

Ekstrakcija farmaceutika iz vode i sedimenta

Židanić, Dolores

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:149:232319>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dolores Židanić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2019.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Dolores Židanić

EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ VODE I SEDIMENTA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

Članovi povjerenstva: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

izv. prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

dr. sc. Martina Biošić

Zagreb, rujan 2019.

Iskreno se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović što mi je omogućila sve potrebno za izradu ovog diplomskog rada. Hvala joj za strpljenje, susretljivost i preneseno znanje.

Zahvaljujem se i asistentici Kristini Tolić, mag.appl.chem. što je apsolutno uvijek bila tu za mene, što mi je uljepšavala one „malo više stresne“ dane u labosu i što je, prije svega, veliki prijatelj!

Sve ovo nikako ne bi bilo uspješno da nije bilo mojih nezamjenjivih tehničarki Tanje Ivančić i Slavice Kos. Hvala im što su mi bile na usluzi u svim trenucima. Da su svi poput njih, svijet bi bio ljepše mjesto.

I za kraj, veliko hvala mojoj obitelji i prijateljima. Bez njih ne bih bila ovo što sam danas. Hvala im što su mi bili najveća podrška tijekom ovih 5 godina studiranja.

SAŽETAK

Ekstrakcija farmaceutika iz vode i sedimenta

U posljednje se vrijeme sve češće raspravlja o štetnosti pojedinih farmaceutika odnosno antibiotika na okoliš, ali i na zdravlje ljudi. Zasad ne postoji zakon koji bi zabranio njihovu primjenu ili je barem smanjio. Dapače, njihova potrošnja se iz godine u godinu sve više povećava i gotovo ju je nemoguće spriječiti.

U ovom radu razvijene su metode pripreme uzoraka za analizu trinaest farmaceutski aktivnih tvari (albendazol, azitromicin, etodolak, febantel, imatinib, levamisol, linezolid, omeprazol, prazikvantel, sulfafurazol, sulfametazin, tiamulin, torasemid) u uzorcima vode i sedimenta i to ekstrakcija miješalom i ultrazvučna ekstrakcija. U svrhu određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije miješalom korištena su čista organska otapala pri različitim pH vrijednostima vode, uz različite volumene otapala za desorpciju, pri različitim vremenima trajanja ekstrakcije i desorpcije kao i pri različitim temperaturama ekstrakcije. Ultrazvučna ekstrakcija provedena je čistim organskim otapalima (kao i njihovim smjesama) te smjesama otapala s kiselinama i lužinama. Utvrđeno je da je za optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika iz vode (ekstrakcije miješalom) najbolje čisto organsko otapalo, metanol, volumena 5 mL pri temperaturi ekstrakcije i desorpcije 30 °C i pH vrijednosti vode 3,0. Isto tako, za optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom odabrano je čisto organsko otapalo, metanol, volumena 10 mL pri temperaturi ekstrakcije 25 °C.

Učinkovitost ekstrakcije kvantitativno je određena tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti. Nakon provođenja postupka optimizacije, metoda je validirana i primijenjena na realnim uzorcima.

Ključne riječi: farmaceutski aktivne tvari, sediment, voda, ultrazvučna ekstrakcija, ekstrakcija miješalom, UHPLC

ABSTRACT

Extraction of pharmaceuticals from water and sediment

In recent times, there has been increasing discussion about the harmful effects of certain pharmaceuticals, in other words antibiotics, on the environment, but also on human health. At present, there is no law forbidding or decreasing their use. In fact, their use is increasing year by year and the increase is almost impossible to stop.

In this paper, methods of sample preparation are developed for analysis of thirteen pharmaceutically active compounds (albendazole, azithromycin, etodolac, febantel, imatinib, levamisole, linezolid, omeprazole, praziquantel, sulfafurazole, sulfamethazine, tiamulin, torasemide) in water and sediment samples – stir bar sorptive extraction and ultrasound extraction. In order to determine optimal conditions for stir bar sorptive extraction, pure organic solvents were used at different pH values of water, with differing volumes of solvents for desorption, at differing time intervals of extraction and desorption, as well as at differing temperatures of extraction. Ultrasound extraction was done by using pure organic solvents (and their mixtures) and mixtures of solvents with acids and bases. It was thenceforth determined that for optimal conditions of extraction of pharmaceuticals from water (stir bar sorptive extraction) pure organic solvent, methanol, volume 5 mL at extraction and desorption temperatures of 30°C and water pH value of 3.0 is best used. Furthermore, for optimal extraction conditions of pharmaceuticals from sediments using ultrasound extraction, a pure organic solvent, methanol, volume 10 mL, at extraction temperature of 25 °C was chosen.

The efficacy of extraction was quantitatively determined by ultra high-performance liquid chromatography. After the optimization process, the method was validated and applied to real samples.

Key words: pharmaceutically active compounds, sediment, water, ultrasound extraction, stir bar sorptive extraction, UHPLC

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. Farmaceutici [1, 2]	3
2.1.1. Antibiotici.....	3
2.1.2. Antihelmintici.....	5
2.1.3. Citostatici	6
2.1.4. Diuretici.....	7
2.1.5. Ostali farmaceutici	8
2.2. Farmaceutici u okolišu [2].....	9
2.3. Određivanje farmaceutika u okolišu.....	9
2.3.1. Metode ekstrakcije	9
2.3.2. Kromatografske metode analize.....	16
2.3.3. Validacija [31].....	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	22
3.1. Materijali	23
3.1.1. Kemikalije	23
3.1.2. Izvorska voda	23
3.1.3. Sorbens	23
3.1.4. Sediment.....	24
3.1.5. Farmaceutski aktivne tvari	24
3.2. Instrumenti	37
3.2.1. Analitička vaga [38]	37
3.2.2. Miješalica	37
3.2.3. Ultrazvučna kupelj	38
3.2.4. pH-metar [40]	39
3.2.5. Rotacijski uparivač [41]	40
3.2.6. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (UHPLC).....	41
3.3. Opis rada	43
3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika.....	43
3.3.2. Kondicioniranje	43
3.3.3. Ekstrakcija miješalom	43
3.3.4. Priprema špikanog sedimenta.....	44

3.3.5. Ultrazvučna ekstrakcija	44
3.3.6. Analiza uzorka pomoću tekućinskog kromatografa ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) [42]	44
4. REZULTATI I RASPRAVA	47
4.1. Ekstrakcija farmaceutika iz vode	48
4.2. Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta	63
4.3. Validacija	98
4.3.1. Validacija kod ekstrakcije farmaceutika iz vode.....	98
4.3.2. Validacija kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta	102
4.4. Utjecaj matice.....	107
4.4.1. Utjecaj matice kod ekstrakcije farmaceutika iz vode.....	107
4.4.2. Utjecaj matice kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta	108
4.5. Analiza realnih uzoraka.....	109
4.5.1. Analiza realnih uzoraka kod ekstrakcije farmaceutika iz vode.....	109
4.5.2. Analiza realnih uzoraka kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta	111
5. ZAKLJUČAK	113
6. LITERATURA.....	116
7. ŽIVOTOPIS	121

1. UVOD

Farmaceutici se nakon oralne, parenteralne ili lokalne primjene izlučuju kroz bubrege ili jetru u obliku smjese osnovnog spoja i metabolita koji su obično polarniji i hidrofilniji od izvornoga lijeka. Veliki dio ovih tvari se nakon upotrebe za namijenjenu svrhu ispušta u otpadne vode nepromijenjen ili u obliku razgradnih produkata koji se često teško uklanjaju konvencionalnim postrojenjima za obradbu voda. Budući da njihova potrošnja i dalje raste, važno je pratiti njihovo ponašanje u okolišu. Upravo iz tog razloga, nužno je razviti analitičke metode koje će omogućiti njihovu detekciju, ali i kvantifikaciju.

Cilj ovog rada bio je optimirati postupak ekstrakcije miješalom i ultrazvučne ekstrakcije trinaest ispitivanih farmaceutski aktivnih tvari (albendazol, azitromicin, etodolak, febantel, imatinib, levamisol, linezolid, omeprazol, prazikvantel, sulfafurazol, sulfametazin, tiamulin, torasemid) iz dva različita medija, vode i sedimenta. Nakon optimiranja ekstrakcijskih uvjeta efikasnost metode ocijenjena je procjenom linearnosti, granicama detekcije (GD), granicama kvantifikacije (GK), ponovljivosti, obnovljivosti te utjecajem matice uzorka. Nakon provođenja validacije, metoda je primijenjena na pet realnih uzoraka otpadne vode odnosno sedam realnih uzoraka sedimenata i tla.

2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici [1, 2]

Farmaceutski aktivni spojevi su složene molekule koje imaju različita fizikalno-kemijska i biološka svojstva. Razvijaju se i koriste zbog svoje specifične biološke aktivnosti. Najčešće su karakterizirani ionskom prirodom. Njihova molekulska masa obično se kreće u rasponu od 300 do 1000. Naziv farmaceutici obuhvaća sve terapijske lijekove koji su namijenjeni ljudima te veterinarske lijekove i dodatke prehrani. U Europskoj uniji se za ljudsku medicinu koristi oko 3000 različitih farmaceutika. Većina modernih lijekova su mali organski spojevi koji moraju biti umjereno topljivi u vodi da bi bili biološki aktivni i bioraspoloživi. Već u malim dozama postižu određene farmakološke i fiziološke učinke te zbog svojih svojstava često uzrokuju loše posljedice po živi svijet. Mogu se klasificirati prema njihovim učincima, ali i prema njihovoj kemijskoj strukturi. Uobičajeno, lijekovi i dezinficijensi se klasificiraju prema njihovoj terapijskoj svrsi pa razlikujemo analgetike, antibiotike, antineoplastike itd. Posljednjih godina povećala im se potrošnja. Očekuje se i daljnji porast potrošnje zbog porasta broja stanovnika, njihovog starenja, pojave novih dobnih skupina i širenja potencijalnih tržišta.

2.1.1. Antibiotici

Antibiotici su kemijski spojevi koji uništavaju bakterije (baktericidno djelovanje) ili zaustavljaju njihovo razmnožavanje (bakteriostatsko djelovanje) [3]. 1928. godine otkrio ih je Alexander Fleming koji je uvidio da plijesan *Penicillium notatum* uništava bakterijske kolonije. Ubrzo nakon našao je način da izolira aktivnu tvar koja je nazvana penicilin i koja se kasnije koristila za liječenje velikog broja bolesti. Tijekom samih početaka antibiotici su se proizvodili iz prirodnih izvora kao što su gljivice, međutim, danas se uglavnom koriste sintetski i polusintetski antibiotici [4]. Mnogo je kriterija prema kojima se antibiotici mogu klasificirati. Neki od njih su: kemijska struktura, način djelovanja, biološko porijeklo, spektar djelovanja te stupanj djelotvornosti [5]. Upotrebljavaju se za liječenje bakterijskih, parazitskih i nekih gljivičnih infekcija. Na viruse ne djeluju [6]. Glavne skupine antibiotika su: penicilini, cefalosporini, tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi, sulfonamidi i kinoloni [7]. Antibiotici se osim za liječenje ljudi i životinja koriste u uzgoju životinja na farmama kao promotori rasta. Njihova prečesta i preraširena upotreba dovodi do negativnih posljedica na pojedinca i cijelo društvo. To je trenutno problem globalnih razmjera u javnom zdravstvu [3].

U ovom radu korišteni su sljedeći antibiotici: azitromicin, linezolid, sulfafurazol, sulfametazin i tiamulin.

2.1.1.1. Azitromicin

Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik s bakteriocidnim i bakteriostatičkim djelovanjem. Pripada skupini azalida [8]. Djeluje tako što zaustavlja rast bakterija. Koristi se za liječenje određenih bakterijskih infekcija poput bronhitisa, upale pluća, spolno prenosivih bolesti, infekcije ušiju, pluća, sinusa, kože, grla i reproduktivnih organa. To je antibiotik koji ne djeluje kod prehlade, gripe ili drugih virusnih infekcija [9].

2.1.1.2. Linezolid

Linezolid je sintetski antibiotik i to prvi iz klase oksazolidinona [10]. Koristi se za liječenje infekcija uzrokovanih Gram-pozitivnim bakterijama koje su otporne na druge antibiotike. Njegova glavna primjena su infekcije kože i upale pluća iako se može koristiti i za mnoge druge infekcije. Može se koristiti kod ljudi svih dobi i kod osoba s bolestima jetre ili slabom funkcijom bubrega [11].

2.1.1.3. Sulfafurazol

Sulfafurazol je sulfonamidni antibiotik koji je vrlo često poznat i pod nazivom sulfioksazol. Sulfonamidi su sintetski bakteriostatski antibiotici širokog spektra djelovanja protiv većine Gram-pozitivnih i mnogih Gram-negativnih bakterija. Sulfafurazol se najčešće koristi za liječenje urinarnih infekcija [12].

2.1.1.4. Sulfametazin

Sulfametazin se često naziva i sulfadimidin te pripada grupi sulfonamida. Koristi se kao antimikrobno sredstvo širokog spektra djelovanja u liječenju ili prevenciji infekcija. Liječene infekcije mogu uključivati upalu pluća, crijevne infekcije, infekcije mekih tkiva te infekcije mokraćnog sustava. Isto tako, to je kremasto-bijeli prah koji se često koristi u veterini [13].

2.1.1.5. Tiamulin

Tiamulin je antimikrobno sredstvo diterpena s kemijskom strukturom pleuromutilina sličnom valnemulinu. Njegova aktivnost je uglavnom ograničena na Gram-pozitivne bakterije [74]. Koristi se za svinje i perad, ali ima i neke primjene kod goveda, koza i liječenja ovaca. Temeljni je lijek za liječenje dizenterije svinja i bakterijske upale pluća. Mehanizam bakteriostatičke aktivnosti tiamulina temelji se na blokadi sinteze proteina u bakterijskoj stanici [14].

2.1.2. Antihelmintici

Antihelmintici su sredstva koja djeluju protiv trakavica i glista odnosno crvolikih crijevnih nametnika na čovjeku i domaćim životinjama. Često se daju u kombinaciji sa sredstvima za čišćenje crijeva koja omogućuju crijevnoj peristaltici njihovo uklanjanje iz crijeva. Ne postoji univerzalni antihelmintik koji djeluje na sve crijevne nametnike. Postoji više kriterija za izbor. Neki od njih su spektar djelovanja, podnošljivost, tip helmintijaze i djelotvornost [15]. Prema kemijskoj strukturi klasificiraju se na: 1) piperazine; 2) antimalarike; 3) heterocikle; 4) benzimidazole i 5) prirodne proizvode [16]. Najpoznatiji antihelmintici su albendazol, mebendazol, piperazin, niklozamid, ekstrakt podanka paprati te pirivinij embonat i pirantel embonat [15].

U ovom radu korišteni su sljedeći antihelmintici: albendazol, febantel, levamisol i prazikvantel.

2.1.2.1. Albendazol

Albendazol je antihelmintik širokog spektra djelovanja koji pripada grupi benzimidazola. Djeluje tako da ometa normalni metabolizam parazita i sprječava ugrađivanje glukoze u njegova sva tri razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u samim parazitima kao i smanjeno stvaranje ATP-a. Iz probavnog sustava apsorbira se manje od 5 % albendazola. Apsorbirani lijek se u jetri metabolizira u albendazol-sulfoksid i veže za serumske bjelancevine. Vrijeme poluraspada lijeka iznosi osam i pol sati te se izlučuje mokraćom [17].

2.1.2.2. Febantel

Febantel je prolijek koji pripada skupini antihelmintika koji se *in vivo* djelomično metabolizira u fenbendazol, benzimidazolni antihelmintik. Koristi se za liječenje i kontrolu gastrointestinalnih okruglih crva, plućnih crva i trakavica [18].

2.1.2.3. Levamisol

Levamisol je antihelmintik širokog spektra djelovanja koji se koristi za liječenje parazitskih, virusnih i bakterijskih infekcija. 1969. godine proizveo ga je i prvi puta upotrijebio Janssen. Također, zbog svojih imunomodulatornih učinaka, ovaj je lijek proučavan u liječenju raznih imunoloških bolesti. 2000. godine povučen je s američkog tržišta jer je otkriveno da uzrokuje ozbiljne štetne učinke [10].

2.1.2.4. Prazikvantel

Prazikvantel je antihelmintik širokog spektra djelovanja koji pripada grupi heterocikla. Djeluje na način da povećava permeabilnost nematoda za kalcij i time uzrokuje kontrakciju mišića i eventualnu paralizu i smrt parazita. Također, povećava osjetljivost parazita na imunološki sustav domaćina [17].

2.1.3. Citostatici

Citostatici su vrlo djelotvorni lijekovi koji uništavaju ćelije tumora ili zaustavljaju njihov rast. Prema mehanizmu djelovanja najčešće remete sintezu i/ili funkciju makromolekula (DNA, RNA, bjelančevine) ili funkciju ćelijskih organela. Posljedica koja se javlja zbog ovih učinaka je smrt ćelija. Citostatici se dijele na: 1) alkilirajuća sredstva; 2) sredstva biljnog porijekla; 3) antimetabolite i 4) protutumorske antibiotike. Citostatici oštećuju i zdrava tkiva domaćina posebice ona čije se stanice brzo dijele što često uzrokuje nuspojave. Za sada, idealni antitumorski lijekovi koji bi uništili isključivo samo tumorske stanice bez štetnog djelovanja na normalna tkiva, ne postoje [19].

Citostatik koji je korišten u ovom radu je imatinib.

2.1.3.1. Imatinib

Imatinib je inhibitor tirozin kinaze koji se koristi za liječenje određenih vrsta raka. Prvi je član nove klase agenasa koji djeluju inhibicijom određenih enzima tirozin kinaze umjesto nespecifičnih inhibitora stanica koje se brzo dijele. Koristi se u liječenju kronične mijelogene leukemije, gastrointestinalnih tumora i niza drugih zloćudnih bolesti [10].

2.1.4. Diuretici

Diuretici se definiraju kao tvari koje uz izlučivanje vode dovode i do povećanja izlučivanja soli u prvom redu natrijeva klorida. Kako bi diuretik potaknuo povlačenje edema, mora imati svojstvo povećanja eliminacije natrija te kloridnih i hidrogenkarbonatnih iona. Zbog toga se pravi diuretici vrlo često nazivaju i saluretici. Prema mehanizmu i mjestu djelovanja dijele se na 5 skupina: 1) osmotski diuretici; 2) diuretici koji čuvaju kalij; 3) tiazidi i njima slični diuretici; 4) diuretici Henleove petlje i 5) inhibitori karboanhidraze. Primjenjuju se kod akutnih edema, kroničnih edema, zatajenja bubrega, zatajenja srca i hipertenzije [20]. Postoji mnogo diuretika, a neki od njih su: ciklopentiazid, furosemid, benzotiazid, torasemid, bumetanid, klortiazid, hidroklortiazid, klopamid, triklormetiazid, politiazid itd [21].

Diuretik koji je korišten u ovom radu je torasemid.

2.1.4.1. Torasemid

Torasemid je novi diuretik s profilom djelovanja sličnim furosemidu. Međutim, u usporedbi s furosemidom, torasemid karakterizira veća biološka dostupnost, veća potentnost te dulje trajanje djelovanja [22]. S obzirom na stupanj i trajanje diureze, pri nižim dozama nalikuje diureticima tiazidskog reda. Snažno potiče izlučivanje mokraće. Koristi se za liječenje edema zbog kongestivnog srčanog zatajenja, edema zbog bolesti jetre ili bubrega i hipertenzije [23].

2.1.5. Ostali farmaceutici

2.1.5.1. Etodolak

Etodolak je nesteroidni protuupalni lijek koji pokazuje protuupalna, analgetska i antipiretska svojstva. Inhibira sintezu prostaglandina i upravo radi toga ima terapijske učinke [10]. Koristi se za ublažavanje bolova kod različitih stanja. Osim toga, smanjuje bol, oticanje i ukočenost zglobova od artritisa [24].

2.1.5.2. Omeprazol

Omeprazol je supstituirani benzimidazol koji služi za regulaciju sekrecije želučane kiseline, tzv. inhibitora protonske pumpe. Inhibira protonsku pumpu u parijetalnim ćelijama sluznice želuca, a time i terminalni stadij u procesu sekrecije kiseline [25]. Koristi se u liječenju bolesti gastroezofagealnog refluksa i peptičkog ulkusa. Također, koristi se i za sprječavanje krvarenja gornjeg gastrointestinalnog trakta kod osoba koje su pod visokim rizikom [26].

2.2. Farmaceutici u okolišu [2]

Farmaceutski aktivni spojevi se nakon oralne, parenteralne ili lokalne primjene izlučuju kroz bubrege ili jetru u obliku smjese osnovnog spoja i metabolita koji su obično polarniji i hidrofilniji od izvornoga lijeka. Veliki dio ovih tvari se nakon upotrebe za namijenjenu svrhu ispušta u otpadne vode nepromijenjen ili u obliku razgradnih produkata koji se često teško uklanjaju konvencionalnim postrojenjima za obradbu voda. Farmaceutski aktivne tvari mogu dospjeti u površinske i podzemne vode što sve ovisi o učinkovitosti obradbe i kemijskom sastavu spoja. Farmaceutici su nađeni u ispuštima nakon obradbe otpadnih voda, tlu, vodovodnoj vodi i površinskim vodama. Unatoč niskim koncentracijama, zabrinutost zbog mogućega dugoročnog utjecaja na ljude i vodene organizme sve je veća. Iako su njihove razine daleko ispod preporučene propisane doze, nađeno je da utječu na vodene ekosustave. Antibiotici i estrogeni su dvije od mnogih vrsta farmaceutika za koje se sumnja da opstaju u okolišu, bilo zato što se ne mogu prirodno biološki razgraditi ili zbog njihova kontinuiranog ispuštanja.

2.3. Određivanje farmaceutika u okolišu

2.3.1. Metode ekstrakcije

Moderne metode pripreme uzorka uglavnom se zasnivaju na ekstrakciji [2]. Ekstrakcija je postupak izdvajanja tvari iz homogenih smjesa na osnovi njene različite topljivosti u različitim otapalima koja se međusobno ne miješaju. Smatra se učinkovitom i brzom metodom razdvajanja i koncentriranja tvari [27]. Moderne metode mogu se podijeliti na metode koje mogu zadržati analit te na one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugog otapala. Sve ekstrakcijske metode koriste princip selektivnog koncentriranja u jednoj fazi dok se njihova selektivnost postiže promjenom radnih uvjeta. Pritom se analit raspodjeljuje između dviju faza u skladu s temperaturom, relativnim obujmom faza te konstantom raspodjele. Također, metode pripreme uzorka se mogu podijeliti i prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita pa razlikujemo ekstrakciju tekuće-tekuće, čvrsto-tekuće te plinovito-tekuće [2].

2.3.1.1. Ekstrakcija iz tekućih uzoraka [2]

Ekstrakcija organskih sastojaka iz tekućih uzoraka definira se kao proces u kojemu tvar koja se ekstrahira prelazi iz jednog otapala u drugo. Budući da djelotvornost ekstrakcije ovisi o hidrofobnosti, kiselo-lužnatom karakteru, fizikalno-kemijskim svojstvima analita, ali i o njegovoj topljivosti, poznavanje tih svojstava ključno je za izbor metode i odabir optimalnih uvjeta ekstrakcije željenoga analita. Postoji mnogo vrsta ekstrakcije, a opisane će biti samo neke od njih.

1) Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)

Ekstrakcija tekuće-tekuće¹ smatra se brzom i jednostavnom metodom prikladnom za automatizaciju. Provodi se u lijevku za odjeljivanje, a radi postizanja veće djelotvornosti ekstrakcije, postupak se ponavlja 2 do 3 puta. Njen glavni nedostatak je uporaba velikog obujma (100 – 250 mL) organskog otapala, što vodi skupljem odjeljivanju, šteti zdravlju te onečišćuje okoliš.

2) Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE)

Ekstrakcija čvrstom fazom² razvijena je sredinom 1970-ih kada je potisnula ekstrakciju tekuće-tekuće te postala najprimjenjivija metoda pripreme uzorka. Kod ekstrakcije čvrstom fazom ekstrakcija analita postiže se njegovom raspodjelom između čvrste i tekuće faze. Afinitet prema čvrstoj fazi puno je veći nego prema matici uzorka dok se vezani analiti desorbiraju eluiranjem.

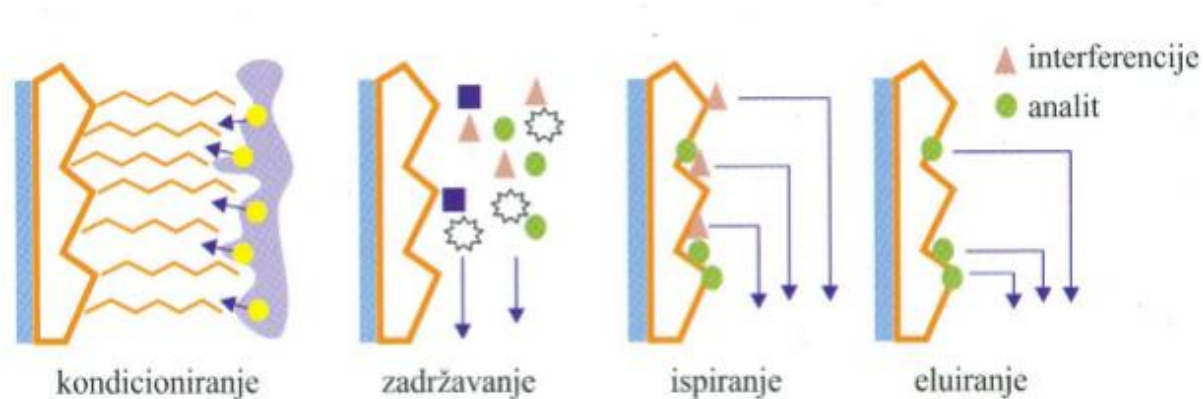
Njeni najvažniji ciljevi su izmjena otapala, koncentriranje tragova analita te pročišćavanje matice uzorka uklanjanjem neželjenih sastojaka. To se postiže tijekom četiri koraka:

- a) Kondicioniranje (solvatacija sorbensa)
- b) Zadržavanje (analit se zadržava na površini sorbensa)
- c) Ispiranje (uklanjanje neželjenih tvari koje su zadržane na površini sorbensa)
- d) Eluiranje ili desorpcija analita sa sorbensa prikladnim otapalom.

¹ engl. liquid-liquid extraction, LLE

² engl. solid-phase extraction, SPE

Veoma važnu ulogu ima izbor sorbensa zato što između različitih vrsta sorbensa treba izabrati one koji ekstrakciji čvrstom fazom daju sposobnost izoliranja različitih analita iz raznovrsnih i složenih uzoraka.



Slika 2.1. Koraci ekstrakcije čvrstom fazom [2]

3) Mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME)

Mikroekstrakcija čvrstom fazom³ novija je metoda koja se koristi za određivanje različitih analita u najraznovrsnijim uzorcima, ali ponajviše u analizi hlapljivih i djelomično hlapljivih sastojaka. Iako je mehanizam ekstrakcije sličan onomu u ekstrakciji čvrstom fazom, razlika je u količini sorbensa, koji je u obliku vlakna, pa je metoda prikladnija za ekstrakciju malih količina analita.

Najvažnija prednost ove metode izrazito je mala potrošnja organskih otapala te njezina jednostavnost, brzina, selektivnost, ali i mogućnost izravnoga povezivanja s plinskom i tekućinskom kromatografijom te s kapilarnom elektroforezom. Nedostatak joj je ograničen vijek uporabe vlakana zbog mogućnosti njihova oštećenja ili uništenja, što vodi dodatnom poskupljenju metode.

³ engl. solid-phase microextraction, SPME

4) Ekstrakcija miješalom (SBSE)

Ekstrakcija miješalom⁴ je metoda koja je razvijena radi poboljšanja mikroekstrakcije čvrstom fazom tako da umjesto vlakana kao nosač sorbensa služi magnetno miješalo. Na taj se način sorpcijska površina povećava 50 do 250 puta, što dovodi do veće djelotvornosti ekstrakcije iz većega volumena uzorka. Budući da se radi o ravnotežnoj tehnici i ovdje prijelaz iz faze u fazu ovisi o koeficijentu razdiobe.

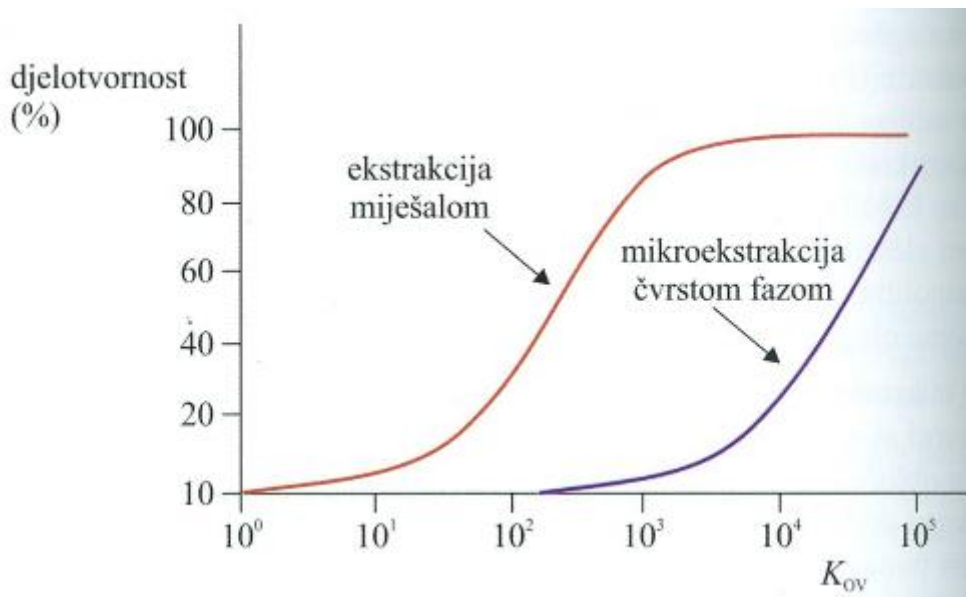
Za polidimetilsiloksan, najčešće korišten sorbens, predložen je matematički odnos razdjelnoga koeficijenta, $K_{PDMS/V}$ odnosno koeficijenta razdjeljenja oktanol-voda, K_{ov} .

$$K_{ov} \approx K_{PDMS/V} = \frac{\gamma_{PDMS}}{\gamma_V} = \left(\frac{m_{PDMS}}{m_V} \right) \left(\frac{V_V}{V_{PDMS}} \right) = \beta \left(\frac{m_{PDMS}}{m_V} \right)$$

pri čemu su γ_{PDMS} i m_{PDMS} masena koncentracija odnosno masa analita u organskoj fazi/vlaknu, V_{PDMS} i V_V volumen organske odnosno vodene faze te γ_V i m_V masena koncentracija odnosno masa analita u vodenoj fazi. β predstavlja omjer faza, a djelotvornost ekstrakcije je veća što je on manji.

S obzirom da je kod mikroekstrakcije čvrstom fazom volumen PDMS-a oko 0,5 μ L, a kod ekstrakcije miješalom 25 – 125 μ L, teorijska djelotvornost ekstrakcije od 100 % puno se bolje dostiže kod ekstrakcije miješalom nego kod mikroekstrakcijom čvrstom fazom.

⁴ engl. stir-bar sorptive extraction, SBSE



Slika 2.2. Usporedba djelotvornosti ekstrakcije miješalom i mikroekstrakcije čvrstom fazom u ovisnosti o K_{OV} [2]

Vrijeme ekstrakcije miješalom određeno je volumenom uzorka, dimenzijama miješala, brzinom miješanja te kinetikom, a za određenu se primjenu mora optimizirati na temelju postignute djelotvornosti u danom vremenu. Kao i kod mikroekstrakcije čvrstom fazom, isti parametri utječu na postupak ekstrahiranja analita iz uzorka, a ekstrahirani se analit može desorbirati toplinski, tekućom desorpcijom i desorpcijom strujom helija te desorpcijskim sustavom povezati s plinskim ili tekućinskim kromatografom.

Nedostatak metode očituje se u sporijem desorpcijskom postupku zbog veće količine ekstrakta pa se upravo zbog toga vrlo često kombinira s postupkom hladnoga zadržavanja i ponovnoga koncentriranja. Unatoč ovim nedostacima, metoda se pokazala dobrom za složene i polučvrste uzorke te za hlapljive, poluhlapljive i nehlapljive spojeve.

2.3.1.2. Ekstrakcija iz čvrstih uzoraka [2]

Ekstrakcija organskih sastojaka iz čvrstih uzoraka je proces kod kojeg se tvar desorbira iz matice uzorka i otapa u prikladnom otapalu. Njena djelotvornost ovisi o tri međuovisna čimbenika: matici uzorka, prijenosu mase i topljivosti dok izbor otapala ovisi o prirodi analita i matice uzorka. Ponekad je potrebno koristiti smjesu vode i organskih otapala zato što ni jedno čisto otapalo nije univerzalno za sve analite. Razlikuju se klasične metode

ekstrakcije koje uključuju Soxhlet ekstrakciju, automatiziranu Soxhlet ekstrakciju i ekstrakciju ultrazvukom te druge metode koje uključuju ekstrakciju fluidom pri superkritičnim uvjetima, ekstrakciju pregrijanom vodom te tlačnu i mikrovalnu ekstrakciju otapalom.

1) Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je relativno spora metoda pripreve uzorka koja se primjenjivala do 1980-ih kada su ju zamijenile moderne metode. Zasniva se na kontinuiranom uparavanju, kondenziranju i prolazu pogodnoga otapala kroz uzorak. Zbog dugotrajnosti postupka, zahtijeva se uporaba znatne količine uzorka te velik volumen organskih otapala koja radi koncentriranja analita treba upariti. Kako bi se smanjili nedostaci metode, nešto kasnije, razvijen je automatizirani Soxhlet. Pri tome je vrijeme ekstrakcije smanjeno na 2 do 3 sata, a volumen otapala s 250 – 500 mL na 40 – 50 mL po ekstrakciji. Također, zbog boljega kontakta između otapala i uzorka, ekstrakcija je puno brža jer je i prijenos mase puno brži.

2) Ultrazvučna ekstrakcija (UAE)⁵

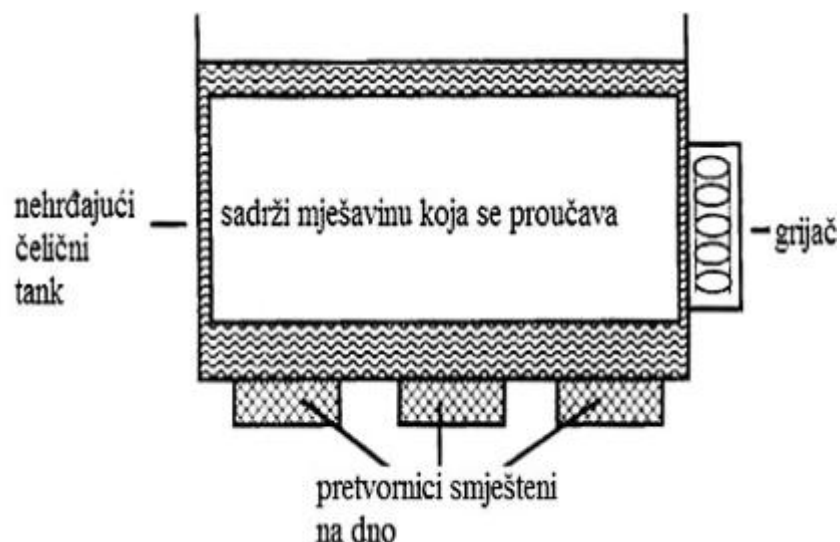
U posljednje se vrijeme sve više povećalo istraživanje ultrazvuka zbog njegove potencijalne primjene u prehrambenoj industriji te za analizu i modifikaciju prehrambenih proizvoda. Ukoliko je primijenjena frekvencija visoka, govori se o ultrazvuku niske energije, a ako je frekvencija niska, o ultrazvuku visoke energije. Ultrazvuk niskog intenziteta djeluje u frekvencijskom rasponu od 2 MHz na više i ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen te se stoga smatra neinvazivnom tehnikom, a koristi se kao analitička tehnika za kontrolu obrade hrane, viskoznosti, brzine protjecanja itd. Ultrazvuk visokog intenziteta sa rasponom od 20 do 100 kHz može uzrokovati fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije u materijalima na kojima je primijenjen. Stoga se koristi za čišćenje, otplinjavanje tekućina, ekstrakciju, emulgiranje, destilaciju, kristalizaciju itd. [28]

Ultrazvučna ekstrakcija koristi se energijom ultrazvuka sa svrhom poboljšanja ekstrakcijskog procesa. Temelji se na vrlo kratkom izlaganju uzorka velikoj količini energije pri čemu se zagrijava i povisuje tlak. Budući da je frekvencija ultrazvuka koji se koristi u

⁵ engl. ultrasound assisted extraction, UAE

kemijskim reakcijama od 20 do 100 kHz, dolazi do stvaranja kavitacije [2]. Taj efekt potiče oslobađanje topljivih sastojaka iz uzorka na način da oštećuje matriks uzorka. Pucanjem matriksa dolazi do direktnog kontakta sa sadržajem uzorka. Time se otapalu olakšava da dođe do sadržaja uzorka te se povećava prijenos tvari. Na taj se način olakšava i ubrzava ekstrakcija i povećava njezina djelotvornost [29]. Ultrazvučna ekstrakcija znatno skraćuje vrijeme ekstrakcije na 10 – 45 minuta i smanjuje volumen otapala do 100 mL. Njena velika prednost uključuje mogućnost ekstrahiranja relativno velike mase uzorka (2 – 30 g). Također, metoda je dosta brza i jednostavna, ali se njome postiže niža djelotvornost ekstrakcije nego nekim drugim metodama, stoga ponekad treba pristupiti višestrukoj ekstrakciji. Iznimno je važno nakon završene ekstrakcije ekstrakte filtrirati, a često ih prije analize treba upariti i pročistiti [2].

Ultrazvučna ekstrakcija često se provodi u ultrazvučnim kupeljima (Slika 2.3.) jer su relativno jeftine i lako dostupne. Elementi pretvornika obično su smješteni na dnu spremnika, a glavna ultrazvučnih kupelji radi na frekvenciji od 20 – 40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području. Postoje mnoge izvedbe ultrazvučnih kupelji što omogućuje velik broj parametara koji se mogu proučavati. Standardne ultrazvučne kupelji rade pri nižem intenzitetu kako bi se izbjeglo oštećenje stijenki spremnika uzrokovano kavitacijom, a i pri manjim snagama jer su volumeni tretirane tekućine u spremniku najčešće veliki [30].



Slika 2.3. Ultrazvučna kupelj [30]

3) Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima [2]

Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima⁶ pripada novijim metodama ekstrakcije koje omogućuju određivanje organskih sastojaka u uzorcima vode, tla i sedimenta. Njene glavne prednosti su: a) što je dotok svježega fluida kontinuiran čime se omogućuje kvantitativnost ekstrakcije; b) što se promjenom tlaka i temperature može utjecati na jakost otapala što je korisno za ekstrakciju složenih uzoraka; c) što superkritični fluidi imaju više difuzijske koeficijente i nižu viskoznost od tekućih otapala što rezultira boljom topljivošću analita te brzom kinetikom reakcije. Dodatne su prednosti i smanjenje volumena opasnih otapala, kraće trajanje ekstrakcije, manja masa uzorka te mogućnost povezivanja s tekućinskim i plinskim kromatografom.

4) Mikrovalna ekstrakcija [2]

Mikrovalna ekstrakcija⁷ pripada metodi ekstrakcije u kojoj se mikrovalnom energijom zagrijava otapalo i uzorak što pospješuje prijelaz ispitivanih spojeva iz uzorka u otapalo. Ekstrakcija se automatski kontrolira osjetilima za temperaturu i tlak. Temperatura ekstrakcije je od 50 do 150 °C, a tlakovi se kreću između 1 i 5 MPa. Smatra se brzom metodom (10 – 20 min) koja troši relativno malo otapala (10 – 30 mL), a u istom se vremenu može ekstrahirati više uzoraka odjednom. Njena djelotvornost je relativno visoka te raste s vremenom i temperaturom. Glavni nedostatak ove metode očituje se u nemogućnosti uporabe otapala koja nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima, što ovisi o dielektričnosti otapala.

2.3.2. Kromatografske metode analize

Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga pokretna. Začetnik kromatografije je Mihail Semjonovič Cvet koji ujedno daje sadašnji naziv toj tehnici. Martin i Synge prvi su objasnili pojam razdjelne kromatografije, Martin i James uveli su plinsku kromatografiju, a Stahl je uveo tankoslojnu kromatografiju. Kromatografija se smatra jednom od najvažnijih analitičkih tehnika zbog svoje široke primjenjivosti i učinkovitosti. Upravo iz tog razloga se njena načela primjenjuju u forenzičkoj analizi, praćenju reaktanata i produkata organske sinteze, znanstvenim istraživanjima i rutinskim analizama uzoraka iz okoliša itd. [2]

⁶ engl. supercritical fluid extraction, SFE

⁷ engl. microwave assisted extraction, MAE

Kromatografski sustav čine dvije faze, nepokretna i pokretna, te ispitivani spoj koji se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih faza. Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na nekoliko načina. Prvi od njih je podjela s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze. Prema tome razlikujemo:

- adsorpcijsku kromatografiju u kojoj se ravnoteža uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa
- afinitetnu kromatografiju u kojoj se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom
- razdjelnu kromatografiju, kada se ravnoteža uspostavlja između dviju kapljevina, što znači da je i nepokretna faza kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač
- kromatografiju isključenjem u kojoj je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom; razdvajanje molekula događa se zbog razlike u molekularnoj masi i volumenu.

Drugi način podjele kromatografskih tehnika je na temelju sastava pokretne faze pa razlikujemo:

- tekućinsku kromatografiju u kojoj je pokretna faza kapljevina male viskoznosti
- plinsku kromatografiju u kojoj je pokretna faza inertni plin
- fluidnu kromatografiju u superkritičnim uvjetima u kojoj je pokretna faza tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka.

U kromatogramu odnosno zapisku koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka nakon završenog procesa razdvajanja, sadržana je informacija o uspješnosti separacije [31].

2.3.2.1. Parametri kromatografskog razdvajanja [31]

Parametri kromatografskog razdvajanja su protok kroz porozni medij, zadržavanje i širenje kromatografske zone.

A. Protok kroz porozni medij

Pokretna faza kroz sloj nepokretne faze u stupcu protječe pomoću njezinih međuprostora. Eksperimentalno određena prosječna brzina pokretne faze jednaka je omjeru duljine stupca L i zadržanog vremena nezadržane otopljene tvari t_m . Budući da je u kromatografskim uvjetima profil brzine laminaran, vrijedi Darcyjev zakon:

$$v(x) = \left(-\frac{K}{\eta}\right) \frac{dP}{dx}$$

pri čemu je $v(x)$ brzina pokretne faze u točki x , K propusnost stupca, η viskoznost pokretne faze.

B. Zadržavanje

Tijekom prolaza kroz stupac molekule uzorka provode dio vremena u pokretnoj, a dio u nepokretnoj fazi. Sve molekule ostaju jednako dugo u pokretnoj fazi. To je tzv. zadržano vrijeme t_m koje je jednako vremenu koje prođe od trenutka injektiranja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka njezine detekcije. Vrijedi:

$$t_R = t_m + t_{R''}$$

pri čemu je t_R vrijeme zadržavanja otopljene tvari odnosno vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu tvar, a $t_{R''}$ prilagođeno vrijeme zadržavanja odnosno vrijeme koje otopljena tvar provede vezana uz nepokretnu fazu.

C. Širenje kromatografske zone

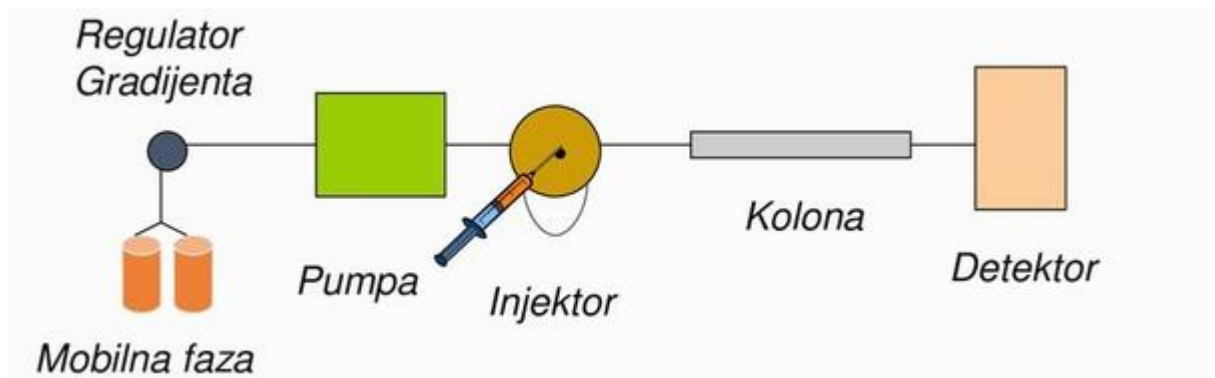
Kako uzorak prolazi kroz kromatografski stupac, proporcionalno duljini putovanja ili vremenu širi se kromatografska zona. Širenje površine zone ukazuje na učinkovitost kromatografske separacije koja se označuje ili kao broj teoretskih tavana (odsječaka) n ili kao visina tavana (odsječaka) H . Ukoliko se pretpostavi da se koncentracija ispitivane tvari raspoređuje po Gausovoj razdiobi, broj teoretskih odsječaka može izravno ovisiti o varijanciji i vremenu zadržavanja prema izrazu:

$$n = \left(\frac{t_R}{\sigma_t}\right)^2$$

pri čemu je σ_t^2 varijancija zone u jedinici vremena. Postoje brojni uzroci širenja kromatografske zone, a neki od njih su: otpor prijenosu mase u obje faze, brzina protoka kroz nepokretnu fazu, uzdužna difuzija te nasumična sorpcija i desorpcija tijekom kromatografskog procesa.

2.3.2.2. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti⁸ je jedna od najčešće upotrebljivanih i najučinkovitijih metoda koja ima sposobnost da analizira te odijeli i/ili očisti gotovo svaki uzorak. Njome se može odijeliti jako veliki broj farmaceutika. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (Slika 2.4.) vezana s detektorom s nizom dioda, UV detektorom ili spektrometrom masa pokazala se kao važna analitička metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj analiza farmaceutika. Prednosti HPLC metode su višekratna upotreba kolona, automatsko unošenje uzorka, skraćeno trajanje analize te detekcija i kvantifikacija koje se mogu postići upotrebom kontinuiranih protočnih detektora. Zbog primjene visoko osjetljivih detektora dovoljne su nanogramske količine uzorka, a omogućeno je visoko razlučivanje sastojaka smjese. Ove prednosti omogućuju točnost i preciznost rezultata analize [32].



Slika 2.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti [34]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima brojne primjene, a neke od njih su analize onečišćenja, analize hlapljivih i nehlapljivih spojeva, odjeljivanje velikog broja organskih, anorganskih i bioloških spojeva, određivanje iona, neutralnih molekula i dipolarnih iona itd. Također, koristi se i za određivanje sadržaja ljekovitih supstancu, određivanje

⁸ engl. high performance liquid chromatography, HPLC

sadržaja sintetskih međuprodukata i razgradnih produkata u dozirnim oblicima, praćenje sintetskih reakcija i u kontroli kvalitete [33].

2.3.3. Validacija [31]

Cilj svake analize je dati pouzdanu informaciju o sastavu i prirodi materijala. Mjerne nesigurnosti prisutne su u svakom mjerenju tako da je namjena programa osiguravanja kvalitete svesti pogreške na minimum. To se postiže validacijom, ali uz prethodnu optimizaciju mjernog postupka. Validacija je postupak kojim se određuje i dokumentira prikladnost analitičkog sustava za određenu namjenu. Mora se temeljiti na objektivnim kriterijima kako bi se izbjegla pogreška uzrokovana subjektivnom pristranošću. Svrha validacije uzorka je prihvatiti pojedini uzorak kao dio populacije, minimizirati dvojbu o autentičnosti uzorka, pružiti mogućnost ponovnog uzorkovanja te pripremiti uzorke za mjerni proces. Koji će se postupci upotrijebiti pri validaciji ovisi o namjeravanoj uporabi metode.

Kako bi se neka metoda mogla validirati, treba odrediti njene izvedbene značajke. To su: preciznost, linearnost, točnost, učinak matice, granica kvantificiranja, granica dokazivanja, stabilnost analita i standardnih otopina, selektivnost i specifičnost, otpornost metode, radno područje, osjetljivost metode i iskoristivost.

Preciznost

Preciznost uključuje dva pojma: 1) ponovljivost rezultata dobivenih istom metodom, istim uzorkom i u istim uvjetima; 2) obnovljivost ukoliko je riječ o istoj metodi i uzorku, ali su promijenjeni uvjeti izvedbe.

Linearnost

Linearnost se definira kao mogućnost da se metodom unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita.

Točnost

Točnost je definirana kao razlika mjerene i prave vrijednosti uzrokovana uglavnom sustavnom pogreškom.

Granica kvantificiranja

Granica kvantificiranja je najmanja moguća koncentracija analita koja se može odrediti uz dopuštenu pogrešku.

Granica dokazivanja

Granica dokazivanja je najmanja moguća koncentracija analita koja se može detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti.

Stabilnost analita i standardnih otopina

Stabilnost analita i standardnih otopina je sposobnost dobivanja istih mjernih rezultata tijekom duljega vremenskog razdoblja.

Selektivnost i specifičnost

Selektivnost se definira kao sposobnost određivanja skupine sličnih sastojaka uzorka, a specifičnost kao mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka uzorka.

Radno područje

Radno područje je interval unutar kojega analitički postupak ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost, a obično pokriva između 80 i 120 % ispitivane koncentracije analita.

Osjetljivost metode

Osjetljivost metode je svojstvo metode da razlikuje male količine analita, a karakterizira je nagib kalibracijskog pravca.

Iskoristivost

Iskoristivost je svojstvo metode da odredi ukupnu količinu analita.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U eksperimentalnom dijelu rada koristile su se sljedeće kemikalije:

Tablica 3.1. Kemikalije korištene u eksperimentalnom dijelu rada

Naziv	Formula	Čistoća	Proizvođač
Aceton	C ₃ H ₆ O	<i>p.a.</i>	Gram-mol
Acetonitril	CH ₃ CN	HPLC Grade	Fisher Chemical
Dietileter	(C ₂ H ₅) ₂ O	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich
Diklormetan	CH ₂ Cl ₂	<i>p.a.</i>	Carlo Erba reagents
Etanol	C ₂ H ₅ OH	<i>p.a.</i>	Carlo Erba reagents
Etil-acetat	C ₄ H ₈ O ₂	<i>p.a.</i>	Kemika
Heksan	C ₆ H ₁₄	<i>p.a.</i>	Carlo Erba reagents
Metanol	CH ₃ OH	HPLC Grade	J.T.Baker
1-propanol	C ₂ H ₇ OH	<i>p.a.</i>	Kemika
2-propanol	C ₂ H ₇ OH	<i>p.a.</i>	Gram-mol

3.1.2. Izvorska voda

Ekstrakcija farmaceutika iz vode provodila se pomoću pitke izvorske vode s izvora Kraljičin zdenac, Zagreb, Hrvatska.

3.1.3. Sorbens

Za ekstrakciju miješalom korišteno je miješalo duljine 20 mm, debljine sloja 1 mm obloženo sa 126 µL organske faze PDMS-a (Twister, Gerstel, Njemačka).

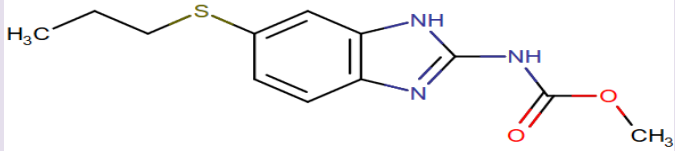
3.1.4. Sediment

Optimizacija postupka ekstrakcije farmaceutika napravljena je na uzorku sedimenta rijeke Petrinjčice koja se nalazi u Sisačko-moslavačkoj županiji, Republika Hrvatska.

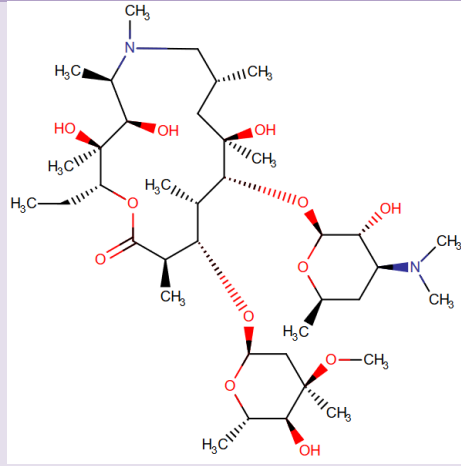
3.1.5. Farmaceutski aktivne tvari

U Tablicama 3.2. – 3.14. navedena su fizikalno-kemijska svojstva 13 farmaceutski aktivnih tvari koje su korištene u eksperimentalnom dijelu rada.

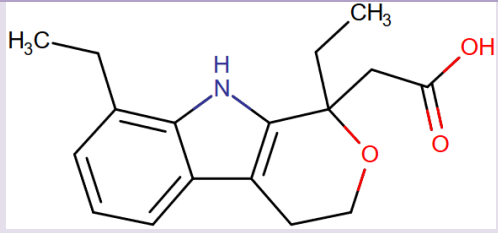
Tablica 3.2. Fizikalno-kemijska svojstva albendazola [10]

Ime	Albendazol
IUPAC naziv	metil <i>N</i> -[6-(propilsulfanil)-1 <i>H</i> -1,3-benzodiazol- <i>il</i>]karbamat
CAS broj	54965-21-8
Empirijska formula	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S
Molarna masa	265,33 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antihelmintik
Talište	208 – 210 °C
Topljivost u vodi	0,023 mg/mL
p <i>K</i> _k	10,26
log <i>K</i> _{ov}	2,7

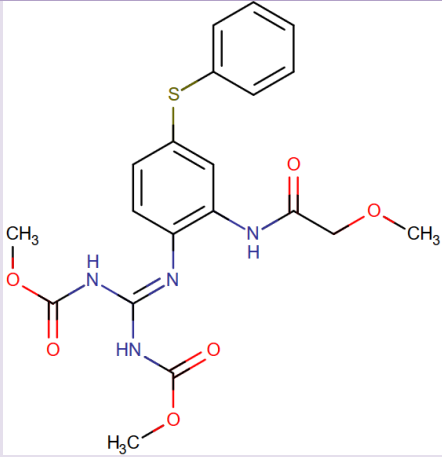
Tablica 3.3. Fizikalno-kemijska svojstva azitromicina [10]

Ime	Azitromicin
IUPAC naziv	(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11-[[[(2S,3R,4S,6R)4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi}-2-etil-3,4,10-trihidroksi-13-[[[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroksi-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi}-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-1-oksa-6-azaciklopentadekan-15-on
CAS broj	83905-01-5
Empirijska formula	C ₃₈ H ₇₂ N ₂ O ₁₂
Molarna masa	748,98 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antibiotik
Talište	126 °C
Topljivost u vodi	0,514 mg/mL
pK _k	8,5
log K _{ov}	3,03

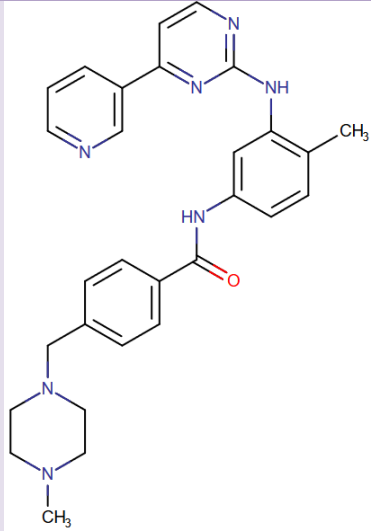
Tablica 3.4. Fizikalno-kemijska svojstva etodolaka [10]

Ime	Etodolak
IUPAC naziv	2-{1,8-dietil-1H,3H,4H,9H-pirano[3,4-b]indol-1-il}octena kiselina
CAS broj	41340-25-4
Empirijska formula	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃
Molarna masa	287,35 g/mol
Strukturna formula	 The chemical structure of Etodolac is shown. It consists of a benzene ring fused to a five-membered pyrrole ring, which is further fused to a six-membered piperidine ring. A methyl group (H ₃ C) is attached to the benzene ring. The piperidine ring has a methyl group (CH ₃) and a propionic acid chain (-CH ₂ -CH ₂ -COOH) attached to it. The nitrogen atom in the pyrrole ring is highlighted in blue, and the oxygen atom in the piperidine ring is highlighted in red.
Klasa	nesteroidni protuupalni lijek
Talište	146,5 °C
Topljivost u vodi	0,0392 mg/mL
pK _k	4,65
log K _{ov}	2,5

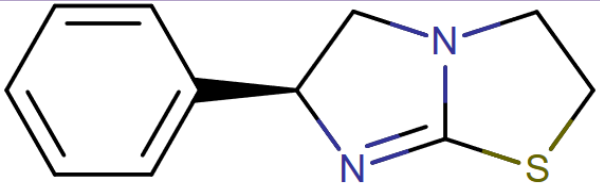
Tablica 3.5. Fizikalno-kemijska svojstva febantela [10, 35]

Ime	Febantel
IUPAC naziv	dimetil[[2-(2-dimetiloksiacetamido)-4-(feniltio)fenil]imidokarbonil]dikarbamat
CAS broj	58306-30-2
Empirijska formula	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S
Molarna masa	446,48 g/mol
Strukturna formula	 The chemical structure of Febantel is shown. It features a central benzimidazole ring system. One nitrogen of the benzimidazole is substituted with a methyl ester group (-NHCOOCH ₃). The other nitrogen is substituted with a 4-(phenylthio)phenyl group (-NH-C ₆ H ₄ -S-C ₆ H ₅). The 2-position of the benzimidazole ring is substituted with a methyl ester group (-NHCOOCH ₃).
Klasa	antihelmintik
Talište	129,5 °C
Topljivost u vodi	0,0052 mg/mL
pK _k	3,8
log K _{ov}	2,73

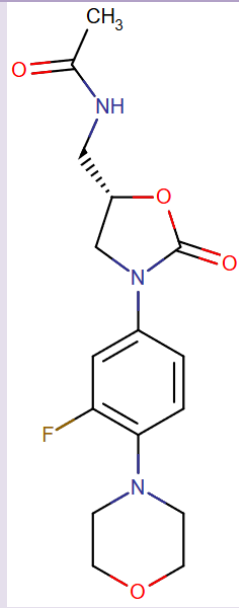
Tablica 3.6. Fizikalno-kemijska svojstva imatiniba [10]

Ime	Imatinib
IUPAC naziv	4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]-N-[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamid
CAS broj	152459-95-5
Empirijska formula	C ₂₉ H ₃₁ N ₇ O
Molarna masa	493,60 g/mol
Strukturna formula	 The chemical structure of Imatinib is shown. It consists of a central pyrimidopyrimidin ring system. One nitrogen atom in this system is bonded to a 4-pyridin-3-yl group. Another nitrogen atom is bonded to a 4-methylphenyl group. The third nitrogen atom is bonded to a 4-[(4-methylpiperazin-1-yl)methyl]benzamide group. The piperazine ring has a methyl group attached to one of its nitrogen atoms.
Klasa	citostatik
Talište	226 °C
Topljivost u vodi	0,0146 mg/mL
p <i>K</i> _k	8,27
log <i>K</i> _{ov}	3

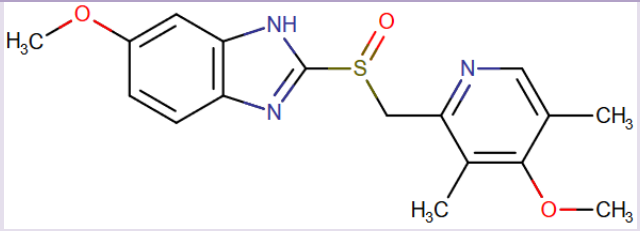
Tablica 3.7. Fizikalno-kemijska svojstva levamisola [10]

Ime	Levamisol
IUPAC naziv	(6S)-6-fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol
CAS broj	14769-73-4
Empirijska formula	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S
Molarna masa	204,29 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antihelmintik
Talište	227 – 227,5 °C
Topljivost u vodi	210 mg/mL
pK _k	6,98
log K _{ov}	1,84

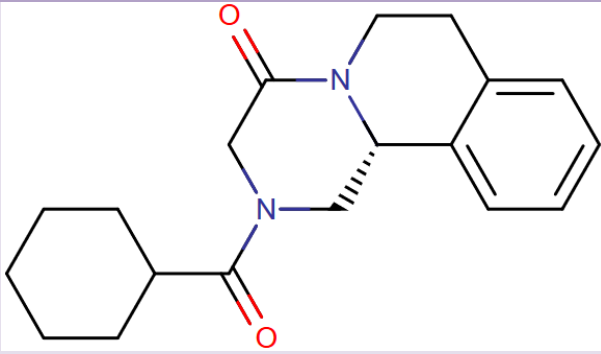
Tablica 3.8. Fizikalno-kemijska svojstva linezolida [10]

Ime	Linezolid
IUPAC naziv	N-{[(5S)-3-(3-fluor-4-morfolin-4-ilfenil)-2-okso-1,3-oksazolidin-5-il]metil}acetamid
CAS broj	165800-03-3
Empirijska formula	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₄
Molarna masa	337,35 g/mol
Strukturna formula	 The image shows the chemical structure of Linezolid. It consists of a morpholine ring connected to a 4-fluorophenyl ring, which is further connected to the nitrogen atom of a 2-oxo-1,3-oxazolidin-5-yl ring. This oxazolidinone ring is attached to the nitrogen atom of an acetamido group (-NH-C(=O)-CH ₃).
Klasa	antibiotik
Talište	182 °C
Topljivost u vodi	3 mg/mL
pK _k	1,8
log K _{ov}	0,9

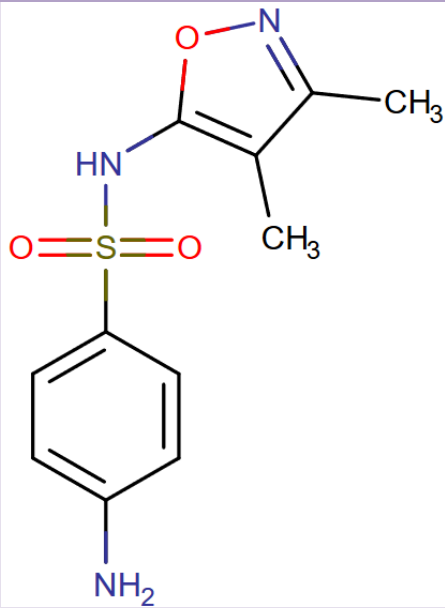
Tablica 3.9. Fizikalno-kemijska svojstva omeprazola [10]

Ime	Omeprazol
IUPAC naziv	6-metoksi-2-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metansulfinil]-1H-1,3-benzodiazol
CAS broj	73590-58-6
Empirijska formula	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S
Molarna masa	345,42 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	inhibitor protonske pumpe
Talište	155 °C
Topljivost u vodi	0,359 mg/mL
pK _k	4,77
log K _{ov}	2,23

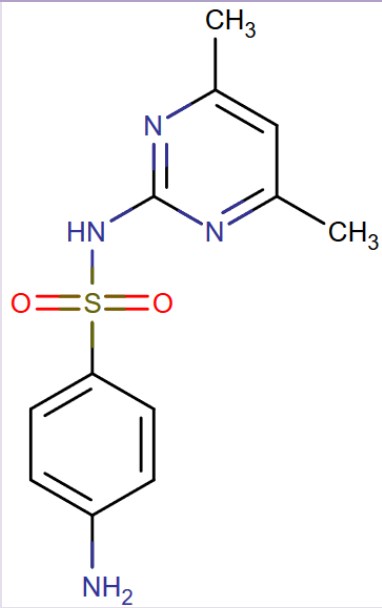
Tablica 3.10. Fizikalno-kemijska svojstva prazikvantela [10, 36]

Ime	Prazikvantel
IUPAC naziv	2-cikloheksil-karbonil-1H,2H,3H,4H,6H,7H,11bH-piperazino[2,1-a]izokinolin-4-on
CAS broj	57452-98-9
Empirijska formula	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂
Molarna masa	312,41 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antihelmintik
Talište	136 – 138 °C
Topljivost u vodi	0,381 mg/mL
pK _k	19,38
log K _{ov}	2,42

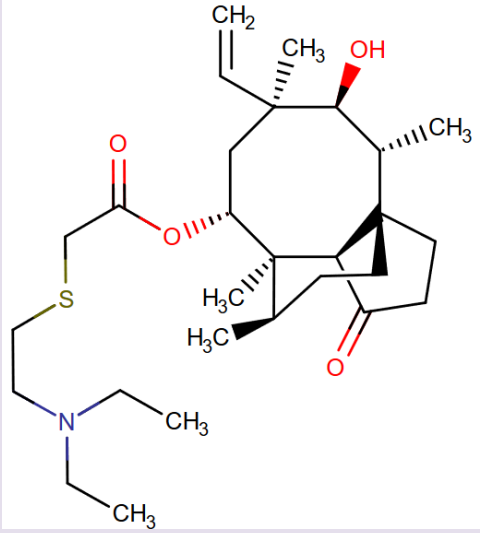
Tablica 3.11. Fizikalno-kemijska svojstva sulfafurazola [10]

Ime	Sulfafurazol
IUPAC naziv	4-amino- <i>N</i> -(dimetil-1,2-oksazol-5-il)benzen-1-sulfonamid
CAS broj	127-69-5
Empirijska formula	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
Molarna masa	267,30 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antibiotik
Talište	191 °C
Topljivost u vodi	300 mg/L
pK _k	5
log K _{ov}	1,01

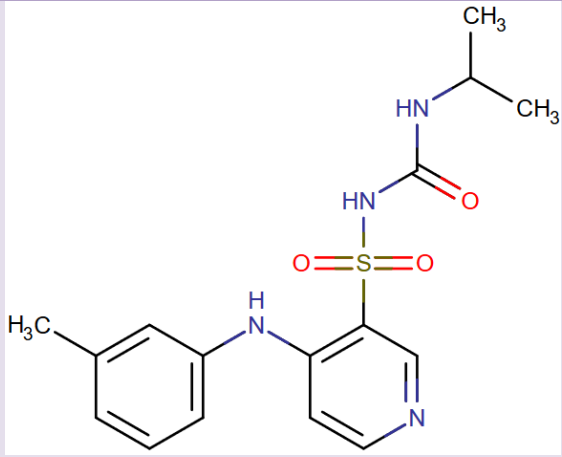
Tablica 3.12. Fizikalno-kemijska svojstva sulfametazina [10]

Ime	Sulfametazin
IUPAC naziv	4-amino- <i>N</i> -(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzen-1-sulfonamid
CAS broj	57-68-1
Empirijska formula	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S
Molarna masa	278,33 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antibiotik
Talište	198,5 °C
Topljivost u vodi	0,23 mg/mL
p <i>K</i> _k	7,59
log <i>K</i> _{ov}	0,89

Tablica 3.13. Fizikalno-kemijska svojstva tiamulina [10,37]

Ime	Tiamulin
IUPAC naziv	(4R,5S,6S,8R,9aR,10R)-5-hidroksi-4,6,9,10-tetrametil-1-okso-6-vinildekahidro-3a,9-propanociklopenta[8]anulen-8-il { [2(dietilamino)etil]sulfanil } acetat
CAS broj	55297-95-5
Empirijska formula	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S
Molarna masa	493,74 g/mol
Strukturna formula	
Klasa	antibiotik
Talište	147,5 °C
Topljivost u vodi	0,000524 mg/mL
p <i>K</i> _k	9,51
log <i>K</i> _{ov}	4,47

Tablica 3.14. Fizikalno-kemijska svojstva torasemida [10]

Ime	Torasemid
IUPAC naziv	1-({4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il} sulfonil)-3-(propan-2-il)urea
CAS broj	56211-40-6
Empirijska formula	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S
Molarna masa	348,42 g/mol
Strukturna formula	 <p>The chemical structure of Torasemid is shown. It consists of a central pyridine ring. At the 3-position of the pyridine ring, there is a sulfonamide group (-NH-C(=O)-NH-). This sulfonamide group is further substituted with a 3-methylphenyl group (-NH-C₆H₄-CH₃) at the 4-position and a 2-propanoyl group (-NH-C(=O)-CH(CH₃)₂) at the 1-position. The pyridine ring has a nitrogen atom at the bottom position.</p>
Klasa	diuretik
Talište	163 – 164 °C
Topljivost u vodi	0,0596 mg/mL
pK _k	7,1
log K _{ov}	3,356

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga [38]

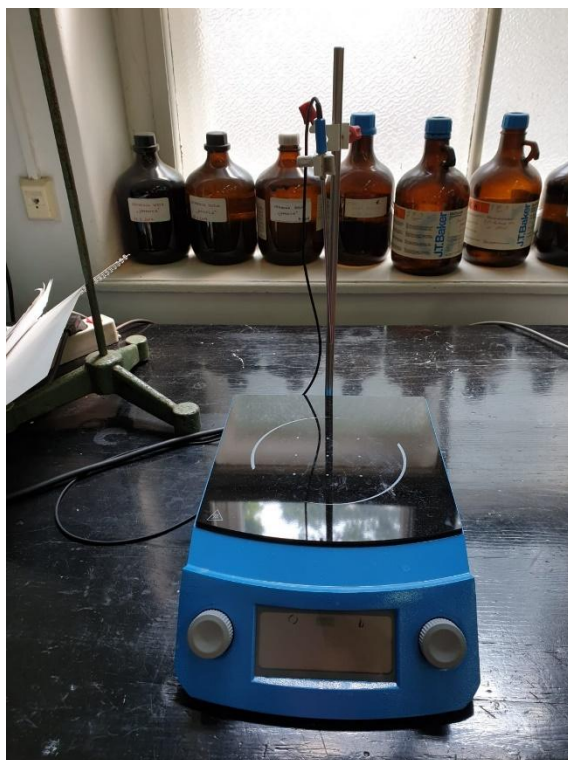
Analitička vaga je instrument za precizno određivanje mase tvari. Jako je skup i vrlo osjetljiv. Kao instrument je važan upravo zato što o njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata analize. Korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105DU (Slika 3.1.). Mogućnost očitavanja je 0,01 g, a maksimalan kapacitet 120 g.



Slika 3.1. Analitička vaga [39]

3.2.2. Miješalica

Ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz vode provodila se na miješalici koja ima mogućnost podešavanja temperature ekstrakcije i broja okretaja. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 200 °C, a maksimalan broj okretaja 1100. Korištena je miješalica SCHOTT instruments GmbH (Slika 3.2.).



Slika 3.2. Miješalica

3.2.3. Ultrazvučna kupelj

Ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz sedimenta provodila se u ultrazvučnoj kupelji koja ima mogućnost podešavanja vremena trajanja ekstrakcije, temperature kupelji te snage ultrazvuka. Maksimalno vrijeme koje je moguće podesiti iznosi 1 – 99 minuta, maksimalna temperatura 80 °C, a maksimalna snaga 1200 W. Korištena je ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin (Slika 3.3.).



Slika 3.3. Ultrazvučna kupelj

3.2.4. pH-metar [40]

pH-metar je uređaj za potenciometrijsko određivanje pH-vrijednosti. Sastoji se od staklene elektrode koja se uranja u čašicu. Nakon stabilizacije, na ekranu uređaja može se očitati izmjerena pH-vrijednost. Korišten je pH-metar Mettler Toledo (Slika 3.4.).



Slika 3.4. pH metar

3.2.5. Rotacijski uparivač [41]

Nakon provedenih ekstrakcija iz vode i sedimenta, uzorci su se uparavali na rotacijskom uparivaču koji ima mogućnost podešavanja temperature kupelji i brzine rotacije tikvice. Osim jedinice za rotaciju tikvice, uređaj se sastoji i od vodene kupelji, povratnog hladila, vakuum sisaljke te tikvice za prikupljanje kondenzata. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 100 °C. Korišten je Rotavapor R-114, Büchi (Slika 3.5.).



Slika 3.5. Rotacijski uparivač

3.2.6. Tekućinski kromatograf ultra visoke djelotvornosti (UHPLC)

Analiza uzoraka provedena je na UHPLC Agilent Series 1290 uređaju koji se sastoji od vakuumnog degazera, automatskog dodavača uzorka, termostata te binarne pumpe. Korištena je WATERS Acquity CSH C18 kolona. Dimenzije kolone su 100 x 2,1 mm, a promjer čestica unutar kolone je 1,7 μm .

UHPLC uređaj spojen je na spektrometar masa Agilent 6490 Triple Quad MS (Slika 3.6.). Ionizacija uzorka je elektroraspršenjem u pozitivnom modu.



Slika 3.6. UHPLC Agilent Series 1290

3.3. Opis rada

3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Temeljna standardna otopina smjese 13 farmaceutika koncentracije 100 mg/L u metanolu dobivena je otapanjem točno određene mase farmaceutika (1,00 mg svakog pojedinačno) u točno određenom volumenu metanola (10 mL). Iz temeljne standardne otopine zatim su pripremljene potrebne standardne otopine farmaceutika.

3.3.2. Kondicioniranje

Prije samog početka ekstrakcije farmaceutika miješalom iz vode, potrebno je provesti kondicioniranje „Twister“ miješala. Otopina koja se koristi za kondicioniranje je $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{CH}_3\text{OH}=1:1$. „Twister“ miješalo se kondicionira na način da se stavi u tikvicu u kojoj se nalazi 5 mL otopine za kondicioniranje. Postupak se provodi tijekom 10 minuta i ponovi se 2 puta. Nakon toga, „Twister“ miješalo se izvadi iz smjese otapala, obriše u suhi papirnati ručnik i suši u eksikatoru.

3.3.3. Ekstrakcija miješalom

Ekstrakcija farmaceutika iz vode provodila se u rasponu pH vrijednosti od 3,0 – 7,0. Te vrijednosti su korištene kako bi se odabrala optimalna vrijednost koja je najidealnija za korištene farmaceutike. Namještanje pH vrijednosti provodi se pomoću 0,1 M otopine klorovodične kiseline, HCl. Nakon podešavanja pH vrijednosti uzorka vode, u Erlenmeyerovu tikvicu odpipetira se 50 mL i doda 1 mL standardne otopine farmaceutika koncentracije 1 mg/L. Miješanje se provodi 120 minuta kod 600 o/min i 30 °C. Po završetku ekstrakcije ukloni se miješalo te se obriše suhim papirnatim rupčićem kako bi se uklonile kapljice vode. Suho „Twister“ miješalo se zatim stavi u 5 mL otapala za desorpciju (metanola). Desorpcija se provodi pri istoj temperaturi, jednakom vremenu, ali kod 300 o/min. Po završetku desorpcije, otapalo se prebaci u tikvicu okruglog dna te uparava do suha na vodenoj kupelji pri 40 °C. Suhi ostatak otopi se u 1 mL metanola i analizira na UHPLC-MS/MS.

3.3.4. Priprema špikanog sedimenta

Prije samog početka ultrazvučne ekstrakcije, sediment Petrinjčice usitni se u tarioniku i prosije kroz sito. Zatim se izvaže 2 g prosijanog sedimenta te doda 2 mL standardne otopine farmaceutika koncentracije 1 mg/L. Dobivena smjesa ostavi se stajati na zraku kako bi metanol ishlapio.

3.3.5. Ultrazvučna ekstrakcija

Kako bi se ultrazvučna ekstrakcija mogla provesti, izvaganom sedimentu (50 mg) doda se 10 mL otapala i ostavi da stoji u kontaktu s uzorkom 15 minuta. Korištena su sljedeća čista otapala: metanol; etanol; acetonitril; aceton; 1-propanol; 2-propanol; voda; etil-acetat; heksan; diklormetan i dietileter. Također, korištene su i različite kombinacije otapala s ciljem pronalaska optimalnog koje će biti najidealnije za ispitivanu smjesu farmaceutika. Nakon 15 minuta smjesa se stavi na ultrazvučnu kupelj i podesi na sljedeće uvjete: snaga 600 W; temperatura 25 °C i vrijeme ekstrakcije 15 minuta. Po završetku ekstrakcije, otapalo se odekantira i prebaci u tikvicu okruglog dna te uparava do suha na vodenoj kupelji pri 40 °C. Suhi ostatak otopi se u 1 mL metanola i analizira na UHPLC-MS/MS.

3.3.6. Analiza uzorka pomoću tekućinskog kromatografa ultra visoke djelotvornosti (UHPLC) [42]

Standardne otopine farmaceutika i dobiveni ekstrakti analizirani su pomoću UHPLC-a vezanog na spektrometar masa kao detektora. Ionizacija uzorka je elektroraspršenjem u pozitivnom modu. Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlje kiseline u vodi (A) i 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 3.15.

Tablica 3.15. Gradijent pokretne faze korišten za separaciju UHPLC-om

Vrijeme, min	Udio otapala A/B u pokretnoj fazi, %
0	90/10
9	30/70

Prije samog početka analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Nakon stabilizacije tlaka u kolonu je injektirano 5 μL uzorka. Prije svakog injektiranja uzorka, kolonu je potrebno uravnotežiti. Protok tijekom analize iznosio je 0,35 mL/min, a temperatura kolone 35 °C. Uvjeti izvora iona spektrometra masa pri kojima su provedene analize prikazani su u Tablici 3.16.

Tablica 3.16. Uvjeti izvora iona spektrometra masa

Temperatura plina	250 °C
Tlak raspršivača plina	20 psi
Protok plina	15 mL/min
Napon kapilare	4500 V

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa Mass Hunter. Farmaceutici su identificirani na temelju spektara masa i vremena zadržavanja (Tablica 3.17.).

Kvantitativna analiza provodila se integriranjem kromatograma, tj. očitavanjem površina ispod kromatografskih krivulja koje odgovaraju ispitivanim farmaceuticima. Nakon očitavanja, uspoređivale su se vrijednosti površina standardnih otopina i uzoraka te se odredila učinkovitost ekstrakcije za svaki pojedini analit.

Tablica 3.17. Uvjeti LC-ESI-MS/MS za analizu odabranih farmaceutika

Farmaceutik	Vrijeme zadržavanja, min	Ciljni ion (<i>m/z</i>)	Potvrđni ion (<i>m/z</i>)	Energija sudara (eV)
Albendazol	5,7	266	234	25
Azitromicin	4,3	750	591	10
Etodolak	8,2	288	172	10
Febantel	8,6	447	415	10
Imatinib	3,4	494	394	25
Levamisol	0,8	205	178	25
Linezolid	3,9	338	296	25
Omeprazol	3,6	346	198	10
Prazikvantel	7,3	313	203	10
Sulfafurazol	4,4	268	156	20
Sulfametazin	1,7	279	186	10
Tiamulin	6,7	494	192	25
Torasemid	5,2	394	264	10

4. REZULTATI I RASPRAVA

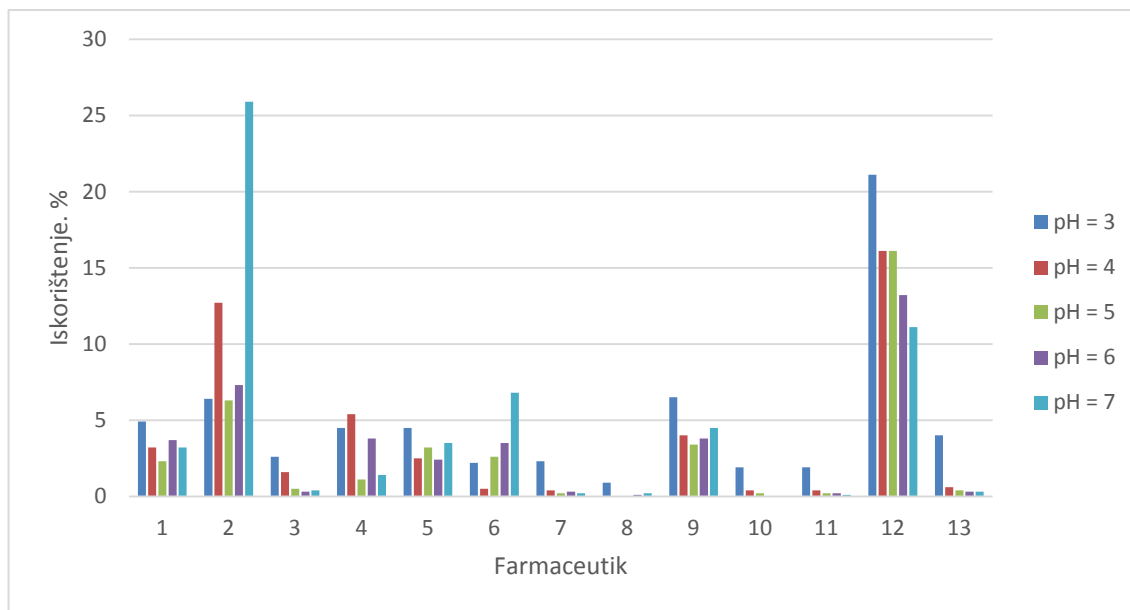
4.1. Ekstrakcija farmaceutika iz vode

Prvi i najbitniji korak u razvoju metode je priprema uzorka. O kvalitetnoj pripremi uzorka kasnije uvelike ovisi i točnost rezultata analize. Budući da se eksperiment provodio na 13 farmaceutika koji se po svojim svojstvima veoma razlikuju, nije jednostavno provesti optimizaciju metode te pronaći optimalne uvjete za njihovu ekstrakciju.

Kako bi se pronašli optimalni uvjeti za ekstrakciju miješalom provedeno je nekoliko setova eksperimenata. U svakom setu eksperimenata ispitivala se određena stvar i na temelju dobivenih rezultata odlučivalo se o idućem koraku. Prvi korak kod ekstrakcije miješalom bio je ispitivanje djelotvornosti ekstrakcije za 5 različitih pH vrijednosti budući da je poznato da pH vrijednost vode znatno utječe na djelotvornost. Korištene pH vrijednosti bile su: 3,0, 4,0, 5,0, 6,0 i 7,0. Ekstrakcija miješalom provodila se kod 30 °C pri brzini okretaja od 600 o/min. Vrijeme provođenja ekstrakcije bilo je 120 minuta nakon čega je uslijedila desorpcija koja se također provodila 120 minuta pri 30 °C i 300 o/min. Volumen otapala (metanola) koji se koristio tijekom desorpcije iznosio je 5 mL. Dobivena iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika prikazana su u Tablici 4.1. i na Slici 4.1.

Tablica 4.1. Dobivena iskorištenja farmaceutika za navedene pH vrijednosti

	Iskorištenje \pm RSO, %				
	pH = 3,0	pH = 4,0	pH = 5,0	pH = 6,0	pH = 7,0
Albendazol	4,9 \pm 5,8	3,2 \pm 0,2	2,3 \pm 2,1	3,7 \pm 12,5	3,2 \pm 9,4
Azitromicin	6,4 \pm 4,1	12,7 \pm 0,5	6,3 \pm 22,4	7,3 \pm 35,6	25,9 \pm 25,2
Etodolak	2,6 \pm 25,1	1,6 \pm 8,5	0,5 \pm 21,2	0,3 \pm 34,8	0,4 \pm 8,6
Febantel	4,5 \pm 13,3	5,4 \pm 30,5	1,1 \pm 18,7	3,8 \pm 44,6	1,4 \pm 11,6
Imatinib	4,5 \pm 11,5	2,5 \pm 13,5	3,2 \pm 38,0	2,4 \pm 14,8	3,5 \pm 5,1
Levamisol	2,2 \pm 46,3	0,5 \pm 23,2	2,6 \pm 14,6	3,5 \pm 19,0	6,8 \pm 6,7
Linezolid	2,3 \pm 54,1	0,4 \pm 32,5	0,2 \pm 15,7	0,3 \pm 7,3	0,2 \pm 11,2
Omeprazol	0,9 \pm 16,8	0,0 \pm 46,3	0,0 \pm 13,1	0,1 \pm 6,5	0,2 \pm 1,7
Prazikvantel	6,5 \pm 15,4	4,0 \pm 16,2	3,4 \pm 11,4	3,8 \pm 6,4	4,5 \pm 14,3
Sulfafurazol	1,9 \pm 61,5	0,4 \pm 13,7	0,2 \pm 9,4	-	-
Sulfametazin	1,9 \pm 41,0	0,4 \pm 15,2	0,2 \pm 8,6	0,2 \pm 24,7	0,1 \pm 14,9
Tiamulin	21,1 \pm 5,8	16,1 \pm 7,2	16,1 \pm 7,2	13,2 \pm 5,5	11,1 \pm 1,3
Torasemid	4,0 \pm 0,8	0,6 \pm 16,7	0,4 \pm 10,1	0,3 \pm 22,1	0,3 \pm 10,1



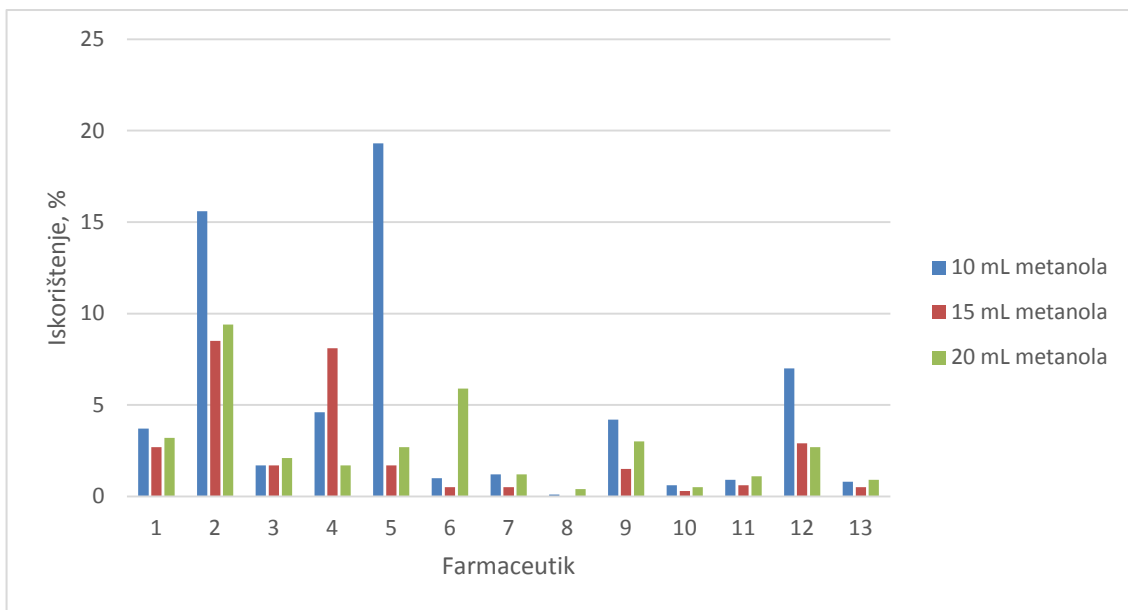
Slika 4.1. Iskorištenja farmaceutika primjenom različitih pH vrijednosti

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su najbolja iskorištenja za većinu ispitivanih farmaceutika dobivena kod pH vrijednosti 3,0. Isto tako, može se uočiti da tiamulin pokazuje najveće, a omeprazol najmanje iskorištenje. Upravo zbog toga što su najbolja iskorištenja dobivena za pH vrijednost 3,0, sljedeći su eksperimenti provedeni kod te pH vrijednosti, ali uz promjenu volumena otapala tijekom desorpcije. Korišteni volumeni metanola bili su 10 mL, 15 mL i 20 mL. Ostali uvjeti ekstrakcije ostali su isti. Također, proveo se i eksperiment s pH vrijednosti 3,5 te volumenom otapala 5 mL kako bi se vidjelo dobivaju li se možda bolja iskorištenja nego kod pH vrijednosti 3,0. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 4.2. i 4.3. te na Slikama 4.2. i 4.3.

Tablica 4.2. Dobivena iskorištenja farmaceutika za navedene volumene metanola kod pH vrijednosti 3,0

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	10 mL metanola	15 mL metanola	20 mL metanola
Albendazol	3,7 \pm 13,6	2,7 \pm 14,1	3,2 \pm 2,4
Azitromicin	15,6 \pm 14,8	8,5 \pm 17,4	9,4 \pm 41,8
Etodolak	1,7 \pm 3,6	1,7 \pm 5,0	2,1 \pm 8,9
Febantel	4,6 \pm 10,1	8,1 \pm 7,2	1,7 \pm 28,8
Imatinib	19,3 \pm 10,9	1,7 \pm 18,9	2,7 \pm 14,8
Levamisol	1,0 \pm 7,2	0,5 \pm 4,2	5,9 \pm 100,8
Linezolid	1,2 \pm 16,1	0,5 \pm 11,3	1,2 \pm 5,9
Omeprazol	0,1 \pm 4,3	0,0 \pm 10,8	0,4 \pm 94,6
Prazikvantel	4,2 \pm 2,9	1,5 \pm 21,2	3,0 \pm 39,2
Sulfafurazol	0,6 \pm 0,5	0,3 \pm 11,5	0,5 \pm 5,7
Sulfametazin	0,9 \pm 6,4	0,6 \pm 10,7	1,1 \pm 51,2
Tiamulin	7,0 \pm 8,4	2,9 \pm 6,4	2,7 \pm 14,7
Torasemid	0,8 \pm 7,7	0,5 \pm 3,1	0,9 \pm 0,3

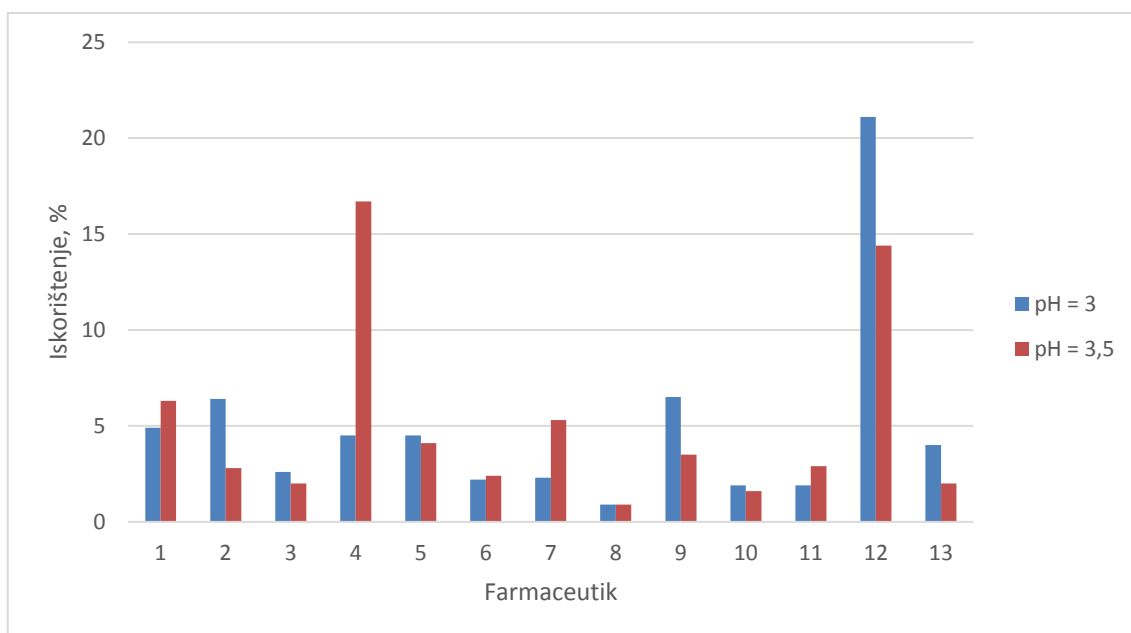


Slika 4.2. Iskorištenja dobivena korištenjem različitih volumena otapala kod pH vrijednosti 3,0

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.3. Dobivena iskorištenja farmaceutika kod pH=3,5 uspoređena s prethodno dobivenim vrijednostima za pH=3,0

	Iskorištenje ± RSO, %	
	pH = 3,0 5 mL metanola	pH = 3,5 5 mL metanola
Albendazol	4,9 ± 5,8	6,3 ± 7,0
Azitromicin	6,4 ± 4,1	2,8 ± 13,8
Etodolak	2,6 ± 25,1	2,0 ± 12,0
Febantel	4,5 ± 13,3	16,7 ± 9,6
Imatinib	4,5 ± 11,5	4,1 ± 15,4
Levamisol	2,2 ± 46,3	2,4 ± 18,4
Linezolid	2,3 ± 54,1	5,3 ± 11,0
Omeprazol	0,9 ± 16,8	0,9 ± 1,5
Prazikvantel	6,5 ± 15,4	3,5 ± 11,0
Sulfafurazol	1,9 ± 61,5	1,6 ± 21,0
Sulfametazin	1,9 ± 41,0	2,9 ± 24,9
Tiamulin	21,1 ± 5,8	14,4 ± 3,5
Torasemid	4,0 ± 0,8	2,0 ± 19,5



Slika 4.3. Usporedba dobivenih iskorištenja kod pH vrijednosti 3,0 i 3,5

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz navedenog se može vidjeti da se iskorištenja farmaceutika ne povećavaju značajno povećanjem volumena otapala (metanola). Isto tako, vidljivo je da su iskorištenja podjednako dobra za pH vrijednosti 3,0 i 3,5 kod volumena metanola 5 mL. Stoga je sljedeći set eksperimenata proveden kod tih pH vrijednosti uz volumen metanola 5 mL. Ono što se u ovom setu ispitivalo je koliko i kako vremena ekstrakcije i desorpcije utječu na iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika. Temperatura je i dalje iznosila 30 °C. Izvedeni su sljedeći eksperimenti:

- A. pH = 3,0; 5 mL MeOH; 30 °C; 2 sata ekstrakcija; 1 sat desorpcija
- B. pH = 3,0; 5 mL MeOH; 30 °C; 1 sat ekstrakcija; 2 sata desorpcija
- C. pH = 3,0; 5 mL MeOH; 30 °C; 1 sat ekstrakcija; 1 sat desorpcija
- D. pH = 3,5; 5 mL MeOH; 30 °C; 2 sata ekstrakcija; 1 sat desorpcija
- E. pH = 3,5; 5 mL MeOH; 30 °C; 1 sat ekstrakcija; 2 sata desorpcija
- F. pH = 3,5; 5 mL MeOH; 30 °C; 1 sat ekstrakcija; 1 sat desorpcija

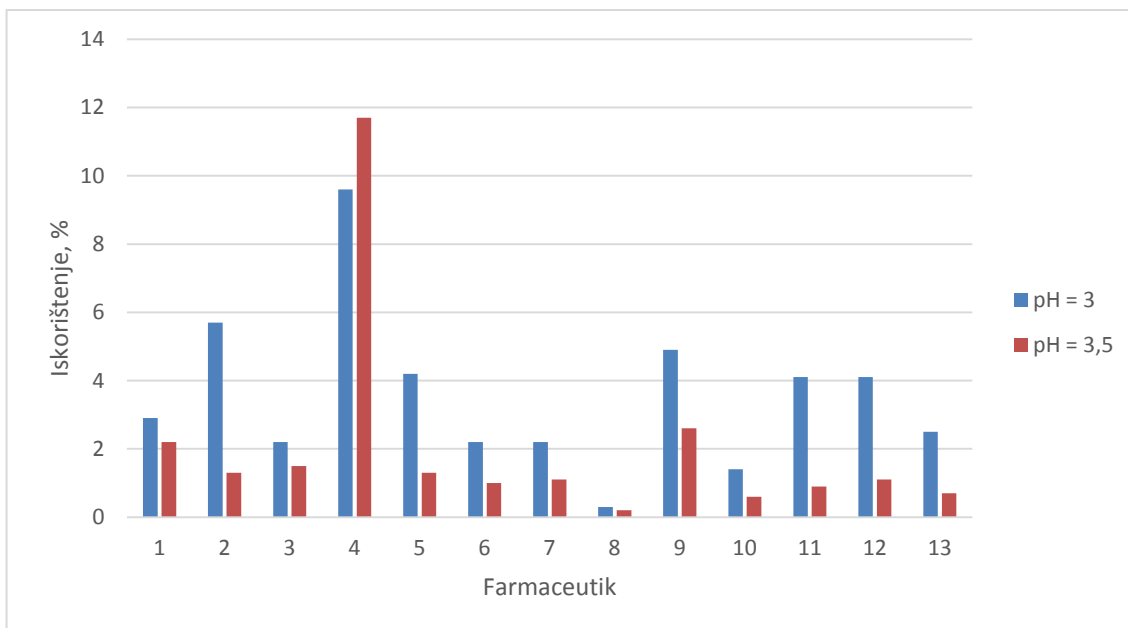
Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 4.4. i 4.5. te na Slikama 4.4., 4.5. i 4.6.

Tablica 4.4. Dobivena iskorištenja farmaceutika kod različitih vremena ekstrakcije i desorpcije za pH vrijednost 3,0

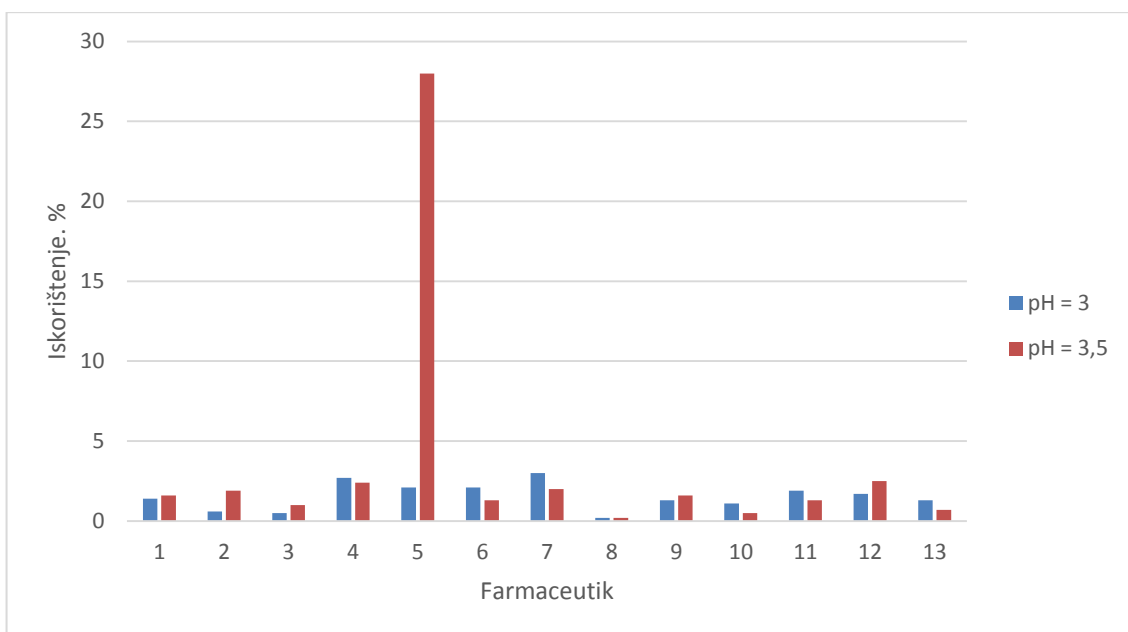
	Iskorištenje \pm RSO, %		
	2 sata ekstrakcija, 1 sat desorpcija	1 sat ekstrakcija, 2 sata desorpcija	1 sat ekstrakcija, 1 sat desorpcija
Albendazol	2,9 \pm 10,5	1,4 \pm 3,1	1,6 \pm 5,8
Azitromicin	5,7 \pm 30,3	0,6 \pm 18,2	2,8 \pm 30,2
Etodolak	2,2 \pm 3,2	0,5 \pm 7,0	1,3 \pm 2,0
Febantel	9,6 \pm 7,8	2,7 \pm 18,5	9,2 \pm 4,6
Imatinib	4,2 \pm 33,2	2,1 \pm 22,4	4,2 \pm 48,2
Levamisol	2,2 \pm 2,1	2,1 \pm 8,3	2,1 \pm 4,7
Linezolid	2,2 \pm 5,1	3,0 \pm 8,6	2,1 \pm 8,4
Omeprazol	0,3 \pm 31,1	0,2 \pm 10,8	0,1 \pm 0,9
Prazikvantel	4,9 \pm 3,7	1,3 \pm 7,2	3,1 \pm 1,8
Sulfafurazol	1,4 \pm 5,7	1,1 \pm 11,8	0,8 \pm 2,9
Sulfametazin	4,1 \pm 7,8	1,9 \pm 8,5	1,2 \pm 4,4
Tiamulin	4,1 \pm 10,3	1,7 \pm 4,4	1,5 \pm 1,7
Torasemid	2,5 \pm 7,7	1,3 \pm 10,0	1,0 \pm 5,3

Tablica 4.5. Dobivena iskorištenja farmaceutika kod različitih vremena ekstrakcije i desorpcije za pH vrijednost 3,5

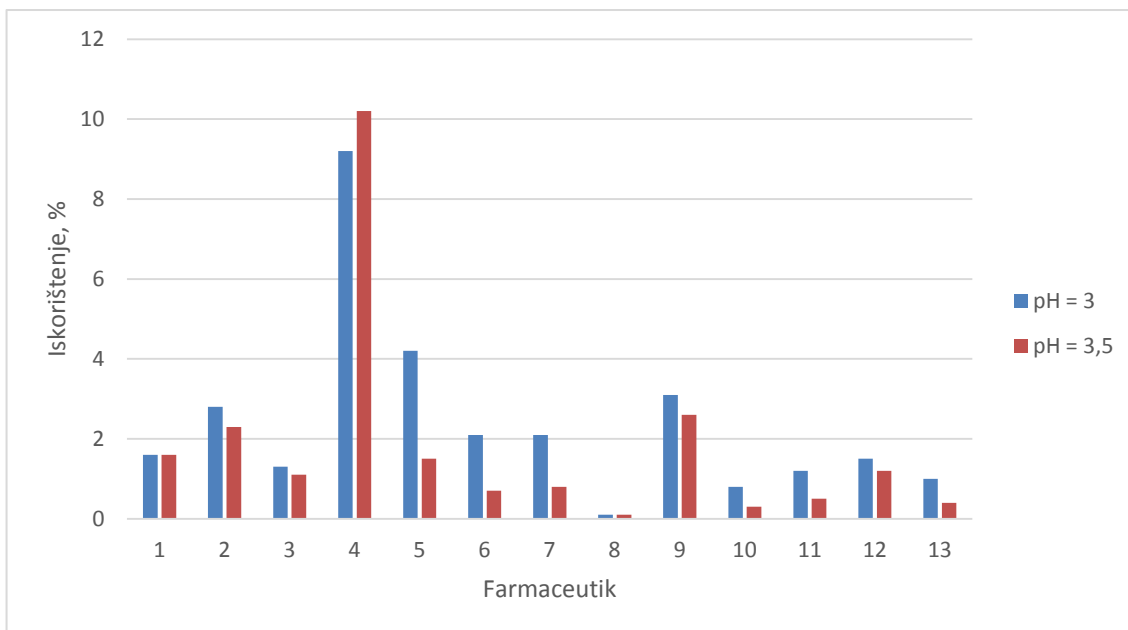
	Iskorištenje \pm RSO, %		
	2 sata ekstrakcija, 1 sat desorpcija	1 sat ekstrakcija, 2 sata desorpcija	1 sat ekstrakcija, 1 sat desorpcija
Albendazol	2,2 \pm 6,3	1,6 \pm 0,0	1,6 \pm 11,1
Azitromicin	1,3 \pm 2,1	1,9 \pm 17,7	2,3 \pm 34,5
Etodolak	1,5 \pm 6,9	1,0 \pm 5,2	1,1 \pm 1,1
Febantel	11,7 \pm 13,8	2,4 \pm 10,8	10,2 \pm 12,4
Imatinib	1,3 \pm 23,0	28,0 \pm 5,9	1,5 \pm 25,3
Levamisol	1,0 \pm 18,4	1,3 \pm 5,3	0,7 \pm 13,6
Linezolid	1,1 \pm 0,1	2,0 \pm 6,1	0,8 \pm 6,2
Omeprazol	0,2 \pm 38,5	0,2 \pm 4,1	0,1 \pm 1,1
Prazikvantel	2,6 \pm 7,3	1,6 \pm 5,6	2,6 \pm 4,7
Sulfafurazol	0,6 \pm 11,7	0,5 \pm 18,3	0,3 \pm 27,8
Sulfametazin	0,9 \pm 5,2	1,3 \pm 13,9	0,5 \pm 3,7
Tiamulin	1,1 \pm 6,8	2,5 \pm 7,3	1,2 \pm 6,1
Torasemid	0,7 \pm 3,4	0,7 \pm 21,2	0,4 \pm 6,0



Slika 4.4. Iskorištenja farmaceutika za dvosatnu ekstrakciju i jednosatnu desorpciju (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)



Slika 4.5. Iskorištenja farmaceutika za jednosatnu ekstrakciju i dvosatnu desorpciju (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

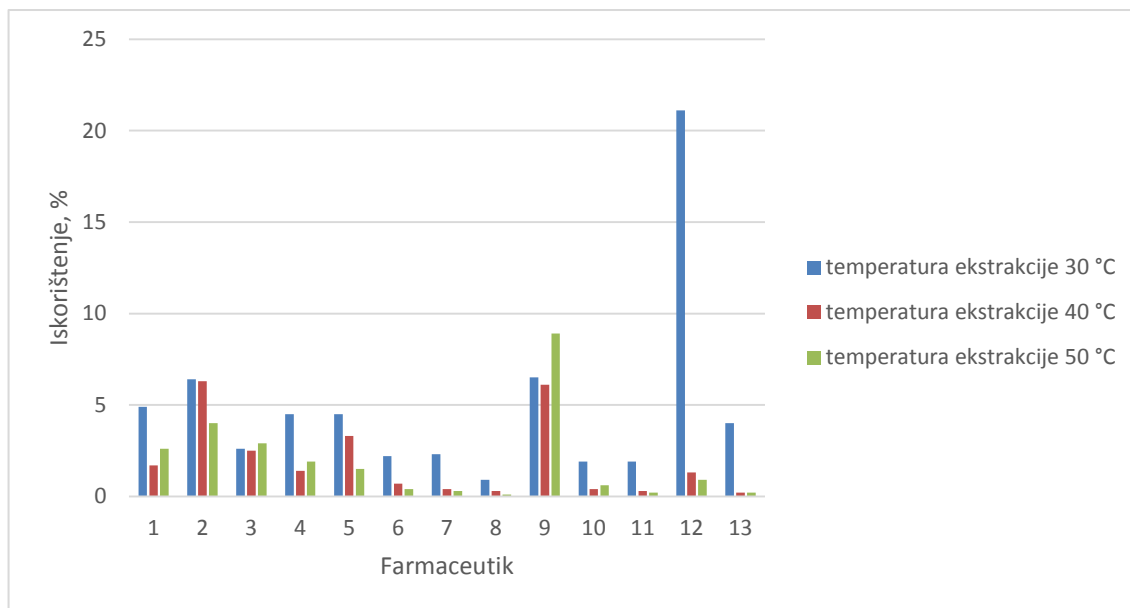


Slika 4.6. Iskorištenja farmaceutika za jednosatnu ekstrakciju i jednosatnu desorpciju (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je kako se najbolja iskorištenja za većinu ispitivanih farmaceutika ipak postižu kod pH vrijednosti vode 3,0. Isto tako, usporedbom svih dobivenih rezultata može se uočiti da se najbolji rezultati dobivaju kod dvosatnog provođenja ekstrakcije te dvosatnog provođenja desorpcije. Stoga se predzadnji set eksperimenata provodio kod ovih uvjeta. Ono što se u ovom slučaju mijenjalo bile su temperature ekstrakcije. Temperatura desorpcije ostala je ista i iznosila je 30 °C. Temperature ekstrakcije bile su 30 °C, 40 °C i 50 °C. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablici 4.6. i na Slici 4.7.

Tablica 4.6. Dobivena iskorištenja farmaceutika kod različitih temperatura ekstrakcije za pH vrijednost 3,0

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	$t_E = 30\text{ }^\circ\text{C}$	$t_E = 40\text{ }^\circ\text{C}$	$t_E = 50\text{ }^\circ\text{C}$
Albendazol	4,9 \pm 5,8	1,7 \pm 7,5	2,6 \pm 4,2
Azitromicin	6,4 \pm 4,1	6,3 \pm 30,5	4,0 \pm 19,3
Etodolak	2,6 \pm 25,1	2,5 \pm 12,8	2,9 \pm 1,1
Febantel	4,5 \pm 13,3	1,4 \pm 0,4	1,9 \pm 6,7
Imatinib	4,5 \pm 11,5	3,3 \pm 4,4	1,5 \pm 1,0
Levamisol	2,2 \pm 46,3	0,7 \pm 22,8	0,4 \pm 26,3
Linezolid	2,3 \pm 54,1	0,4 \pm 11,2	0,3 \pm 10,7
Omeprazol	0,9 \pm 16,8	0,3 \pm 1,5	0,1 \pm 18,1
Prazikvantel	6,5 \pm 15,4	6,1 \pm 15,8	8,9 \pm 11,8
Sulfafurazol	1,9 \pm 61,5	0,4 \pm 2,8	0,6 \pm 2,0
Sulfametazin	1,9 \pm 41,0	0,3 \pm 11,2	0,2 \pm 9,9
Tiamulin	21,1 \pm 5,8	1,3 \pm 1,9	0,9 \pm 13,5
Torasemid	4,0 \pm 0,8	0,2 \pm 10,0	0,2 \pm 13,0

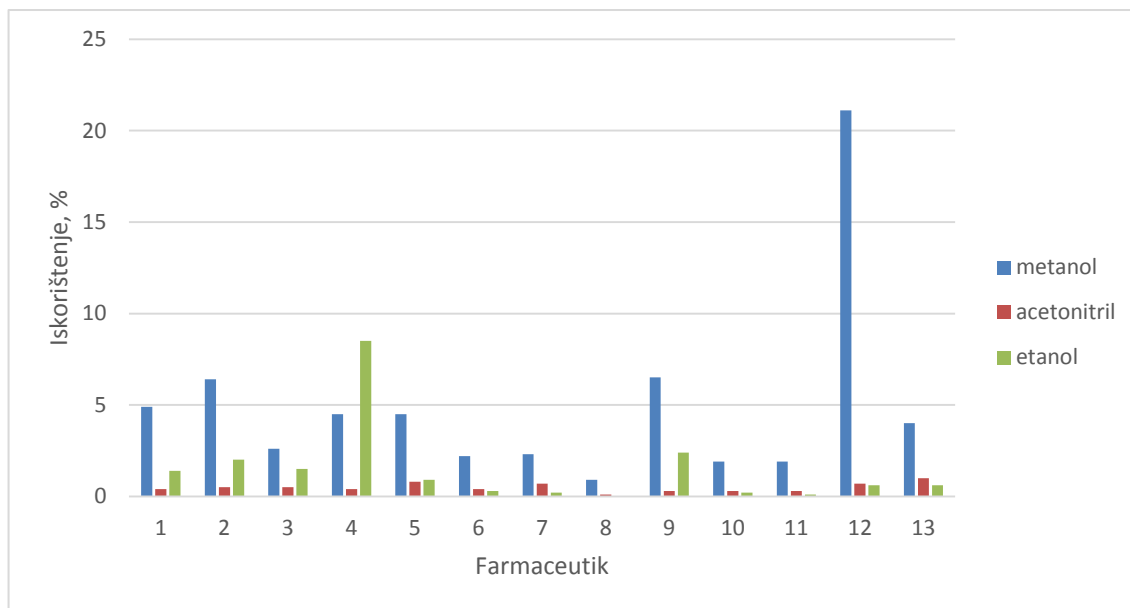


Slika 4.7. Iskorištenja farmaceutika kod različitih temperatura ekstrakcije (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz priloženih rezultata vidljivo je da se najbolja iskorištenja za većinu ispitivanih farmaceutika ipak dobivaju kod prvobitne temperature ekstrakcije odnosno kod temperature 30 °C. U zadnjem setu eksperimenata se provjeravalo daju li možda acetonitril ili etanol bolja iskorištenja od metanola. Provedeni su eksperimenti kod pH vrijednosti 3,0, temperature 30 °C i korištenjem 5 mL navedenih otapala. U Tablici 4.7. i na Slici 4.8. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 4.7. Dobivena iskorištenja farmaceutika kod različitih otapala za desorpciju

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Metanol	Acetonitril	Etanol
Albendazol	4,9 \pm 5,8	0,4 \pm 34,4	1,4 \pm 5,3
Azitromicin	6,4 \pm 4,1	0,5 \pm 9,8	2,0 \pm 72,5
Etodolak	2,6 \pm 25,1	0,5 \pm 36,7	1,5 \pm 10,3
Febantel	4,5 \pm 13,3	0,4 \pm 19,2	8,5 \pm 4,7
Imatinib	4,5 \pm 11,5	0,8 \pm 24,2	0,9 \pm 82,0
Levamisol	2,2 \pm 46,3	0,4 \pm 21,2	0,3 \pm 33,6
Linezolid	2,3 \pm 54,1	0,7 \pm 36,7	0,2 \pm 16,5
Omeprazol	0,9 \pm 16,8	0,1 \pm 1,5	0,0 \pm 12,8
Prazikvantel	6,5 \pm 15,4	0,3 \pm 21,4	2,4 \pm 2,5
Sulfafurazol	1,9 \pm 61,5	0,3 \pm 7,4	0,2 \pm 7,4
Sulfametazin	1,9 \pm 41,0	0,3 \pm 2,5	0,1 \pm 10,1
Tiamulin	21,1 \pm 5,8	0,7 \pm 10,7	0,6 \pm 4,7
Torasemid	4,0 \pm 0,8	1,0 \pm 8,0	0,6 \pm 2,5



Slika 4.8. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem različitih čistih otapala (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz svih dosad navedenih rezultata i dobivenih vrijednosti za iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika, kao optimalno otapalo za ekstrakciju miješalom izabran je metanol. Optimalna pH vrijednost vode iznosi 3,0, optimalan volumen otapala za desorpciju (metanola) 5 mL, a optimalna temperatura ekstrakcije i desorpcije 30 °C.

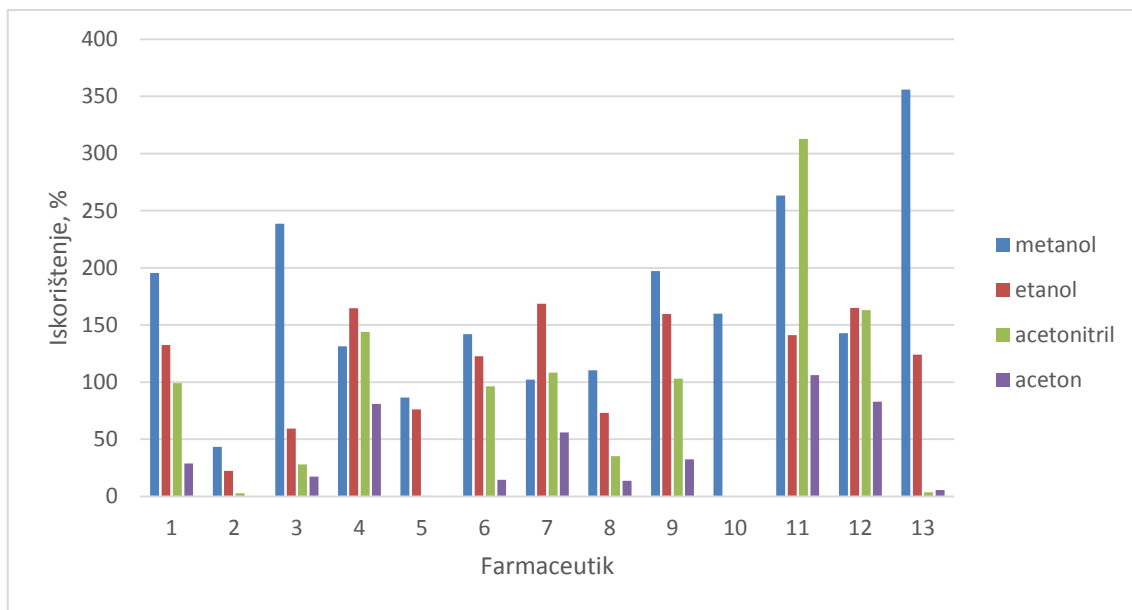
Ipak ono što se može primijetiti kod svih eksperimenata bez obzira na ekstrakcijske/desorpcijske uvjete uključujući i optimalne je da su iskorištenja svih farmaceutika prilično niska uz velika relativna standardna odstupanja. Razlog niskih iskorištenja je što ekstrakcija miješalom preferira analite visokih vrijednosti koeficijena razdjeljenja oktanol-voda, K_{ov} ($\log K_{ov} > 3$) što u ispitivanoj smjesi farmaceutika zadovoljavaju samo 3-4 farmaceutika (azitromicin, imatinib, tiamulin i toresamid). Međutim, da se primijetiti da se niti njihova iskorištenja pretjerano ne ističu među ostalima posebice ona za azitromicin, imatinib i toresamid, a razlog tome je što se svih 13 farmaceutika smjese natječu za svoje mjesto na malom ekstrakcijskom miješalu. Iz tog razloga može se očekivati da bi njihova iskorištenja, a posebice tiamulina koji među njih 13 ima najvišu vrijednost $\log K_{ov}$ bila daleko viša da su u uzorku vode prisutni pojedinačno ili da ih u smjesi ima manje (prema Slici 2.2 za očekivati je da bi iskorištenja tiamulina bila oko 90 %).

4.2. Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta

Kod druge metode ekstrakcije odnosno kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta također je provedeno nekoliko setova eksperimenata. Kao i kod ekstrakcije miješalom u svakom se setu eksperimenata ispitivala određena stvar i na temelju dobivenih rezultata odlučivalo o idućem koraku. U prvom koraku za ekstrakciju su se koristila čista otapala, a njihov volumen je iznosio 10 mL. Korištena otapala su: metanol, etanol, acetonitril, aceton, 1-propanol, 2-propanol, voda, etil-acetat, heksan, diklormetan i dietileter. Vrijeme ekstrakcije bilo je 15 min, temperatura 25 °C, a snaga 600 W. Iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika dobivena korištenjem navedenih čistih otapala prikazana su u Tablicama 4.8., 4.9. i 4.10. te na Slikama 4.9., 4.10. i 4.11.

Tablica 4.8. Dobivena iskorištenja farmaceutika za metanol, etanol, acetonitril i aceton

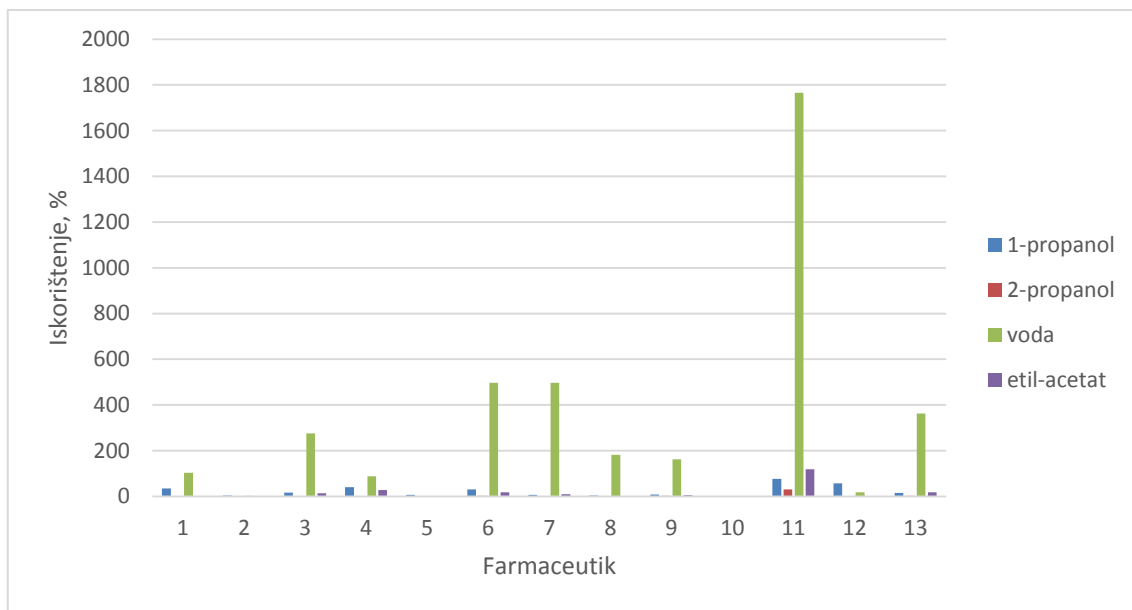
	Iskorištenje \pm RSO, %			
	Metanol	Etanol	Acetonitril	Aceton
Albendazol	195,4 \pm 10,6	132,4 \pm 6,3	99,2 \pm 38,8	28,9 \pm 19,1
Azitromicin	43,4 \pm 1,2	22,2 \pm 3,3	2,8 \pm 8,6	-
Etodolak	238,7 \pm 11,1	59,3 \pm 54,6	28,0 \pm 42,7	17,4 \pm 11,8
Febantel	131,2 \pm 1,3	164,5 \pm 8,8	143,8 \pm 17,2	80,8 \pm 3,7
Imatinib	86,5 \pm 5,2	76,1 \pm 9,6	0,4 \pm 20,2	0,3 \pm 0,0
Levamisol	142,0 \pm 2,7	122,6 \pm 18,2	96,3 \pm 42,5	14,5 \pm 44,5
Linezolid	102,2 \pm 3,2	168,4 \pm 7,5	108,4 \pm 78,0	55,9 \pm 12,2
Omeprazol	110,3 \pm 8,4	73,1 \pm 5,9	35,3 \pm 74,4	13,6 \pm 1,1
Prazikvantel	197,1 \pm 8,0	159,7 \pm 1,8	103,1 \pm 40,1	32,5 \pm 5,2
Sulfafurazol	159,9 \pm 7,4	-	-	-
Sulfametazin	263,3 \pm 7,3	141,1 \pm 13,0	312,9 \pm 28,4	106,2 \pm 7,2
Tiamulin	142,9 \pm 2,1	164,9 \pm 6,7	163,0 \pm 13,7	82,9 \pm 11,4
Torasemid	355,9 \pm 9,9	124,0 \pm 1,9	3,7 \pm 35,5	5,4 \pm 18,8



Slika 4.9. Dobivena iskorištenja farmaceutika za metanol, etanol, acetonitril i aceton (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.9. Dobivena iskorištenja farmaceutika za 1-propanol, 2-propanol, vodu i etil-acetat

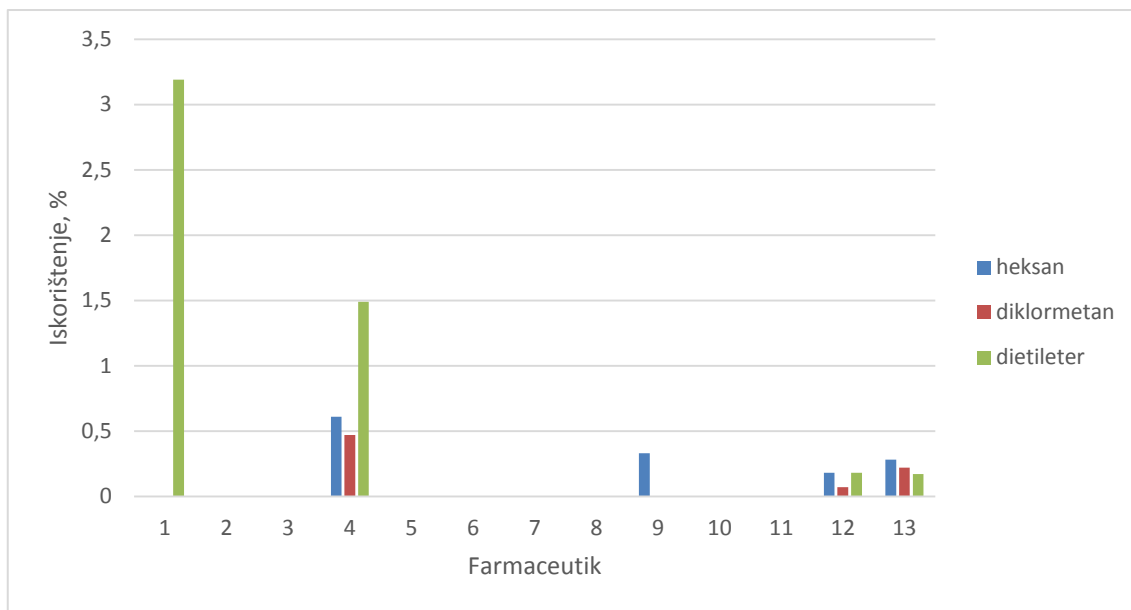
	Iskorištenje \pm RSO, %			
	1-propanol	2-propanol	Voda	Etil-acetat
Albendazol	34,7 \pm 16,1	0,6 \pm 0,0	102,6 \pm 8,1	-
Azitromicin	3,8 \pm 25,3	-	2,2 \pm 43,5	1,0 \pm 0,0
Etodolak	15,9 \pm 2,9	0,8 \pm 0,0	275,8 \pm 18,5	14,0 \pm 3,9
Febantel	40,7 \pm 12,5	0,2 \pm 101,5	87,5 \pm 13,4	27,0 \pm 7,2
Imatinib	6,5 \pm 9,7	0,2 \pm 0,0	0,3 \pm 74,1	-
Levamisol	30,3 \pm 91,5	2,5 \pm 0,0	496,2 \pm 59,1	17,9 \pm 0,0
Linezolid	7,2 \pm 0,0	-	497,1 \pm 5,8	9,4 \pm 39,9
Omeprazol	3,9 \pm 4,8	-	182,0 \pm 8,6	-
Prazikvantel	8,2 \pm 4,8	3,1 \pm 66,3	161,7 \pm 3,2	5,3 \pm 30,0
Sulfafurazol	-	-	-	-
Sulfametazin	76,2 \pm 39,8	31,0 \pm 37,7	1765,4 \pm 48,3	119,1 \pm 15,0
Tiamulin	56,6 \pm 11,8	0,9 \pm 8,4	18,1 \pm 11,6	0,8 \pm 3,7
Torasemid	14,8 \pm 29,9	2,4 \pm 103,4	362,6 \pm 16,6	18,3 \pm 21,9



Slika 4.10. Dobivena iskorištenja farmaceutika za 1-propanol, 2-propanol, vodu i etil-acetat (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.10. Dobivena iskorištenja farmaceutika za heksan, diklormetan i dietileter

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Heksan	Diklormetan	Dietileter
Albendazol	-	-	3,2 \pm 11,2
Azitromicin	-	-	-
Etodolak	-	-	-
Febantel	0,6 \pm 7,3	0,5 \pm 31,1	1,5 \pm 5,1
Imatinib	-	-	-
Levamisol	-	-	-
Linezolid	-	-	-
Omeprazol	-	-	-
Prazikvantel	0,3 \pm 63,2	-	-
Sulfafurazol	-	-	-
Sulfametazin	-	-	-
Tiamulin	0,2 \pm 13,0	0,1 \pm 68,8	0,2 \pm 12,0
Torasemid	0,3 \pm 25,5	0,2 \pm 64,8	0,2 \pm 67,0



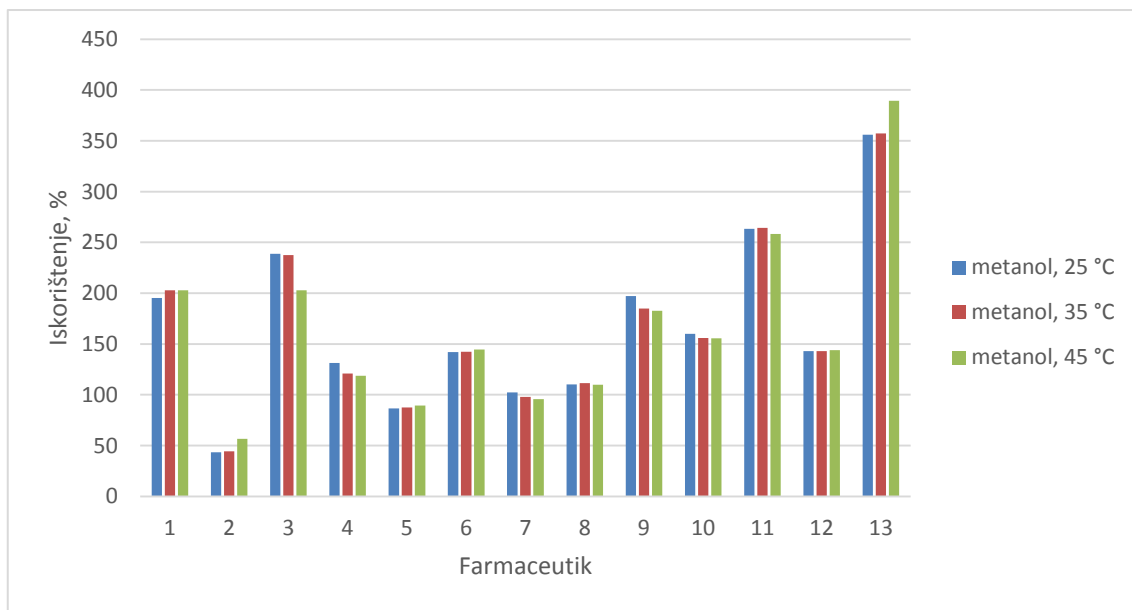
Slika 4.11. Dobivena iskorištenja farmaceutika za heksan, diklormetan i dietileter (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz navedenog je vidljivo da se iskorištenja razlikuju za sva otapala, ali mogu se izdvojiti 3 otapala koja pokazuju relativno dobra iskorištenja za većinu farmaceutika. To su metanol, etanol i voda. Najmanja iskorištenja dobivena su kod heksana i diklormetana. Od 13 ispitivanih farmaceutika, azitromicin pokazuje najmanje iskorištenje primjenom svih otapala.

Na temelju dobivenih vrijednosti iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika korištenjem čistih otapala, u sljedećem setu eksperimenata ispitalo se ponašanje metanola i etanola kao čistih otapala, ali pri temperaturama 35 °C i 45 °C. Osim toga, proveli su se i eksperimenti u kojima su se metanol i etanol pomiješali s vodom u raznim omjerima. Korišteni omjeri otapala i vode bili su: 7:3, 8:2 i 9:1. Volumen je i dalje ostao 10 mL. Također, i ostali uvjeti ekstrakcije ostali su isti (osim kod čistih otapala gdje su temperature bile 35 °C i 45 °C). U Tablicama 4.11., 4.12., 4.13. i 4.14. te na Slikama 4.12., 4.13., 4.14. i 4.15. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 4.11. Dobivena iskorištenja farmaceutika za metanol pri 35 °C i 45 °C uspoređena s prethodno dobivenim iskorištenjima pri 25 °C

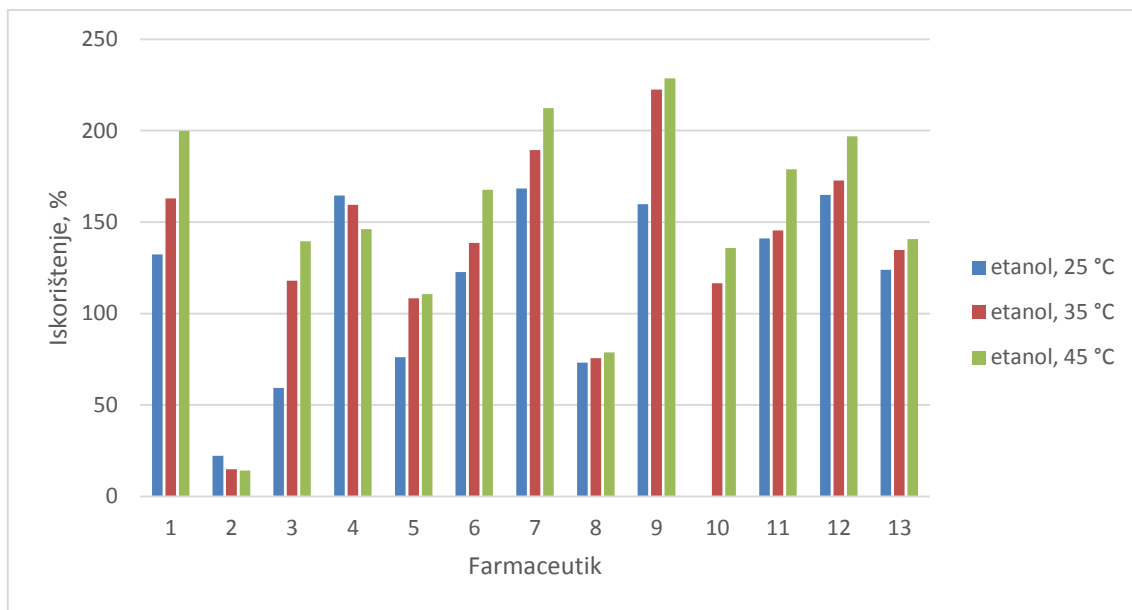
	Iskorištenje ± RSO, %		
	Metanol; 25 °C	Metanol; 35 °C	Metanol; 45 °C
Albendazol	195,4 ± 10,6	202,8 ± 1,2	203,0 ± 1,1
Azitromicin	43,4 ± 1,2	44,3 ± 5,8	56,7 ± 9,5
Etodolak	238,7 ± 11,1	237,6 ± 4,2	202,8 ± 9,8
Febantel	131,2 ± 1,3	120,9 ± 0,4	118,8 ± 0,4
Imatinib	86,5 ± 5,2	87,6 ± 2,4	89,4 ± 5,6
Levamisol	142,0 ± 2,7	142,4 ± 0,8	144,7 ± 3,7
Linezolid	102,2 ± 3,2	97,9 ± 2,5	95,7 ± 5,3
Omeprazol	110,3 ± 8,4	111,4 ± 4,3	110,0 ± 0,8
Prazikvantel	197,1 ± 8,0	184,9 ± 4,8	182,6 ± 0,6
Sulfafurazol	159,9 ± 7,4	155,8 ± 7,2	155,6 ± 4,7
Sulfametazin	263,3 ± 7,3	264,3 ± 2,3	258,2 ± 2,3
Tiamulin	142,9 ± 2,1	142,9 ± 1,3	143,9 ± 0,4
Torasemid	355,9 ± 9,9	357,2 ± 4,5	389,4 ± 3,4



Slika 4.12. Dobivena iskorištenja farmaceutika za metanol pri 25 °C, 35 °C i 45 °C (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.12. Dobivena iskorištenja farmaceutika za etanol pri 35 °C 45 °C uspoređena s prethodno dobivenim iskorištenjima pri 25 °C

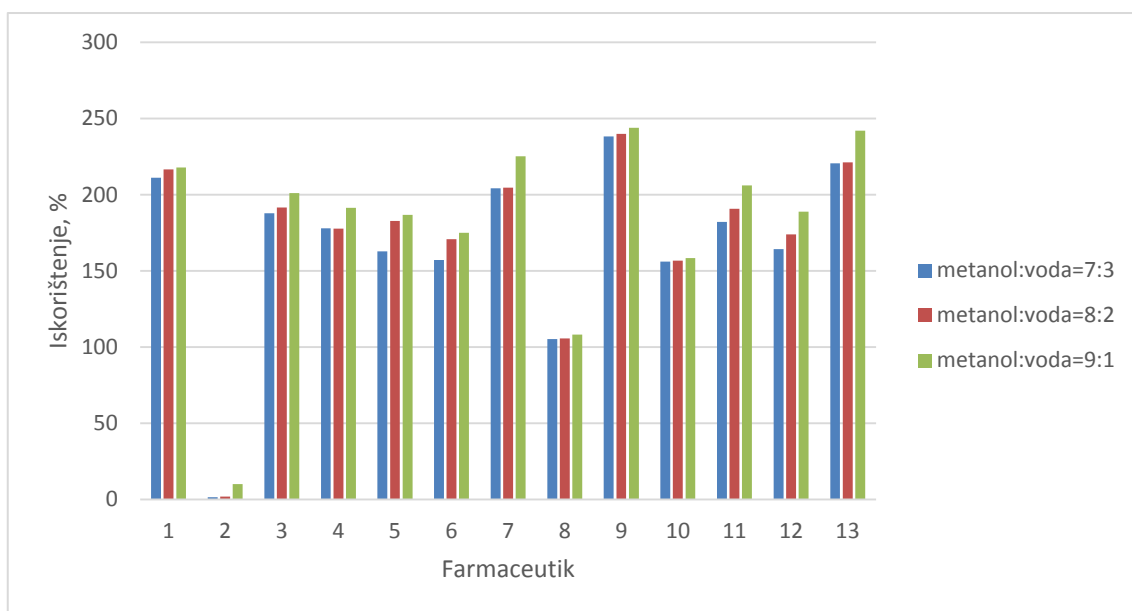
	Iskorištenje ± RSO, %		
	Etanol; 25 °C	Etanol; 35 °C	Etanol; 45 °C
Albendazol	132,4 ± 6,2	162,9 ± 5,2	199,9 ± 10,0
Azitromicin	22,2 ± 3,3	14,8 ± 20,6	14,2 ± 15,4
Etodolak	59,3 ± 54,6	118,0 ± 2,5	139,5 ± 7,6
Febantel	164,5 ± 8,8	159,5 ± 1,5	146,2 ± 10,5
Imatinib	76,1 ± 9,6	108,3 ± 7,6	110,7 ± 0,1
Levamisol	122,6 ± 18,2	138,6 ± 2,8	167,6 ± 5,1
Linezolid	168,4 ± 7,5	189,4 ± 6,6	212,4 ± 8,3
Omeprazol	73,1 ± 5,9	75,5 ± 12,5	78,8 ± 11,3
Prazikvantel	159,7 ± 1,8	222,4 ± 2,6	228,7 ± 12,2
Sulfafurazol	-	116,6 ± 2,2	135,75 ± 9,6
Sulfametazin	141,1 ± 13,0	145,5 ± 2,4	178,8 ± 9,0
Tiamulin	164,9 ± 6,7	172,8 ± 0,1	196,9 ± 10,7
Torasemid	124,0 ± 1,9	134,8 ± 0,2	140,6 ± 11,1



Slika 4.13. Dobivena iskorištenja farmaceutika za etanol pri 25 °C, 35 °C 45 °C
 (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.13. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola i vode u raznim omjerima

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Metanol:voda	Metanol:voda	Metanol:voda
	7:3	8:2	9:1
Albendazol	211,1 \pm 4,7	216,6 \pm 7,4	217,8 \pm 3,7
Azitromicin	1,4 \pm 4,5	1,9 \pm 10,3	10,0 \pm 3,5
Etodolak	187,9 \pm 3,7	191,5 \pm 7,4	200,9 \pm 8,4
Febantel	177,9 \pm 4,5	177,7 \pm 8,5	191,4 \pm 1,8
Imatinib	162,7 \pm 9,4	182,8 \pm 2,7	186,8 \pm 1,7
Levamisol	157,1 \pm 5,3	170,6 \pm 5,9	175,0 \pm 4,5
Linezolid	204,1 \pm 2,5	204,5 \pm 2,5	225,2 \pm 7,7
Omeprazol	105,1 \pm 0,5	105,6 \pm 3,3	108,2 \pm 5,3
Prazikvantel	238,2 \pm 0,4	239,9 \pm 6,1	243,9 \pm 11,6
Sulfafurazol	156,1 \pm 1,6	156,8 \pm 1,8	158,3 \pm 12,8
Sulfametazin	182,1 \pm 6,5	190,6 \pm 4,1	206,1 \pm 8,7
Tiamulin	164,1 \pm 4,8	174,0 \pm 9,7	188,8 \pm 0,1
Torasemid	220,6 \pm 7,8	221,1 \pm 7,1	241,9 \pm 8,0

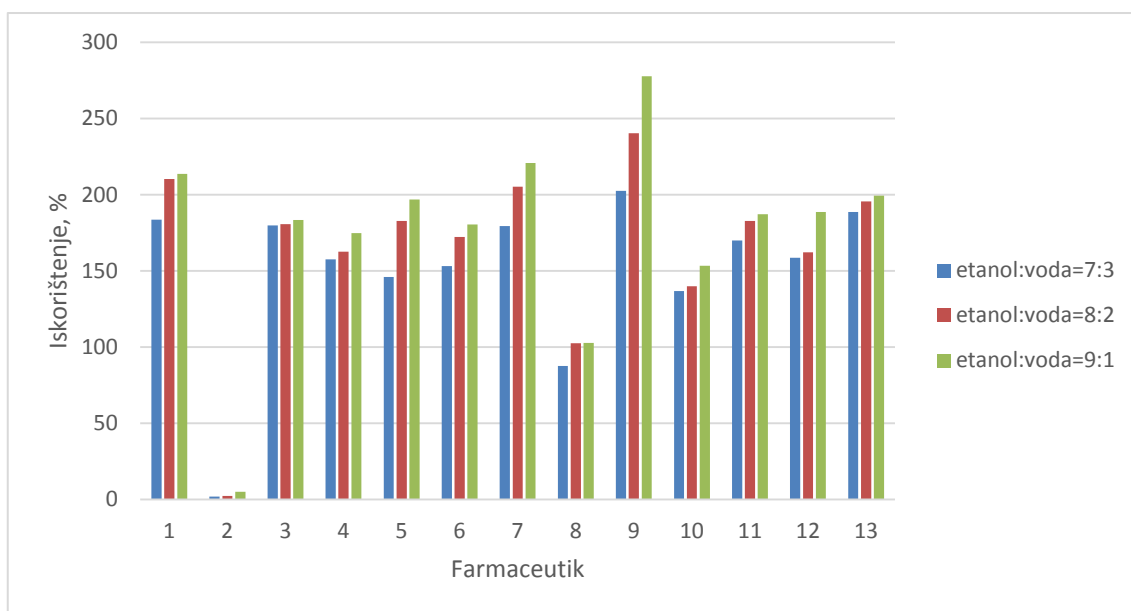


Slika 4.14. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola i vode u raznim omjerima

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.14. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem etanola i vode u raznim omjerima

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Etanol:voda	Etanol:voda	Etanol:voda
	7:3	8:2	9:1
Albendazol	183,5 \pm 7,7	210,2 \pm 9,3	213,5 \pm 15,9
Azitromicin	1,9 \pm 24,5	2,2 \pm 7,5	5,0 \pm 8,1
Etodolak	179,8 \pm 6,1	180,5 \pm 8,6	183,4 \pm 10,7
Febantel	157,5 \pm 9,3	162,6 \pm 7,7	174,6 \pm 10,0
Imatinib	146,0 \pm 19,0	182,8 \pm 8,5	196,8 \pm 10,4
Levamisol	153,0 \pm 23,9	172,3 \pm 0,3	180,4 \pm 10,7
Linezolid	179,3 \pm 22,4	205,1 \pm 14,1	220,7 \pm 7,9
Omeprazol	87,6 \pm 3,9	102,4 \pm 0,4	102,6 \pm 8,9
Prazikvantel	202,5 \pm 6,5	240,3 \pm 8,3	277,6 \pm 14,2
Sulfafurazol	136,7 \pm 13,7	139,9 \pm 3,3	153,2 \pm 17,5
Sulfametazin	170,0 \pm 12,2	182,8 \pm 5,8	187,1 \pm 11,0
Tiamulin	158,6 \pm 13,7	162,2 \pm 13,4	188,5 \pm 11,3
Torasemid	188,5 \pm 3,0	195,4 \pm 4,5	199,3 \pm 1,3

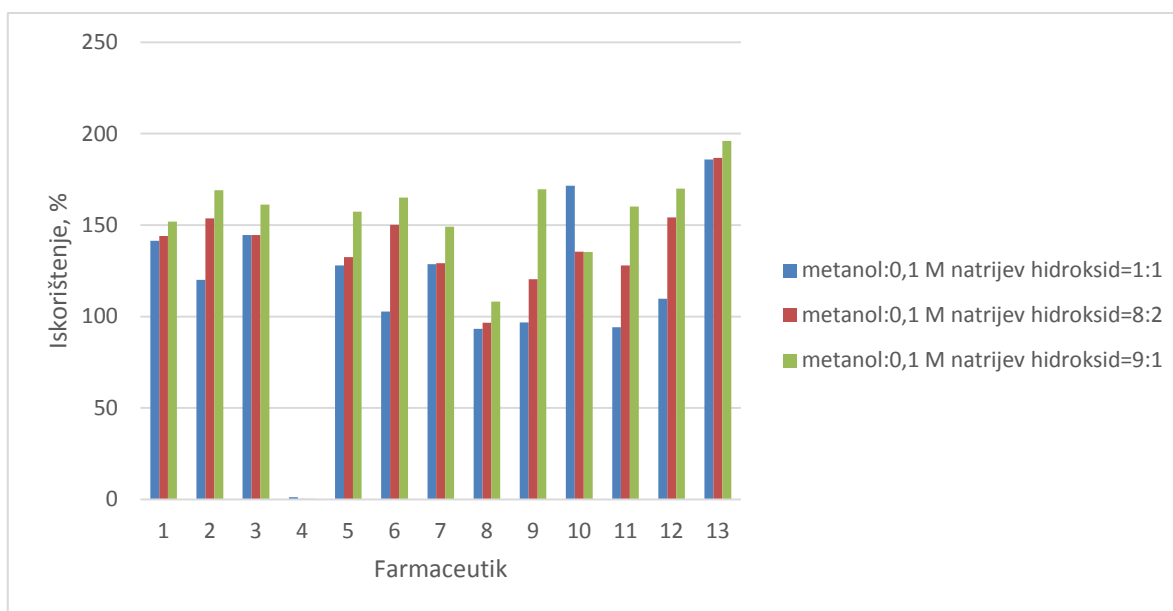


Slika 4.15. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem etanola i vode u raznim omjerima (1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se primjenom metanola kao otapala najbolja iskorištenja za većinu ispitivanih farmaceutika ipak dobivaju pri prvobitnoj temperaturi od 25 °C. Međutim, kod etanola je uočen malo drugačiji trend odnosno primjenom etanola kao otapala najbolja iskorištenja se postižu pri temperaturi od 45 °C. Što se tiče kombinacija otapala s vodom, može se uočiti da su iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika najveća kod omjera otapalo:voda=9:1. Također, vidljivo je kako azitromicin ima najmanje, a prazikvantel najveće iskorištenje. Sljedeći set eksperimenata obuhvaćao je razne omjere metanola i etanola s 0,1 M natrijevim hidroksidom, 0,1 M klorovodičnom kiselinom, 0,1 M octenom kiselinom te 0,1 M oksalnom kiselinom. Korišteni omjeri bili su, 8:2 i 9:1 za metanol odnosno etanol i 0,1 M natrijev hidroksid te 8:2 za kombinaciju navedenih otapala s navedenim kiselinama. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 4.15., 4.16., 4.17. i 4.18. te na Slikama 4.16., 4.17., 4.18. i 4.19.

Tablica 4.15. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola i 0,1 M natrijevog hidroksida u raznim omjerima

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Metanol:0,1 M NaOH	Metanol:0,1 M NaOH	Metanol:0,1 M NaOH
	1:1	8:2	9:1
Albendazol	141,4 \pm 6,4	144,1 \pm 4,3	151,9 \pm 4,6
Azitromicin	120,1 \pm 4,5	153,7 \pm 0,8	169,0 \pm 9,3
Etodolak	144,6 \pm 4,8	144,6 \pm 0,4	161,2 \pm 3,7
Febantel	1,1 \pm 15,1	0,4 \pm 11,8	0,3 \pm 8,8
Imatinib	128,0 \pm 3,0	132,6 \pm 1,2	157,4 \pm 1,1
Levamisol	102,8 \pm 9,7	150,1 \pm 4,3	165,1 \pm 5,3
Linezolid	128,6 \pm 3,5	129,1 \pm 2,5	149,1 \pm 2,2
Omeprazol	93,3 \pm 1,9	96,7 \pm 6,2	108,1 \pm 9,7
Prazikvantel	96,8 \pm 13,1	120,3 \pm 10,6	169,7 \pm 4,8
Sulfafurazol	171,5 \pm 2,6	135,5 \pm 3,7	135,2 \pm 12,6
Sulfametazin	94,1 \pm 2,6	128,0 \pm 12,0	160,1 \pm 2,9
Tiamulin	109,6 \pm 6,9	154,2 \pm 3,2	169,9 \pm 9,0
Torasemid	185,8 \pm 3,4	186,8 \pm 3,2	196,1 \pm 24,3

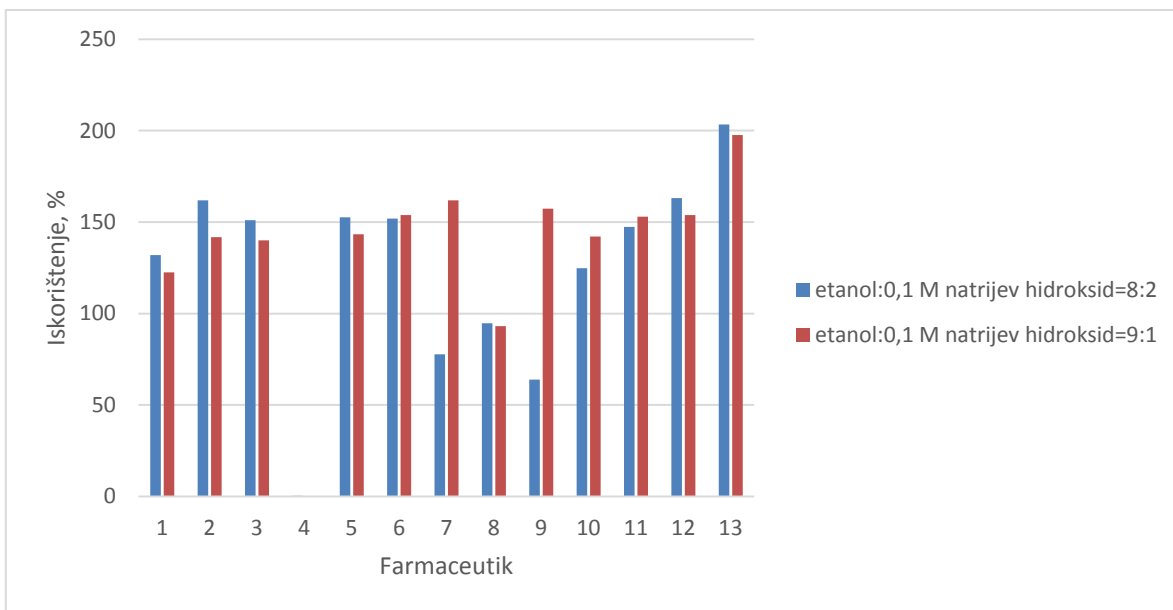


Slika 4.16. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola i 0,1 M natrijevog hidroksida u raznim omjerima

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.16. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem etanola i 0,1 M natrijevog hidroksida u raznim omjerima

	Iskorištenje \pm RSO, %	
	Etanol:0,1 M NaOH	Etanol:0,1 M NaOH
	8:2	9:1
Albendazol	132,0 \pm 8,7	122,5 \pm 16,5
Azitromicin	161,8 \pm 5,0	141,8 \pm 2,1
Etodolak	151,1 \pm 3,1	140,0 \pm 2,2
Febantel	0,2 \pm 1,0	0,2 \pm 2,3
Imatinib	152,6 \pm 7,4	143,3 \pm 2,0
Levamisol	151,8 \pm 6,9	153,9 \pm 5,2
Linezolid	77,7 \pm 8,9	161,9 \pm 3,3
Omeprazol	94,7 \pm 8,8	93,1 \pm 3,4
Prazikvantel	63,8 \pm 9,0	157,3 \pm 3,4
Sulfafurazol	124,7 \pm 3,3	142,1 \pm 2,1
Sulfametazin	147,4 \pm 3,1	153,0 \pm 0,6
Tiamulin	163,1 \pm 7,4	153,8 \pm 5,2
Torasemid	203,5 \pm 7,5	197,7 \pm 0,3

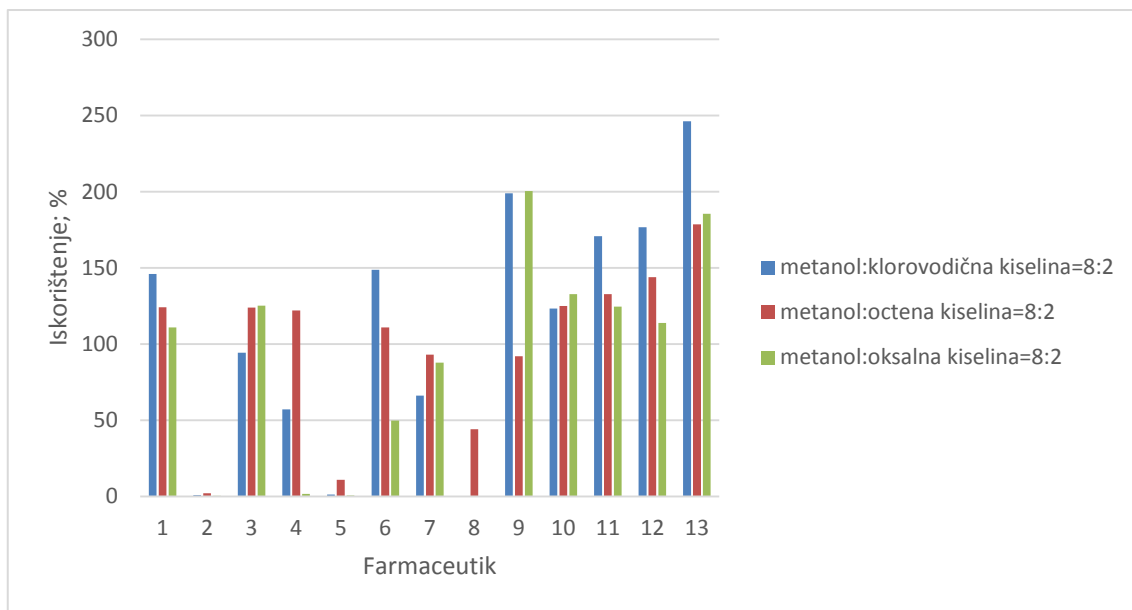


Slika 4.17. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem etanola i 0,1 M natrijevog hidroksida u raznim omjerima

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.17. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola te klorovodične, octene i oksalne kiseline u omjeru 8:2

	Iskorištenje ± RSO, %		
	Metanol:0,1 M HCl	Metanol:0,1 M HAc	Metanol:0,1 M H ₂ C ₂ O ₄
	8:2	8:2	8:2
Albendazol	145,9 ± 1,5	124,1 ± 33,4	110,9 ± 7,3
Azitromicin	0,8 ± 6,8	2,1 ± 56,3	0,3 ± 14,4
Etodolak	94,2 ± 14,9	123,9 ± 37,6	125,1 ± 0,6
Febantel	57,0 ± 4,1	122,0 ± 35,1	1,6 ± 14,8
Imatinib	1,3 ± 9,8	11,0 ± 3,0	0,5 ± 18,1
Levamisol	148,8 ± 8,6	110,8 ± 26,4	49,8 ± 13,1
Linezolid	66,1 ± 4,8	93,1 ± 22,0	87,8 ± 15,4
Omeprazol	0,0 ± 48,5	44,1 ± 29,0	-
Prazikvantel	199,0 ± 3,2	92,0 ± 140,8	200,4 ± 7,0
Sulfafurazol	123,3 ± 0,7	124,9 ± 28,3	132,8 ± 7,8
Sulfametazin	170,7 ± 4,9	132,7 ± 23,0	124,6 ± 5,3
Tiamulin	176,6 ± 1,4	144,0 ± 29,3	113,7 ± 1,8
Torasemid	246,3 ± 8,3	178,5 ± 40,2	185,4 ± 4,0

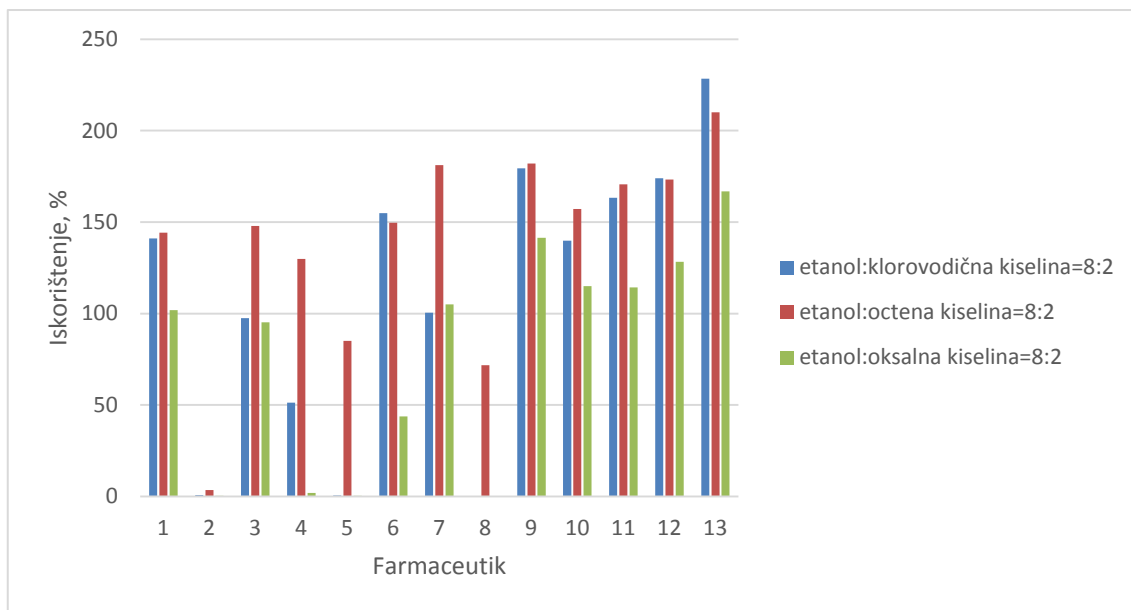


Slika 4.18. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola te klorovodične, octene i oksalne kiseline u omjeru 8:2

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.18. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem etanola te klorovodične, octene i oksalne kiseline u omjeru 8:2

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Etanol:0,1 M HCl	Etanol:0,1 M HAc	Etanol:0,1 M H ₂ C ₂ O ₄
	8:2	8:2	8:2
Albendazol	141,1 \pm 1,9	144,2 \pm 1,0	101,8 \pm 2,2
Azitromicin	0,7 \pm 8,3	3,5 \pm 9,5	0,2 \pm 17,7
Etodolak	97,5 \pm 10,7	148,0 \pm 4,0	95,2 \pm 2,0
Febantel	51,2 \pm 12,1	129,9 \pm 2,8	1,9 \pm 10,9
Imatinib	0,6 \pm 9,4	85,0 \pm 3,0	0,4 \pm 3,9
Levamisol	154,9 \pm 4,2	149,6 \pm 0,1	43,7 \pm 1,6
Linezolid	100,5 \pm 10,2	181,2 \pm 1,0	104,9 \pm 1,3
Omeprazol	-	71,7 \pm 1,6	-
Prazikvantel	179,4 \pm 8,9	182,0 \pm 2,0	141,5 \pm 14,3
Sulfafurazol	139,9 \pm 9,2	157,1 \pm 2,0	114,9 \pm 1,7
Sulfametazin	163,3 \pm 3,7	170,6 \pm 8,6	114,3 \pm 3,3
Tiamulin	174,0 \pm 2,6	173,2 \pm 0,2	128,2 \pm 4,0
Torasemid	228,4 \pm 6,6	210,1 \pm 5,1	166,7 \pm 5,8



Slika 4.19. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem etanola te klorovodične, octene i oksalne kiseline u omjeru 8:2

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se najbolja iskorištenja za čak 11 ispitivanih farmaceutika dobivaju kod kombinacije metanola s 0,1 M natrijevim hidroksidom u omjeru 9:1. Etanol ponovno daje drugačije rezultate odnosno većem dijelu farmaceutika kod kombinacije etanola s 0,1 M natrijevim hidroksidom ipak više odgovara omjer 8:2. Što se tiče kombinacija metanola i etanola s klorovodičnom, octenom i oksalnom kiselinom, metanol najbolja iskorištenja daje u kombinaciji s klorovodičnom kiselinom dok etanolu više odgovara octena kiselina.

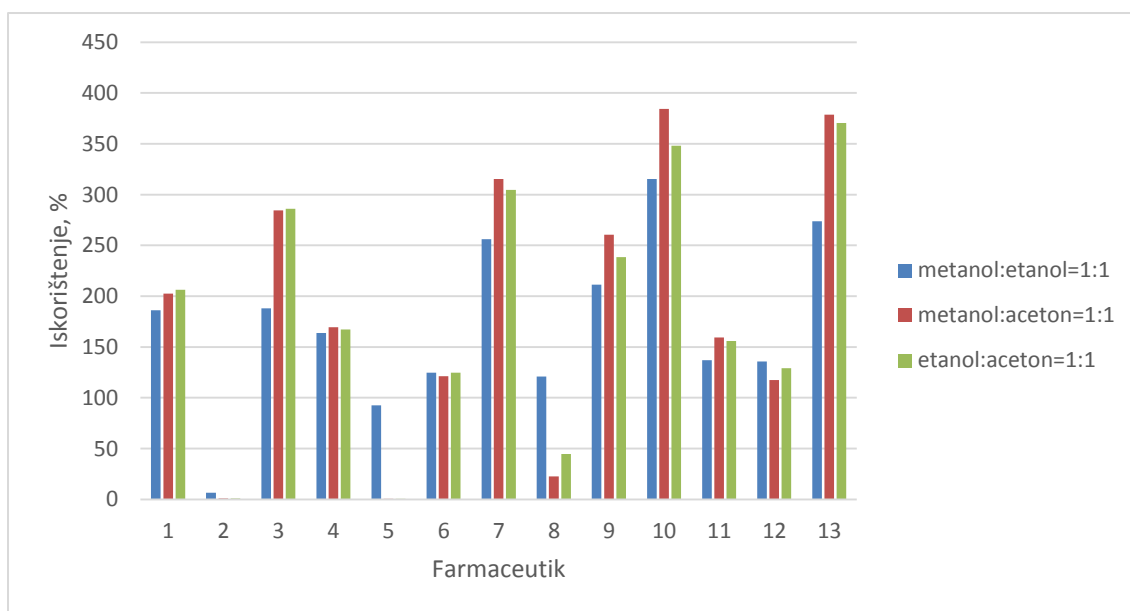
Budući da se cijelo vrijeme teži dobivanju što boljih iskorištenja za svih 13 ispitivanih farmaceutika, napravljeni su i sljedeći eksperimenti. Prva tri eksperimenta uključivala su međusobnu kombinaciju metanola, etanola i acetona u omjeru 1:1. Osim toga, napravljeni su i eksperimenti koji su sadržavali različite kombinacije metanola s 0,1 M natrijevim hidroksidom i 0,1 M octenom kiselinom. Naime, postupak ultrazvučne ekstrakcije se provodio u dva stupnja (za razliku od dotadašnjeg jednog stupnja). U svakom stupnju koristio se volumen od 5 mL tako da je ukupni volumen ponovno iznosio 10 mL. Tim načinom izvedeni su sljedeći eksperimenti:

- A. 1. stupanj: 5 mL MeOH 2. stupanj: 5 mL MeOH:0,1 M NaOH = 8:2
- B. 1. stupanj: 5 mL MeOH:0,1 M NaOH = 8:2 2. stupanj: 5 mL MeOH
- C. 1. stupanj: 5 mL MeOH 2. stupanj: 5 mL MeOH:0,1 M NaOH = 1:1
- D. 1. stupanj: 5 mL MeOH:0,1 M NaOH = 1:1 2. stupanj: 5 mL MeOH
- E. 1. stupanj: 5 mL MeOH 2. stupanj: 5 mL MeOH:0,1 M HAc = 8:2
- F. 1. stupanj: 5 mL MeOH:0,1 M HAc = 8:2 2. stupanj: 5 mL MeOH

U Tablicama 4.19., 4.20., 4.21. i 4.22. te na Slikama 4.20., 4.21., 4.22. i 4.23. prikazani su dobiveni rezultati.

Tablica 4.19. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola, etanola i acetona u omjeru 1:1

	Iskorištenje \pm RSO, %		
	Metanol:etanol	Metanol:aceton	Etanol:aceton
	1:1	1:1	1:1
Albendazol	186,3 \pm 5,9	202,4 \pm 5,4	206,3 \pm 0,3
Azitromicin	6,4 \pm 11,9	0,8 \pm 13,1	0,9 \pm 4,7
Etodolak	188,0 \pm 8,2	284,5 \pm 3,6	286,2 \pm 2,9
Febantel	163,9 \pm 7,2	169,6 \pm 2,7	167,3 \pm 3,6
Imatinib	92,4 \pm 9,2	0,6 \pm 1,8	0,4 \pm 32,2
Levamisol	124,8 \pm 6,2	121,3 \pm 6,7	124,6 \pm 0,2
Linezolid	256,1 \pm 2,9	315,5 \pm 0,1	304,7 \pm 3,1
Omeprazol	120,8 \pm 3,2	22,6 \pm 3,3	44,5 \pm 7,9
Prazikvantel	211,3 \pm 15,2	260,6 \pm 11,0	238,5 \pm 1,1
Sulfafurazol	315,2 \pm 12,5	384,3 \pm 3,3	348,2 \pm 1,3
Sulfametazin	137,1 \pm 0,9	159,4 \pm 1,5	155,8 \pm 0,6
Tiamulin	135,8 \pm 3,2	117,3 \pm 3,4	129,1 \pm 1,2
Torasemid	273,8 \pm 10,0	378,6 \pm 2,7	370,4 \pm 2,5

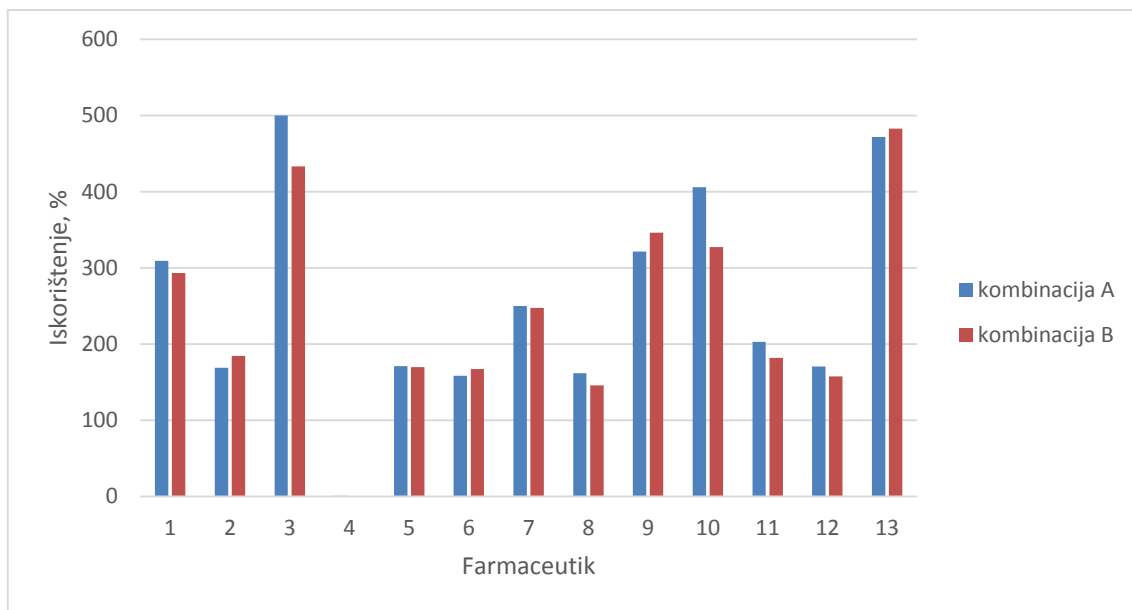


Slika 4.20. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem metanola, etanola i acetona u omjeru 1:1

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.20. Dobivena iskorištenja farmaceutika provedbom ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja (kombinacije A i B)

	Iskorištenje \pm RSO, %	
	MeOH; MeOH:0,1 M NaOH = 8:2	MeOH:0,1 M NaOH = 8:2; MeOH
Albendazol	309,2 \pm 7,4	293,3 \pm 5,3
Azitromicin	168,8 \pm 8,5	184,5 \pm 1,8
Etodolak	499,9 \pm 9,3	433,3 \pm 0,9
Febantel	0,7 \pm 8,0	0,4 \pm 4,2
Imatinib	170,8 \pm 6,0	169,5 \pm 5,7
Levamisol	158,3 \pm 10,7	166,9 \pm 3,3
Linezolid	249,9 \pm 5,7	247,5 \pm 5,5
Omeprazol	161,7 \pm 7,3	145,7 \pm 6,4
Prazikvantel	321,1 \pm 6,6	346,1 \pm 7,3
Sulfafurazol	405,6 \pm 4,0	327,0 \pm 11,7
Sulfametazin	202,9 \pm 1,8	182,0 \pm 9,4
Tiamulin	170,3 \pm 5,4	157,6 \pm 5,0
Torasemid	471,8 \pm 6,6	482,8 \pm 6,2

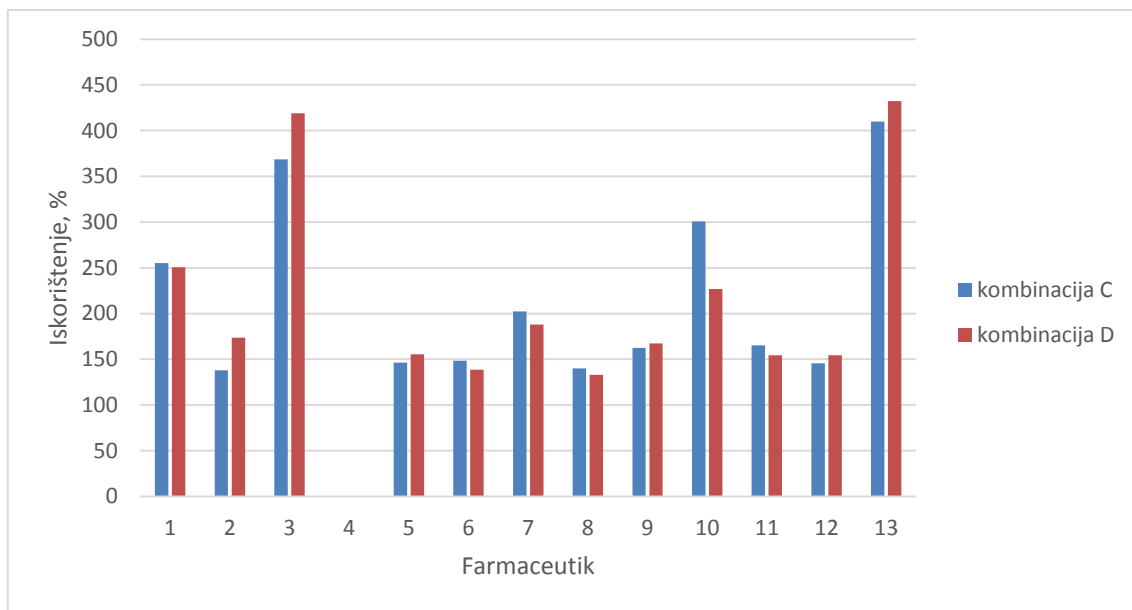


Slika 4.21. Dobivena iskorištenja farmaceutika provedbom ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja (kombinacije A i B)

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.21. Dobivena iskorištenja farmaceutika provedbom ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja (kombinacije C i D)

	Iskorištenje \pm RSO, %	
	MeOH; MeOH:0,1 M NaOH = 1:1	MeOH:0,1 M NaOH = 1:1; MeOH
Albendazol	255,0 \pm 4,7	250,7 \pm 8,4
Azitromicin	137,8 \pm 3,9	173,7 \pm 5,1
Etodolak	368,7 \pm 6,9	418,9 \pm 4,8
Febantel	0,3 \pm 0,2	0,4 \pm 1,4
Imatinib	146,4 \pm 5,7	155,2 \pm 7,5
Levamisol	148,3 \pm 5,5	138,4 \pm 2,1
Linezolid	202,4 \pm 2,8	187,9 \pm 5,3
Omeprazol	140,0 \pm 2,3	133,0 \pm 10,5
Prazikvantel	162,5 \pm 15,2	167,3 \pm 2,0
Sulfafurazol	300,8 \pm 9,4	226,7 \pm 4,5
Sulfametazin	165,1 \pm 0,1	154,1 \pm 1,7
Tiamulin	145,5 \pm 3,2	154,1 \pm 0,6
Torasemid	410,0 \pm 4,8	432,4 \pm 0,9

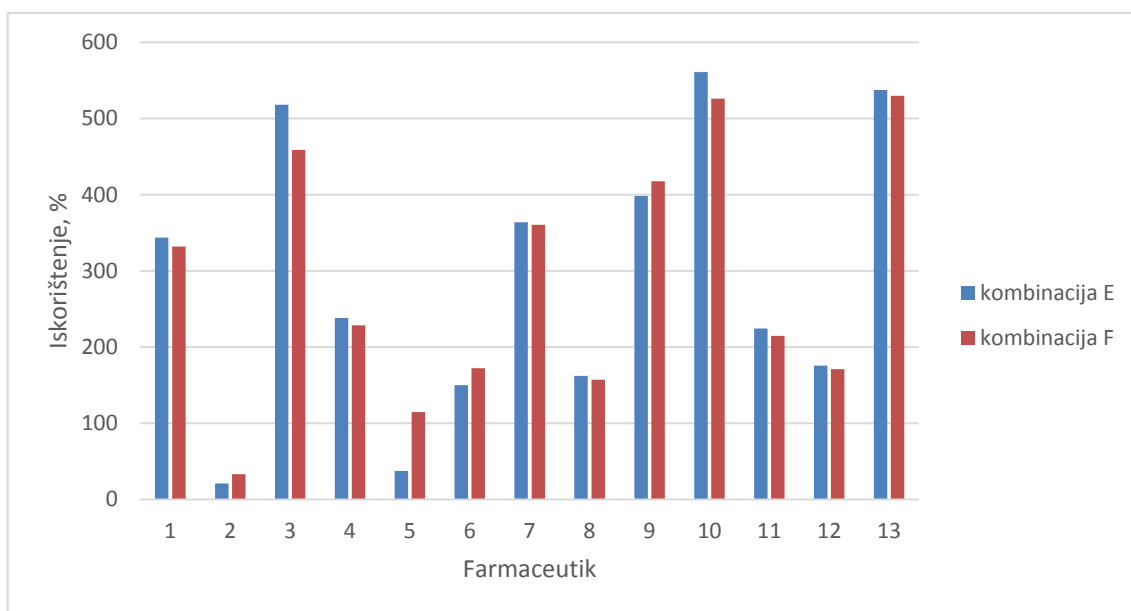


Slika 4.22. Dobivena iskorištenja farmaceutika provedbom ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja (kombinacije C i D)

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.22. Dobivena iskorištenja farmaceutika provedbom ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja (kombinacije E i F)

	Iskorištenje ± RSO, %	
	MeOH; MeOH:0,1 M NaOH = 8:2	MeOH:0,1 M NaOH = 8:2; MeOH
Albendazol	343,5 ± 1,6	331,9 ± 4,8
Azitromicin	20,7 ± 5,2	33,2 ± 5,9
Etodolak	517,8 ± 5,7	458,6 ± 6,8
Febantel	238,1 ± 1,1	228,4 ± 3,0
Imatinib	37,2 ± 18,3	114,5 ± 9,3
Levamisol	149,9 ± 5,7	172,2 ± 3,7
Linezolid	363,7 ± 10,3	360,3 ± 5,0
Omeprazol	162,2 ± 11,7	156,8 ± 8,3
Prazikvantel	398,1 ± 10,2	417,5 ± 4,5
Sulfafurazol	560,8 ± 1,5	526,0 ± 7,0
Sulfametazin	224,1 ± 2,8	214,8 ± 2,8
Tiamulin	175,4 ± 0,5	170,7 ± 4,3
Torasemid	537,1 ± 5,0	529,8 ± 7,7



Slika 4.23. Dobivena iskorištenja farmaceutika provedbom ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja (kombinacije E i F)

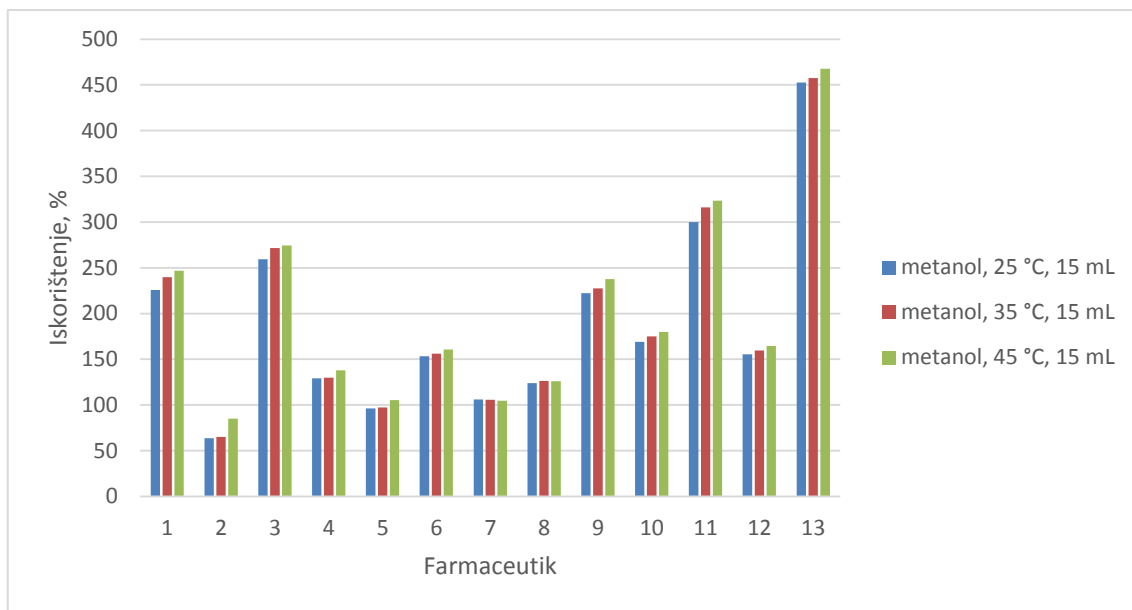
(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se najbolja iskorištenja za većinu farmaceutika dobivaju kod kombinacije metanola i acetona u omjeru 1:1. Što se tiče provođenja ultrazvučne ekstrakcije u dva stupnja uočeno je da se bolja iskorištenja dobivaju ukoliko se u prvom stupnju doda čisto otapalo, a u drugom smjesa. Međutim, iskorištenja dobivena provođenjem ekstrakcije u dva stupnja nisu značajno veća pa se ipak odlučio koristiti jedan stupanj provođenja ekstrakcije iz razloga što je to daleko jednostavnije i brže.

Iz svih dosadašnjih rezultata, može se zaključiti da se metanol kao čisto otapalo pokazao najboljim otapalom za svih 13 ispitivanih farmaceutika. Upravo iz tog razloga, zadnji set eksperimenata proveo se s ciljem optimizacije volumena otapala i temperature ekstrakcije kako bi se dobili što bolji rezultati. Korišteni volumeni bili su 15 i 20 mL, a korištene temperature 35 °C i 45 °C. Ti dobiveni rezultati uspoređeni su s prethodno dobivenim rezultatima za metanol pri 25 °C i kod volumena 10 mL. Dobiveni rezultati prikazani su u Tablicama 4.23. i 4.24. te na Slikama 4.24. i 4.25.

Tablica 4.23. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem 15 mL metanola pri temperaturama 25 °C, 35 °C i 45 °C

	Iskorištenje ± RSO, %		
	Metanol; 25 °C; 15 mL	Metanol; 35 °C; 15 mL	Metanol; 45 °C; 15 mL
Albendazol	225,9 ± 2,1	239,8 ± 1,4	246,9 ± 4,8
Azitromicin	63,6 ± 5,1	65,0 ± 4,7	85,1 ± 5,4
Etodolak	259,2 ± 3,3	271,5 ± 1,7	274,3 ± 1,8
Febantel	129,2 ± 1,6	129,8 ± 0,3	137,7 ± 5,0
Imatinib	96,2 ± 2,6	97,3 ± 2,8	105,3 ± 3,5
Levamisol	153,2 ± 2,5	155,9 ± 1,6	160,7 ± 2,3
Linezolid	105,9 ± 3,5	105,5 ± 3,0	104,6 ± 6,3
Omeprazol	123,7 ± 2,4	126,4 ± 1,2	126,1 ± 0,1
Prazikvantel	222,1 ± 3,7	227,6 ± 2,7	237,8 ± 8,6
Sulfafurazol	169,1 ± 9,4	174,8 ± 7,5	179,7 ± 6,6
Sulfametazin	299,9 ± 4,4	316,0 ± 4,7	323,5 ± 4,9
Tiamulin	155,2 ± 2,8	159,4 ± 2,1	164,5 ± 1,8
Torasemid	452,5 ± 3,6	457,6 ± 3,8	467,5 ± 7,3

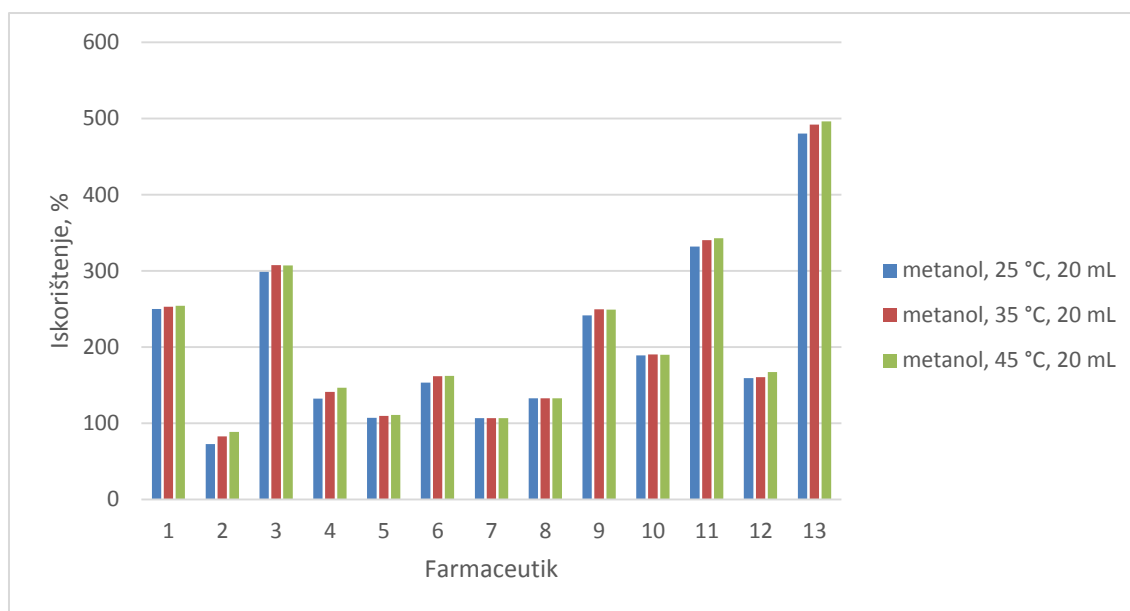


Slika 4.24. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem 15 mL metanola pri temperaturama 25 °C, 35 °C i 45 °C

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Tablica 4.24. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem 20 mL metanola pri temperaturama 25 °C, 35 °C i 45 °C

	Iskorištenje ± RSO, %		
	Metanol; 25 °C; 20 mL	Metanol; 35 °C; 20 mL	Metanol; 45 °C; 20 mL
Albendazol	250,0 ± 6,0	253,0 ± 1,8	254,0 ± 0,6
Azitromicin	72,5 ± 0,1	82,7 ± 9,7	88,7 ± 7,7
Etodolak	298,7 ± 4,7	307,5 ± 4,8	307,1 ± 0,5
Febantel	132,2 ± 2,1	141,0 ± 3,6	146,6 ± 6,2
Imatinib	107,0 ± 6,2	109,7 ± 4,6	110,7 ± 2,6
Levamisol	153,4 ± 2,8	161,5 ± 2,2	161,9 ± 0,9
Linezolid	106,6 ± 2,8	106,8 ± 1,0	106,8 ± 1,7
Omeprazol	132,5 ± 5,2	132,5 ± 5,5	132,5 ± 0,4
Prazikvantel	241,3 ± 5,1	249,6 ± 1,4	249,2 ± 0,1
Sulfafurazol	188,8 ± 8,0	190,2 ± 4,9	190,0 ± 4,9
Sulfametazin	331,6 ± 3,9	340,4 ± 3,5	342,7 ± 0,8
Tiamulin	159,1 ± 4,3	160,3 ± 1,7	166,9 ± 3,9
Torasemid	480,0 ± 6,2	492,0 ± 3,1	496,0 ± 3,2



Slika 4.25. Dobivena iskorištenja farmaceutika korištenjem 20 mL metanola pri temperaturama 25 °C, 35 °C i 45 °C

(1-albendazol, 2-azitromicin, 3-etodolak, 4-febantel, 5-imatinib, 6-levamisol, 7-linezolid, 8-omeprazol, 9-prazikvantel, 10-sulfafurazol, 11-sulfametazin, 12-tiamulin, 13-torasemid)

Budući da se kao optimalno otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju već odabrao metanol, preostalo je odabrati optimalnu temperaturu i optimalni volumen otapala. Usporedbom iskorištenja dobivenih korištenjem 15 i 20 mL metanola pri temperaturama 25 °C, 35 °C i 45 °C i svih dosad dobivenih rezultata i vrijednosti iskorištenja za 13 ispitivanih farmaceutika kao optimalna temperatura odabrana je 25 °C, a kao optimalan volumen otapala 10 mL.

4.3. Validacija

4.3.1. Validacija kod ekstrakcije farmaceutika iz vode

Nakon što su se odabrali optimalni uvjeti za ekstrakciju miješalom (metanol, pH=3,0, $V_{\text{MeOH}}=5$ mL, $t_E=30$ °C i $t_D=30$ °C) metoda je validirana. Validacija uključuje određivanje linearnosti, ponovljivosti, obnovljivosti te granice detekcije i granice kvantifikacije. Napravljeno je 16 razrijeđenja standardne otopine smjese 13 farmaceutika kako bi se odredili navedeni parametri. Linearno područje određeno je za svaki pojedini farmaceutik u uzorku vode upotrebom 6 standardnih otopina u rasponu koncentracija od 0,02 do 20 µg/L ovisno o farmaceutiku.

Tablica 4.25. Kvantitativni validacijski parametri određivanja farmaceutika u vodi

	Linearno područje, µg/L	Jednadžba linearnosti	R²	GD, µg/L	GK, µg/L
Albendazol	0,1 – 20	$A=2 \cdot 10^6 \gamma + 10274$	0,9847	0,02	0,1
Azitromicin	1 – 20	$A=55646 \gamma + 88,161$	0,9999	0,2	1,0
Etodolak	0,1 – 20	$A=616592 \gamma + 1263,8$	0,9589	0,02	0,1
Febantel	0,2 – 10	$A=2 \cdot 10^6 \gamma + 34804$	0,8998	0,1	0,2
Imatinib	0,2 – 10	$A=623284 \gamma + 5550,2$	0,9752	0,1	0,2
Levamisol	0,2 – 10	$A=4 \cdot 10^6 \gamma + 7719,2$	0,9986	0,1	0,2
Linezolid	0,2 – 20	$A=28895 \gamma + 249,2$	0,9821	0,1	0,2
Omeprazol	0,2 – 10	$A=130383 \gamma + 2288$	0,9689	0,1	0,2
Prazikvantel	0,1 – 20	$A=3 \cdot 10^6 \gamma + 3046,6$	0,9761	0,02	0,1
Sulfafurazol	1 – 10	$A=16889 \gamma + 221,61$	1,0000	1,0	10,0
Sulfametazin	0,2 – 10	$A=176001 \gamma + 741,76$	0,9909	0,1	0,2
Tiamulin	0,2 – 10	$A=4 \cdot 10^6 \gamma + 17996$	0,9912	0,1	0,2
Torasemid	0,1 – 10	$A=3 \cdot 10^6 \gamma + 5836,8$	0,9836	0,02	0,1

Tablica 4.26. Iskorištenja trinaest ispitivanih farmaceutika za tri koncentracijska nivoa

	Koncentracija, µg/L	Iskorištenje ± RSO, % (n=3)
Albendazol	0,2	22,1 ± 15,9
	1	11,1 ± 6,2
	10	2,8 ± 7,7
Azitromicin	1	5,5 ± 36,5
	10	2,2 ± 15,5
	20	3,0 ± 32,0
Etodolak	0,2	13,5 ± 11,7
	1	8,3 ± 16,8
	10	1,5 ± 8,8
Febantel	0,2	6,0 ± 5,1
	1	11,0 ± 28,9
	10	3,1 ± 11,8
Imatinib	0,2	15,3 ± 9,2
	1	6,3 ± 8,0
	10	1,5 ± 6,4
Levamisol	0,2	10,5 ± 4,5
	1	6,7 ± 16,1
	10	3,4 ± 6,7
Linezolid	0,2	9,9 ± 12,9
	1	4,3 ± 19,2
	10	1,1 ± 12,8
Omeprazol	0,2	2,6 ± 6,8
	1	1,5 ± 0,5
	10	0,3 ± 0,4
Prazikvantel	0,2	12,8 ± 0,1
	1	8,3 ± 9,8
	10	3,1 ± 8,8
Sulfafurazol	-	-
	10	4,9 ± 19,3
	20	3,9 ± 11,0
Sulfametazin	0,2	7,0 ± 11,8
	1	5,6 ± 14,8
	10	1,2 ± 7,3
Tiamulin	0,2	11,1 ± 16,9
	1	4,7 ± 4,8
	10	1,5 ± 10,1
Torasemid	0,2	10,3 ± 11,0
	1	5,3 ± 6,4
	10	1,8 ± 8,8

Tablica 4.27. Ponovljivost i obnovljivost

	Ponovljivost (RSO, %)	Obnovljivost (RSO, %)
Albendazol	8,4	23,5
Azitromicin	8,9	30,0
Etodolak	13,4	37,1
Febantel	16,1	28,4
Imatinib	11,6	39,1
Levamisol	7,1	44,0
Linezolid	19,5	40,5
Omeprazol	5,2	17,8
Prazikvantel	17,0	21,6
Sulfafurazol	20,4	38,5
Sulfametazin	6,2	37,2
Tiamulin	10,4	42,8
Torasemid	11,9	39,5

Rezultati dobiveni linearnom regresijskom analizom prikazani su u Tablici 4.25. Navedeni kvantitativni validacijski parametri su: linearno područje, jednadžba linearnosti, R^2 (regresijski koeficijent), granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK). Može se zaključiti da visoke vrijednosti regresijskog koeficijenta ukazuju na linearnost metode. Granice detekcije i kvantifikacije eksperimentalno su određene iz omjera signala i šuma usporedbom mjerenog signala ispitivanog farmaceutika s mjerenim signalom slijepe probe. Za granicu detekcije taj omjer mora iznositi 3, a za granicu kvantifikacije 10. Za 13 ispitivanih farmaceutika granice detekcije kreću se od 0,02 do 1 $\mu\text{g/L}$, a granice kvantifikacije od 0,1 do 10 $\mu\text{g/L}$.

U Tablici 4.26. prikazana su iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika za tri koncentracijska nivoa kako bi se ispitaio utjecaj koncentracije unutar linearnog područja na učinkovitost ekstrakcije analita. Vidljivo je da se kod azitromicina, omeprazola te sulfafurazola iskorištenja ne razlikuju značajno za sva tri koncentracijska nivoa. Također, iako su vrijednosti iskorištenja općenito dosta mala, ostali farmaceutici pokazuju nešto veće razlike u iskorištenjima što ne odgovara teoriji prema kojoj se iskorištenja u optimalnim uvjetima ne bi trebala značajno mijenjati.

Posljednji korak kod validacije bio je određivanje preciznosti metode koja je iskazana kao ponovljivost i obnovljivost. Ponovljivost je ispitana tijekom pet uzastopnih ponavljanja u istom danu, a obnovljivost tijekom spomenutih pet uzastopnih ponavljanja u tri različita dana. U Tablici 4.27. prikazani su dobiveni rezultati. Može se uočiti da najmanje relativno standardno odstupanje (RSO) za ponovljivost ima omeprazol (5,2 %), a najveće sulfafurazol (20,4 %). Isto tako, najmanje relativno standardno odstupanje odnosno najbolju obnovljivost pokazuje omeprazol (17,8 %), a najveće levamisol (44 %).

4.3.2. Validacija kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta

Postupak validacije provodio se na identičan način kao kod ekstrakcije miješalom. Nakon što su se odabrali optimalni uvjeti za ultrazvučnu ekstrakciju (metanol, $V_{\text{MeOH}}=10 \text{ mL}$, $t_{\text{E}}=25 \text{ }^{\circ}\text{C}$) metoda je validirana. Za određivanje parametara koristilo se onih spomenutih 16 razrijeđenja standardne otopine smjese 13 ispitivanih farmaceutika. Linearno područje određeno je za svaki pojedini farmaceutik u uzorku sedimenta upotrebom 9 standardnih otopina u rasponu koncentracija od 0,025 do 20 $\mu\text{g/g}$ ovisno o farmaceutiku.

Tablica 4.28. Kvantitativni validacijski parametri određivanja farmaceutika u sedimentu

	Linearno područje, $\mu\text{g/g}$	Jednadžba linearnosti	R^2	GD, $\mu\text{g/g}$	GK, $\mu\text{g/g}$
Albendazol	1 – 20	$A=75676\gamma-39070$	0,9896	0,25	1,0
Azitromicin	5 – 20	$A=365,93\gamma+315,33$	0,9965	1,0	5,0
Etodolak	0,25 – 20	$A=34827\gamma-21207$	0,9959	0,1	0,25
Febantel	0,025 – 10	$A=253219\gamma+27612$	0,9990	0,0025	0,025
Imatinib	0,25 – 20	$A=30392\gamma-7901,4$	0,9974	0,025	0,25
Levamisol	0,1 – 10	$A=103435\gamma+26302$	0,9856	0,01	0,1
Linezolid	0,1 – 10	$A=3650,2\gamma+373,71$	0,9949	0,025	0,1
Omeprazol	0,025 – 20	$A=116780\gamma-11729$	0,9983	0,01	0,025
Prazikvantel	0,1 – 20	$A=63460\gamma-29511$	0,9898	0,025	0,1
Sulfafurazol	5 – 10	$A=419,89\gamma-917$	0,9878	1,0	5,0
Sulfametazin	0,1 – 10	$A=18094\gamma-2000,2$	0,9980	0,025	0,1
Tiamulin	0,1 – 20	$A=309950\gamma+120960$	0,9938	0,025	0,1
Torasemid	1 – 20	$A=144167\gamma-99151$	0,9941	0,25	1,0

Tablica 4.29. Iskorištenja trinaest ispitivanih farmaceutika za tri koncentracijska nivoa

	Koncentracija, $\mu\text{g/g}$	Iskorištenje \pm RSO, % (n=3)
Albendazol	1	57,9 \pm 11,4
	5	86,7 \pm 2,8
	20	157,0 \pm 8,7
Azitromicin	5	12,0 \pm 1,1
	10	12,6 \pm 5,4
	20	10,4 \pm 5,2
Etodolak	1	60,8 \pm 11,3
	5	66,3 \pm 2,9
	20	87,3 \pm 5,5
Febantel	0,25	66,0 \pm 0,5
	5	67,3 \pm 1,7
	20	82,7 \pm 3,1
Imatinib	1	35,9 \pm 8,2
	5	49,5 \pm 3,9
	20	81,0 \pm 6,7
Levamisol	0,25	58,7 \pm 5,6
	5	80,0 \pm 1,9
	20	90,6 \pm 7,3
Linezolid	0,25	76,8 \pm 7,2
	5	95,1 \pm 2,3
	20	127,6 \pm 4,6
Omeprazol	0,25	47,8 \pm 12,1
	5	75,8 \pm 3,0
	20	97,6 \pm 6,8
Prazikvantel	0,25	83,7 \pm 8,3
	5	93,8 \pm 2,2
	20	76,9 \pm 5,9
Sulfafurazol	5	68,6 \pm 2,1
	10	57,4 \pm 5,3
	20	129,5 \pm 0,6
Sulfametazin	0,25	55,8 \pm 3,1
	5	83,0 \pm 1,4
	10	118,6 \pm 7,2
Tiamulin	0,25	69,8 \pm 8,4
	5	85,9 \pm 0,8
	10	89,2 \pm 3,7
Torasemid	1	61,0 \pm 7,6
	5	83,2 \pm 1,7
	10	88,3 \pm 6,6

Tablica 4.30. Ponovljivosti i obnovljivost

	Ponovljivost (RSO, %)	Obnovljivost (RSO, %)
Albendazol	4,2	16,0
Azitromicin	5,2	10,1
Etodolak	4,5	17,5
Febantel	4,5	5,0
Imatinib	3,8	15,0
Levamisol	4,7	5,7
Linezolid	3,9	11,3
Omeprazol	2,8	16,2
Prazikvantel	6,4	9,9
Sulfafurazol	5,6	13,8
Sulfametazin	5,8	11,0
Tiamulin	2,6	6,4
Torasemid	7,3	8,4

Rezultati dobiveni linearnom regresijskom analizom prikazani su u Tablici 4.28. Visoke vrijednosti regresijskog koeficijenta i kod ove metode ukazuju na njenu linearnost. Granice detekcije se za 13 ispitivanih farmaceutika kreću od 0,0025 do 1 $\mu\text{g/g}$, a granice kvatifikacije od 0,025 do 5 $\mu\text{g/g}$.

U Tablici 4.29. prikazana su iskorištenja 13 ispitivanih farmaceutika za tri koncentracijska nivoa. Može se uočiti da se jedino kod azitromicina vrijednosti iskorištenja ne mijenjaju značajno za sva tri koncentracijska nivoa. Kod svih ostalih farmaceutika vidljive su znatno veće razlike u vrijednostima iskorištenja. Također, vrijednosti iskorištenja su znatno veća od onih kod ekstrakcije miješalom. Isto tako, kod albendazola, linezolida, sulfafurazola i sulfametazina vidljive su vrijednosti iskorištenja veće od 100 % što ukazuje na utjecaj matice uzorka sedimenta.

Preciznost metode iskazana kao ponovljivost i obnovljivost ispitana je na isti način kao kod ekstrakcije miješalom. U Tablici 4.30. prikazani su dobiveni rezultati. Može se uočiti da najmanje relativno standardno odstupanje (RSO) za ponovljivost ima tiamulin (2,6 %), a najveće prazikvantel (6,4 %). Isto tako, najmanje relativno standardno odstupanje odnosno najbolju obnovljivost pokazuje febantel (5,0 %), a najveće omeprazol (16,2 %).

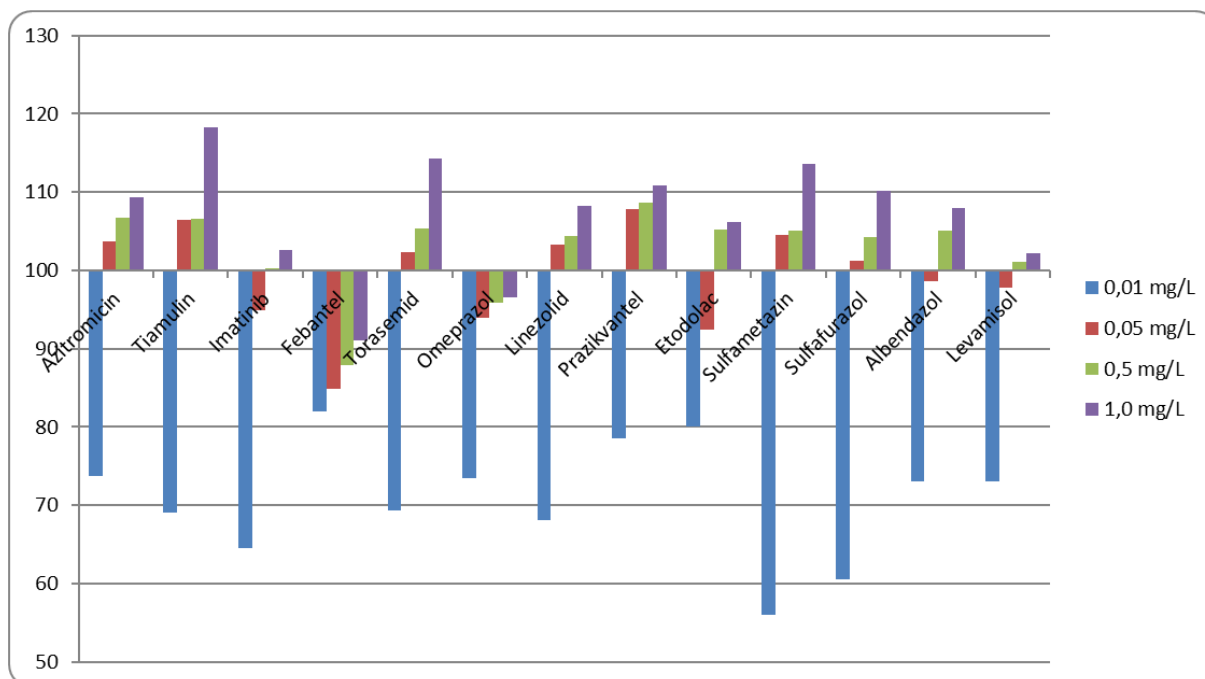
4.4. Utjecaj matice

4.4.1. Utjecaj matice kod ekstrakcije farmaceutika iz vode

U posljednje vrijeme, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) vezana sa spektrometrijom masa (MS/MS) pokazala se kao dobra metoda za kvantitativno određivanje lijekova i metabolita u biološkim fluidima. Naime, opaženo je da je MS/MS detekcija visoko selektivna i prema tome efektivno eliminira interferencije od strane nečistoća. Određivanje utjecaja matice dopušta procjenu pouzdanosti i selektivnosti postojeće HPLC-MS/MS metode. Ukoliko rezultati nisu zadovoljavajući, određeni parametri mogu biti vodič za promjene koje bi se mogle primijeniti u metodi kako bi se poboljšala selektivnost [43].

Utjecaj matice pripisuje se prisutnošću aktivnih mjesta u injektoru što uzrokuje razlike u promatranim rezultatima za dani analit u otapalu u usporedbi s rezultatom u uzorku matice. Prisutnost matice u injektiranom ekstraktu uzorka može blokirati aktivna mjesta u injektoru, spriječiti termalnu razgradnju te može imati značajan efekt na vrijednosti iskorištenja [44]. Posebice je izražen kada se koristi ionizacija elektroraspršenjem. Utjecaj matice specifičan je za svaki analit, promjenjiv je ovisno o matici, teško ga je predvidjeti i u konačnici vodi pogrešnim rezultatima [45]. Rezultira u supresiji (smanjenju) ili povećanju signala analita; kod prevelikog utjecaja može dovesti do pojave lažno negativnog signala, ili do povećanja lažno pozitivnog rezultata što u konačnici utječe na točnost i preciznost metode [46].

Kako bi se ispitaio utjecaj matice provela se usporedba signala analita iz vode i signala analita iz otapala. Slika 4.26. prikazuje utjecaj matice svih 13 ispitivanih farmaceutika za koncentracije u vodi 0,01; 0,05; 0,5 i 1,0 mg/L.

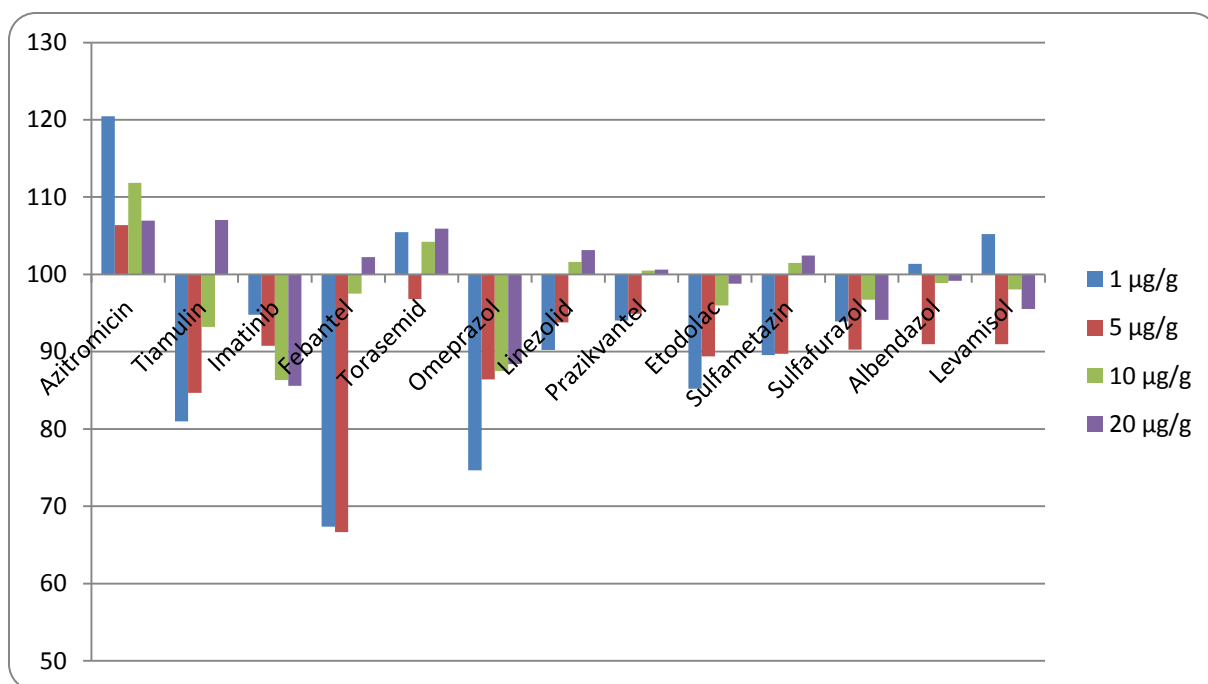


Slika 4.26. Utjecaj matice kod ekstrakcije miješalom na četiri koncentracijska nivoa

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da većina farmaceutika (azitromicin, imatinib, omeprazol, linezolid, etodolac, sulfafurazol, albendazol i levamisol) ne pokazuje znatan utjecaj matice (vrijednosti na osi y se kreću od 90 – 110 %) osim pri najnižoj koncentraciji što se vidi iz promjene signala koja je manja od 10 %. Kod tiamulina, torasemida, prazikvantela i sulfametazina utjecaj matice je znatan za dvije koncentracije (najnižu i najvišu, posebice najnižu) dok febantel jedino za najvišu koncentraciju ne pokazuje znatan utjecaj matice (za ostale tri pokazuje).

4.4.2. Utjecaj matice kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta

Isto kao i kod ekstrakcije miješalom, i kod ove metode se ispitaio utjecaj matice tako da se signal analita iz sedimenta usporedio sa signalom analita iz otapala. Slika 4.27. prikazuje utjecaj matice svih 13 ispitivanih farmaceutika za koncentracije u sedimentu 1; 5; 10 i 20 µg/g.



Slika 4.27. Utjecaj matice kod ultrazvučne ekstrakcije na četiri koncentracijska nivoa

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da je utjecaj matice u potpunosti zanemariv kod torasemida, linezolida, prazikvantela, sulfafurazola, albendazola i levamisola ($\pm 10\%$). Azitromicin pokazuje nešto znatniji utjecaj matice pri najnižoj koncentraciji dok je kod tiamulina, febantela, etodolka i sulfametazina taj utjecaj prisutan kod prve dvije najniže koncentracije. Imatinib znatniji utjecaj matice pokazuje za dvije najviše koncentracije dok je kod omeprazola taj utjecaj značajan za sve četiri koncentracije.

4.5. Analiza realnih uzoraka

4.5.1. Analiza realnih uzoraka kod ekstrakcije farmaceutika iz vode

Nakon optimiranja i validiranja metode provela se analiza realnih uzoraka. Kao realni uzorci koristili su se uzorci otpadnih voda (OV) iz farmaceutske industrije (njih 5). Oni su analizirani metodom standardnog dodatka i to na način da su se pripremili uzorci bez standardnog dodatka te uz dodatak standardne otopine smjese farmaceutika koncentracije 0,001 mg/L odnosno 0,005 mg/L. Dobivene vrijednosti uspoređene su s vrijednostima granica detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) primijenjene metode. Tablica 4.31. prikazuje dobivene rezultate.

Tablica 4.31. Koncentracije ispitivanih farmaceutika u uzorcima otpadnih voda

Farmaceutik	Koncentracija farmaceutika u realnom uzorku vode						
	GD, µg/L	GK, µg/L	OV1	OV2	OV3	OV4	OV5
Albendazol	0,02	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Azitromicin	0,2	1,0	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Etodolak	0,02	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Febantel	0,1	0,2	n.d.	n.d.	<GD	0,317	n.d.
Imatinib	0,1	0,2	0,101	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Levamisol	0,1	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	1,38
Linezolid	0,1	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Omeprazol	0,1	0,2	n.d.	1,37	<GD	n.d.	n.d.
Prazikvantel	0,02	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfafurazol	1,0	10	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfametazin	0,1	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tiamulin	0,1	0,2	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Torasemid	0,02	0,1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	<GK

(OV1 – bazen 2; OV2 – Bistra Mladica; OV3 – bazen 1; OV4 – ulaz Pliva; OV5 – izlaz Pliva)
(n.d. – nije detektiran)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da albendazol, azitromicin, etodolak, linezolid, prazikvantel, sulfafurazol, sulfametazin i tiamulin nisu detektirani niti u jednom realnom uzorku. Isto tako, od ostalih farmaceutika, niti jedan nije prisutan u više od dva uzorka otpadnih voda. Febantel je detektiran u otpadnoj vodi OV4 dok mu je u OV3 koncentracija manja od granice detekcije. Imatinib je detektiran samo u OV1; omeprazol u OV2 dok mu je u OV3 koncentracija manja od granice detekcije. Kod torasemida je u OV5 koncentracija manja od granice kvantifikacije.

4.5.2. Analiza realnih uzoraka kod ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta

Kao i kod prethodne metode i u ovoj se metodi nakon optimiranja i validiranja metode provela analiza realnih uzoraka. Kao realni uzorci koristili su se uzorci sedimenta i tla prikupljeni na različitim lokacijama (njih 7). Oni su analizirani metodom standardnog dodatka i to na način da su se pripremili uzorci bez standardnog dodatka te uz dodatak standardne otopine smjese farmaceutika koncentracije 10 mg/L odnosno 20 mg/L. Dobivene vrijednosti uspoređene su s vrijednostima granica detekcije (GD) i kvantifikacije (GK) primijenjene metode. Tablica 4.32. prikazuje dobivene rezultate.

Tablica 4.32. Koncentracije ispitivanih farmaceutika u zagađenim uzorcima sedimenta i tla

Farmaceutik	Koncentracija farmaceutika u realnim uzorcima sedimenta i tla								
	GD, µg/L	GK, µg/L	1	2	3	4	5	6	7
Albendazol	0,25	1,0	1,48	1,03	<GK	<GK	<GK	1,30	82,58
Azitromicin	1,0	5,0	<GK	<GD	<GD	<GD	<GK	n.d.	n.d.
Etodolak	0,1	0,25	0,44	n.d.	0,78	0,55	1,35	n.d.	18,66
Febantel	0,0025	0,025	0,72	1,09	2,74	1,22	0,88	5,70	11,42
Imatinib	0,025	0,25	1,10	<GK	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	52,74
Levamisol	0,01	0,1	0,95	0,97	0,75	0,52	<GK	3,79	105,6
Linezolid	0,025	0,1	0,78	n.d.	0,66	0,95	0,88	<GK	37,77
Omeprazol	0,01	0,025	0,59	0,51	n.d.	0,32	1,45	n.d.	8,38
Prazikvantel	0,025	0,1	0,9	0,73	<GK	0,77	<GK	1,08	229,0
Sulfafurazol	1,0	5,0	<GD	<GD	<GD	<GD	<GD	n.d.	13,91
Sulfametazin	0,025	0,1	0,89	1,22	0,86	0,50	0,35	0,43	43,75
Tiamulin	0,025	0,1	0,98	0,79	0,49	0,10	n.d.	0,13	140,9
Torasemid	0,25	1,0	1,06	<GD	n.d.	n.d.	<GD	<GD	38,16

(n.d. – nije detektiran)

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da su azitromicin, etodolak, imatinib, linezolid, omeprazol, sulfafurazol, tiamulin i torasemid detektirani u minimalno jednom realnom uzorku sedimenata odnosno tla. Najviše farmaceutika pronađeno je u uzorku 7, i to svi osim azitromicina. Imatinib je detektiran u najmanje uzoraka i to u uzorku 1 i uzorku 7. U uzorku 2 njegova se koncentracija nalazi ispod granice kvantifikacije. Albendazol, febantel, levamisol, prazikvantel i sulfametazin su jedini farmaceutici koji su detektirani u svih sedam uzoraka sedimenata odnosno tla.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu primijenjena je prethodno razvijena metoda za određivanje trinaest farmaceutski aktivnih tvari različitih fizikalno-kemijskih svojstava u uzorcima vode i sedimenta. Provodio se postupak ekstrakcije miješalom i ultrazvučne ekstrakcije. Nakon toga, farmaceutski aktivne tvari analizirane su i kvantificirane UHPLC-MS/MS metodom. Utvrđeno je da je za optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika iz vode najbolje čisto organsko otapalo, metanol, volumena 5 mL pri temperaturi ekstrakcije i desorpcije 30 °C i pH vrijednosti vode 3. Isto tako, za optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom odabrano je čisto organsko otapalo, metanol, volumena 10 mL pri temperaturi ekstrakcije 25 °C.

Visoke vrijednosti regresijskog koeficijenta (R^2) ukazuju na linearnost metode. Kod ekstrakcije miješalom se granice detekcije za ispitivane farmaceutike kreću od 0,02 do 1 µg/L dok su granice kvantifikacije u rasponu od 0,1 do 10 µg/L. Kod ultrazvučne ekstrakcije se granice detekcije nalaze u rasponu od 0,0025 do 1 µg/g dok se granice kvantifikacije kreću između 0,025 i 5 µg/g. Također se odredila i preciznost metode iskazana kao ponovljivost i obnovljivost. Uočeno je da kod ekstrakcije miješalom najmanje relativno standardno odstupanje (RSO) za ponovljivost ima omeprazol (5,2 %), a najveće sulfafurazol (20,4 %). Isto tako, najbolju obnovljivost ima omeprazol (17,8 %), a najlošiju levamisol (44 %). Kod ultrazvučne ekstrakcije, najmanje RSO za ponovljivost ima tiamulin (2,6 %), a najveće prazikvantel (6,4 %) dok najbolju obnovljivost pokazuje febantel (5,0 %), a najlošiju omeprazol (16,2 %).

Uz validacijske značajke ispitao se i utjecaj matice. Kod ekstrakcije miješalom većina farmaceutika ne pokazuje znatan utjecaj matice osim pri najnižoj koncentraciji. Najveći učinak matice, u slučaju ekstrakcije miješalom, primijećen je kod febantela. S druge strane, kod ultrazvučne ekstrakcije je utjecaj matice u potpunosti zanemariv kod torasemida, linezolida, prazikvantela, sulfafurazola i levamisola. U slučaju ultrazvučne ekstrakcije, najveći je utjecaj matice prisutan kod omeprazola.

Nakon optimizacije i validacije metode provela se analiza realnih uzoraka. U slučaju ekstrakcije miješalom kao realni uzorci korišteni su uzorci otpadnih voda (OV) iz farmaceutske industrije (njih 5) dok je kod ultrazvučne ekstrakcije korišteno 7 realnih uzoraka sedimenta i tla prikupljenih s različitih područja. Kod ekstrakcije miješalom, albendazol,

azitromicin, etodolak, linezolid, prazikvantel, sulfafurazol, sulfametazin i tiamulin nisu detektirani niti u jednom realnom uzorku. Ostali farmaceutici nisu prisutni u više od dva uzorka otpadnih voda. Kod ultrazvučne ekstrakcije je najviše farmaceutika detektirano u uzorku 7, i to svi osim azitromicina. Jedini farmaceutici koji su detektirani u svih sedam uzoraka sedimenata i tla su albendazol, febantel, levamisol, prazikvantel i sulfametazin.

Iz svega navedenog može se zaključiti kako su primijenjene metode vrlo efikasne i omogućuje jednostavnu detekciju i kvantifikaciju ispitivanih farmaceutika iz realnih uzoraka vode te sedimenta odnosno tla.

6. LITERATURA

- [1] K. Kümmerer: *Pharmaceuticals in the Environment Sources, Fate, Effects and Risks*, Springer, Second edition, 2004., str. 3.
- [2] Skupina autora, *Analitika okoliša*, ur. M. Kaštelan-Macan i M. Petrović, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb 2013., str. 75, 140 – 161
- [3] Antibiotici, <http://www.romanadekic.com/antibiotici.php> (pristup lipanj 2019.)
- [4] Antibiotici, <https://www.farmacia.hr/farmacia-savjetuje/clanci/57/sve-o-antibioticima/> (pristup lipanj 2019.)
- [5] Klasifikacija antibiotika, <http://www.bionet-skola.com/w/Antibiotici> (pristup lipanj 2019.)
- [6] Antibiotici, <http://arhiva.medri.uniri.hr/jeka/antibiotici.html> (pristup lipanj 2019.)
- [7] Antibiotici, <https://patient.info/health/antibiotics-leaflet> (pristup lipanj 2019.)
- [8] Azitromicin, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Azithromycin> (pristup lipanj 2019.)
- [9] Azitromicin, <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a697037.html> (pristup lipanj 2019.)
- [10] Farmaceutici, <https://www.drugbank.ca/> (pristup lipanj 2019.)
- [11] Linezolid, <https://en.wikipedia.org/wiki/Linezolid> (pristup lipanj 2019.)
- [12] Sulfafurazol, <https://pharmacycode.com/Sulfafurazol.html> (pristup lipanj 2019.)
- [13] Sulfametazin, <https://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search/a?dbs+hsdb:@term+@DOCNO+4157> (pristup lipanj 2019.)
- [14] D. Krasucka, A. Mitura, W. Cybulski, K. Kos, W. Pietro, Tiamulin hydrogen fumarate-veterinary uses and HPLC method of determination in premixes and medicated feeding stuffs, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research* **67** (6) (2010) 682-685.
- [15] Antihelmintici, <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2954> (pristup lipanj 2019.)
- [16] A. Kar, *Medicinal chemistry*, New Age International (P) Ltd. Publishers, New Delhi, 2007., str. 653- 654.

- [17] Antihelmintici, <https://www.stetoskop.info/odeljci-knjiga/antihelmintici> (pristup lipanj 2019.)
- [18] Febantel, https://www.ema.europa.eu/en/documents/mrl-report/febantel-extrapolation-all-ruminants-summary-report-4-committee-veterinary-medicinal-products_en.pdf (pristup lipanj 2019.)
- [19] Citostatici, <http://mediko.sveznadar.info/20Lijekovi/80Citostatici/Citostatici.html>
- [20] Diuretici, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Diuretici> (pristup lipanj 2019.)
- [21] M. A. Diskunets, S. A. Appolonova, G. M. Rodchenkov, Matrix Effect on the Determination of Synthetic Corticosteroids and Diuretics by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *Russian Journal of Physical Chemistry A*, **83** (4) (2009) 513-519.
- [22] C. March, D. Farthing, B. Wells, E. Besenfelder, H. T. Karnes, Solid-Phase Extraction and Liquid Chromatography of Torsemide and Metabolites from Plasma and Urine, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **79** (5) (1990) 453-457.
- [23] Torasemid, <https://hr.wikipedia.org/wiki/Torasemid> (pristup lipanj 2019.)
- [24] Etodolak, <https://www.webmd.com/drugs/2/drug-214-428/etodolac-oral/etodolac-oral/details> (pristup lipanj 2019.)
- [25] Omeprazol, <https://www.zdravstvo.com/lijeci/omeprazol.htm> (pristup lipanj 2019.)
- [26] Omeprazol, <https://en.wikipedia.org/wiki/Omeprazole> (pristup lipanj 2019.)
- [27] Ekstrakcija, <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=ekstrakcija> (pristup lipanj 2019.)
- [28] H. Drmić, A. Režek Jambrak, Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, pregledni rad, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2010.
- [29] M. Gretić, Ultrazvučna, mikrovalna i tlačna ekstrakcija otapalom, seminarski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
- [30] M. Brnčić, B. Tripalo, A. Penava, D. Karlović, D. Ježek, D. Vikić Topić, S. Karlović, T. Bosiljkov, Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* **4** (2009) 32-37.

- [31] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-238.
- [32] A. Braithwaite, F. J. Smith, Chromatographic Methods, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2002, str. 258-261.
- [33] T. Milekić, Razvoj UPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija antihelmintika, diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
- [34] HPLC,
https://www.google.com/search?q=teku%C4%87inska+kromatografija+visoke+djelotvornosti&client=firefox-b-d&source=lnms&tbn=isch&sa=X&ved=0ahUKEwisyoZ88MrjAhUoURUIHavuC5cQ_AUIESgB&biw=1536&bih=750#imgrc=marp4PP6c9XxZM: (pristup lipanj 2019.)
- [35] Febantel, <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Febantel#section=CrystalStructures> (pristup, lipanj 2019.)
- [36] Prazikvantel, <https://en.wikipedia.org/wiki/Praziquantel> (pristup lipanj 2019.)
- [37] Tiamulin,
https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7171536.htm (pristup lipanj 2019.)
- [38] Analitička vaga, <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=analiti%C4%8Dka+vaga> (pristup travanj 2019.)
- [39] Analitička vaga,
<https://www.google.hr/search?q=analiti%C4%8Dka+vaga&client=firefox-b-ab&tbn=isch&tbo=u&source=univ&sa=X&ved=0ahUKEwj7mLfwrtfUAhXsF5oKHbWhAPAQsAQIMg&biw=2048&bih=1051#imgrc=w0H2ewpk04zt0M>: (pristup travanj 2019.)
- [40] pH – metar, <https://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=pH-metar> (pristup lipanj 2019.)
- [41] Rotacijski uparivač, https://en.wikipedia.org/wiki/Rotary_evaporator (pristup lipanj 2019.)

- [42] K. Tolić, Ekstrakcija farmaceutika iz vode, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.
- [43] B. K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C. M. Chavez-Eng, Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC-MS/MS, *Analytical Chemistry* **75** (13) (2003) 3019-3030.
- [44] G. Peček, D. M. Pavlović, S. Babić, Development and validation of a SPE-GC-MS method for the determination of pesticides in surface water, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* **93** (12) (2013) 1311-1328.
- [45] Utjecaj matice, <https://www.bib.irb.hr/722223> (pristup srpanj 2019.)
- [46] S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, M. Periša, M. Zrnčić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS), *Anal Bioanal Chem* **398** (2010) 1185-1194.

7. ŽIVOTOPIS

████████████████████ Osnovnoškolsko obrazovanje završavam u Osnovnoj školi Bartola Kašića. Paralelno pohađam i Osnovnu muzičku školu „Glazbeno učilište Elly Bašić“. 2008. godine upisujem srednju muzičku školu „Glazbeno učilište Elly Bašić“, a 2009. Gimnaziju Tituša Brezovačkog. Od akademske godine 2013./2014. pohađam Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, sveučilišni preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo. Tijekom treće godine studija postajem demonstrator na kolegijima Analitička kemija II, Upravljanje kvalitetom i Analitička kemija. Praksu odrađujem u Zavodu za javno zdravstvo na Odjelu za predmete opće uporabe. Od akademske godine 2017./2018. upisujem diplomski studij na istom fakultetu, modul Kemijsko inženjerstvo. Tijekom akademske godine 2018./2019. volontirala sam na dvadeset šestom hrvatskom skupu kemičara i kemijskih inženjera u Šibeniku. Koautorica sam jednog rada objavljenog u *Current Contents* časopisu. Tijekom školovanja primila sam tri stipendije grada Zagreba za izvrsnost.

Od stranih jezika koristim se osnovama engleskog i njemačkog jezika. Od računalnih programa služim se *Microsoft Word*, *Excel*, *Power Point* programom te koristim osnove programa *Matlab*.

Izvorni znanstveni radovi u *Current Contents* časopisima:

K. Tolić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Židanić, M. Runje, Nitrofurantoin in sediments and soils: Sorption, isotherms and kinetics, *Sci. Total. Environ.* **681** (2019) 9-17.