

Hidrolitička razgradnja nitrofurantoina

Beganović, Jasmina

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

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:149:467768>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-04**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

ZAVRŠNI RAD

HIDROLITIČKA RAZGRADNJA NITROFURANTOINA

JASMINA BEGANOVIĆ

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitne komisije:

prof. dr. sc. Sandra Babić

izv. prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Martina Periša

Zagreb, rujan 2015.

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

Zahvaljujem se dr. sc. Martini Periši na uloženom radu i trudu oko izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Zahvaljujem se i svima ostalima na Zavodu za analitičku kemiju, a posebno tehničarkama koje su mi pomagale u tehničkom dijelu eksperimenta.

SADRŽAJ

SAŽETAK	1
SUMMARY	2
1. UVOD	3
2. OPĆI DIO	4
2.1. Farmaceutici u okolišu	4
2.2. Ponašanje farmaceutika u okolišu	6
2.2.1. Biorazgradnja farmaceutika	6
2.2.2. Fotolitička razgradnja farmaceutika	7
2.2.3. Hidrolitička razgradnja farmaceutika	7
2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	10
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. Materijali	15
3.1.1. Kemikalije	15
3.1.2. Nitrofurantoin	16
3.2. Instrumenti	17
3.2.1. Analitička vaga	18
3.2.2. pH metar	19
3.2.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti	19
3.3. Postupak rada	20
3.3.1. Priprema puferskih otopina	20
3.3.2. Priprema standardnih otopina nitrofurantoina	21
3.3.3. Izvođenje eksperimenta hidrolize	21
3.3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	23
5. ZAKLJUČAK	27
6. POPIS LITERATURE	28
ŽIVOTOPIS	31

SAŽETAK

U ovom radu ispitana je hidrolitička razgradnja nitrofurantoina, antibiotika namijenjenog za liječenje urinarnih infekcija i jednog od najčešće korištenih farmaceutika. Hidrolitička razgradnja nitrofurantoina ispitana je u puferkim otopinama različitih pH-vrijednosti i pri različitim temperaturama, a mjerenja su provedena na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti vezanom sa spektrometrijom masa.

Rezultati ispitivanja pokazali su da je hidrolitička razgradnja brža pri višim temperaturama i većim pH-vrijednostima. Nitrofurantoin je najstabilniji pri pH 4 i 20 °C, dok je hidrolitička razgradnja bila najbrža pri pH 9 i 60 °C. Određene su konstante brzine reakcije, te vremena poluraspada koji ovise o uvjetima u okolišu. Hidrolitička razgradnja nitrofurantoina slijedi reakciju prvog reda uz koeficijent determinacije veći od 0,97.

Ključne riječi: nitrofurantoin, hidroliza, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

SUMMARY

In this work hydrolytic degradation of nitrofurantoin was investigated. Nitrofurantoin is an antibiotic used to treat urinary infections and it is one of the most commonly used pharmaceuticals. Hydrolytic degradation was examined in puffer solutions with different pH-values and at different temperatures. Samples were analysed using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry.

Results showed that the rate of hydrolytic degradation is higher at higher temperatures and higher pH-values. The slowest degradation rate was observed at pH 4 and 20 °C, and the highest at pH 9 and 60 °C. Also, degradation rate constants and half-lives were determined. Hydrolytic degradation of nitrofurantoin followed first order kinetics with the coefficient of determination $> 0,97$.

Key words: nitrofurantoin, hydrolysis, high performance liquid chromatography

1. UVOD

Farmaceutici su u okolišu prisutni više desetljeća, dok su ispitivanja o njihovoj prisutnosti u okolišu počela tek godinama kasnije. Glavni izvor farmaceutika u okolišu smatraju se postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda koja nisu prilagođena za uklanjanje takve vrste zagađivala. Farmaceutici se ubrajaju u tzv. *nova zagađivala* za koje još ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. U okoliš dospijevaju ispuštanjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda, nepropisnim odlaganjem neiskorištenih farmaceutika ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja. Navedenim putevima farmaceutici dospijevaju u tlo kao i u podzemne, površinske i pitke vode. Njihova koncentracija u okolišu ovisi o njihovoj potražnji, potrošnji i ponašanju u okolišu, kao i karakteristikama procesa tijekom procesa obrade otpadnih voda. U podzemnim vodama farmaceutici se nalaze u manjim koncentracijama (ng/L do µg/L), dok je njihova koncentracija znatno veća u izlaznim tokovima postrojenja za obradu otpadnih voda.

Nakon što se unesu u okoliš farmaceutici se mogu vezati na čestice tla ili sedimenta, ili podliježu strukturnim promjenama koje su rezultat abiotičkih (hidroliza i fotoliza) i biotičkih procesa. Navedeni procesi vode smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih spojeva.

Hidroliza, kao jedan od abiotičkih procesa, može biti značajna za smanjenje koncentracije farmaceutika u okolišu. Stoga, cilj ovog rada je ispitati ponašanje nitrofurantoina kao jednog od farmaceutika koji se najčešće koristi kao antibiotik u humanoj medicini, odnosno potrebno je ispitati kako njegova hidrolitička nestabilnost (pri odgovarajućim uvjetima) utječe na okolinu i žive organizme u njoj.

2.OPĆI DIO

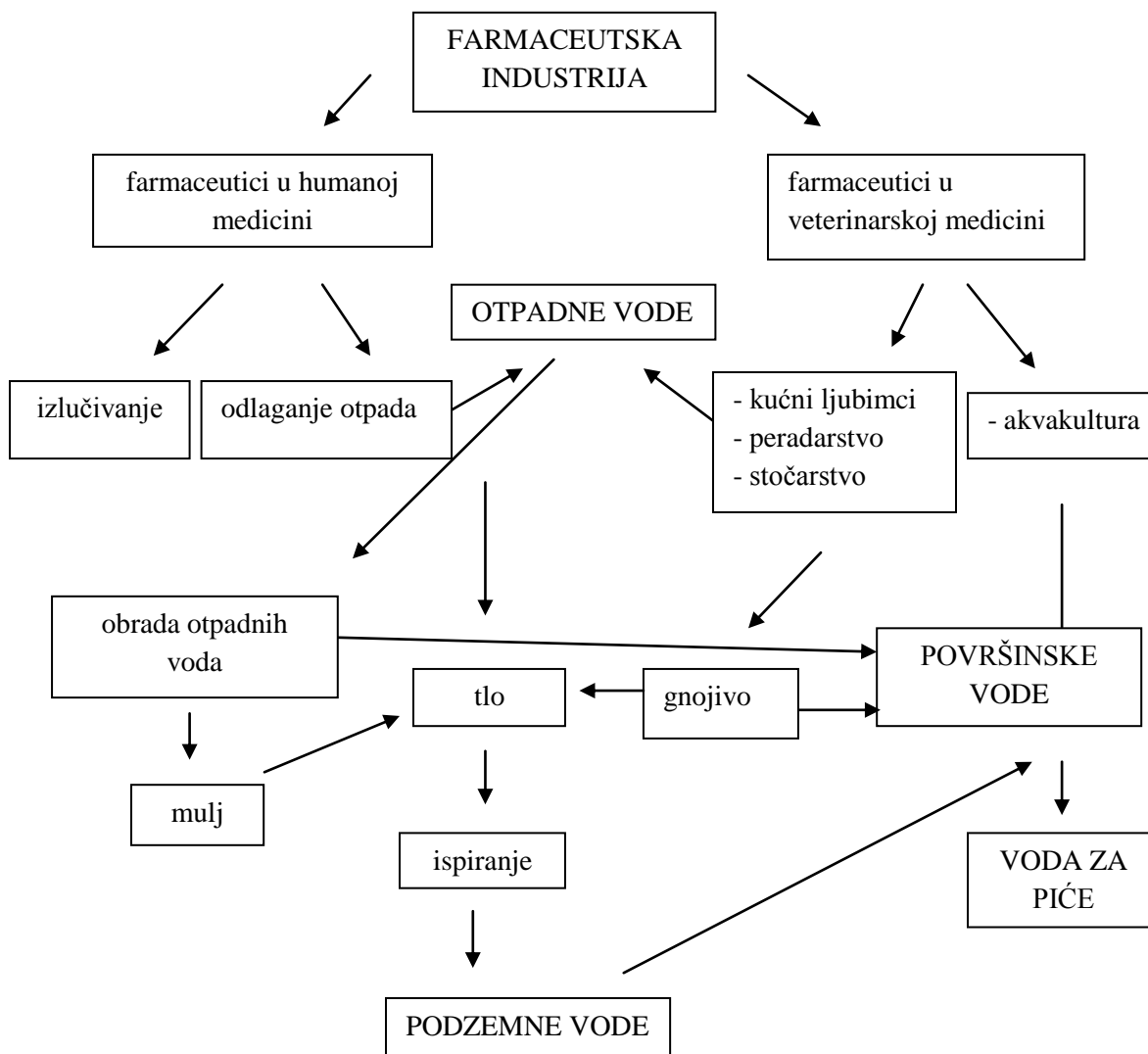
2.1. Farmaceutici u okolišu

Posljednjih godina znanstvena istraživanja su usmjerena na *nova zagađivala* za koje ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. Pod pojmom *nova zagađivala* podrazumijevaju se sredstva za kućanstvo i osobnu higijenu, te farmaceutici. Prijašnjih godina nije im se pridavalo toliko pažnje kao zagađivalima, ali danas se sve više koriste, te s toga predstavljaju sve veću opasnost za ekosustav [1, 2, 3].

Farmaceutici su kompleksne molekule različitih fizikalno-kemijskih i bioloških svojstava koji se koriste u dijagnozi, liječenju i prevenciji bolesti kako kod ljudi tako i kod životinja. Većina ih se koristi za kontrolu simptoma bolesti, dok manji broj za uklanjanje uzročnika bolesti, poput antibiotika [4]. Zbog sve veće primjene u svakodnevnom životu farmaceutici se kontinuirano unose u okoliš pa tako predstavljaju sve veću opasnost za prirodu i žive organizme u njoj.

Ponašanje farmaceutika u okolišu vrlo je važno uzeti u obzir, jer se razlikuju od konvencionalnih zagađivala zbog složenosti molekula koje imaju različite molekulske mase, strukture i funkcionalnosti s jednom ili više ionizacijskom skupinom. Nakon njihove primjene dospijevaju u okoliš izlučivanjem bilo u nepromijenjenom obliku, obliku metabolita, ali najčešće kao smjesa osnovne komponente i njenog metabolita [5].

Glavnim izvorom farmaceutika u okoliš smatraju se postrojenja za obradu otpadnih voda, ali i životinjske izlučevine, jer većina farmaceutika koji se koriste u veterinarskoj medicini završavaju u gnojivima za poljoprivredne površine [6]. Dospijevaju u okoliš i njihovim korištenjem u akvakulturi kao dodatci prehrani, a ispitivanja su pokazala da na taj način direktno ulaze u vodu (oko 70%) [4]. Upotrebom gnojiva koja sadrže farmaceutike, oni se direktno unose u tlo čime predstavljaju prijetnju kako podzemnim vodama, tako i površinskim i pitkim vodama. Jedan od načina unosa farmaceutika u okoliš je i nepropisno odlaganje neupotrijebljenih farmaceutika kojima je istekao rok trajanja, dok se ispuštanje iz proizvodnog procesa može zanemariti jer su takvi procesi strogo kontrolirani. Glavni putevi unošenja farmaceutika u okoliš navedeni su na slici 1.



Slika 1. Glavni putevi unošenja farmaceutika u okoliš [7]

Općenito, uklanjanje farmaceutika u konvencionalnim postrojenjima za obradu otpadnih voda nije dovoljno učinkovito, pa su potrebna dodatna poboljšanja (poput ozonizacije ili UV oksidacije) [8]. Tijekom obrade farmaceutici se mogu ukloniti hidrolizom, biorazgradnjom ili fotolitički, a učinkovitost ovisi o samom procesu obrade, kao i o uvjetima primijenjenim tijekom procesa [9, 10].

Za farmaceutike se može još reći da ne moraju biti postojani u okolišu da bi negativno utjecali na njega jer se kontinuirano unose. Prisutni i u manjim koncentracijama mogu utjecati na kvalitetu pitke vode, te ugroziti okoliš i žive organizme u njemu. Danas najveću brigu predstavljaju antibiotici koji mogu uzrokovati razvoj rezistentnih bakterija što bi moglo dovesti do neučinkovitosti u liječenju mnogih bolesti.

2.2. Ponašanje farmaceutika u okolišu

Farmaceutici u okolišu mogu proći kroz različite strukturne promjene zbog abiotičkih i biotičkih procesa. Abiotički procesi razgradnje uključuju hidrolizu i fotolizu, dok biotička razgradnja podrazumijeva razgradnju farmaceutika bakterijama i gljivicama. Strukturne promjene predstavljaju promjene u strukturi osnovne molekule koja se razgrađuje na manje strukturne jedinice, pri čemu nastaju transformacijski, tj. razgradni produkti.

2.2.1. Biorazgradnja farmaceutika

Biorazgradnja je vrlo važan proces koji uključuje enzimatske reakcije koje ovise o kemijskoj strukturi spoja. Stupanj razgradnje se može razlikovati i za farmaceutike unutar iste skupine [11]. Rezultat takve razgradnje je djelomična ili potpuna mineralizacija farmaceutika do ugljikova dioksida i anorganskih soli poput sulfata i nitrata.

Dvije važne skupine mikroorganizama odgovorne za razgradnju farmaceutika su gljivice i bakterije koje ih koriste za energiju i rast. Dok su gljivice važne za razgradnju u tlu, bakterije su važne u podzemnim i površinskim vodama [12, 13]. Koliko će razgradnja biti brza ovisi o načinu razgradnje, o koncentraciji farmaceutika, te o tome da li se farmaceutici nalaze u sedimentu ili vodi. Ovakva razgradnja ponekad nije potpuna pri čemu se sam proces zaustavlja prije nego je postignuta potpuna mineralizacija, a rezultat su produkti s različitim toksičnim svojstvima.

2.2.2. Fotolitička razgradnja farmaceutika

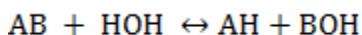
Fotolitička razgradnja je značajan proces kod farmaceutika koji su pokazali otpornost na hidrolizu i biorazgradnju. Javlja se većinom u površinskim vodama koje su izložene Sunčevoj svjetlosti. Farmaceutici zahvaljujući svojim strukturama imaju sposobnost da apsorbiraju Sunčevo zračenje, ali da bi bili podložni fotolitičkoj razgradnji njihovi apsorpcijski spektri bi se trebali poklapati sa spektrom Sunčeva zračenja [14].

Učinkovitost procesa ovisi o intenzitetu i frekvenciji svjetlosti, godišnjem dobu, vremenskim uvjetima, kvantnom iskorištenju apsorpcijskog spektra, strukturi farmaceutika, pH-vrijednosti vode, tvrdoći vode, dubini vode, te o koncentracijama pojedinih sastojaka vode [15, 16]. Ovakva razgradnja može biti djelomična ili potpuna, a rezultat su manje ili više stabilni i toksični kemijski spojevi.

2.2.3. Hidrolitička razgradnja farmaceutika

Hidroliza je jedan od dva glavna abiotička procesa razgradnje farmaceutika. Važna je osobito za one koji su otporni na razgradnju mikroorganizmima. Ovakva razgradnja podrazumijeva cijepanje kovalentnih veza složenih molekula u reakciji s vodom, pri čemu se vodikovi i hidroksilni ioni spajaju s nastalim produktima.

Odvija se uz djelovanje kiselina, lužina ili enzima prema kemijskoj reakciji:



gdje HOH predstavlja vodu, AB ispitivani kemijski spoj, a A i B njegove kemijske skupine [17].

Hidroliza je jedan od važnih fizioloških procesa i u organizmu, gdje se, uz djelovanje enzima, bjelančevine razgrađuju na aminokiseline a složeni ugljikohidrati na glukozu i slično. Hidroliza se odvija i u mnogim procesima kemijske industrije, poput proizvodnje polivinilalkohola ili u takozvanoj reakciji saponifikacije, gdje hidrolizom estera nastaju alkoholi i

karboksilne kiseline. Iako se smatra da je to najčešća kemijska reakcija kojom se farmaceutici razgrađuju u okolišu, vrlo je malo literaturnih podataka o njihovoj hidrolitičkoj stabilnosti [1].

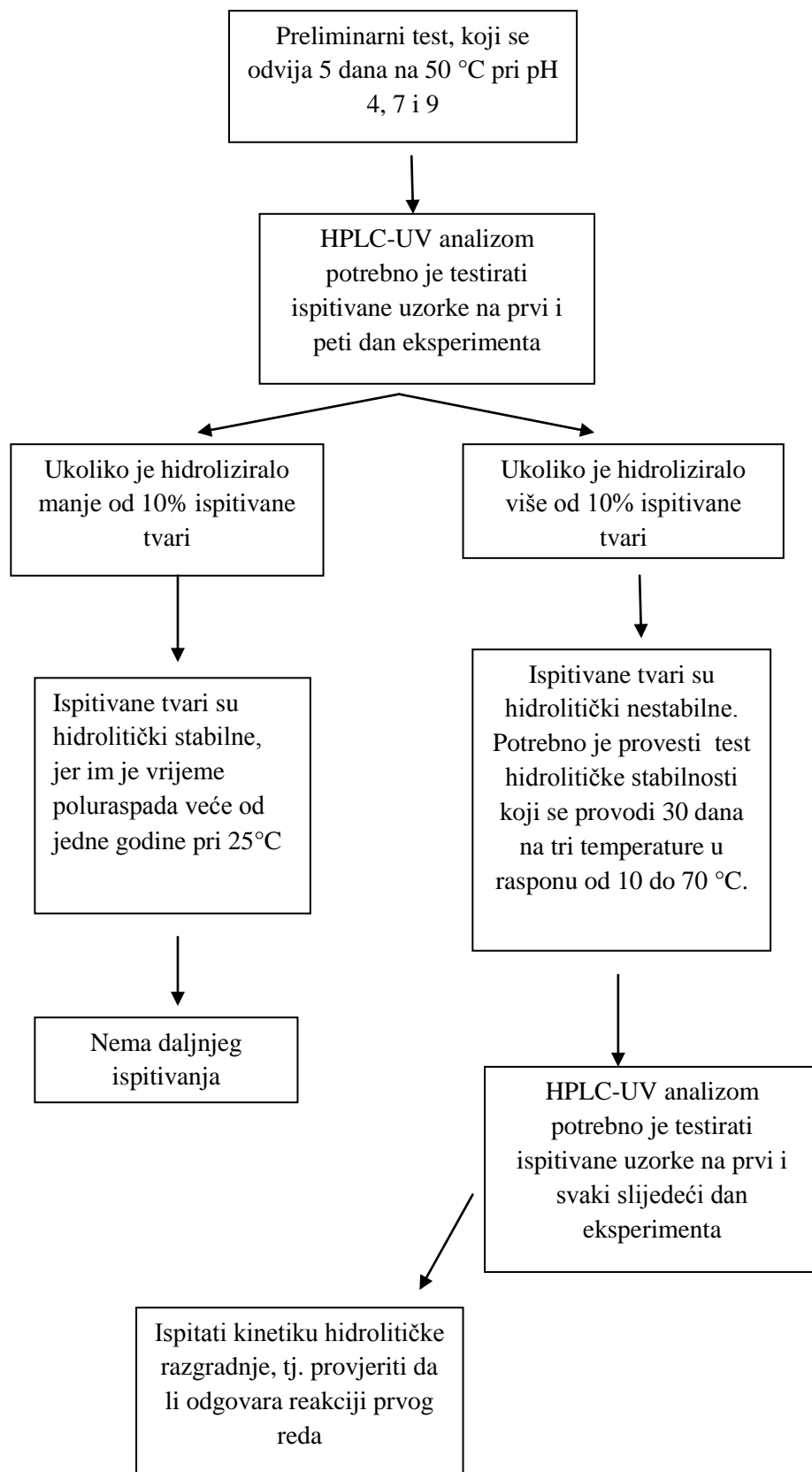
Poznati su znanstveni radovi o hidrolitičkoj stabilnosti antibiotika sulfonamida. Znanstvena istraživanja su pokazala da je hidroliza sulfonamida najuspješnija kod pH 4, dok su kod pH 9 hidrolizirali manje od 10%. Nakon izračunavanja vremena poluraspada, zaključili su da bi na 25 °C sulfonamidi bili stabilni čak godinu dana. Takvo ponašanje bi se moglo objasniti prisutnošću anionskog oblika sulfonamida u lužnatom mediju, koji je manje osjetljiv na hidrolizu od neutralnog ili kationskog oblika. Ovo istraživanje pokazalo je i da je devet od dvanaest ispitanih sulfonamida bilo stabilno pri pH 7, a samo dva pri pH 4, te da se brzina hidrolize ispitivanih tvari povećava s povišenjem temperature [1]. Za razliku od sulfonamida hidrolitička razgradnja se pokazala značajnom kod primjerice penicilina gdje dolazi do otvaranja β -laktamskog prstena [12].

Prema preporukama Europske agencije za medicinu (EMA) i Uprave za hranu i lijekove (FDA), laboratorijska ispitivanja promjena u strukturama farmaceutika, njihove razgradnje ili identifikacije produkata razgradnje (pri različitim temperaturama i pH-vrijednostima) trebala bi se provoditi prema OECD postupku 111 koji je shematski prikazan na slici 2 [1].

Stupanj hidrolize (S, %) može se izračunati iz jednadžbe:

$$S (\%) = 100\% - \left[\left(\frac{A_t}{A_0} \right) \cdot 100\% \right] \quad (1)$$

gdje je S stupanj hidrolize, A_0 površina ispod kromatografske vrpce za početnu koncentraciju spoja na određenoj temperaturi i pH-vrijednosti, A_t je površina ispod kromatografske vrpce u određenom vremenu (t) na određenoj temperaturi i pH-vrijednosti.



Slika 2. Shema procedure OECD 111 [1]

2.2.3.1. Kinetika hidrolitičke razgradnje farmaceutika u okolišu

Proučavanjem kinetike reakcije hidrolize moguće je odrediti brzinu razgradnje farmaceutika i vrijeme unutar kojeg će se razgraditi pola od početne količine ispitivanog spoja, tzv. vrijeme poluraspada. Ovakva razgradnja farmaceutika pripada reakciji prvoga reda koja pretpostavlja da se koncentracija ispitivanog spoja smanjuje proporcionalno s vremenom:

$$\frac{d[c]}{d[t]} = k[c] \quad (2)$$

gdje je c koncentracija početnog spoja, t vrijeme provođenja eksperimenta, a k konstanta brzine reakcije. Integriranjem izraza (2) dobijemo:

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

gdje je c_0 početna koncentracija spoja pri $t = 0$, a c_t koncentracija u nekom vremenu t . Konstanta brzine reakcije se odredi iz jednadžbe pravca, kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c_t/c_0)$ o vremenu (t) [18]. Dok je vrijeme poluraspada moguće odrediti iz izraza:

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

2.3. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kromatografija je analitička tehnika koja se zasniva na odjeljivanju sastojaka ispitivanih uzoraka na temelju različitih brzina putovanja pojedinih sastojaka kroz sustav koji se sastoji od pokretne i nepokretne faze. Kako bi došlo do odjeljivanja njihovih sastojaka, molekule moraju imati različiti afinitet prema nepokretnoj fazi. One molekule čiji je afinitet veći prema nepokretnoj fazi gibaju se sporije u odnosu na one koje imaju manji afinitet.

Kromatografske tehnike služe za odjeljivanje, kvantitativno određivanje i identifikaciju kemijskih sastojaka složenih smjesa. Prema pokretnoj fazi koja nosi sastojke smjese, dijele se na plinsku kromatografiju (pokretna faza inertni plin) i tekućinsku kromatografiju (pokretna faza kapljevina male viskoznosti). S obzirom na prirodu između pokretne i nepokretne faze tekućinsku kromatografiju dijelimo na [19, 20]:

- *adsorpcijsku kromatografiju* u kojoj je nepokretna faza adsorbens, a pokretna tekućina,
- *razdjelnu kromatografiju* u kojoj je tekuća nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač,
- *afinitetnu kromatografiju* koja na površini čvrste faze posjeduje različite funkcijske skupine,
- *kromatografiju isključenjem* pri kojoj je nepokretna faza materijal s porama i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima.

Tekućinsku kromatografiju, nadalje možemo podijeliti na:

- *kromatografiju normalnih faza* i
- *kromatografiju obratnih faza*.

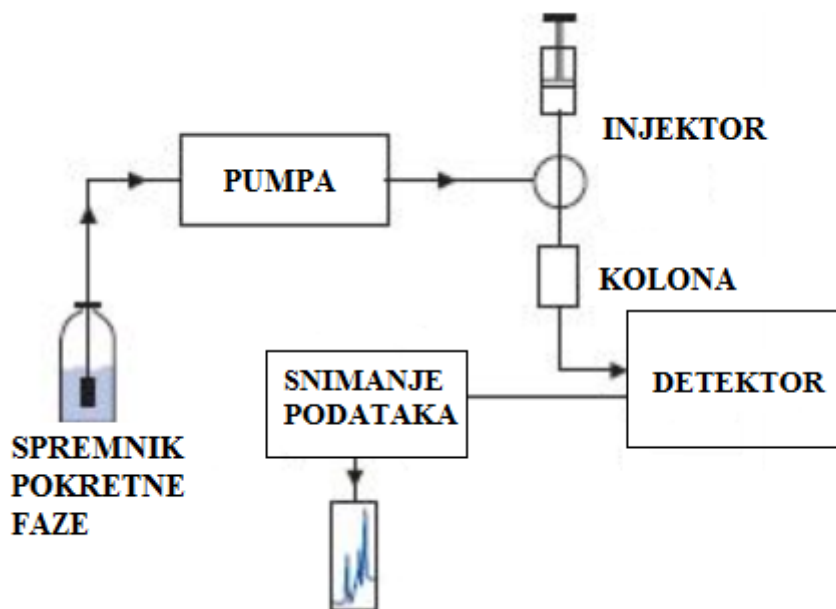
Kod kromatografije normalnih faza nepokretna faza je polarna, dok je pokretna faza nepolarna. Odjeljivanje ovisi o interakciji polarnog analita s nepokretnom fazom koja je najčešće silikagel. Kod kromatografije obratnih faza pokretna faza je polarna (silikagel), dok odjeljivanje ovisi o hidrofobnosti ili lipofilnosti analita.

Jedan od primjera tekućinske kromatografije je kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC). Smatra se suvremenom analitičkom tehnikom, koja pripada kromatografiji na stupcu koja se koristi za razdvajanje komponenti smjese na osnovi kemijsko-fizikalnih interakcija između ispitivanog analita i tekuće pokretne faze i nepokretne faze u stupcu. Razlikuje se od osnovne tekućinske kromatografije po tlaku koji se mora primijeniti kako bi pokretna faza mogla prolaziti kroz nepokretnu fazu, a pogodna je za nisko hlapljive i toplinske nestabilne komponente.

Princip rada HPLC-a zasniva se na prolasku analizirane tvari ili smjese tvari kroz kolonu (nepokretnu fazu) pumpanjem otapala (pokretne faze) pod visokim tlakom. U tok pokretne faze unosi se mali volumen uzorka, te na temelju specifičnih interakcija dolazi do različitog zadržavanja komponenti smjese. Svaka molekula u kromatografskoj koloni prolazi kroz niz slučajnih koraka sorpcije i desorpcije. Kada one prelaze iz jedne faze u drugu, moraju savladati energetska barijeru, a za što im je potrebna određena količina energije. One molekule koje se nalaze u pokretnoj fazi lakše će prolaziti energetska barijeru, jer je veza između te pokretne faze i molekula slabija u odnosu na vezu s nepokretnom fazom. Razdvajanje se može poboljšati kontroliranjem temperature ili optimizacijom protoka pokretne faze. Kinetički parametri će biti bolji ukoliko je temperatura viša, pri čemu će se povećavati difuzivnost uzorka i smanjivati viskoznost pokretne faze. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, nepokretnoj fazi i sastavu pokretne faze. Pokretna faza može biti voda, puferi, organsko otapalo ili smjesa otapala, a bitno je da bude visoke čistoće [20].

Uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografske kolone ovisi o radnom tlaku i temperature, duljini kolone, te promjeru čestica punjenja. Nakon prolaska kroz kolonu, uzorak dolazi na detektor koji prati svojstva uzorka. Na taj način moguće je kvalitativno i kvantitativno odrediti ispitivane analite.

Na slici 3. prikazani su osnovni dijelovi uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti [21].



Slika 3. Shematski prikaz osnovnih dijelova uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Spremnik pokretne faze omogućuje skladištenje dovoljnog volumena otapala za kontinuirani rad sustava (minimalno 500 ml). Cjevčica koja povezuje spremnik i crpku trebala bi imati filtar kako bi se spriječilo unošenje čestica iz spremniku u crpku.

Pumpa omogućuje konstantan i kontinuiran protok pokretne faze kroz sustav. Budući da vrlo male čestice u kromatografskoj koloni pružaju otpor pokretnoj fazi, potrebne su pumpe koje rade pri visokim tlakovima. U HPLC sustavima se uobičajeno koriste pumpe s konstantnim protokom. Budući da je pokretna faza najčešće kombinacija dva ili više otapala u različitom omjeru, pumpe omogućuju njihovo kontrolirano miješanje.

Injektor automatski unosi uzorak u struju pokretne faze prije samog ulaska u kromatografsku kolonu.

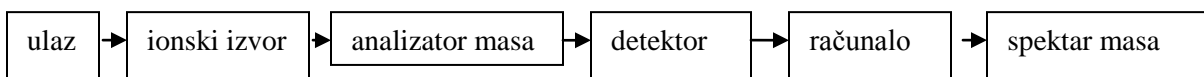
Kromatografsku kolonu predstavlja metalna cijev unutar koje je smještena nepokretna faza. Dimenzije kromatografske kolone mogu biti različite: 100 – 250 mm duljine, 2,1 – 4,6 mm unutrašnjeg promjera te 3 – 5 μm promjera čestica [22].

Detektor je zadnji dio uređaja, a služi za mjerenje promjena svojstava pokretne faze ili specifičnog svojstva analita. Smatra se glavnom komponentom uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, koji mogu biti UV, maseni (MS), fluorescentni ili

elektrokemijski. Njihova glavna svojstva trebala bi biti osjetljivost, ponovljivost i stabilnost, te brzi odziv (neovisno o protoku) i što manja širina kromatografske zone.

Snimanje podataka je moguće pomoću računalnog programa koji kontrolira cijeli HPLC sustav, prikuplja i obrađuje dobivene podatke.

Spektrometar masa je uređaj koji radi na principu ionizacije, razdvajanja molekula i njihovom identifikacijom na temelju omjera mase i naboja (m/z). Spektrometar masa (slika 4.) sastoji se od ionskog izvora u kojem dolazi do ionizacije, analizatora masa koji ih razdvaja te detektora. Uz nekoliko različitih ionskih izvora koji se mogu koristiti tijekom HPLC-MS analize ovisno o spojevima koji se analiziraju, postoje i nekoliko različitih analizatora masa sa svojim prednostima i nedostacima. Nakon detekcije na detektoru, kao ispis dobije se spektar masa [23].

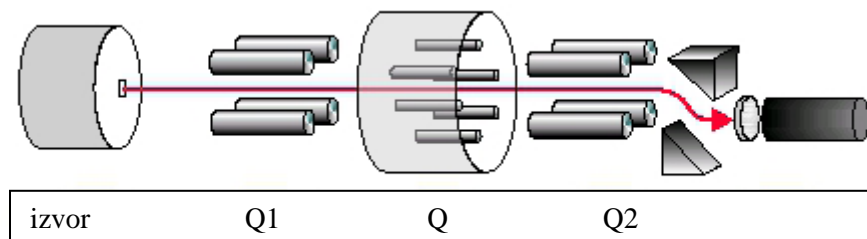


Slika 4. Shematski prikaz spektrometra masa

Postoje različite tehnike kojima se molekule analita mogu ionizirati ovisno o količini energije koja se primjenjuje tijekom procesa ionizacije te fizikalno-kemijskim svojstvima analita koji se ionizira. Za ionizaciju uzoraka iz otopine koriste se ionizacijske tehnike pri atmosferskom tlaku, kao što su toplinska ionizacija raspršenjem, ionizacija elektroraspršenjem, kemijska ionizacija i ionizacija fotonima. Nastali ioni molekula uzorka unose se u vakuumski dio sustava (analizator masa) preko sučelja koji je pod atmosferskim tlakom. Za nesmetan prolaz nastalih iona kroz analizator masa i dolazak do detektora potreban je visoki vakuum.

Najčešći korišteni analizator masa je kvadripolni analizator koji se sastoji od četiri paralelne elektrode valjkastog oblika od kojih dvije imaju pozitivan naboj, a preostale dvije negativan. Ioni se razdvajaju na temelju stabilnosti njihove putanje u oscilirajućem električnom polju. Kvadripoli se vrlo često spajaju u seriju, tzv. trostruki kvadripolni spektrometar masa, tako da se prvi (Q_1) i treći (Q_2) kvadripol koriste kao filtri masa, dok drugi kvadripol djeluje kao reakcijska zona (slika 5). To je zapravo ćelija ispunjena inertnim plinom u kojoj dolazi do sudara

molekula plina i iona uzorka što rezultira njihovom fragmentacijom. Kvadripol Q_1 može djelovati pod stalnim električnim poljem pri čemu propušta ione u određenom rasponu omjera m/z [24].



Slika 5. Shematski prikaz trostrukog kvadripolnog spektrometra masa

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu rada navedene su u tablici 1.

Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Kalijev monofosfat	KH_2PO_4	p.a.	Kemika, Hrvatska
Dikalijev fosfat	K_2HPO_4	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Lachner, Hrvatska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Borna kiselina	H_3BO_3	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Limunska kiselina	$C_6H_8O_7$	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Mravlja kiselina	HCOOH	p.a.	Orka Lab, Hrvatska
Acetonitril	CH_3CN	p.a.	Kemika, Hrvatska

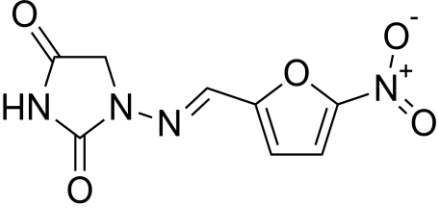
3.1.2. Nitrofurantoin

U ovom radu, istraživanja su provedena s farmaceutikom iz skupine nitrofurana, nitrofurantoinom. Nitrofurantoin je najčešće korišteni antibiotik za liječenje infekcija urinarnog trakta. To je žuti kristalni prah, gorkog okusa i mirisa. Otapa se u dimetilformamidu i metanolu, slabo je topljiv u acetonu i etanolu, a gotovo netopljiv u vodi. Na tržištu se nalazi od 1953. godine, a koristi se kao alternativa trimetoprimu i sulfametoksazolu [25]. Koristi se za liječenje infekcija izazvanih gram pozitivnim i gram negativnim bakterijama.

Nitrofurantoin je jedan od rijetkih farmaceutika koji mogu koristiti trudnice, ali u ranoj trudnoći kako bi se izbjegla hemolitička anemija, oksidativna oštećenja na crvenim krvnim stanicama ili neke oftalmološke malformacije. To je lijek koji se uzima oralno, a doza i vrijeme trajanje terapije ovise o stupnju infekcije i načinu djelovanja lijeka na pojedinog pacijenta. Djeluje tako što zaustavlja rast bakterija, te ga je potrebno uzimati i par dana nakon što nestanu simptomi infekcije. Izlučuje se putem bubrega, tako da ga se ne preporučuje osobama kod kojih je filtracija kreatinina 60 mL po minuti ili manje [26].

Fizikalno-kemijska svojstva nitrofurantoina prikazana su u tablici 2.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva nitrofurantoina

Generičko ime	Nitrofurantoin
Grupa farmaceutika	Antibiotik
Strukturna formula	
Molekulska formula	$C_8H_6N_4O_5$
CAS broj	67-20-9
Molarna masa	238,16 g/mol
Naziv po IUPAC-u	(E)-1-[(5-nitro-2-furyl)methylideneamino]imidazolidine-2,4-dione
pK_K [27]	7,2
$\log K_{ov}$ [27]	-0,47

3.2. Instrumenti

U ovom radu korišteni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga
- pH metar
- tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

3.2.1 Analitička vaga

Analitička vaga je instrument za precizno određivanje mase tvari, a o njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata analize. Kvantitativnu kemijsku analizu nije moguće napraviti bez upotrebe vage, jer uvijek treba odvagati uzorak za analizu i potrebne količine reagensa za pripremu otopina. Najrašireniji tip analitičke vage je vaga nosivosti 100 g i osjetljivosti 0,1 mg. U ovom radu korištena je analitička vaga AB104 proizvođača Mettler Toledo, Švicarska (prikazana na slici 6). Specifikacije vage:

- napon: 8-14 V
- masa: 0,1 mg – 101 g
- frekvencija: 50 – 60 Hz



Slika 6. Analitička vaga AB 104 Mettler Toledo

3.2.2. pH metar

pH-metar je uređaj koji se koristi za potenciometrijsko određivanje pH-vrijednosti. pH-metar se sastoji od elektrode koja mjeri pH-vrijednost kao aktivitet vodikovih iona koji se nalaze u tekućem uzorku. Prije korištenja, pH-metar je potrebno umjeriti puferima poznatih pH-vrijednosti. U ovom radu korišten je pH-metar S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) prikazan na slici 7.

Specifikacije pH-metra:

- raspon vrijednosti: 0 - 14
- rezolucija: 0,01 pH
- temperaturni raspon: 5 °C - 105 °C



Slika 7. pH metar S20 SevenEasy Mettler Toledo

3.2.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti

Za analizu svih uzoraka nitrofurantoina korišten je HPLC kromatograf Agilent (Santa Clara, Kalifornija, SAD) Series 1200 koji se sastoji od vakuumske degazera, automatskog uzorkivača i binarne pumpe, te Agilent 6410 trostrukog kvadrupolnog spektrometra masa (slika 8). Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84).



Slika 8. Agilent 1200 HPLC kromatograf vezan s trostrukim kvadrupolnim spektrometrom masa 6410

3.3. Postupak rada

3.3.1. Priprema puferских otopina

Za praćenje hidrolize nitrofurantoina korištene su otopine pufera pH-vrijednosti 4, 7 i 9.

Otopina pufera pH-vrijednosti 4 pripremljena je miješanjem 38,55 mL 0,2 M otopine dikalijevog fosfata i 61,45 mL 0,1 M limunske kiseline. Otopina pH-vrijednosti 7 pripremljena je miješanjem 29,63 mL 0,1 M otopine natrijevog hidroksida, 50 mL 0,1 M kalijevog monofosfata i 20,37 mL MilliQ vode, dok je pufer pH 9 pripremljen miješanjem 21,30 mL 0,1 M otopine natrijevog hidroksida, 50 mL 0,1 M borne kiseline u 0,1 M KCl i 28,70 mL MilliQ vode. pH-vrijednost pripremljenih pufera provjerena je pH-metrom.

3.3.2. Priprema standardnih otopina nitrofurantoina

Temeljna standardna otopina nitrofurantoina, masene koncentracije 200 mg/L, pripremljena je vaganjem standarda na analitičkoj vagi (0,0050 g) koji je zatim kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL i otopljen u metanolu.

Radne standardne otopine nitrofurantoina, masenih koncentracija 10 mg/L, pripremljene su uzimanjem alikvota od 1,25 mL temeljne standardne otopine koji je prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL. Tikvica je nadopunjena do oznake puferima različitih pH-vrijednosti, 4, 7 ili 9. Temeljna i radne standardna otopine čuvane su u mraku na temperaturi od 4 °C.

3.3.3. Izvođenje eksperimenta hidrolize

3.3.3.1. Preliminarni test

Preliminarni eksperimenti ispitivanja hidrolitičke stabilnosti nitrofurantoina provedeni su 5 dana na $50 \pm 0,1$ °C pri tri različite pH-vrijednosti, 4, 7 i 9. Prema postupku opisanom u OECD 111 priručniku spoj koji se tijekom 5 dana provođenja eksperimenta na 50 °C razgradi manje od 10 % smatra se stabilnim i daljnja istraživanja nisu potrebna. Hidrolitička razgradnja od 10 % na 50 °C odgovara vremenu poluraspada oko 30 dana što je ekvivalentno vremenu poluraspada od 1 godine na 25 °C [1].

3.3.3.2. Hidroliza nestabilnih spojeva

Ovaj test ovisi o rezultatima preliminarnog testa. Ukoliko se pokaže da se radi o nestabilnom farmaceutiku (hidrolitička razgradnja veća od 10 %), potrebno ga je podvrgnuti testu od 30 dana na različitim temperaturama (20 °C, 40 °C i 60 °C) i pH-vrijednostima pri kojima se pokazao nestabilnim (4, 7 i 9) [1]. Svi eksperimenti hidrolize provedeni su u mraku kako bi se izbjegla mogućnost razgradnje nitrofurantoina pod utjecajem svjetlosti. Alikvoti

uzorka uzimani su u određenim vremenskim intervalima i analizirani HPLC-MS/MS-om kako bi se utvrdila brzina hidrolitičke razgradnje nitrofurantoina.

3.3.4. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Kromatografsko određivanje izvedeno je na koloni Synergi Hydro-RP 100 x 2 mm i promjera čestica punjenja 2,5 μm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD) uz izokratno eluiranje pokretnom fazom koja se sastojala od 0.1 % mravlje kiseline u acetonitrilu kao organskom fazom i 0.1 % mravlje kiseline u vodi kao vodenom fazom. Sastav od 10 % organske faze bio je konstantan tijekom 25 min uz protok od 0,2 mL/min.

Nitrofurantoin je detektiran korištenjem spregnute spektrometrije masa (MS/MS). Sve analize provedene su ionizacijom uzorka elektroraspršenjem pri pozitivnoj ionizaciji. Uvjeti na spektrometru masa bili su :

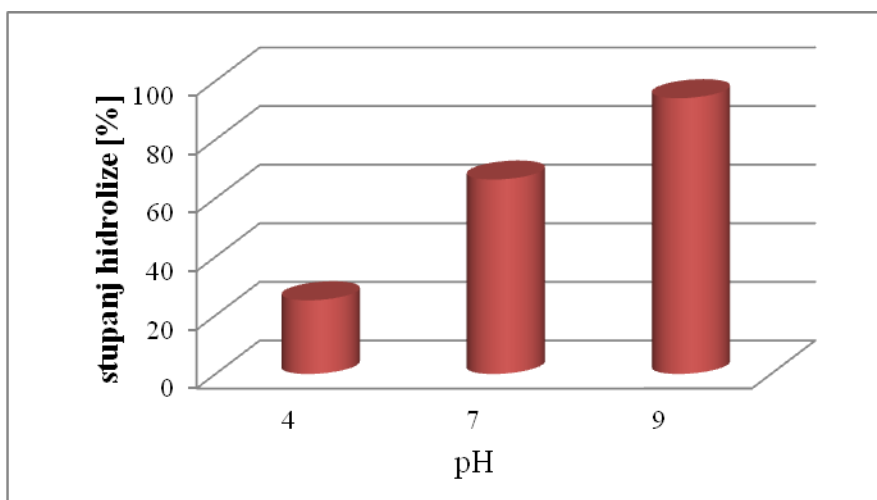
- temperatura plina: 250 °C
- protok plina: 11 L/min
- tlak raspršivača plina: 35 psi
- napon kapilare pozitivan: 4000 V

4. REZULTATI I RASPRAVA

Dolaskom u okoliš farmaceutici ili njihovi metaboliti mogu biti podvrgnuti biotičkim ili abiotičkim procesima koji rezultiraju njihovom razgradnjom. Rezultat može biti smanjenja koncentracija početnog spoja te nastanak razgradnih produkata koji mogu biti manje ili više toksični od osnovne molekule. Stoga, važno je poznavati ponašanje farmaceutika u okolišu kako bi se mogao procijeniti mogući rizik koji je posljedica njihove prisutnosti u tlu, vodama ili sedimentu. Hidroliza kao jedan od abiotičkih procesa može biti značajan proces smanjenja koncentracije farmaceutika. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati hidrolitičku razgradnju nitrofurantoina.

Preliminarni eksperimenti ispitivanja hidrolitičke stabilnosti nitrofurantoina provedeni su 5 dana na temperaturi od $50 \pm 0,1$ °C te na tri različite pH-vrijednosti, 4, 7 i 9. Nitrofurantoin se pokazao nestabilnim pri svim temperaturama i svim pH-vrijednostima, kao što se može vidjeti na slici 9. Stupanj hidrolitičke razgradnje nitrofurantoina izračunat je po prethodno navedenom izrazu (1), pri 50 °C nakon 5 dana iznosio je 25,15 % pri pH 4, 66,37 % pri pH 7 i 94,14 % pri pH 9.

Na temelju rezultata može se zaključiti da je hidrolitička razgradnja najizraženija pri pH 9, dok se nitrofurantion pokazao najstabilnijim pri pH 4. Njegova konstanta disocijacije veća je od 2, tj. iznosi 7,2, što ima za posljedicu lako otpuštanje protona i svojstva srednje jake kiseline.

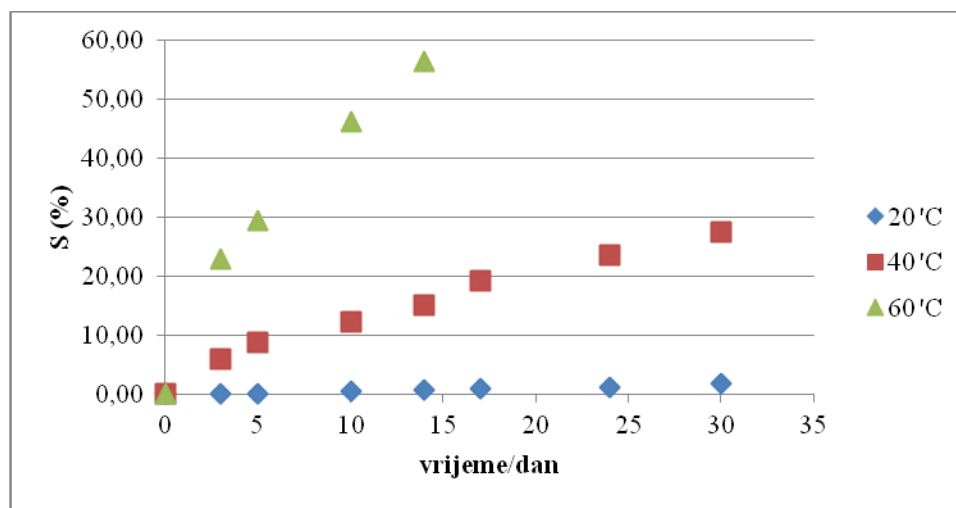


Slika 9. Stupanj hidrolitičke razgradnje nitrofurantionina na tri različite pH-vrijednosti pri 50 °C

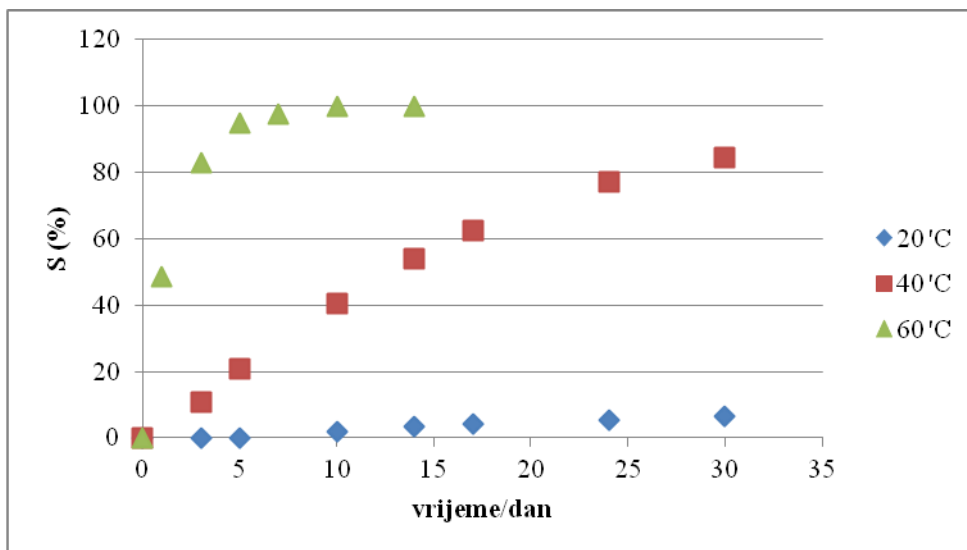
Kako je preliminarni test pokazao da se radi o nestabilnom farmaceutiku, potrebno je bilo provesti daljnja istraživanja (poglavlje 3.3.3.2). Test od 30 dana proveden je pri pH-vrijednostima od 4, 7 i 9 i temperaturama od 20 °C, 40 °C i 60 °C.

Rezultati ovog testa potvrdili su da je hidrolitička razgradnja usko povezana s temperaturom, tako da će stupanj hidrolize rasti kako raste i vrijednost temperature. Iz slika 10.-12. vidi se da je stupanj hidrolize nitrofurantoina veći pri većoj temperaturi i pri većoj pH-vrijednosti.

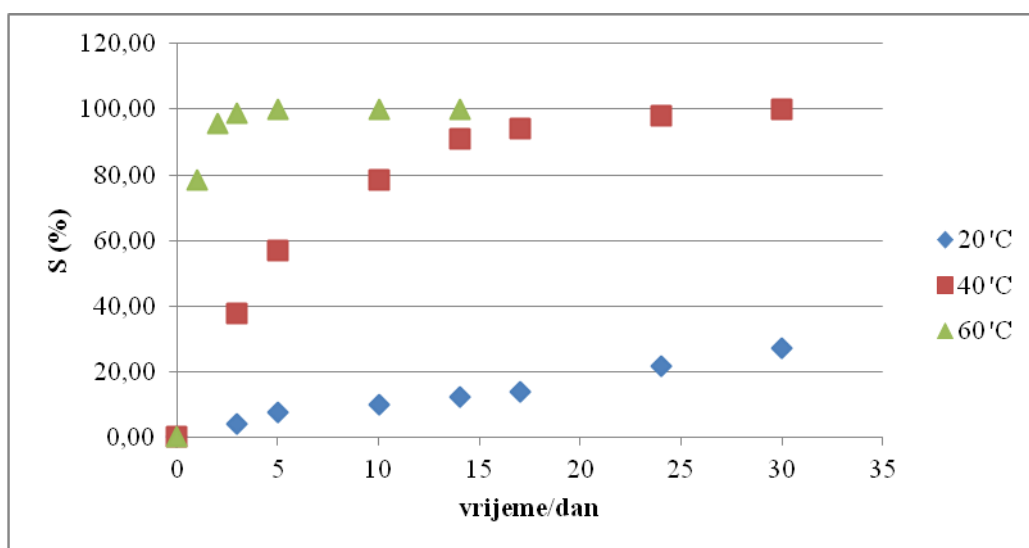
Na slici 10. može se vidjeti da je hidroliza pri pH 4 uspješnija i brža na 60 °C nego na druge dvije ispitivane temperature. U ovom dijelu eksperimenta, ispitivanja na 60 °C nisu provedena do kraja, ali vjerojatno bi se u idućih 15 dana postigao stupanj hidrolize od 100% s obzirom da je stupanj hidrolize nitrofurantoina u prvih 15 dana iznosio 50 %. Iz slike 11. može se vidjeti da nitrofurantoin jako malo i jako sporo hidrolizira pri 20 °C i pH 7, da je kod 40 °C hidroliza brža, dok je pri 60 °C stupanj hidrolize nitrofurantoina iznosio 100 % nakon 14 dana provođenja eksperimenta. Kao i u prva dva slučaja, hidroliza nitrofurantoina pri pH 9 je također najuspješnija pri najvećoj temperaturi. Nitrofurantoin je potpuno hidrolizirao nakon 14 dana.



Slika 10. Ovisnost stupnja hidrolize o vremenu pri pH 4



Slika 11. Ovisnost stupnja hidrolize o vremenu pri pH 7



Slika 12. Ovisnost stupnja hidrolize o vremenu pri pH 9

Rezultati hidrolitičke razgradnje mogu se opisati reakcijom prvog reda pri kojoj se koncentracija spoja smanjuje proporcionalno vremenu:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (5)$$

gdje je A_0 površina ispod kromatografske vrpce za početnu koncentraciju spoja, A je površina kromatografske vrpce u određenom vremenu (t), a k (min^{-1}) je konstanta brzine razgradnje. Vremena poluraspada izračunata su prema jednadžbi (4).

Dobiveni rezultati pokazuju da hidrolitička razgradnja nitrofurantoina u svim slučajevima slijedi reakciju prvog reda s koeficijentom determinacije (R^2) većim od 0,97. Dobivene konstante brzine razgradnje (k) nitrofurantoina pri različitim ispitivanim pH-vrijednostima i temperaturama, te vremena poluraspada ($t_{1/2}$) prikazani su u tablici 3.

Tablica 3. Prikaz rezultata konstanti brzine reakcije i vremena poluraspada

pH / T(°C)	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (dani)	R^2
pH 4			
20°C	0,0005	1386,29	0,9944
40°C	0,0100	69,32	0,9850
60°C	0,0570	12,16	0,9897
pH 7			
20°C	0,0020	346,57	0,9928
40°C	0,0630	11,00	0,9961
60°C	0,5400	1,28	0,9939
pH 9			
20°C	0,0090	77,02	0,9795
40°C	0,1650	4,20	0,9980
60°C	1,5220	0,46	0,9989

Iz tablice 3. se može vidjeti da je pri nižim temperaturama (20 °C) manja konstanta brzine reakcije, a pri tome vrijeme poluraspada veće. Tako će primjerice nitrofurantoin pri 20 °C na pH 7 biti prisutan u okolišu 347 dana, dok će se pri 60 °C razgraditi isti dan. Dakle, nitrofurantoin je farmaceutik koji će se zadržati u okolišu dugi niz dana ukoliko je prisutan u vodama s nižim pH-vrijednostima i nižim temperaturama.

5. ZAKLJUČAK

U ispitivanim uzorcima nitrofurantoina uočeno je da se radi o nestabilnom farmaceutiku koji hidrolizira pri svim odabranim temperaturama i pH-vrijednostima.

Rezultati su pokazali da na hidrolitičku razgradnju nitrofurantoina uvelike utječu uvjeti u okolišu, tj. pH-vrijednost i temperatura. Ustanovljeno je da je hidrolitička razgradnja najbrža pri najvećoj odabranoj temperaturi i pH vrijednosti, odnosno pri pH 9 i 60 °C, dok je razgradnja najsporija pri pH 4 i temperaturi od 20 °C .

Iz rezultata se vidi da hidrolitička razgradnja nitrofurantoina pri svim uvjetima slijedi reakciju prvog reda uz koeficijent determinacije (R^2) veći od 0,97. Vremena poluraspada nitrofurantoina su u rasponu od 0,46 dana do 1386 dana, ovisno o eksperimentalnim uvjetima. Što je veća konstanta brzine reakcije, to je vrijeme poluraspada nitrofurantoina manje, čime ujedno predstavlja manju potencijalnu opasnost za okoliš.

6. POPIS LITERATURE

1. Q. Bu, B. Wang, J. Huang, S. Deng, G. Yu, Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review, *Journal of Hazardous Materials*(2013).
2. C. G. Daughton, Emerging Chemicals as Pollutants in the Environment: a 21st Century Perspective, *Renewable Resources Journal* 23 (2005) 6-23.
3. A. B. A. Boxall, M. A. Rudd, B. W. Brooks, D. J. Caldwell, K. Choi, S. Hickmann, E. Innes, K. Ostapyk, J. P. Staveley, T. Verslycke, G. T. Ankley, K. F. Beazley, S. E. Belanger, J. P. Berninger, P. Carriquiriborde, A. Coors, P. C. DeLeo, S. D. Dyer, J. F. Ericson, F. Gagne, J. P. Giesy, T. Gouin, L. Hallstrom, M. V. Karlsson, D. G. J. Larsson, J. M. Lazorchak, F. Mastrocco, A. McLaughlin, M. E. McMaster, R. D. Meyerhoff, R. Moore, J. L. Parrott, J. R. Snape, R. Murray-Smith, M. R. Servos, P. K. Sibley, J. O. Straub, N. D. Szabo, E. Topp, G. R. Tetrealt, V. L. Trudeau, G. V. DerKraak, Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment: What are the Big Questions?, *Environmental Health Perspectives* 120 (2012) 1221-1229.
4. V. Calisto, V. I. Esteves, Psychiatric pharmaceuticals in the environment, *Chemosphere* (2009) 1257-1274.
5. K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment - A review - Part I, *Chemosphere* (2009)
6. Petrikovski, A., Određivanje farmaceutski aktivnih tvari u vodi vezanim sustavom tekućinska kromatografija-spektrometrija masa, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.
7. V. Andreu, C. Blasco, Y. Pico, Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment, *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007) 534-556.
8. G.-G. Ying, J.-L. Zhao, L.-J. Zhou, S. Liu, Fate and Occurrence of Pharmaceuticals in the Aquatic Environment (Surface Water and Sediment) u: M. Petrović, D. Barcelo (urednici), *Comprehensive Analytical Chemistry - Analysis, removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle, Occurrence and transformation in the environment*, Elsevier, Amsterdam (2013), str. 453-550.
9. N. Le-Minh, S. J. Khan, J. E. Drewes, R. M. Stuetz, Fate of antibiotics during municipal water recycling treatment processes, *Water Research* 44 (2010) 4295-4323.

10. S. Suarez, M. Carballa, F. Omil, J. M. Lema, How are pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) removed from urban wastewaters?, *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* **7** (2008) 125-138
11. J. Wang, P. R. Gardinali, Identification of phase II pharmaceutical metabolites in reclaimed water using high resolution benchtop Orbitrap mass spectrometry, *Chemosphere* **107** (2014) 65-73
12. K. M. Onosios, J. T. Yu, E. J. Bouwer, Biodegradation and removal of Pharmaceuticals and Personal Care Products in Treatment Systems: A Review, *Biodegradation* **20** (2009) 441-466.
13. R. Alexy, K. Kummerer, Antibiotics for Human Use u: T. Reemtsma, M. Jekel (urednici), Organic pollutants in the Water Cycle – Properties, Occurrence, Analysis Kroand Environmental Relevance of Polar Compounds, WILEY-VCH, Weinheim (2006).
14. K. Kummerer, Pharmaceuticals in the Environment, Springer, Berlin 2008.
15. D. Prabhakaran, P. Sukul, M. Lamshoft, M. A. Maheswari, S. Zuhlke, M. Spittler, Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems, *Chemosphere* **77** (2009) 739-746.
16. S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, Occurence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environment International* **35** (2009) 803-814.
17. D. Fatta-Kassinos, M. I. Vasquez, K. Kummerer, Transfromation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed durinf photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency, *Chemosphere* **85** (2011) 693-709.
18. <https://hr.wikipedia.org/wiki/Hidroliza>
19. OECD Guidelines for the testing of chemicals (Hydrolysis as a function of pH), 13.travnja.2004
20. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003. Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu 149
21. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Mentor d.o.o., Zagreb, 2014.
22. M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Mentor d.o.o., Zagreb, 2014.
23. M. Petrović, M. Gros, D. Barcelo, Multi-residue analysis of pharmaceuticals using LCtandem MS and LC-hybrid MS u: M. Petrović, D. Barcelo (urednici), Comprehensive

Analytical Chemistry - Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle, Elsevier, Amsterdam (2007), str. 157-181.

24. Martina Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu,

25. E. de Hoffmann, V. Stroobant, Mass Spectrometry: Principles and Applications, John Wiley & Sons, West Sussex, Engleska, 2007

26. <https://en.wikipedia.org/wiki/Nitrofurantoin>

27. Paul R Race¹ , Andrew L Lovering¹ , Richard M.Green¹ , Abdelmijid Oссор¹ , Scott A. White¹ , Peter F. Searle² , Christopher J. Wrighton³ and Eva I. Hyde¹, Structural and mehanistic studies pf Escherichia Coli nitroreductase with the antibiotic

ŽIVOTOPIS

Rođena sam 05. 05. 1992. godine u Velikoj Kladuši, Bosna i Hercegovina. Osnovno-školsko obrazovanje sam završila u Osnovnoj školi Zijad Šetkić u Velikoj Kladuši. Nakon osnovne škole, 2006. godine upisujem srednju Medicinsku školu u Zadru. Srednju školu završavam 2010. godine i te iste godine upisujem preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.