS uređaji korišteni za analizu

3.3. METODA RADA

3.3.1. PRIPREMA RADNIH OTOPINA

Za eksperimentalni rad korištena je temeljna standardna otopina (TSO) vankomicina, masene koncentracije 1 g/L iz koje je pripravljena radna standardna otopina (RSO) masene koncentracije 1 mg/L. Odmjerna tikvica od 200 mL, uz alikvot od 200 μ L vankomicina, nadopunjena je do oznake MiliQ ili izvorskom vodom, ovisno o eksperimentu. Prije izvođenja eksperimenata fotolitičke razgradnje, iz RSO pripravljene su otopine za umjernu krivulju, koncentracija: 30, 50, 70, 100, 200, 300, 400, 500, 700 i 1000 μ g/L. Otopine su pripravljene u vialama uzimanjem odgovarajućeg alikvota RSO te nadopunjavanjem s MiliQ ili izvorskom vodom, ovisno o eksperimentu. Konačan volumen otopina za umjernu krivulju iznosi 1 mL. Temeljna i radne standardne otopine čuvane su u tamnim bocama i vialama u zamrzivaču.

3.3.2. OSVJETLJAVANJE OTOPINA

Alikvoti od 30 mL RSO vankomicina, koncentracije 1 g/L, smješteni su u kvarcne posude. Niske koncentracije vankomicina odabrane su zbog simulacije realnih uvjeta, ali i zbog preliminarnog ispitivanja koje je pokazalo da se vankomicin lako detektira i pri niskoj koncentraciji od 100 µg/L, jer pokazuje jasno vidljiv i intenzivan pik na kromatogramu. Za osvjetljavanje uzoraka korišten je uređaj Suntest CPS+ opremljen ksenonskom lampom kao izvorom umjetnog Sunčeva zračenja, u rasponu valnih duljina 300 - 800 nm. Tijekom eksperimenata intenzitet lampe održavan je na 250 W/m², a temperatura na 25 ± 2 °C.

Za dobivanje pouzdanih rezultata, rađene su tri probe, to jest tri identične otopine u tri kvarcne posude te tri kontrolna uzorka, koja su istovremeno podvrgnuta fotolitičkoj razgradnji. Kontrolni uzorci imaju isti sastav i volumen kao otopine namijenjene za ispitivanje fotolize, ali su zaštićeni aluminijskom folijom od utjecaja zračenja. Kontrolni uzorci korišteni su kako bi se potvrdilo da je razgradnja vankomicina posljedica djelovanja zračenja, a ne temperature ili hidrolize. Tijekom eksperimenta uzimani su alikvoti ispitivanih otopina (200 µL) u određenim vremenima: 0, 15, 30, 60, 90, 120, 200 i 300 minuta. Kontrolni uzorci su uzeti samo pri vremenima: 0, 60, 120, 200 i 300 minuta. Uzeti alikvoti otopine vankomicina analizirani su UHPLC-MS analizom kako bi se utvrdila brzina fotolitičke razgradnje.

3.3.3. ANALIZA VEZANIM SUSTAVOM UHPLC-MS

Kvantifikacija vankomicina u ultračistoj i izvorskoj vodi provedena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti vezanom s trodimenzionalnim, kvadripolnim spektrometrom masa s ionskom stupicom, uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. Uzorci od 5 µL su injektirani na kromatografsku kolonu Acclaim PepMap RSLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD), dimenzija 150 x 0,3 mm, promjera čestica unutar kolone 2 µm, pri sobnoj temperaturi. Prije same analize kolona je kondicionirana na početne uvjete gradijenta u vremenu od 30 min. Razdvajanje vankomicina postignuto je gradijentnim eluiranjem. Čišćenje kolone provođeno je izokratnim eluiranjem. Pokretna faza sastojala se od binarne smjese eluensa A, vodene faze koju je činio amonijev formijat, 20 mM, pH = 4,1 te eluensa B, organske faze, odnosno metanola. Korišteni gradijent pokretne faze prikazan je u **Tablici 4**. Protok pokretne faze iznosio je 3,5 µL/min.

Tablica 4. Gradijent pokretne faze

VRIJEME, min	ORGANSKA FAZA (B), %
0	5,0
0 - 8	5,0 - 60,0
8 - 11	60,0 - 80,0
11 - 22	5,0

Sve analize provedene su pri istim uvjetima ionskoga izvora spektrometra masa:

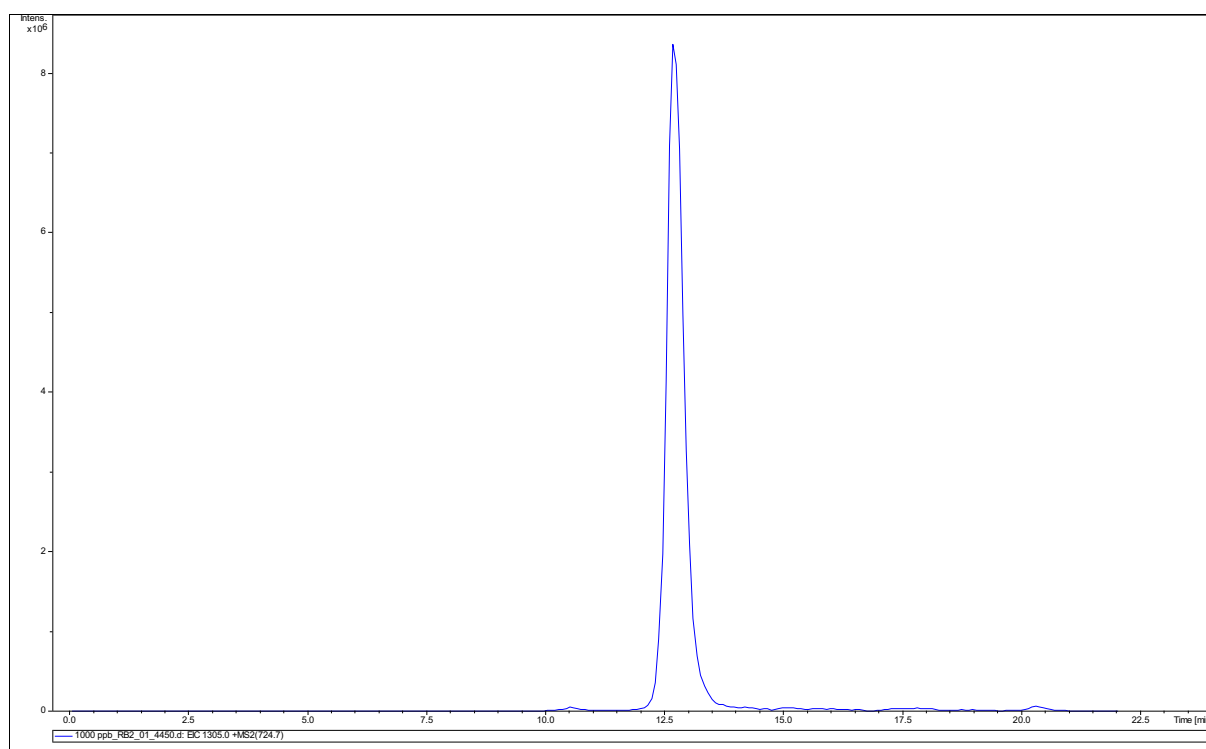
- ❖ temperatura plina, 200 °C
- ❖ protok plina, 50 L/min
- ❖ napon kapilare, 4,5 kV
- ❖ tlak raspršivača plina, 10 psi

Uzorci su analizirani u rasponu omjera mase i naboja (m/z) od 400 do 1350 Da. Nakon odabira dvostruko nabijenog, $[M+2H]^{2+}$ iona, u drugom stupnju nastaju ioni produkti. Vankomicin je identificiran na temelju spregnutog spektara masa i vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Kvantitativna analiza provedena je očitavanjem površine ispod odgovarajuće kromatografske krivulje.

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. OPTIMIRANJE UVJETA UHPLC ANALIZE

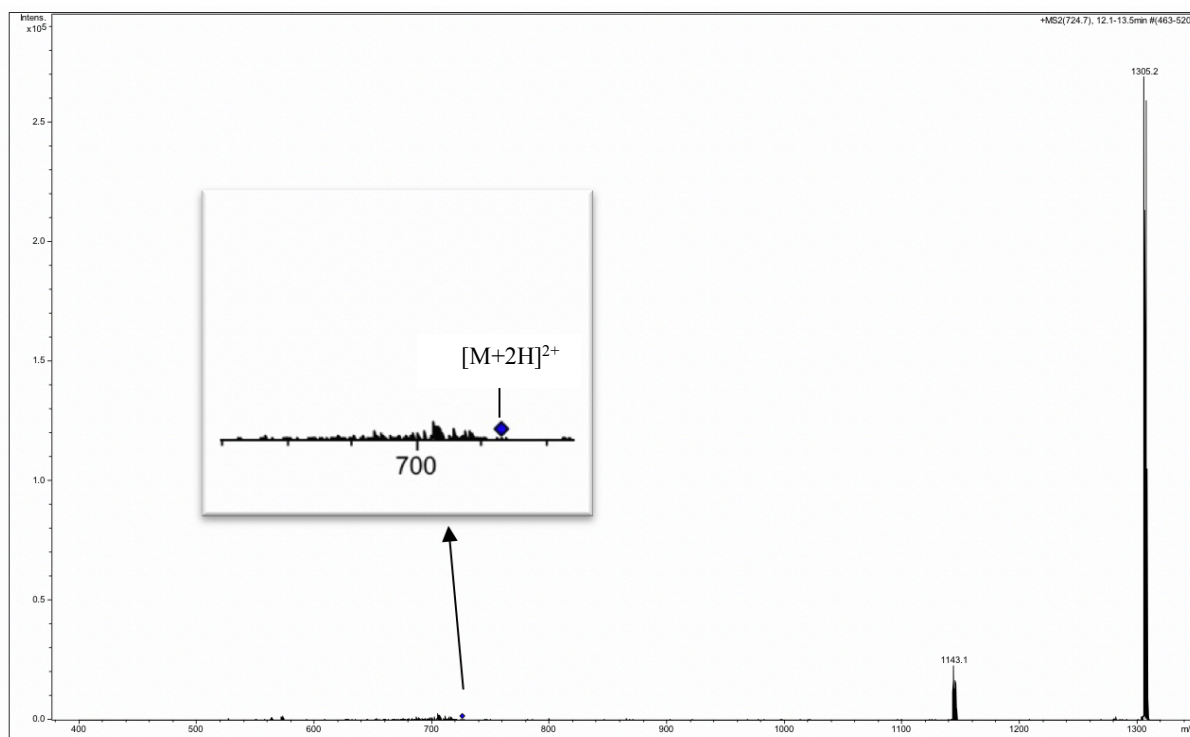
Vankomicin, kao glikopeptidni antibiotik, ima izrazito složenu strukturu te veliku molekulsku masu, stoga je izrazito bitan odabir kromatografske kolone koja ima kapacitet za analizu takvih molekula, kako u otopini samog spoja, tako i u smjesi. Za kromatografsko određivanje vankomicina korištena je kromatografska kolona Acclaim PepMap RSLC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, SAD). Kolona ima dimenzije 150 x 0,3 mm te C18 nepokretnu fazu, s česticama veličine 2 μm . Namijenjena je optimalnom razdvajanju peptida, proteina, biomarkera i sličnih spojeva koji sadrže aminokiseline, zbog čega je i izabrana za analizu vankomicina. Proizvođač navodi visoku osjetljivost i rezoluciju kolone te reproducibilnost. Ovaj tip kolone zahtijeva manji volumen uzorka (5 μL) te radi na manjem protoku ($\sim 4 \mu\text{L}/\text{min}$). Kolona je pokazala odlično razdvajanje samog vankomicina iz otapala (**Slika 9.**), kao i u smjesi s drugim peptidima, stoga se nije mijenjala.



Slika 9. Kromatogram vankomicina

4.2. OPTIMIRANJE UVJETA MS ANALIZE

Identifikacija vankomicina provedena je s trodimenzionalnim, kvadripolnim spektrometrom masa s ionskom stupicom uz ionizaciju elektroraspršenjem. Ionizacija vankomicina provedena je u pozitivnom načinu rada jer se vankomicin pri pH-vrijednosti pokretne faze (4,1) nalazi u protoniranom obliku, pa ionizacijom nastaje dvostruko protonirani molekularni ion. Kako bi se postigli što bolji odzivi, potrebno je optimirati sudarnu ćeliju i ionski izvor. Optimalni napon kapilare iznosio je 4500 V. Uvjeti ionskoga izvora spektrometra masa za vrijeme analize: temperatura plina - 200 °C; protok plina - 50 L/min; napon kapilare - 4,5 kV; tlak raspršivača plina - 10 psi. Također, da bi se postigla optimalna fragmentacija molekularnih iona, optimiran je i napon sudarne ćelije te amplituda fragmentacije. Nakon ionizacije uslijedila je fragmentacija odabranog $[M+2H]^{2+}$ molekularnog iona u sudarnoj ćeliji uz amplitudu fragmentacije u rasponu od 0,1 - 1. U ovom radu za potrebe kvantifikacije korišten je najintenzivniji fragmentni ion, a za potrebu identifikacije cjelokupni MS/MS spektar (**Slika 10.**). Informacije o fragmentaciji te vrijednosti korištene za identifikaciju i kvantifikaciju prikazane su u **Tablici 5.**



Slika 10. MS/MS spektar vankomicina

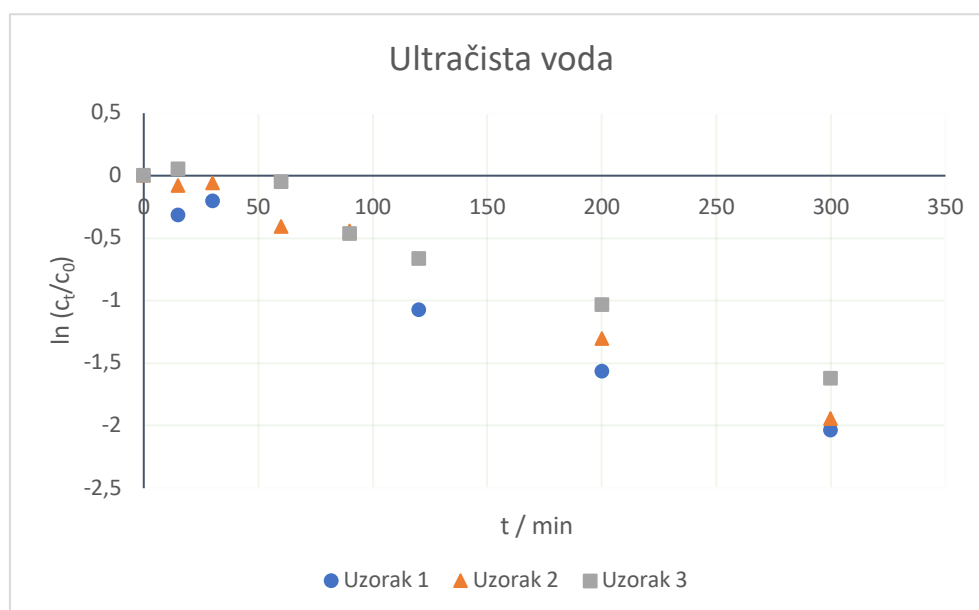
Tablica 5. Ionska tranzicija i vrijeme zadržavanja

t_R , min	$[M+H_n]^{n+}$	Fragmentni ion	Amplituda fragmentacije	Napon sudarne ćelije, V
12,6	724,7; $z = 2$	1305,3	0,25	250

4.3. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA VANKOMICINA

Osunčavanjem otopine vankomicina, odnosno izlaganju umjetnom Sunčevom zračenju dolazi do smanjenja koncentracije spoja u otopini. Smanjenje koncentracije dobro je opisano kinetikom prvog reda, to jest pad koncentracije eksponencijalan je u vremenu. S obzirom da je eksperiment proveden s tri kontrole i tri ispitivana uzorka za obje matrice, konstante brzine razgradnje spoja i vrijeme poluraspada zasebno su računati za svaku otopinu, a potom je za konačnu vrijednost uzeta aritmetička sredina od tri dobivene vrijednosti.

Na **Slici 11.** grafički je prikazana linearizirana promjena koncentracije vankomicina u ultračistoj vodi prema jednadžbi 3. Dobiveni rezultati relativno su dobro opisani pravcem što se može vidjeti i u **Tablici 6.** Tri istovremeno sunčane otopine pokazuju male međusobne razlike, no neznatne.

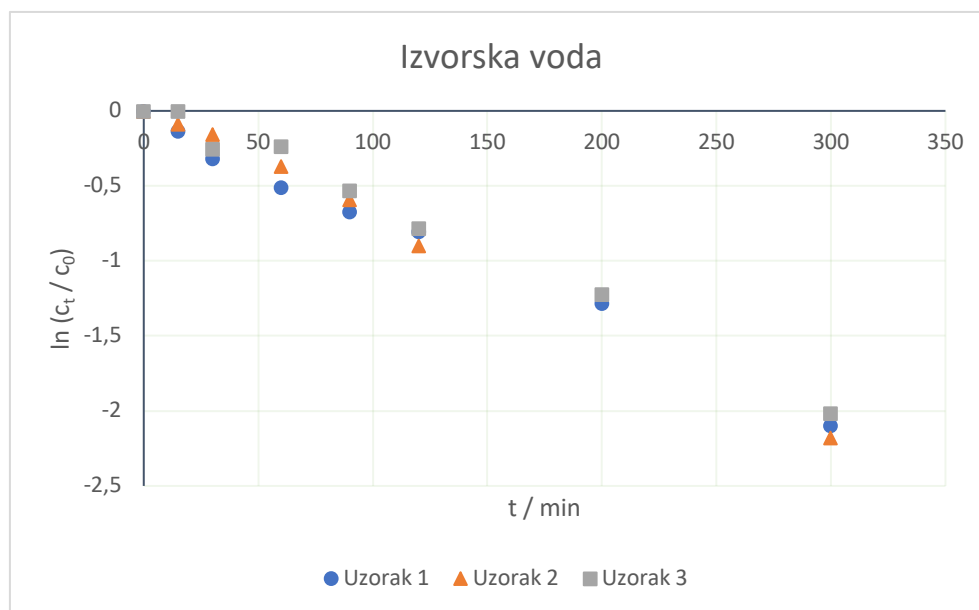


Slika 11. Grafički prikaz ovisnosti promjene koncentracije vankomicina u ultračistoj vodi o vremenu

Tablica 6. Linearizacija krivulje ovisnosti koncentracije vankomicina o vremenu

		JEDNADŽBA PRAVCA (3)	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$
Ultračista voda	Uzorak 1	$y = -0,0068x - 0,1123$ $R^2 = 0,9769$	0,0068	101,93
	Uzorak 2	$y = -0,0066 + 0,054$ $R^2 = 0,9919$	0,0066	105,02
	Uzorak 3	$y = -0,0057x + 0,1038$ $R^2 = 0,9751$	0,0057	121,60
Izvorska voda	Uzorak 1	$y = -0,0066x - 0,0518$ $R^2 = 0,992$	0,0066	105,02
	Uzorak 2	$y = -0,0074x + 0,0371$ $R^2 = 0,9978$	0,0074	93,67
	Uzorak 3	$y = -0,0067x + 0,0536$ $R^2 = 0,9889$	0,0067	103,45

Na **Slici 12.** prikazani su linearizirani podaci promjene koncentracije vankomicina u izvorskoj vodi. Kao i kod ultračiste vode, dolazi do fotolitičke razgradnje vankomicina, odnosno smanjenja koncentracije. Dobiveni podaci nešto su bolje opisani pravcima u odnosu na pravce ultračiste vode te su također prikazani u **Tablici 6.** Istovremeno sunčane otopine gotovo ni ne pokazuju razlike u promjenama koncentracija u vremenu, to jest rasipanje podataka je neznatno.

**Slika 12.** Grafički prikaz ovisnosti promjene koncentracije vankomicina u izvorskoj vodi o vremenu

Srednja vrijednost konstante brzine i vremena poluraspada vankomicina u ultračistoj vodi iznosi $\bar{k} = 0,0064 \pm 0,0007 \text{ min}^{-1}$, a vrijeme poluraspada $\bar{t}_{1/2} = 109,52 \pm 12,08 \text{ min}$. Vrijednosti za izvorsku vodu iznose $\bar{k} = 0,0069 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$ te $\bar{t}_{1/2} = 100,71 \pm 7,04 \text{ min}$. Prema ovim podacima možemo zaključiti da je razgradnja nešto brža u izvorskoj nego u ultračistoj vodi. Razlog tome mogu biti razne anorganske i organske tvari koje su otopljene u izvorskoj vodi, a pospješuju raspad vankomicina neizravnom fotolizom. Međutim, provedbom statističke analize utvrđeno je nema statistički značajne razlike između konstante brzine raspada u izvorskoj i ultračistoj vodi ($P = 0,2746$). Na isti način je provedena statistička analiza usporedbe kontrolnih eksperimentalnih uzoraka, gdje je dobivena statistički značajna razlika ($P \approx 10^{-5}$) koja ukazuje da u eksperimentalnim uzorcima dolazi do fotolitičke razgradnje vankomicina.

U diplomskom radu koji se bavio između ostalog i fotolitičkom razgradnjom vankomicina u sličnim uvjetima, dobivene su srednje vrijednosti konstante brzine razgradnje i vremena poluraspada za ultračistu vodu u vrijednostima $k = 0,0083 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 83,51 \text{ min}$, a za istu izvorsku vodu $k = 0,0119 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2} = 58,25 \text{ min}$ [6]. Autorica je također na temelju statističke analize odredila kako ne postoji statistički značajna razlika u ta dva rezultata. Bitno je spomenuti i da je u navedenom radu rađeno s drugačijom koncentracijom vankomicina koja je iznosila $500 \mu\text{g/L}$.

5. ZAKLJUČAK

Eksperimentalno dobiveni podaci o fotolitičkoj razgradnji vankomicina u dvije vodene matrice pokazuju relativno brzu razgradnju. Uočeno je da ne postoji statistički značajna razlika u brzini razgradnje vankomicina u ispitivanim uzorcima voda, što znači da matica ne utječe u velikoj mjeri. Na osnovi toga možemo zaključiti kako vankomicin podliježe izravnoj fotolizi, odnosno da do neizravne fotolize ne dolazi ili je zanemariva. Dobivene vrijednosti konstanti brzine razgradnje i vremena poluraspada za ultračistu vodu iznose: $\bar{k} = 0,0064 \pm 0,0007 \text{ min}^{-1}$, $\bar{t}_{1/2} = 109,52 \pm 12,08 \text{ min}$, a za izvorsku vodu: $\bar{k} = 0,0069 \pm 0,0005 \text{ min}^{-1}$, $\bar{t}_{1/2} = 100,71 \pm 7,04 \text{ min}$. Vidljivo je da se polovina početne koncentracije vankomicina razgradi već unutar prvih 100 minuta što ukazuje na potencijalnu nestabilnost molekule vankomicina u okolišu u svom izvornom obliku. S obzirom na biološku aktivnost vankomicina, mogućnosti unutarstaničnih efekata te da se radi o antibiotiku, u nastavku istraživanja trebalo bi identificirati razgradne produkte vankomicina. Osim identifikacije, nužno je ispitati njihova svojstva, a posebno njihovu sposobnost biološke aktivnosti, kao i drugih mogućih efekata na okoliš i ljudsko zdravlje.

6. LITERATURA

- [1] P. Draganić, M. Škribulja, S. Oštarčević, Potrošnja lijekova u Hrvatskoj, Agencija za lijekove i medicinske proizvode (HALMED) (2018)
- [2] URL: https://www.dzs.hr/Hrv_Eng/publication/2017/07-01-03_01_2017.htm (pristup 26.5.2018.)
- [3] K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the environment, *The Ann. Rev. of Environ. and Res.*, 35 (2010) 57-75.
- [4] D. J. Lapworth, N. Baran, M. E. Stuart, R. S. Ward, Emerging organic contaminants in groundwater: A review of sources, fate and occurrence, *Environ. Pollut.*, 163 (2012) 287-303.
- [5] X. Zhang, J. Shen, N. Zhuo, Z. Tian, P. Xu, Z. Yang, W. Yang, Interactions between Antibiotics and Graphene-Based Materials in Water: A Comparative Experimental and Theoretical Investigation, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 8 (2016) 24273-24280.
- [6] A.-M. Čižmek, Razumijevanje međuodnosa UV filtri - farmaceutski aktivne tvari tijekom fotolitičkih procesa, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017
- [7] M. Kaštelan-Macan, M. Petrović (ur.), *Analitika okoliša*, Hinus i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013
- [8] K. Fosgerau, T. Hoffmann, Peptide therapeutics: current status and future directions, *Drug Discov. Today*, 20-1 (2015) 122-128.
- [9] T. Uhlig, T. Kyprianou, F. G. Martinelli, C. A. Oppici, D. Heiligers, D. Hills, X. R. Calvo, P. Verhaert, The emergence of peptides in the pharmaceutical business: From exploration to exploitation, *EuPA Open Proteom.*, 4 (2014) 58-69.
- [10] URL: https://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_76_1522.html (pristup 14.5.2018.)
- [11] J. L. Lau, M. K. Dunn, Therapeutic peptides: Historical perspectives, current development trends, and future directions, *Bioorg. Med. Chem.*, 26 (2018) 2700-2707.
- [12] B. Bedenić, Antibakterijski lijekovi, *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 221-251.
- [13] URL: <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-08-02-02.pdf> (pristup 9.6.2018.)
- [14] URL: <https://ec.europa.eu/jrc/en/news/first-watch-list-emerging-water-pollutants> (pristup 17.6.2018.)
- [15] K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment, A review-Part I, *Chemosphere*, 75

(2009) 417-434.

- [16] K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use - present knowledge and future challenges, *Jour. of Environ. Manag.*, 90 (2009) 2354-2366.
- [17] M. A. Shannon, P. W. Bohn, M. Elimelech, J. G. Georgiadis, B. J. Marías, A. Mayes, Science and technology for water purification in the coming decades, *Nature*, 452 (2008) 301-310.
- [18] D. W. Kolpin, M. T. Meyer, Pharmaceuticals, hormones and other organic wastewater contaminants in U.S. streams, 1999-2000: A national reconnaissance, *Environ. Sci. Technol.*, 36 (2002) 1202-1211.
- [19] K. E. Murray, S. M. Thomas, A. A. Bodour, Prioritizing research for trace pollutants and emerging contaminants in the freshwater environment, *Environ. Pollut.*, 158 (2010) 3462-3471.
- [20] B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res.*, 72 (2014) 3-27.
- [21] H. Yamamoto, Y. Nakamura, S. Moriguchi, Y. Nakamura, Y. Honda, I. Tamura, Y. Hirata, A. Hayashi, J. Sekizawa, Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: laboratory photolysis, biodegradation and sorption experiments, *Water Res.*, 43 (2009) 351-362.
- [22] R. G. Zepp, D. M. Cline, Rates of direct photolysis in aquatic environment, *Environ. Sci. Technol.*, 11 (1977) 359-366.
- [23] OECD, Test No. 316: Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 3: Environmental fate and behaviour, OECD Publishing, Paris, 2008
- [24] M. Kaštelan-Macan, *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217-235.
- [25] D. Ašperger, *Karakterizacija materijala, predavanja*, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2018
- [26] URL: https://en.wikipedia.org/wiki/High-performance_liquid_chromatography (pristup 26.5.2018.)
- [27] T. Poljak, *Razvoj UPLC metode za odjeljivanje enantiomera tetramizola*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2016
- [28] T. Milekić, *Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika*, diplomski rad, Sveučilište

u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Zagreb, 2015

- [29] Y. Samatha, A. Srividya, A. Ajitha, V. Uma, M. Rao, Ultra performance liquid chromatography (UPLC), *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 4 (2015) 356-367.
- [30] R. B. Cole, *Electrospray and MALDI mass spectrometry: fundamentals, instrumentation, and biological applications*, 2. izdanje, John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, SAD, 2010
- [31] URL: https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry (pristup 27.5.2018.)
- [32] D. J. Burinsky, Chapter 11 Mass spectrometry, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 47 (2006) 319-396.
- [33] P. Novak, *Spektrometrija masa, predavanja*, Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb, 2012/2013
- [34] URL: <http://www.chem.ucalgary.ca/courses/351/Carey5th/Ch13/ch13-ms.html> (pristup 26.5.2018.)
- [35] M. Radić, *Ionizacija negativnih iona nano-elektroaspršenjem uzrokovana umiješavanjem estera, aldehida i ketona u tok pokretne faze*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno - matematički fakultet, Zagreb, 2016
- [36] URL: http://www.chem.umd.edu/wp-content/uploads/2009/09/EI_ionSource.pdf (pristup 17.5.2018.)
- [37] S. Ujević, *Određivanje mikroorganizama pomoću MS/MS analize proteoma*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2016
- [38] URL: <https://www.creative-proteomics.com/technology/triple-quadrupole-mass-spectrometry.htm> (pristup 27.5.2018.)
- [39] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/14969#section=Top> (pristup 10.6.2018.)

7. ŽIVOTOPIS

Klaudija Ivanković [REDACTED] Osnovnoškolsko obrazovanje završava 2009. godine u OŠ Stenjevec, u Zagrebu. Odličnim uspjehom završava V. Gimnaziju u Zagrebu, polaganjem Državne mature 2013. godine. Sveučilišni preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala upisuje na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije 2015. godine. Stručnu praksu odradila je na Institutu Ruđer Bošković u Zagrebu, u Laboratoriju za molekulsku spektroskopiju. U sklopu stručne prakse radila je na dva istraživanja, pod vodstvom dr. sc. Marka Rožmana s Instituta Ruđer Bošković i prof. dr. sc. Sandre Babić s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije. Rad „Adsorpcija farmaceutski aktivnih spojeva na ugljikove nanomaterijale“ nagrađen je Rektorovom nagradom Sveučilišta u Zagrebu za akad. god. 2017./2018. Demonstratorica je već dvije godine na nekoliko kolegija na četiri zavoda; Zavod za analitičku kemiju, Zavod za organsku kemiju, Zavod za fizikalnu kemiju i Zavod za termodinamiku, strojarstvo i energetiku. U svrhu popularizacije znanosti i Fakulteta, sudjelovala je dvije godine na Danima otvorenih vrata (2017. i 2018.) na Zavodu za analitičku kemiju, radionicama pod projektom „Prirodoslovna lepeza za mlade znanstvenike“ (2017.) te na Festivalu znanosti (2018.) s radionicom „U potrazi“, sve pod vodstvom Daria Dabića, mag. chem. S posterskim priopćenjem sudjelovala je 2018. godine na međunarodnom skupu „XII. susret mladih kemijskih inženjera“ u Zagrebu.