

Validacija ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja

Bule, Kristina

Undergraduate thesis / Završni rad

2018

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:666799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-17**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Bule

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Bule

**VALIDACIJA ULTRAZVUČNE EKSTRAKCIJE
FARMACEUTIKA IZ AKTIVNOG MULJA**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Doc. dr. sc. Davor Dolar

Dr. sc. Mirjana Novak Stankov

Zagreb, rujan 2018.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger koja me primila pod svoje mentorstvo i pomogla mi sa stručnim savjetima pri izradi ovog rada.

Zahvaljujem se asistentici dr. sc. Mirti Čizmić na svim savjetima, prijedlozima i općenito na velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela rada i obrade rezultata.

Također se zahvaljujem tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić koje su uvijek bile tu za mene i pružile mi svu moguću pomoć koju su mogle u laboratoriju prilikom provođenja eksperimenata.

Najveće zahvale idu mojoj obitelji, dečku Igoru i svim prijateljima koji su mi bili velika podrška kroz ove tri godine studija. Zahvaljujem se svima koji su mi na bilo koji način pomogli da doguram do ovdje, a i dalje!

SAŽETAK

Validacija ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja

Farmaceutici su kemijski spojevi koji se upotrebljavaju najčešće u farmaceutskoj industriji. Koriste se za liječenje ili sprječavanje bolesti ljudi i životinja. Nazivaju se novim onečišćivačima jer do sada nisu posebno proučavani, niti postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. U posljednje vrijeme ispuštaju se u okoliš u sve većim količinama i predstavljaju potencijalnu opasnost za živi svijet. Iako do sad nismo sa sigurnošću upoznati s načinom njihovog ponašanja u okolišu, vrlo je bitno razviti najbolje metode kvalitativnog i kvantitativnog određivanja aktivnih farmaceutskih tvari u različitim sastavnicama okoliša, kao i metode za njihovo uklanjanje iz istih.

Ovaj rad proučava uklanjanje farmaceutika ultrazvučnom ekstrakcijom iz aktivnog mulja. Aktivni mulj koji se analizirao nije sadržavao farmaceutike. Naknadno je onečišćen slijedećim farmaceuticima: albendanzol, febantel, prazikvantel, nitrofurantoin, cefdinir, hidroksiklokin i metoklopramid. Provedena je ultrazvučna ekstrakcija primjenom različitih otapala: metanol, etanol i metanol-voda u omjeru 1:1. Separacija i kvalitativna analiza farmaceutika provedeni su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti (HPLC).

Najbolji rezultat dobiven je ultrazvučnom ekstrakcijom pri temperaturi 30°C i u trajanju od 60min, a kao najpogodnijim otapalom za ekstrakciju pokazao se metanol.

Međutim, niti jedno otapalo nije dalo zadovoljavajuće rezultate te se ultrazvučna ekstrakcija kao metoda uklanjanja farmaceutika iz aktivnog mulja ne preporuča.

Metoda je validirana određivanjem ponovljivosti, obnovljivosti, granice detekcije i granice kvantifikacije.

Ključne riječi: *farmaceutici, aktivni mulj, ultrazvučna ekstrakcija, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, validacija*

ABSTRACT

Validation of ultrasonic extraction of pharmaceuticals from active sludge

Pharmaceuticals are the chemical compounds most commonly used in the pharmaceutical industry and they are used to treat or prevent diseases of humans and animals. They are referred to as new pollutants because they have not been researched so far and there are no legal regulations on their release into the environment. They are chemical substances that are released to the environment in larger quantities and pose a potential danger to the living world. Although we are not familiar with the way they behave in the environment, it is very important to develop the best methods of qualitative and quantitative determination of active pharmaceutical substances in different environmental constituents as well as methods for their elimination.

This paper studies the removal of the pharmaceuticals by ultrasonic extraction from the active sludge. The analyzed active sludge did not contain pharmaceutical. It was afterwards contaminated with the following pharmaceuticals: albendazole, febantel, praziquantel, nitrofurantoin, cefdinir, hydroxychloroquine and metoclopramide. Ultrasonic extraction was performed by using different solvents: methanol, ethanol and methanol-water at a ratio of 1:1. Separation and qualitative analysis of the pharmaceuticals were conducted by high performance liquid chromatography (HPLC).

The best results of ultrasonic extraction was obtained at a temperature of 30°C for 60min, and the most preferred solvent for extraction was methanol.

However, none of the solvents yielded satisfactory results, and ultrasonic extraction, as a method of removing pharmaceuticals from active sludge, is not recommended.

The method was validated by determining repeatability, renewability, boundary detection and boundary quantification.

Key words: *pharmaceuticals, active sludge, ultrasonic extraction, high quality liquid chromatography, validation*

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Farmaceutici	2
2.1.1. Antihelmintici.....	3
2.1.1.1. Albendazol.....	3
2.1.1.2. Febantel.....	4
2.1.1.3. Prazikvantel	4
2.1.2. Antibiotici	5
2.1.2.1. Cefdinir.....	7
2.1.2.2. Nitrofurantoin.....	7
2.1.3. Kemoterapeutici	8
2.1.3.1. Hidroksiklorokin	8
2.1.4. Antiemetici	9
2.1.4.1. Metoklopramid.....	10
2.2. Aktivni mulj.....	11
2.2.1. Metode obrade i zbrinjavanja aktivnog mulja.....	12
2.3. Kemijska analiza okoliša.....	14
2.3.1. Priprava uzorka za analizu.....	14
2.3.2. Metode ekstrakcije.....	15
2.3.2.1. Ekstrakcija iz čvrstih uzoraka	15
2.4. Kromatografija.....	19
2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	20
2.4.1.1. Detektor s nizom dioda (DAD).....	22
2.5. Validacija analitičkog sustava	24
2.5.1. Određivanje preciznosti	24
2.5.2. Granica detekcije	25
2.5.3. Granica kvantifikacije	25
2.6. Umjerni postupci	26
2.6.1. Umjerni dijagram.....	26
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	28
3.1. Materijali	28

3.1.1.	Aktivni mulj.....	28
3.1.2.	Farmaceutici	28
3.1.3.	Kemikalije.....	28
3.2.	Aparatura	29
3.2.1.	Analitička vaga.....	29
3.2.2.	Ultrazvučna kupelj.....	29
3.2.3.	Rotavapor	30
3.2.4.	Tekućinski kromatograf (HPLC).....	31
3.3.	Metode rada	32
3.3.1.	Obrada aktivnog mulja.....	32
3.3.2.	Priprema standardne otopine farmaceutika	33
3.3.3.	Umjerni dijagrami.....	33
3.3.4.	Validacija metode	35
3.3.5.	Priprava špikanog mulja	35
3.3.6.	Ultrazvučna ekstrakcija.....	35
3.3.7.	Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	36
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	38
5.	ZAKLJUČAK	43
6.	LITERATURA:.....	44
7.	POPIS KRATICA:.....	47
8.	ŽIVOTOPIS.....	48

1. UVOD

Farmaceutici obuhvaćaju mnoštvo različitih spojeva koji se koriste u različite svrhe. Među njih spadaju lijekovi za ljude i razni dodaci prehrani, te različiti proizvodi namijenjeni za osobnu higijenu poput krema, losiona, dezodoransa, mirisa, sapuna i slično. Postoje mnoge vrste farmaceutika koji se koriste u veterinarske svrhe za liječenje životinja. Farmaceutska industrija u stalnom je usponu, te se konstantno proizvode novi lijekovi i pronalaze nove vrste farmaceutika koji se sve više upotrebljavaju. Kod nas je poznato oko 3000 različitih farmaceutika koji se koriste u ljudskoj medicini. Samim razvojem farmaceutske industrije sve više farmaceutika prilikom testiranja, proizvodnje i upotrebe samih završava u okolišu, bilo to nepropisnim odlaganjem i ispuštanjem otpadnih i komunalnih voda u okoliš ili zbog ljudske nemarnosti i neobrazovanosti. Na taj način mogu završiti u podzemnim i površinskim vodama i u drugim sastavnica okoliša. Farmaceutici su aktivne tvari koje u vrlo malim dozama mogu izazvati utjecaj na ljude i životinje, a u većim dozama mogu biti opasni po život. Zbog do sada navedenih razloga vrlo je bitno donijeti zakonsku regulativu o maksimalnim dopuštenim koncentracijama (MDK) koje se smiju pronaći u okolišu i potreban je konstantan nadzor kako ne bi došlo do neželjenih posljedica. Trenutno se istražuju najbolje metode za separaciju određenih farmaceutika iz matice i uklanjanje istih.

Ovaj rad bazirat će se na uklanjanju farmaceutika ultrazvučnom ekstrakcijom iz aktivnog mulja koji nastaje prilikom obrade otpadnih voda u različitim industrijama. Cilj eksperimenata bio je optimirati uvjete procesa kao i odabir otapala s najboljim iskorištenjem ekstrakcije.

Validacija je dokumentirani postupak koji potvrđuje točnost i analitičku kvalitetu određene analitičke metode. Prilikom uvođenja bilo kojeg postupka, nove metode ili uređaja u analitički laboratorij potrebna je validacija. Isto tako, ako su uvedene promjene u neki proces ili su promijenjeni uvjeti procesa potrebno ga je validirati. Ona je dokaz da je mjerni postupak prikladan za određen svrhu, tj. da će određena analitička metoda dati točne rezultate. Bitno je naglasiti da ti rezultati ne moraju biti zadovoljavajući, ali će biti precizni i točni s minimalnom pogreškom.

Validirati se mogu uzorci, metodologija, podaci, laboratorijska oprema, pojedine tehnološke faze, računalni sustav i sve ostalo što može utjecati na kvalitetu procesa. U ovom radu validiran je postupak ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja određivanjem ponovljivosti, obnovljivosti, granice detekcije i granice kvantifikacije.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Farmaceutici

Dugo vremena zanemarivala se moguća opasnost utjecaja farmaceutika na ljude, biljni i životinjski svijet. Tek nedavno se počelo istraživati i proučavati njihov utjecaj i ponašanje u okolišu. Istraživanja su pokazala kako se u površinskim vodama, vodovodnoj vodi, u tlu i u ostalim sastavnicama okoliša mogu pronaći razni farmaceutici u različitim oblicima. Farmaceutici se unose u okoliš nepropisnim odlaganjem, nakon primjene u humanoj ili veterinarskoj medicini farmaceutici se izlučuju kroz jetru ili bubrege i najčešće putem komunalnih voda dopiju u okoliš. Međutim, najvećim izvorom farmaceutika koji se ispuštaju u okoliš smatraju se postrojenja za obradu otpadnih voda. Iako su koncentracije do sada pronađenih farmaceutika u okolišu relativno niske, trebalo bi se početi kontrolirati njihovo ispuštanje u okoliš zbog mogućeg dugoročnog utjecaja na živi svijet. Dozvoljena koncentracija farmaceutika koji se mogu pronaći u okolišu još nije zakonski limitirana.[1,2] Dokle god ne postoji zakonska regulativa, pojedine tvrtke neće imati obzira i nekontrolirano će ispuštati otpadne vode u okoliš bez prethodne analize i detaljne obrade. Postoji više vrsta farmaceutika, ali najveća zabrinutost raste zbog antibiotika jer se u većini otpadnih voda koje su zagađene antibioticima mogu pronaći i bakterije otporne na te antibiotike. Također, tu je problem i širenja rezistencije ljudi na antibiotike. Kao primjer možemo uzeti 2017. godinu kada su u rijeci Savi pronađene velike količine antibiotika azitromicina, čak 4 miligrama po litri što je dva puta više nego što unosimo u krv dok pijemo antibiotik. Međutim, zakonska regulativa ne postoji, te odgovorna farmaceutska kompanija još nije odgovarala za svoje postupke.[3]

Kako bi se otkrilo najbolju metodu pronalaska i uklanjanja farmaceutika u okolišu, vrlo je bitno poznavati njihovu strukturu i fizikalno-kemijska svojstva. Iz tog razloga upoznat ćemo se s farmaceuticima koji su analizirani u ovome radu.

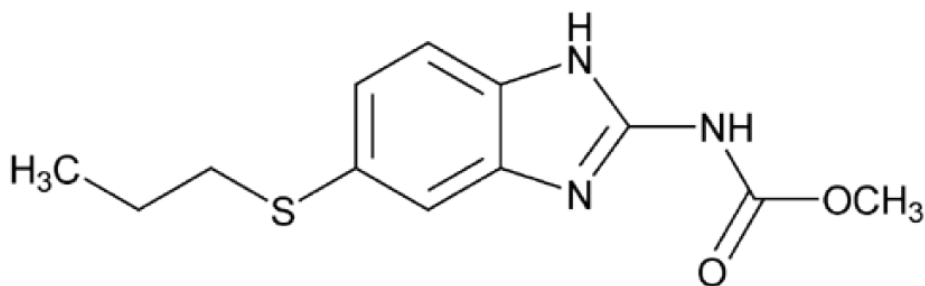
2.1.1. Antihelmintici

Antihelmintici su lijekovi koja se koriste protiv raznih crijevnih nametnika na ljudima ili životinjama poput glista, crva, trakavica i sl., a u poljoprivredi se koriste kao insekticidi (protiv insekata) i akaricidi (protiv grinja). Kada se primjenjuju kod živih bića, najčešće se koriste u kombinaciji sa sredstvima za čišćenje crijeva. Antihelmintik ubija ili paralizira nametnika, a pomoću sredstva za čišćenje crijeva nametnik lakše izađe izvan tijela domaćina. Svaki antihelmintik djeluje na određenu vrstu nametnika, a primjena je bazirana na određenim biokemijskim i fiziološkim razlikama između nametnika i stanica domaćina. Njegova idealna svojstva trebala bi biti: širok spektar djelovanja, netoksičnost za domaćina (čovjek ili životinja), brzo izlučivanje te jednostavna primjena i niska cijena. Rijetko koji antihelmintik ima sva navedena svojstva. Možemo ih svrstati u sedam skupina s obzirom na njihovu otpornost na parazite: benzimidazoli, imidazotiazoli, difenilsulfidi, makrocikličkilaktoni, heksahidropirazini, salicilanilidi i tetrahidropirimidini.[4,5]

U ovom radu koristili su se sljedeći antihelmintici: albendazol, febantel i prazikvantel.

2.1.1.1. Albendazol

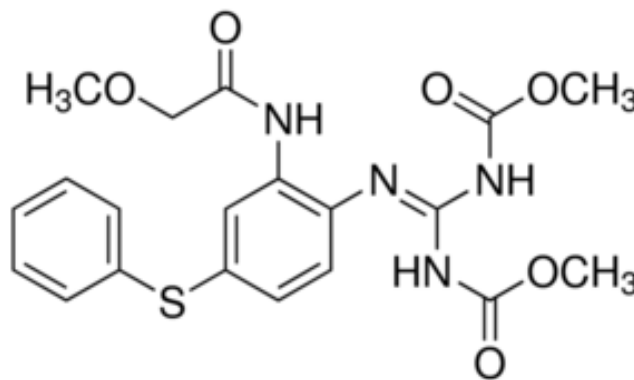
Albendazol($C_{12}H_{15}N_3O_2S$) je antihelmintik širokog spektra i pripada grupi benzimidazola. Otkriven je 1960. godine, a 1982. godine odobren je za ljudsku uporabu. Djeluje na način da ometa normalan metabolizam nametnika i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u sva tri razvojna stupnja, što dovodi do potrošnje endogenog glikogena i samim time do smanjenog stvaranja adenozin-trifosfata (ATP). Hidrofoban je, te se samo 5% albendazola apsorbira u digestivnom sustavu. Apsorbirani dio prolazi brzu oksidaciju u jetri, te nastaje albendazol-sulfoksid koji je odgovoran za antihelmintsko djelovanje. Primjenjuje se oralno, vrijeme poluraspada lijeka je oko 8,5 sati, a izlučuje se u mokraći.[6] Njegova molekulska struktura prikazana je na Slici 1.



Slika 1. Molekulska struktura albendazola [7]

2.1.1.2. Febantel

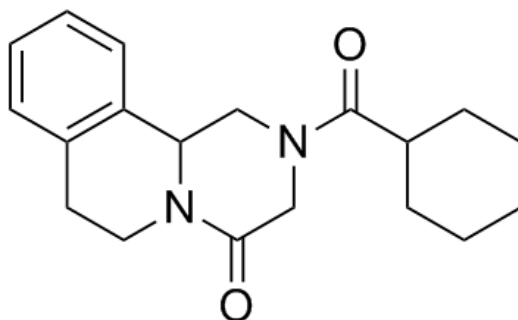
Febantel ($C_{20}H_{22}N_4O_6S$) je antihelmintik širokog spektra i također pripada grupi benzimidazola. Upotrebljava se u veterinarske svrhe jer se kod životinja brzo apsorbira i metabolizira, a na ljude može imati štetan učinak. S obzirom da se njime najčešće liječe domaće životinje kao što su svinje, ovce i govedo, odnosno životinje koje se koriste u ljudskoj prehrani, treba paziti na doze koje se koriste pri liječenju tih životinja.[8] Febantel je probenzimidazol, odnosno postaje aktivan tek kada se prevede u svoje aktivne metabolite kao što su: fenbendazol, oksfendazol i febantelsulfoksid. Febantel se nakon uporabe razgradi u jetri životinje na fenbendazol i oksfendazol. Aktivni metaboliti u enterocitima i kutikuli osjetljivih nametnika kože polimerizaciju tubulina. Tako se u nametnicima sprječava stvaranje mikrotubula, nastupe strukturni i metabolički poremećaji, zakoči se resorpcija glukoze i iscrpe se zalihe energije (ATP). Nametnici uginu unutar 2-3 dana.[9] Molekulska struktura febantela prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Molekulska struktura febantela [10]

2.1.1.3. Prazikvantel

Prazikvantel ($C_{19}H_{24}N_2O_2$) je antihelmintik širokog spektra i spada u skupinu heksahidropirazina. Najdjelotvorniji je protiv trakavica i njihovih ličinki u životinjama. Nakon oralne primjene iz crijeva se brzo i gotovo u potpunosti resorbira i djelatna tvar se raspodijeli u sve organe. Djeluje na principu povećavanja permeabilnosti nametnika za kalcij. Već nakon nekoliko sekundi po interakciji lijeka s fosfolipidima i proteinima trakavica, oštećuje se njihova kutikula i u trakavicu ulaze divalentni ioni kalcija, te se ona kontrahira. Trakavice uginu nakon dehelmintizacije i budu razgrađene proteolitičkim enzimima domaćina. Izlučuje se preko mokraće i izmeta.[11,12] Njegova struktura prikazana je na Slici 3.



Slika 3. Molekulska struktura prazikvantela [13]

2.1.2. Antibiotici

Antibiotici su kemijski spojevi koji se upotrebljavaju u borbi protiv velikog broja zaraznih bolesti. Dobar su izbor liječenja kod bakterijskih infekcija, a nisu djelotvorni kod virusnih i gljivičnih infekcija. Oni mogu u potpunosti uništiti patogene mikroorganizme ili zaustaviti njihov rast ili razmnožavanje, a da pri tome ne nanose značajnu štetu organizmu domaćinu. Koriste se u humanoj i veterinarskoj medicini, ali i u poljoprivredi. Njemački liječnik Paul Ehrlich je 1904. godine nakon niza pokusa utvrdio da je određenom kemijskom toksičnošću moguće ubiti patogeni organizam, a da se pritom ne ubije domaćin. To je bio tek početak. Već 1939. godine, australski znanstvenik Howard Florey utvrdio je da je antibiotik dovoljno jak za preživljavanje u čovječjem sustavu uz zadržavanje svoje antibiotske mogućnosti i aktivno djelovanje protiv patogena. Tada je započela uporaba antibiotika u humanoj medicini. U početku su se antibiotici koristili samo kada je to bilo neophodno, odnosno služili su samo za liječenje jakih i smrtno opasnih bakterija, ali danas se antibiotici koriste i kada to nije potrebno. Njihova prečesta upotreba dovodi do negativnih posljedica po pojedinca i cijelo društvo, prvobitno u vidu slabljenja imuniteta i razvoja otpornih vrsta bakterija, a antibiotici koji završe u okolišu mogu imati štetno djelovanje na različite ekosustave. Njihovo ponašanje u okolišu ovisi o njihovim fizikalnim i kemijskim svojstvima kao što su molekularni oblik, topljivost, veličina, hidrofobnost, ali i o svojstvima tla (pH). Antibiotici se često dijele na bakteriostatske i baktericidne. Većina antibiotika može imati i bakteriostatsku aktivnost i baktericidnu aktivnost što ovisi o njegovoj koncentraciji. Bakteriostatska aktivnost inhibira rast bakterije i sprječava njezino razmnožavanje i na taj način pomaže domaćinu da suzbije infekciju, a baktericidna aktivnost ubija bakteriju i liječi infekciju bez pomoći organizma domaćina. Svaki

antibiotik ima svoj spektar antibakterijskog djelovanja. Općenito se dijele na antibiotike širokog spektra i uskog spektra. Antibiotici širokog spektra inhibiraju i gram-pozitivne i gram-negativne bakterije i oni su pogodniji za uporabu, a antibiotici uskog spektra su aktivni samo protiv ograničenog broja bakterija. Najčešća klasifikacija antibiotika je prema kemijskoj strukturi na: sulfonamide, diaminopirimidine, beta-laktame, fluorokinolone, tetracikline, makrolide, nitrofurane, linkozamide, aminoglikozide, glikopeptide i ostale antibiotike. Postoji više mehanizama djelovanja antibiotika na patogen (Tablica 1.).

Tablica 1. Mehanizmi djelovanja antibiotika [14]

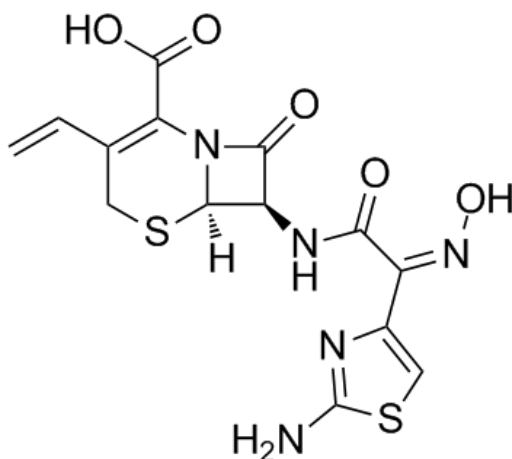
Mehanizam djelovanja	Antibiotik
selektivna toksičnost	sulfonamidi, diaminopirimidini
inhibicija sinteze staničnog zida bakterije	beta-laktami, glikopeptidi
inhibicija sinteze proteina	tetraciklini, makrolidi, aminoglikozidi, linkozamidi
inhibicija sinteze nukleinskih kiselina	fluorokinoloni, nitrofurani

Najidealniji antibiotici djeluju na mehanizmu selektivne toksičnosti, odnosno oštećuju samo patogeni organizam, a na domaćina nemaju nikakav utjecaj. Antibiotici sa mehanizmom koji inhibira sintezu staničnog zida bakterije djeluju na način da aktiviraju enzim koji kida veze peptidoglikana u staničnoj stijenci patogena, te on ostaje omeđen samo krhkom citoplazmatskom membranom koju je lako uništiti. Mehanizam inhibicije proteina temelji se na vezanju antibiotika na 30S ili 50S podjedinicu ribosoma i na taj način dolazi do pogrešnog čitanja slijeda aminokiselina i patogeni organizam gubi svoju funkcionalnost. Kada je riječ o mehanizmu sinteze nukleinskih kiselina možemo govoriti o antibioticima koji inhibiraju sintezu bakterijske DNK ili bakterijske RNK i onima koji se vežu na enzime koji upravljaju replikacijom DNK koji su ujedno i najčešći.[14]

Antibiotici koji su se koristili u ovome radu su: cefdinir i nitrofurantoin.

2.1.2.1. Cefdinir

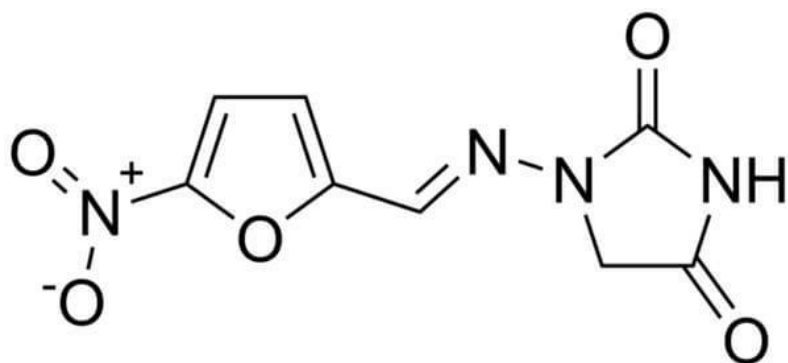
Cefdinir ($C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$) je antibakterijsko sredstvo širokog spektra i prvi put je sintetiziran 1988. godine, a 1997. godine odobrena je njegova uporaba u ljudskoj medicini. Pripada grupi beta-laktama i učinkovit je kod suzbijanja gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Najčešće se koristi kod infekcija uha, grla, dišnih puteva, sinusa i lakših kožnih infekcija. Djeluje na mehanizmu inhibicije sinteze staničnog zida bakterije. Točnije, veže se na penicilin-vezujuće proteine, izazivajući zadebljanje staničnog zida i lizu na mjestu stvaranja septuma i time uzrokuje smrt bakterijske stanice. Uzima se oralno, vrijeme poluraspada je otprilike 1,5 sati, a izlučuje se preko urina.[15] Njegova molekulska struktura prikazana je na Slici 4.



Slika 4. Molekulska struktura cefdinira [16]

2.1.2.2. Nitrofurantoin

Nitrofurantoin ($C_8H_6N_4O_5$) spada u skupinu nitrofurana. To je antibakterijsko sredstvo širokog spektra koje djeluje protiv mnogih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. U ljudskoj medicini počeo se koristiti 1953. godine, a njegova upotreba povećala se s povećanjem otpornosti bakterija na neke druge uobičajenije antibiotike. Njegova uporaba ograničena je na liječenje isključivo donjeg mokraćnog trakta. Njegov mehanizam djelovanja je inhibicija sinteze nukleinskih kiselina. Postoje određene pretpostavke da može štetno utjecati na pojedine organe poput jetre, pluća, bubrega, ali je i dalje u upotrebi zbog širokog spektra djelovanja i niske cijene. Najčešće se uzima oralno, vrlo brzo se apsorbira iz crijeva, vrijeme poluraspada je manje od 1 sat, a većina ga se izluči putem urina u ne promijenjenom obliku.[17] Molekulska struktura nitrofurantoina prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Molekulska struktura nitrofurantoina [18]

2.1.3. Kemoterapeutici

Liječenje raka naziva se kemoterapijom jer se liječi kemijskim sredstvima – kemoterapeuticima. Oni suzbijaju rast i razmnožavanje zloćudnih stanica u tijelu. Međutim, kemoterapeutici imaju dvije neriješene prepreke, a to su: otpornost i toksičnost. Već godinama se istražuje način na koji bi se kemoterapeutici mogli koristiti u borbi protiv zloćudnih stanica, a da pri tome ne oštećuju zdrave stanice domaćina zbog svoje toksičnosti. Najviše oštećuju one stanice koje se brzo dijele poput krvne stanice, sluznice probavnoga trakta, spolne stanice i folikul kose. Stoga su najčešće nuspojave kod pacijenata: eukopenija, neutropenija, anemija, trombocitopenija, proljevi i mukozitis. Do sada nije otkriven način na koji bi se te nuspojave zaustavile, ali najuspješnijom metodom pokazala se kombinacija različitih kemoterapeutika.[19]

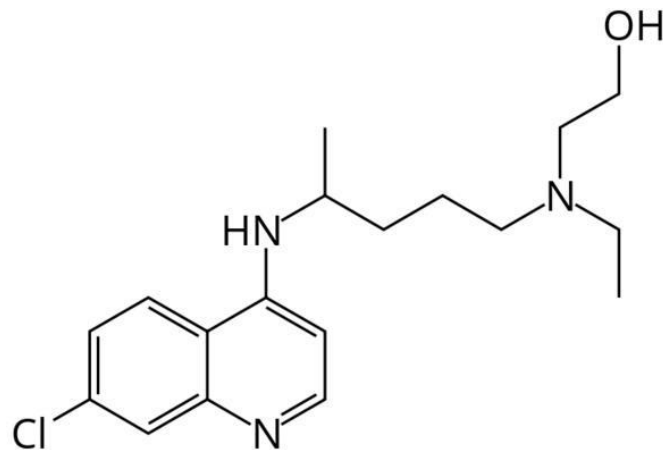
Kemoterapeutici se dijele na alkilirajuća sredstva, antimetabolite, protutumorske antibiotike i sredstva prirodnog porijekla. Djeluju na način da inhibiraju sintezu nukleinskih kiselina(DNK,RNK) i/ili sprječavaju funkciju ćelijskih organela, posebice mitotskog aparata koji omogućuje diobu ćelija. [20]

Kemoterapeutik koji se koristio u ovom radu je: hidroksiklorokin.

2.1.3.1. Hidroksiklorokin

Hidroksiklorokin(C₁₈H₂₆ClN₃O) je kemoterapeutik koji se koristi za prevenciju i liječenje određenih vrsta malarije, te je jedan od najstarijih i najraširenijih sredstva za sistavne autoimune reumatske bolesti. Hidroksiklorokin je siguran, učinkovit i jeftin kemoterapeutik koji se koristi još od 1955. godine. To je sintetički lijek koji ima antimikrobne, kardiovaskularne, antitrombotske i protutumorske učinke. Trenutno se proučava njegova potencijalna sposobnost za liječenje tumora dojke i limfoma. Početne nuspojave uključuju prolazno zamućivanje vida i blage gastrointestinalne tegobe, koje se obično u kratkom roku

povuku. Pacijenti mogu rijetko doživjeti alergijske reakcije kože, ali dugotrajno korištenje i prevelike doze mogu dugotrajno oštetiti vid. Hidroksiklorokin ima sposobnost vezivanja i mijenjanja DNK-a, te se nakuplja u bijelim krvnim stanicama, stabilizira lizosomalne membrane i inhibira aktivnost enzima. Na taj način sprječava rast i razmnožavanje patogena. Najveća mana mu je dugo vrijeme poluraspada, čak 1-2 mjeseca.[21] Molekulska struktura prikazan je na Slici 6.



Slika 6. Molekulska struktura hidroksiklorokina [22]

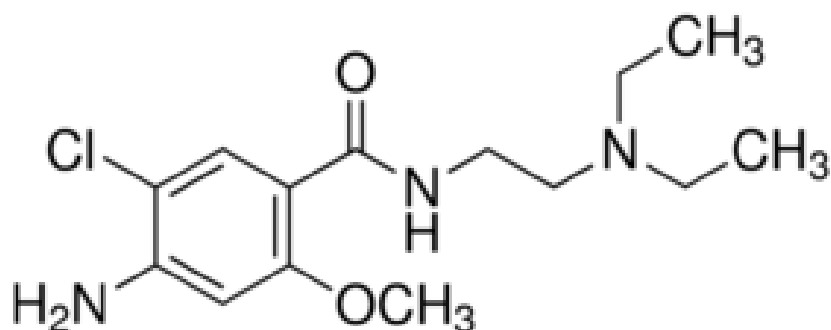
2.1.4. Antiemetici

Antiemetici su kemijska sredstva koja blokiraju 5-hidroksitriptamin receptore koji se nalaze u centru za povraćanje, te na taj način sprječavaju simptome mučnine i povraćanja. Primjenjuju se kod ljudi koji liječe tumor kako bi se što više ublažile posljedice kemoterapije i zračenja ili se koriste u kombinaciji s jakim lijekovima kod kojih su kao učestala nuspojava zabilježeni ti simptomi. Sve češće se primjenjuju nakon kirurških zahvata radi prevencije postoperativne mučnine i povraćanja koju uzrokuju anestetici. Mogu se koristiti i za sprječavanje osjećaja mučnine prilikom vožnje autom, brodom, avionom i sl. Postoji više vrsta antiemetika, a prilikom liječenja biramo ih prema uzroku i tipu simptoma. Obično je potrebna kombinacija više njih za adekvatno liječenje simptoma.[23]

U ovom radu korišten je samo jedan antiemetik: metoklopramid.

2.1.4.1. Metoklopramid

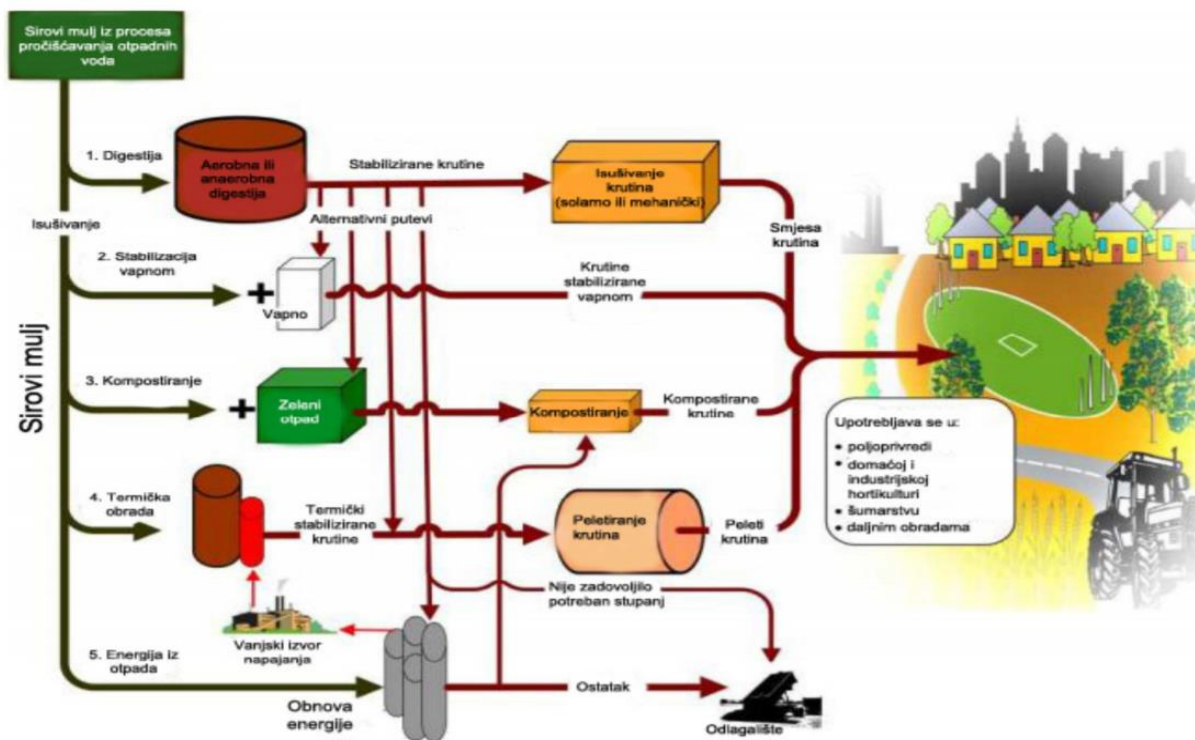
Metoklopramid ($C_{14}H_{22}ClN_3O_2$) je antiemetik široke uporabe. Njegova antiemetička svojstva posredovana su antagonizmom dopaminskih receptora (D2) i 5-hidroksitriptamin receptora u središnjem živčanom sustavu. Na taj način sprječava mučninu i povraćanje. Kontraktivno djeluje na glatke mišiče probavnog trakta. Istraživanja su pokazala kontraktivnu aktivnost u jednjaku, želudcu, debelom crijevu i tankom crijevu. Njegova upotreba se općenito dobro podnosi, ali kod velikih doza može izazvati ekstrapiramidalne reakcije ili tardivnu diskineziju, te općenito može izazvati agitiranost pacijenta.[24] Najčešće se uzima oralno. Brzo se apsorbira, vrijeme poluraspada je u prosjeku 4 do 6 sati, a izlučuje se urinom.[25] Njegova struktura prikazana je na Slici 7.



Slika 7. Molekulska struktura metoklopramida [26]

2.2. Aktivni mulj

Obrada otpadne vode pomoću aktivnog mulja poznata je još od 1914. godine. Aktivni mulj se koristio pod pretpostavkom da mikroorganizmi koje sadrži povećavaju učinkovitost pročišćavanja voda. Od tada su se razvili moderniji postupci obrade otpadnih voda pomoću aktivnog mulja i detaljno je proučen njegov sastav i način rada. Danas se aktivni mulj koristi u sekundarnoj obradi otpadnih voda, industrijskih ili komunalnih. Prikladan je za obradu voda koje sadrže veliki udio biološkog onečišćenja jer se sastoji od nataloženih nakupina aktivnih bakterijskih stanica koje uklanjaju biorazgradive organske i hranjive tvari iz otpadnih voda. To je zapravo naziv za biološki aktivnu biomasu aerobne mikroflore koja se formira povezivanjem bakterija, algi, kvasca, protozoa i metazoa sa suspendiranim česticama u veće ili manje flokule. Sastav pojedine flokule nije isti, ali se uvijek na površini nalaze mikroorganizmi koji koriste više kisika za razgradnju tvari u otpadnoj vodi, a unutar flokule nalaze se mikroorganizmi koji koriste manje kisika i oni razgrađuju produkte razgradnje mikroorganizama sa površine. Iz tog razloga vrlo je bitno osigurati konstantni dovod kisika u procesima obrade otpadne vode u kojima se koristi aktivni mulj. Važno je naglasiti da biološka aktivnost mikroorganizama ovisi o više parametara, ne samo o količini otopljenog kisika, već i o temperaturi, pH-vrijednosti, količini toksičnih tvari i sl.[27,28] Proces obrade otpadne vode pomoću aktivnog mulja prikazan je na Slici 8.



Slika 8. Proces brada otpadne vode pomoću aktivnog mulja [29]

Mulj nakon procesa obrade vode sadrži u najvećem udjelu (oko 70%) organske tvari od kojih su neke biološki razgradive, a neke biološki nerazgradive i vodu, ali može sadržavati i mnoge druge kemijske spojeve među kojima se mogu pronaći i farmaceutici. To ovisi o vodi koja se pročišćava. Ovisno o njegovom sadržaju na kraju obrade potrebno ga je na različite načine obraditi i na siguran način odložiti.

2.2.1. Metode obrade i zbrinjavanja aktivnog mulja

Višak aktivnog mulja nakon biološke obrade otpadne vode izdvaja se zajedno sa primarnim otpadnim muljem i zajedno se obrađuju i odlažu. Muljevi su po svojem sastavu i količini, obradi i konačnom odlaganju veliki tehnološki i ekonomski problem jer zahtijevaju posebne tehnologije obrade i stabilizacije koje su financijski skupe i to je najveća mana pri korištenju aktivnog mulja za pročišćavanje voda. Odlaganje i obrada mulja stvara veliki problem u Hrvatskoj i svijetu. Kada je započela obrada otpadnih voda, jedini cilj bio je dobiti konačni efluent koji će zadovoljavati kriterije učinkovitosti pročišćavanja voda i koji neće ugroziti prijammnik. Nitko nije razmišljao niti znao na koji način će se obrađivati i odlagati mulj kao neizbježan nusprodukt obrade voda. U početku se mulj samo odlagao na obična odlagališta, što danas više nije dozvoljeno jer se zbog svog sastava često može bolje iskoristiti uz manje troškove od troškova odlaganja. Mogućnosti obrade, iskorištenja i mogućnost ponovne primjene mulja polaze od njegovih karakteristika i općenitih čimbenika poput energijske vrijednosti, jedinične količina proizvedenog mulja, kemikalija koje se nalaze u mulju, mogućnost centralizirane obrade, raspoloživost poljoprivrednih i ostalih površina za ponovnu upotrebu, sve uz zadovoljenje zakonskih odredba. Temeljni ciljevi obrade otpadnog mulja su: smanjiti volumen nastalog mulja radi smanjenja troškova daljnje obrade i lakšeg prijevoza obrađenog mulja do lokacije konačne dispozicije, te nadziranje razgradnje otpadne tvari kako bi se spriječili neželjeni utjecaji na okoliš nakon konačnog odlaganja. Postoji više načina smanjenja volumena, kao na primjer zgušnjavanje, cijedenje, sušenje ili spaljivanje sirovog mulja. Nadziranje razgradnje organske tvari u mulju postiže se stabilizacijom. To je postupak kojim se ometa, smanjuje ili sprječava mogućnost daljnje organske razgradnje mulja. Može se provoditi kemijski, toplinski ili biološki. Na taj način se smanjuje broj patogenih organizama u mulju i njegov neugodan miris. Koja vrsta stabilizacije će se provoditi ovisi o mjestu i načinu konačnog odlaganja mulja. Obrada mulja ovisi o njegovoj namjeni. Visoki udio organske(hranjive) tvari može se iskoristiti u poljoprivredi, njegova visoka energetska vrijednost može se iskoristiti tijekom obrade, primjerice pri proizvodnji bioplina kod anaerobne stabilizacije ili iskorištavanjem energijskog potencijala pri termičkoj stabilizaciji. U Pravilniku

o načinima i uvjetima odlaganja otpada, kategorijama i uvjetima rada na odlagalištima otpada jasno piše da odlaganje mulja na odlagališta nije dopušteno, te da je zabranjen prihvat komunalnog otpada kojemu je masa biorazgradive komponente veća od 35% od ukupne mase, a biološki stabilizirani mulj uvijek sadrži više od 35% biorazgradive tvari od ukupne mase. Iz toga slijedi da ne postoji jedinstveni način konačnog odlaganja mulja. Neke od mogućnosti su: iskorištavanje otpadnog mulja u poljoprivredi ili za slične namjene u šumarstvu, cvjećarstvu, za sanaciju oštećenih dijelova zemljišta i sl., može se termički obraditi uz iskorištenje energetske vrijednosti ili se uz odgovarajuću obradu, može rabiti u građevinarstvu. Ukoliko se odluči iskoristiti u poljoprivredi, postoje zakonske regulative koje ograničavaju sadržaj određenih tvari u mulju. Analizira se sadržaj teških metala, organskih tvari, patogenih mikroorganizama, količinu suhe tvari mulja, ali ne postoji zakonska regulativa koja se odnosi na farmaceutike.[30,31] Upravo iz tog razloga u daljnjem tekstu navedene su najčešće metode određivanja farmaceutika u aktivnom mulju.

2.3. Kemijska analiza okoliša

Općenito, cilj analitičke kemije je dobivanje kvalitativnih i kvantitativnih informacija o kemijskom sastavu i strukturi ispitivanog materijala. Svako analitičko istraživanje ima tri jednako važna parametra, a to su: problem, uzorak i metoda. Kako bi se dobila informacija o ispitivanom uzorku potrebno je provesti analitički proces koji će dovesti do rješenja postavljenog problema. Idealni analitički sustav čine: ispravan model, besprijekoran plan, odgovarajući uzorci, primjerena metodologija, prikladna kalibracija i dobra procjena i interpretacija podataka.[32] Kada govorimo o zaštiti okoliša i praćenju stanja okoliša, analitička kemija ima veliku ulogu. Kemijska analiza okoliša je proces koji se provodi da bi smo dobili informacije kojima možemo procijeniti kvalitetu okoliša i kako bi smo bolje razumjeli procese i mehanizme koji se odvijaju u ekosustavima. Proces analize okoliša obuhvaća:

1. Uzorkovanje → plan i tehnika uzorkovanja, čuvanje i transport uzorka, kontrola kvalitete uzorkovanja.
2. Laboratorijsku analiza → priprava uzorka za analizu, standardni radni postupci, analitičke metode, umjeravanje i laboratorijska kontrola kvalitete.
3. Analizu rezultata → statistička obrada rezultata, interpretacija rezultata i modeliranje.

Analiza realnih uzoraka uzetih iz okoliša (voda, tlo, biološki materijal, aktivni mulj) obuhvaća uzorkovanje, pripravu uzorka, odjeljivanje analita, detekciju i na kraju, procjenu mjernih podataka pomoću kojih dobivamo informacije o identifikaciji uzorka i kvantitativnom sastavu. Jasno je da treba osigurati kvalitetu svakoga od navedenih koraka, ali kako bi se riješio bilo koji analitički problem, potreban je prije svega uzorak.[1]

2.3.1. Priprava uzorka za analizu

Nakon provedenog uzorkovanja slijedi priprava uzorka za analizu. Realan uzorak često nije prikladan za analizu, te ga je potrebno prevesti u uzorak pogodan za analizu, pri čemu treba izbjeći interakcije sastojaka uzorka s okolinom u najvećoj mogućoj mjeri. Interakcije s okolinom ovise o kemijskim i fizikalnim svojstvima matice i analita uzorka. Uzorak prije svega mora biti reprezentativan, odnosno mora predstavljati dio okoliša koji se analizira u cjelini. Nadalje, uzorak se priprema s obzirom na: instrumente kojima se analizira, cilj analize i stupanje željene točnosti.

Ciljevi pripreve uzorka su:

- povećati koncentraciju analita da bi se dostignula granica detekcije ili kvantifikacije uzorka,
- povećati selektivnost metode uklanjanjem interferencija iz matice uzorka,
- osigurati otpornost i ponovljivost metode kako bi bila neovisna o promjeni matičnog uzorka,
- prevesti analit u najbolji mogući oblik za određivanje i odjeljivanje.

Priprava tekućih i plinovitih uzoraka jednostavnija je od pripreve čvrstih uzorka jer se laboratorijski uzorak homogenizira miješanjem ili mućkanjem, dok homogenizacija čvrstih uzoraka zahtijeva složeniji pristup.[1] U ovom radu riječ je o pripravi čvrstih uzoraka aktivnog mulja za kromatografsku analizu farmaceutika. Uzorci su pripremljeni fizikalnim procesom – ekstrakcijom.

2.3.2. Metode ekstrakcije

Kemijska analiza okoliša često zahtijeva odvajanje analita od matice uzorka – ekstrakciju. Općenito, ekstrakcija je metoda potpunog ili djelomičnog „prebacivanja“ jedne ili više tvari iz jedne faze u drugu fazu. Postoji više vrsta ekstrakcije, a mogu se klasificirati na metode koje mogu zadržati analit i one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugog otapala. Najčešća podjela je s obzirom na faze između kojih dolazi do prijenosa analita: ekstrakcija tekuće-tekuće, ekstrakcija čvrsto-tekuće ili ekstrakcija plinovito-tekuće. Izbor metode pripreve uzorka ovisi o agregacijskom stanju uzorka, ali i o drugim svojstvima komponenti koje želimo izdvojiti, poput polarnosti, topljivosti, pK_k vrijednostima i sl. Pošto je u ovome radu riječ o ekstrakciji iz čvrstih uzoraka (ekstrakcija čvrsto-tekuće) upravo te metode će biti navedene u daljnjem tekstu.[1]

2.3.2.1. Ekstrakcija iz čvrstih uzoraka

Ova vrsta ekstrakcije temelji se na desorpciji tvari iz matice uzorka i njenom otapanju u prikladnom otapalu. Djelotvornost ekstrakcije ovisi o tri čimbenika: topljivosti, prijenosu mase i matici uzorka. Prijenosu analita iz matice uzorka u otapalo pogoduje visoka temperatura i tlak, niska viskoznost otapala i mala veličina čestica, a sama topljivost analita ovisi ponajviše o vrsti otapala. Ne postoji čisto otapalo univerzalno za sve analite, a izbor otapala ovisi o prirodi analita i matice uzorka. Ponekad je potrebno koristiti smjesu vode i otapala.

Metode ekstrakcije iz čvrstih uzoraka dijele se na klasične i moderne metode. Metode i njihove karakteristike prikazane su u Tablici 2.

Tablica 2. Prikaz klasičnih i modernih metoda ekstrakcije iz čvrstih uzoraka [1]

METODA	KARAKTERISTIKE
Klasične metode ekstrakcije	
Soxhlet ekstrakcija	<ul style="list-style-type: none"> - kontinuirano uparavanje, kondenziranje i prolaz pogodnog otapala kroz uzorak - trajanje: 6 – 48 sati - volumen otapala: 250 – 500mL - potrebno uparavanje otapala prije pročišćavanja dobivenog ekstrakta
Automatizirana Soxhlet ekstrakcija	<ul style="list-style-type: none"> - bolji kontakt otapala i uzorka = bolji prijenos mase - trajanje: 2 – 3 sata kraće - volumen otapala: 40 – 50mL po ekstrakciji - moguća ekstrakcija više uzoraka
Ultrazvučna ekstrakcija	<ul style="list-style-type: none"> - koristi energiju ultrazvuka - trajanje: 10 – 60 minuta - volumen otapala: do 100mL - moguća ekstrakcija više uzoraka odjednom - ekstrakti se moraju filtrirati i upariti prije analize
Moderne metode ekstrakcije	
Tlačna ekstrakcija otapalom	<ul style="list-style-type: none"> - automatizirana metoda ekstrakcije otapalom pri povišenoj temperaturi - porastom temperature (do 200 °C) raste i tlak (do 20Mpa) - povišena temperatura smanjuje viskoznost i napetost površine otapala = bolje prodiranje u uzorak - uzorak se miješa sa pijeskom ili dijatomejskom zemljom radi sprječavanja aglomeriranja - trajanje: 12 – 18 minuta - volumen otapala: 15 – 40mL - nužno je pročišćavanje dobivenih ekstrakta
Ekstrakcija pregrijanom vodom	<ul style="list-style-type: none"> - voda je jako polarno otapalo - prikladna metoda za ekstrakciju nepolarnih i umjereno polarnih organskih sastojaka - temperatura: 100 – 374 °C - pri visokim temperaturama estrahiraju se manje polarni sastojci, a pri nižim polarni - izbjegava se rad pri 374 °C zbog moguće razgradnje uzorka - dobivaju se razrijeđeni vodeni ekstrakti koje je potrebno dodatno estrahirati ili koncentrirati manjim volumenom organskog otapala

Tablica 2. Prikaz klasičnih i modernih metoda ekstrakcije iz čvrstih uzoraka [1] (Nastavak I.)

Ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima	<ul style="list-style-type: none"> - viši difuzijski koeficijent i niža viskoznost = bolja topljivost analita i brza kinetika reakcije - promjenom tlaka i temperature kontrolira se jakost otapala - dotok svježeg fluida je kontinuiran - trajanje: 30 – 75 minuta - volumen otapala: 5 – 10mL - nije potrebno filtrirati ili dodatno pročišćavati dobivene ekstrakte
Mikrovalna ekstrakcija	<ul style="list-style-type: none"> - koristi mikrovalnu energiju za prijelaz spojeva iz uzorka u otapalo - temperatura: 50 – 150 °C - tlak: 1 – 5 MPa - trajanje: 10 – 20 minuta - volumen otapala: 10 – 30mL - moguća ekstrakcija više uzoraka odjednom - potrebno je pročišćavanje ekstrakta

Ova podjela metoda ekstrakcije temelji se na temperaturi i tlaku koji imaju veliku ulogu u kinetici ekstrakcije. Klasične metode provode se pri atmosferskom tlaku, uz grijanje ili djelovanje ultrazvuka, te zahtijevaju velike količine organskih otapala, a sam proces je dugotrajan. Moderne metode provode se pri povišenome tlaku i temperaturi i na taj način se smanjuje vrijeme trajanja ekstrakcije i potrebne su manje količine organskih otapala što dovodi do manjeg onečišćenja okoliša. Kako bi ekstrakcija imala bolje iskorištenje, preporuča se sušenje i usitnjavanje uzorka do finog praha. Neki ekstrakti mogu sadržavati sastojke koji mogu uzrokovati sustavnu pogrešku, onečišćenje i/ili uništenje opreme te pogoršanje kromatografskog razlučivanja. Iz navedenih razloga zahtijevaju prethodno pročišćavanje kako bi se ti sastojci uklonili. Biološki uzorci poput mulja najčešće zahtijevaju prethodno pročišćavanje, a kao najbolja metoda pročišćavanja preporuča se ekstrakcija čvrstom fazom.[1]

2.3.2.1.1. Ultrazvučna ekstrakcija

Primjenom metode ultrazvučne ekstrakcije dobiva se bolji prinos željenih komponenti, smanjuje se upotreba velikih količina otapala, povećava se stopa ekstrakcije i smanjuje se vrijeme trajanja ekstrakcije. Djelovanje ultrazvuka omogućava poboljšanu bioraspoloživost mikronutrijenata zadržavajući pritom njihova izvorna svojstva i njegovom primjenom izbjegava se degradacija bioaktivnih sastojaka. Frekvencije ultrazvuka koje se primjenjuju (20 – 100 kHz) izazivaju kavitaciju koja omogućava prodiranje otapala u materijal i povećava prijenos mase. Kavitacije uzrokuju bubrenje stanica te probijanje staničnih stjenki, što

omogućuje visoke brzine difuzije kroz staničnu stjenku te jednostavnije ispiranje sastojaka stanice. Drugim riječima, prolaskom ultrazvučnog vala kroz medij dolazi do nastanka longitudinalnih valova, što dovodi do stvaranja područja promjenjivih kompresija i ekspanzija tlaka. Dolazi do formiranja milijuna mikroskopskih mjehurića (šupljina)(Slika 9.), ti mjehurići osciliraju te uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije i kada dosegnu svoju kritičnu veličinu ne mogu više učinkovito apsorbirati energiju te se raspadnu. Njihova kritična veličina ovisi o primijenjenoj frekvenciji ultrazvuka i mediju koji se tretira. Kada se odabere metoda ultrazvučne ekstrakcije da bi se postigao maksimalan prinos potrebno je optimirati proces. Uz odabir pogodnog otapala, temperature i pritiska, za optimiziranje procesa potrebno je odrediti frekvenciju, vrijeme trajanja i snagu ultrazvuka. Najčešće se primjenjuje u analizi ostataka antibiotika i različitih sastojaka hrane, ali i u druge svrhe.[33]



Slika 9. Fotografski prikaz kavitacijskog mjehurića [33]

Nakon pripreve uzorka slijedi njegova analiza. Kao najučinkovitija metoda analize uzoraka pokazala se kromatografija.

2.4. Kromatografija

Kromatografija je zbirni naziv za grupu laboratorijskih fizikalnih tehnika odjeljivanja komponenti iz uzorka. Komponente se raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna (stacionarna), a druga pokretna (mobilna). Princip tehnike je kretanje ispitivanog uzorka, koji je otopljen u mobilnoj fazi, kroz stacionarnu fazu pri čemu dolazi do odvajanja i izoliranja komponenti iz uzorka te se one mogu analizirati i kvantitativno odrediti. Kromatografske tehnike imaju široku primjenu i visoku učinkovitost. Primjenjuju se u analizi okoliša, forenzičkoj analizi, ispitivanju lijekova, biomedicinskim ispitivanjima, itd. Ispitivana tvar se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između dvije navedene faze, a da bi došlo do odjeljivanja komponenti iz ispitivanog uzorka, nepokretna faza mora selektivno i različito dugo zadržavati pojedine komponente. Tehnike kromatografije dijele se s obzirom na prirodu ravnoteže između nepokretne i pokretne faze i navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Podjela tehnika kromatografije s obzirom na prirodu ravnoteže između faza [1]

KROMATOGRAFSKA TEHNIKA	PRIRODA RAVNOTEŽE
Razdjelna kromatografija	Ravnoteža se uspostavlja između pokretne faze (tekućina ili fluid u superkričnim uvjetima) i tekuće nepokretne faze vezane na inertni čvrsti nosač.
Adsorpcijska kromatografija	Ravnoteža se uspostavlja između tekućine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze → ispitivane molekule izravno se vežu na površinu adsorbensa.
Ionsko – izmjenjivačka kromatografija	Dolazi do izmjene iona analiziranog spoja s ionima nepokretne faze.
Afinitetna kromatografija	Do vezanja dolazi zbog specifične interakcije molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze.
Kromatografija isključenjem po veličini	Nepokretna faza je materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, do odjeljivanja dolazi zbog razlike u molekulskoj masi i volumena.

Nadalje, kromatografske tehnike mogu se podijeliti prema sastavu pokretne faze:

- Plinska kromatografija (GC) – pokretna faza je inertni plin,
- Tekućinska kromatografija (LC) – pokretna faza je tekućina male viskoznosti,
- Fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima (SFC) – pokretna faza je fluid iznad svoje kritične temperature i tlaka.

Dok nepokretna faza može biti tekuća ili čvrsta:

- Kromatografija u stupcu – nepokretna faza je pakirana u kromatografskome stupcu,
- Plošna kromatografija – nepokretna faza je tanki homogeni film nanesen na inertnu podlogu ili je podloga specijalno pripremljeni papir.

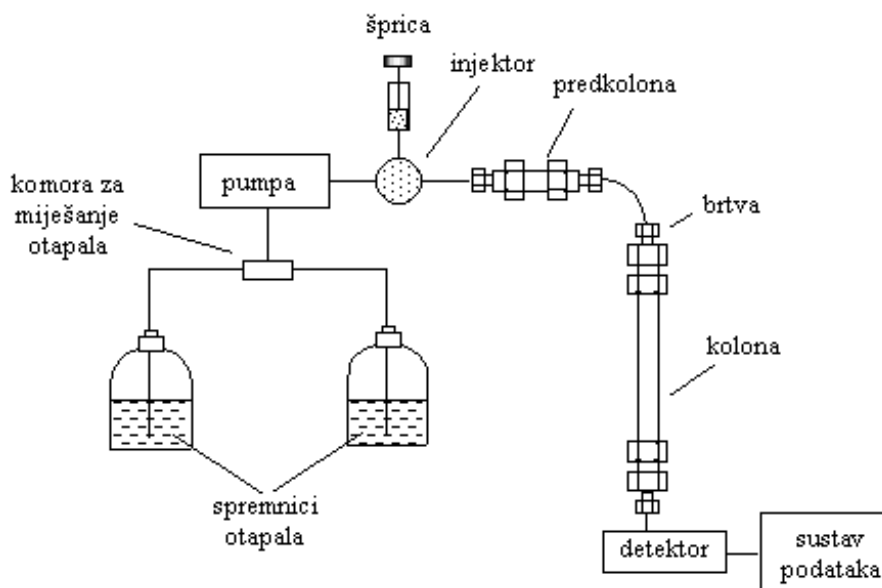
U ovom radu pri analizi uzoraka korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD).

Kromatografirana tvar uravnotežuje se između nepokretne i pokretne faze, a proces se naziva kromatografsko razvijanje. Krajnji rezultat kromatografske analize je kromatogram → zapis analitičkog signala u ovisnosti o vremenu razvijanja ili volumenu eluata.[1]

2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti razvijena je kasnih 1960 – ih godina. Danas je to najprihvaćenija metoda separacije zbog svoje visoke efikasnosti i sposobnosti da odijeli i analizira gotovo svaki uzorak. Jedna je od najučinkovitijih metoda kojom se može odijeliti veliki broj farmaceutika.

Osnovni konstrukcijski dijelovi tekućinsog kromatografa visoke djelotvornosti su spremnik za otapalo (ili više njih), komora za miješanje otapala, pumpa i otplinjač (degazer), sustav za unošenje uzorka, kolona, detektor te sustav za obradu podataka. Kromatograf je prikazan na Slici 10.



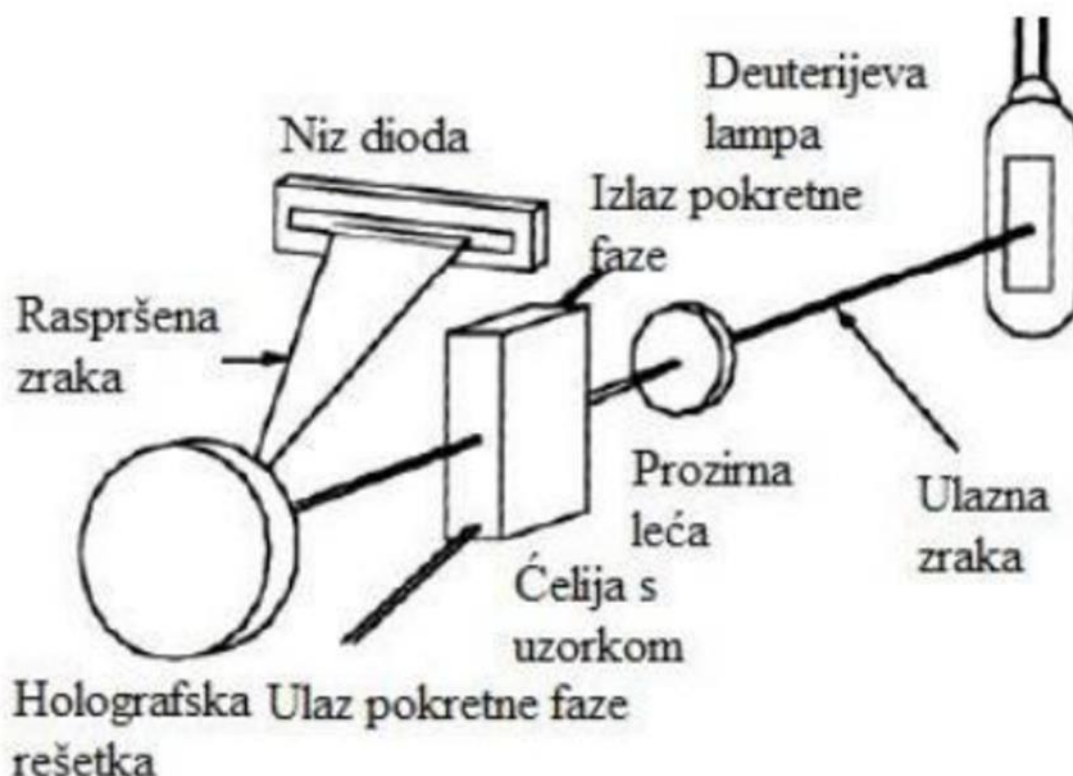
Slika 10. Shematski prikaz HPLC kromatografa [36]

Spremnici za otapalo načinjeni su od čelika ili stakla. Otapala koja se nalaze u njima koriste se kao pokretna faza i moraju biti visoke čistoće i treba ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica i zato se često u sklopu tog dijela kromatografa nalazi oprema za uklanjanje plinova i čvrstih čestica. Pumpa služi za ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 40 milijuna Pa), stalnom brzinom ($0,1-10 \text{ mL min}^{-1}$) u kolonu, a reproducibilnost protoka ne smije biti manja od 99,5% i mora biti otporna na koroziju. Uzorak se unosi kroz elastičnu membranu radi jednostavnosti, međutim, takav način unošenja uzorka je ograničen na tlakove niže od 10 milijuna Pa. Kada je riječ o višim tlakovima, uzorak se unosi injekcijskom štrcaljkom na početak punila u sustav za injektiranje tzv. petlju. Suvremeni kromatografi često imaju, kao sastavni dio opreme, plinski ventil. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sa sobom nosi uzorak na kolonu. Petlje mogu u kolonu unositi količine uzorka od 5 do 500 μL . Kolona je najčešće cijev izrađena od nehrđajućeg čelika, ali pri određenim uvjetima mogu se upotrebljavati i staklene cijevi debljih stjenki. Kolone su duge od 10 do 30 cm, a promjer im iznosi između 4 i 10 mm. Punjene su česticama veličine od 5 do 10 μm . Najčešće korišteno punilo je silikagel. Mogu se koristiti i punila koja sadrže glinicu, porozne polimere i ionske izmjenjivače. Ne postoji univerzalni sustav detektora već on ovisi o prirodi uzorka. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari. Najčešće se upotrebljavaju detektori koji se temelje na apsorpciji ultraljubičastog ili vidljivog zračenja (UV/Vid), a druga vrsta detektora temelji se na tehnici mjerenja promjene u indeksu loma ili vodljivosti otapala prouzročene prisutnošću molekula analita. Postoje tri vrste detektora: s promjenjivom valnom duljinom, s fiksnom valnom duljinom i s nizom dioda.[34,35]

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti u kombinaciji s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) pokazala se kao jedna od najučinkovitijih metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi farmaceutika i zato se upravo ta metoda koristila u ovom radu.

2.4.1.1. Detektor s nizom dioda (DAD)

Detektori s diodnim nizom ("*diode-array*") (HPLC-DAD sustavi) pokazali su se kao vrlo dobar izbor. Oni omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vid području u rasponu od 200 do 600nm. Apsorbancija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini.[39] Detektor s nizom dioda prikazan je na Slici 11.



Slika 11. Detektor s nizom dioda [37]

Detektor s nizom dioda koristi se kada je brzina mjerenja bitna. To je općenito brža i preciznija metoda od ostalih sustava za detekciju. Detektor se sastoji od deuterijeve lampe (ili drugog izvora zračenja), prozirne leće, ćelije s uzorkom, holografске rešetke i niza dioda. Svjetlo iz deuterijeve lampe usmjerava se uz pomoć prozirne leće tako da cijeli snop svjetla može proći kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Na taj način uzorak je izložen svjetlu svih valnih duljina koje generira izvor zračenja. Raspršeno svjetlo od rešetke usmjereno je na niz dioda, a svaka dioda mjeri intenzitet zračenja određene valne duljine koji pada na nju. Fotodiode

pretvaraju elektromagnetski podražaj u električni signal i na taj način se izlaz iz svake diode pohranjuje na računalo, odnosno prikupljanje podataka se obavlja paralelno. Signali iz pojedinih dioda daju spektar analiziranog analita, a spektar otopljene tvari može se dobiti iz krivulje koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Jedini nedostatak ovog tipa detektora je ograničenost broja dioda koje se nalaze u nizu.[36,37]

2.5. Validacija analitičkog sustava

Svaki laboratorij mora osigurati kvalitetu mjernih podataka. Kontrola kvalitete predstavlja tehnike i aktivnosti kojima se laboratorij služi kako bi se zadovoljila tražena kvaliteta. Odnosno, laboratorij mora garantirati ispravnost svih instrumenata, točnost i kvalitetu dobivenih rezultata u svim analizama i mora imati educirano osoblje. Validacija analitičkog sustava jedna je od mnogih koraka u osiguravanju kvalitete. Kako bi se validirao analitički sustav, potrebno je provesti vrednovanje svih njegovih bitnih koraka. To je dokumentirani proces kojim se ispituju sve pretpostavke na kojima se temelji analitička metoda i utvrđuju i dokumentiraju karakteristike izvedbe metode. Ona dokazuje je li metoda pogodna za određenu analitičku svrhu. Jednostavnije rečeno, njome se dokazuje da je mjerni postupak prikladan za točno određenu namjenu. Postupak validacije obavezan je prilikom uvođenja nove metode u laboratorij i svaki put nakon promjene bilo kojeg dijela analitičkog sustava. Postupak validacije obuhvaća ispitivanje sljedećih značajki: preciznost, točnost, linearnost, granicu detekcije, granicu kvantifikacije, analitičku specifičnost i selektivnost, iskoristivost, otpornost metode, interferencije i dr. Validacija može biti potpuna ili djelomična što ovisi o tome da li se provode sve izvedbene značajke metode ili samo određene. Djelomična validacija se provodi kada se rabe prethodno validirane metode kojima se treba potvrditi primjenjivost u laboratoriju. Validirati se može svaki korak u analitičkom sustavu, ali u osiguravanju kvalitete najbitnija je validacija uzorka i uzorkovanja, validacija metodologije i validacija podataka. Validacija metode najbitniji je korak u osiguravanju kvalitete. Budući da se analitičke metode razlikuju, ne postoji univerzalna metoda validacije. Tijekom bilo kojeg procesa validacije najbitnije je prepoznati najvažnije parametre i postaviti zahtjeve na te parametre.[1]

U ovom radu provedena je djelomična validacija metode određivanjem preciznosti (ponovljivosti i obnovljivosti), granice detekcije i granice kvantifikacije.

2.5.1. Određivanje preciznosti

Određivanje preciznosti uključuje dva važna pojma, a to su ponovljivost i obnovljivost. Ponovljivost znači da će se istom metodom, istim uzorkom i u istim uvjetima uvijek dobiti isti rezultati, a obnovljivost potvrđuje ispravnost metode kada je riječ o istoj metodi i uzorku, ali drugim uvjetima rada (npr. promjena mjesta, analitičara ili vremena). Preciznost se općenito izražava kao standardna devijacija (SD), RSD te raspon (interval) pouzdanosti srednje vrijednosti. Granice prihvatljivosti ovise o tipu analize i matici uzorka te o koncentraciji analita. Preciznost govori o veličini slučajne pogreške.[1]

2.5.2. Granica detekcije

Granica detekcije (LOD) je najmanja količina analita u uzorku koja se može detektirati uz odgovarajuću preciznost i istinitost, ali ne nužno i kvantificirati. Postoji više načina određivanja LOD-a, ali općenito se određuje statistički kao koncentracija koja odgovara najmanjem signalu koji se može detektirati uz neku određenu vjerojatnost. Najmanji signal računa se prema formuli: $k \cdot s_{s.v}$, gdje je k koeficijent koji izaberemo ovisno o željenom stupnju vjerojatnosti, najčešće je $k = 3$, a $s_{s.v}$ je standardno odstupanje niza mjerenja slijepe probe.[1] LOD se može odrediti još vizualno razrjeđenjem uzorka gdje se procjenjuje najmanji signal koji se nedvojbeno može prepoznati ili s pomoću omjera signal / šum. Omjer signal / šum može se primijeniti samo na analitičke postupke s baznom linijom, a prihvatljiv je omjer 3:1.[39]

2.5.3. Granica kvantifikacije

Granica kvantifikacije (LOQ) je najmanja moguća koncentracija analita koja se može odrediti uz dopuštenu pogrešku. Kao i granica detekcije najčešće se određuje prema gore navedenoj formuli, a preporučani $k = 10$. [1] Također se može odrediti vizualno razrjeđenjem osnovne otopine ili omjerom šuma / signala, a u ovom slučaju je prihvatljivost omjera 10:1. Određivanje LOQ-a je iznimno važno kod mjerenja analita u tragovima, koji i u vrlo niskim koncentracijama mogu nepovoljno djelovati na okoliš i zdravlje ljudi.

Kod izračunavanja LOD-a i LOQ-a, ukoliko se zahtjeva određena preciznost, prilikom statističke metode određivanja, potrebno je isti uzorak mjeriti pet do šest puta. Iz dobivenih rezultata se izračuna relativna standardna devijacija (RSD) prema već navedenoj formuli. [39]

2.6. Umjerni postupci

Uz postupak validacije, umjeravanje je također temelj svakog mjerenja i to je sastavni dio kemijske analize. Mjerenje je proces uspoređivanja nepoznate vrijednosti s poznatom. Umjeravanje je postupak usporedbe mjernog sustava sa standardiziranim sustavom. Usporedba se može napraviti izravno ili neizravno, uporabom nekog prethodno kalibriranog instrumenta. Umjeravanje se provodi sa svrhom smanjenja ili čak uklanjanja pogreške u mjernom procesu. U procesu umjeravanja mjeri se signali dobiveni iz standardnih uzoraka poznate koncentracije i ti rezultati se prikazuju grafički ili matematički te se iz njih izračuna koncentracija nepoznatog analita. Ovisno o sustavu, pri umjernoj analizi, rezultat može biti umjerna krivulja ako je riječ o jednokomponentnom sustavu ili umjerna površina ako je riječ o višekomponentnom sustavu.[32]

2.6.1. Umjerni dijagram

Umjerni dijagrami su sastavni dio postupka umjeravanja. Rezultat analize najčešće prikazujemo kao relativnu vrijednost prema nekom referencijskom uzorku. U analitičkoj kemiji se često koriste instrumentalne metode. Prije analize nepoznatog uzorka, naprave se standardne otopine različitih koncentracija i očita se odziv instrumenta ovisno o njihovoj koncentraciji. Ti rezultati prikazuju se u dijagramu. Takav dijagram naziva se umjerni dijagram i služi za određivanje koncentracije ispitivanog uzorka, ako je riječ o uskom koncentracijskom području dobivena ovisnost biti će linearna, ali to nije uvijek slučaj. Prilikom svakog umjernog postupka može doći do sustavne pogreške. Takve pogreške mogu potjecati od instrumenta, analitičara i standardne otopine. Pošto je priprava standardnih otopina početak svakog postupka umjeravanja, njoj se daje najveća pozornost. Važni koraci priprave standardnih otopina su provjera njihove čistoće, postupak vaganja, otapanje i razrjeđivanje na određeni volumen. Svaki od tih koraka može utjecati na koncentraciju otopine koja će u daljnjoj analizi služiti kao referencijska vrijednost. U savršenom standardu udio nečistoće ne smije biti veći od 0,02%. Jednom pripremljeni umjerni dijagram ne smije se koristiti bez vremenskog ograničavanja. Ovisno o zahtijevanoj točnosti analize, o stabilnosti standardnih otopina, o preporuci proizvođača i ponajviše o cijeni umjernog postupka potrebno ih je ponavljati što češće je moguće.

Kad se napravi umjerni dijagram za željenu instrumentalnu metodu i ako se uspjelo svesti ovisnost između analita i odziva instrumenta na linearnu ovisnost, lako se izračuna nepoznata koncentraciju uzorka iz jednadžbe pravca: $y = a + bx$. U jednadžbi pravca y je mjereni parametar, x koncentracija, b nagib pravca i a odsječak na ordinati ili slijepa vrijednost. Na ovaj

način određuje se koncentracija nepoznatog uzorka samo ako je riječ o linearnoj ovisnosti. Kad nije riječ o linearnoj ovisnosti, određivanje nepoznate vrijednosti je kompliciraniji proces.[32]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Aktivni mulj

Aktivni mulj koji se koristio u radu zaprimljen je iz tvrtke Jamnica d.o.o. Nakon slijepe probe utvrđeno je da nije onečišćen farmaceuticima. Prilikom eksperimenta, kako bi utvrdili učinkovitost ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja, onečistili (špikali) smo ga standardnom otopinom farmaceutika.

3.1.2. Farmaceutici

Aktivni mulj špikan je sa 7 farmaceutika iz različitih skupina farmaceutika. Albendazol, febantel i prazikvantel koji spadaju u antihelmintike, cefdinir i nitrofurantoin koji spadaju u antibiotike, hidrosiklorokin iz skupine kemoterapeutika i metoklopramid iz skupine antiemetika.

3.1.3. Kemikalije

Otapala korištena pri ultrazvučnoj ekstrakciji su: metanol (MeOH), etanol (EtOH) i metanol:voda (1:1), a kao pokretna faza prilikom analize uzoraka na HPLC-u koristio se acetonitril. Sve kemikalije prikazane su u Tablici 4.

Tablica 4. Kemikalije korištene prilikom eksperimenata

Naziv	Molekulska formula	Proizvođač
Acetonitril	CH ₃ CN	Fisher Chemical, Velika Britanija
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	Gram – mol, Hrvatska
Metanol	CH ₃ OH	JT Baker, Nizozemska
Voda	H ₂ O	MiliQ, FKIT, Hrvatska

3.2. Aparatura

3.2.1. Analitička vaga

Za vaganje aktivnog mulja korištena je analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, a za vaganje farmaceutika Mettler Toledo, XA105 (Slika 12.)



Slika 12. Analitička vaga Mettler Toledo, AB104 (lijevo) i analitička vaga Mettler Toledo, XA105(desno)

3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz aktivnog mulja provedena je u ultrazvučnoj kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka, prikazanoj na Slici 13. Ultrazvučna kupelj ima mogućnost podešavanja temperature kupelji, vremena trajanja ekstrakcije i snage ultrazvuka. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C, vrijeme od 1-99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W.

Za eksperiment kao optimalni uvjeti koristili su se temperatura kupelji 30 °C, vrijeme trajanja ekstrakcije 60 min, a snaga 600 W.



Slika 13. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P

3.2.3. Rotavapor

Uparavanje ekstrakata provedeno je na rotavaporu Büchi Waterbath B – 480, Švicarska i Büchi Rotavapor R-114. Uređaj je prikazan na Slici 14.



Slika 14. Rotavapor Büchi Waterbath B – 480

3.2.4. Tekućinski kromatograf (HPLC)

Dobiveni ekstrakti analizirani su na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti Varian ProStar 500, SAD, uređaj je prikazan na Slici 15. Sastoji se od automatskog uzorkivača 410, pumpe 230, detektorom s nizom dioda 330, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala kojim se upravlja preko računalnog programa, pomoću kojeg se očitavaju rezultati nakon analize. Za analizu je korištena kolona InterSustain™ C18 (GLSciences INC, Japan), dimenzija 4,6 mm × 250 mm, a veličina zrnaca kojima je ispunjena kolona iznosi 5 μm.



Slika 15. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti Varian ProStar 500

3.3. Metode rada

3.3.1. Obrada aktivnog mulja

Aktivni mulj zaprimljen je u tekućem obliku prikazanom na Slici 16. u karnistrima. Nakon što se istaložio, voda je dekantirana, a mulj izliven u plastične posude obložene filter papiirom te ostavljen da se osuši. Sušio se 10 dana u digestoru uz povremeno isisavanje nakupljene vode špricom od 50 mL i krajnji rezultat prikazan je na Slici 17.



Slika 16. Aktivni mulj u zaprimljenom stanju [40]



Slika 17. Osušeni aktivni mulj

Kako bi ultrazvučna ekstrakcija bila učinkovitija potrebno ga je usitniti u tarioniku do sitnog praha. Usitnjeni aktivni mulj prikazan je na Slici 18. Nakon toga se sušio u sušioniku 24 sata na 105 °C kako bi se uklonila preostala vlaga i čuvao se u eksikatoru.



Slika 18. Usitnjeni aktivni mulj

3.3.2. Priprema standardne otopine farmaceutika

Standardna otopina farmaceutika pripravljena je vaganjem 5mg svakog farmaceutika u plastične posudice na vagi Mettler Toledo, XA105. Odvage farmaceutika prikazane su na Slici 19.



Slika 19. Odvage farmaceutika s lijeva na desno (albendazol, febantel, prazikvantel, cefdinir, nitrofurantoin, hidroksiklorokin i metoklopramid)

Farmaceutici su otopljeni u metanolu HPLC čistoće u tikvici od 100 mL. Tako da je masena koncentracija pojedinog farmaceutika iznosila 50 mg/L (ppm). Standardna otopina čuvana je u hladnjaku na temperaturi od 4°C.

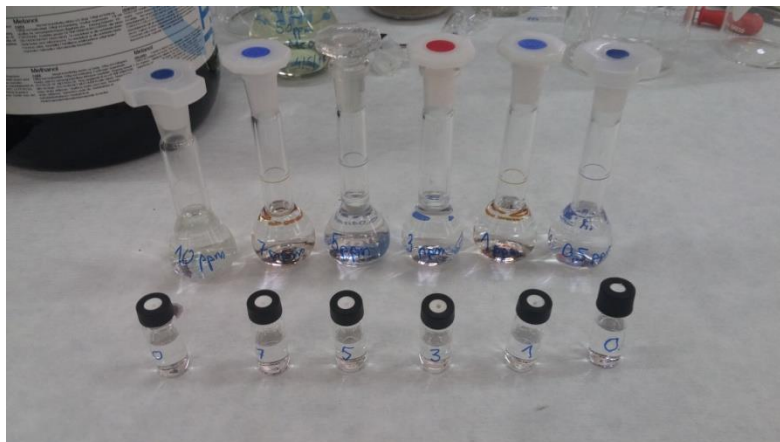
3.3.3. Umjerni dijagrami

Kako bi napravili umjerne dijagrame za pojedini farmaceutik bilo je potrebno razrijediti standardnu otopinu na sljedeće koncentracije: 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L, 1 mg/L, 3 mg/L, 5 mg/L, 7 mg/L i 10 mg/L u tikvice od 10mL. Potreban volumen standardne otopine izračunat je iz formule:

$$V_1 = \frac{\gamma_2 \cdot V_2}{\gamma_1}$$

Gdje je V_1 potrebni volumen standardne otopine, γ_2 potrebna masena koncentracija (npr. 0,05 mg/L), V_2 volumen tikvice (10mL) i γ_1 masena koncentracija standardna otopine (50 mg/L).

Otopine su razrijeđene metanolom i prebačene u vijalice (Slika 20.) te analizirane na HPLC-DAD.



Slika 20. Pripravljene standardne otopine

Apsorpcijski spektri za svih 7 farmaceutika dobiveni su snimanjem standardnih otopina na spektrofotometru. Iz apsorpcijskih spektra određene su valne duljine maksimuma apsorpcije pri kojima se kvantificiraju pojedini farmaceutici i njihovo vrijeme zadržavanja. Ti podaci prikazani su u Tablici 5.

Tablica 5. Prikaz farmaceutika, valnih duljina pri kojima se analiziraju i njihova vremena zadržavanja.

FARMACEUTIK	VALNA DULJINA[nm]	VRIJEME ZADRŽAVANJA [τ]
Albendazol	210	23,0270
Febantel	210	25,6933
Prazikvantel	210	24,4933
Nitrofurantoin	370	20,9467
Cefdinir	280	18,773
Hidroksiklorokin	343	17,0190
Metoklopramid	280	19,2000

3.3.4. Validacija metode

Metoda je validirana određivanjem ponovljivosti, obnovljivosti, granice detekcije (LOD) i granice kvantifikacije (LOQ).

3.3.5. Priprava špikanog mulja

Špikani mulj pripravo se na slijedeći način:

- U posudicu za vaganje vagano je tri puta po 10 g prethodno obrađenog aktivnog mulja
- U prvu posudicu je dodano 10 mL standardne otopine koncentracije 1 mg/L, u drugu 10 mL standardne otopine koncentracije 5 mg/L i u treću 10 mL standardne otopine koncentracije 10 mg/L
- U sve tri posudice je dodano 12 mL metanola te se promiješalo laganim pokretima u obliku osmice kako bi se lakše homogeniziralo
- Dobivene smjese ostavile su se jedan dan u mućkalici (ali bez mućkanja) na 30°C da metanol ishlapi.

3.3.6. Ultrazvučna ekstrakcija

Nakon priprave špikanog mulja, potrebno je pripremiti uzorke za ultrazvučnu ekstrakciju.

Priprava uzoraka sastojala se od slijedećih koraka:

- U jednu staklenu bočicu odvagalo 0,5 g aktivnog mulja koji nije špikan. Taj uzorak je služio kao slijepa proba.
- U tri staklene bočice sa čepom odvagalo se 0,5 g aktivnog mulja špikanog standardnom otopinom 1 mg/L i postupak se ponovio s ostale dvije koncentracije (aktivnim mulj koncentracije 5 mg/L i 10 mg/L) – sve skupa 9 odvaga (3x3).
- U svaku bočicu dodano je 3 mL metanola te su se tako pripremljeni uzorci stavili u ultrazvučnu kupelj.

Uvjeti rada ultrazvuka su optimirani: 60min, 30°C i snaga 600W. Nakon ultrazvučne ekstrakcije provedena je filtracija uzoraka kako bi se dobili čisti ekstrakti. Za filtraciju se koristio Filter papir „*FilterBio NY Syringe Filter*“, veličine pora 0,45 µm. Pomoću šprice se izvuče otopina iz smjese te se otopina kroz filter papir uštrca u tikvicu s okruglim dnom. Pribor za filtriranje prikazan je na Slici 21. Nakon toga ekstrakti se uparavaju na rotavaporu Büchi Waterbath B – 480 na 40 °C do suha. U tikvicu sa suhim ostatkom doda se 1 mL metanola i

tikvica se rotira dok se sav suhi ostatak ne otopi (otprilike 20 puta u jednu stranu i 20 puta u drugu stranu). Zatim se otopine pretoče u vijalice i slijedi analiza na HPLC-u.

Ultrazvučna ekstrakcija se provodila s još dva otapala: etanol i metanol:voda(1:1). Postupak pripreve uzoraka je isti kao što je već opisano, samo se u trećem koraku umjesto 3 mL metanola dodalo 3 mL etanola, odnosno 3 mL smjese metanol:voda(1:1).



Slika 21. Pribor za filtriranje ekstrakta

3.3.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Dobiveni uzorci su se analizirali tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s nizom dioda (HPLC-DAD). Prilikom analize uzoraka vrlo je bitno dobro postaviti program. Analizirali su se redom: standardne otopine, slijepa proba i ekstrakti. Volumen injektiranja uzoraka bio je 30 μ L. Svaki ekstrakt je injektiran 3 puta kao i standardne otopine potrebne za umjerne dijagrame, a slijepa proba jedanput. Kao pokretna faza korišteni su 0,01% mravlja

kiselina u vodi i 0,01% mravlja kiselina u acetonitrilu. Kolona se ispirala kada je to potrebno, injektiranjem 10 μ L metanola. Brzina protoka pokretne faze bila je 0,5 mL/min.

Kromatogrami su snimani pri sljedećim valnim duljinama: 210nm, 280nm, 343nm i 370nm. Površine farmaceutika iz kromatograma se očitavaju na temelju valne duljine koju apsorbiraju i njihovog vremena zadržavanja (Tablica 5.). Dobiveni rezultati su obrađeni u programskom paketu Microsoft Office Excel 2016.

Učinkovitost ekstrakcije praćena je kao iskorištenje, η [%]. Iskorištenje je izračunato kao omjer površine kromatografske krivulje analita u ekstraktu i površine kromatografske krivulje analita u standardu prema sljedećoj formuli:

$$\eta = \frac{A_{i,E}}{A_{i,STD}} \times 100$$

gdje je $A_{i,E}$ površina kromatografske krivulje analita u ekstraktu, a $A_{i,STD}$ površina kromatografske krivulje analita u standardu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Postoje mnoge metode ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja. Cilj ovog rada bio je provesti validaciju ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja te pokazati da je metoda prikladna za tu namjenu.

Prije svega bilo je potrebno napraviti umjerne dijagrame koji su služili za usporedbu rezultata. Na temelju valne duljine pri kojoj se apsorbira određeni farmaceutik i njegovog vremena zadržavanja (Tablica 5.), iz kromatograma su očitane površine svakog farmaceutika u standardnim otopinama pri različitim koncentracijama te su napravljeni umjerni dijagrami. Umjerni dijagrami temelje se na ovisnosti koncentracije farmaceutika o površini koju zauzima. Dobiveni umjerni dijagrami prikazani su u Tablici 6.

Tablica 6. Umjerni dijagrami za svaki farmaceutik prikazan je u obliku jednadžbe pravca

Farmaceutik	Jednadžba pravca	Koeficijent korelacije R^2	Koncentracijski raspon [mg/L]
Albendazol	$y = 2E+06x - 80147$	0,9968	0,05-10
Febantel	$y = 1E+06x - 56035$	0,9961	0,05-10
Prazikvantel	$y = 2E+06x - 126739$	0,9972	0,05-10
Nitrofurantoin	$y = 1E+06x - 130234$	0,9919	0,05-10
Cefdinir	$y = 292974x - 142635$	0,9902	0,05-10
Hidroksiklorokin	$y = 271121x - 115861$	0,9977	0,05-10
Metoklopramid	$y = 805193x - 43036$	0,9941	0,05-10

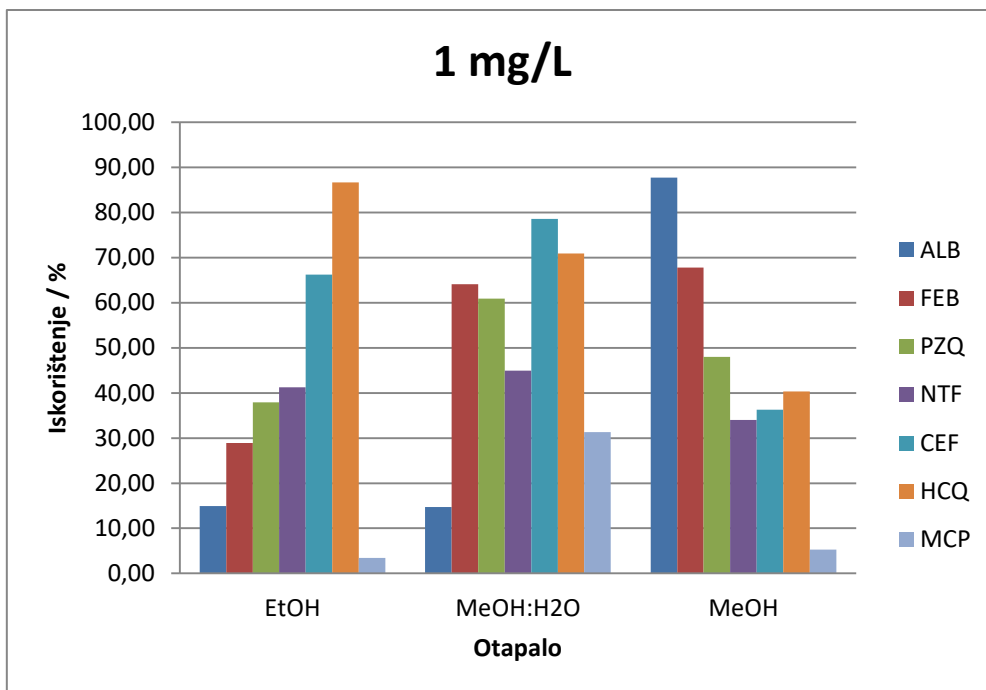
Metoda je validirana određivanjem preciznosti, granice detekcije i granice kvantifikacije. Preciznost se mjerila istovremenom analizom pet uzoraka standardne otopine farmaceutika koncentracije 5 mg/L . Prva analiza provela se 25.5.2018., a druga analiza 6.6.2018. Kriteriji prihvatljivosti za preciznost metode su: RSD < 10%. Rezultati su potvrdili kvalitetu metode i prikazani su u Tablici 7.

Tablica 7. Dobiveni rezultati provedbom validacije metode

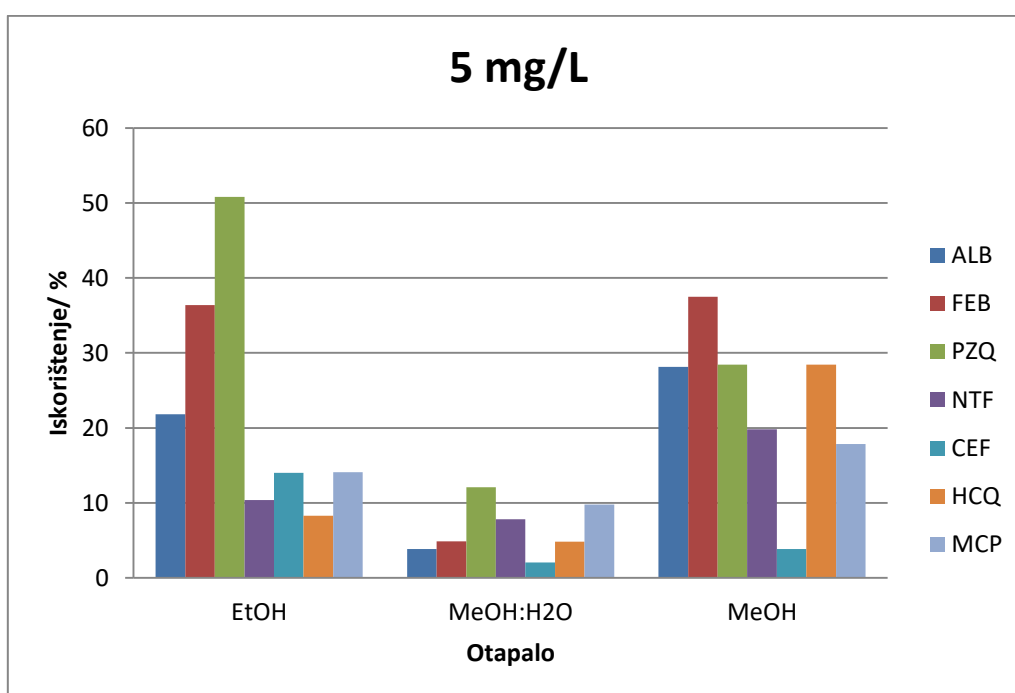
	Ponovljivost (5 mg/L) RSD(%)		Obnovljivost (5 mg/L)	LOD [mg/L]	LOQ [mg/L]
	25.5.2018.	6.6.2018.			
Albendazol	0,26	0,35	1,11	0,024	0,072
Febantel	0,86	0,51	2,79	0,552	0,541
Prazikvantel	0,22	1,02	1,47	0,012	0,036
Nitrofurantoin	0,19	0,27	0,49	0,018	0,054
Cefdinir	2,62	7,83	7,47	0,140	0,425
Hidroksiklorokin	3,50	1,89	3,35	0,107	0,324
Metoklopramid	1,55	5,26	3,66	0,317	0,960

Nakon provedene validacije metode. Analizirali su se uzorci špikanog mulja različitih koncentracija farmaceutika i pripremljeni ultrazvučnom ekstrakcijom s različitim otapalima.

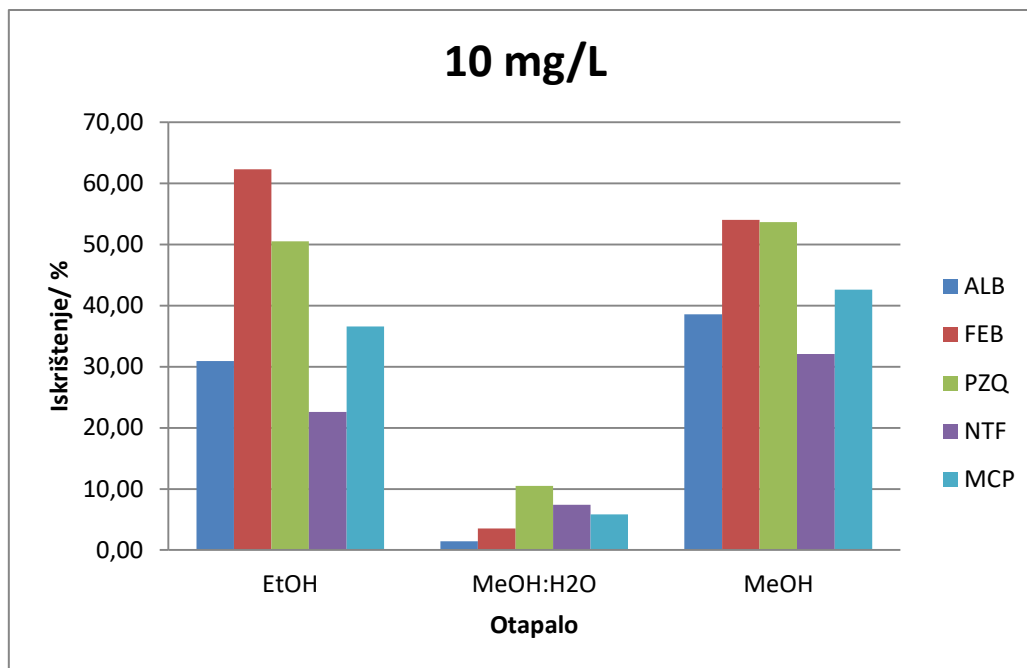
Dobiveni rezultati obradili su se u Excel-u i prikazani su grafički sa stupićima za aktivni mulj špikan slijedećim koncentracijama standardne otopine farmaceutika: 1 mg/L, 5 mg/L i 10 mg/L. (Slika 22.,23. i 24.)



Slika 22. Grafički prikaz iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije za aktivni mulj špikan standardnom otopinom farmaceutika koncentracije 1 mg/L



Slika 23. Grafički prikaz iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije za aktivni mulj špikan standardnom otopinom farmaceutika koncentracije 5 mg/L



Slika 24. Grafički prikaz iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije za aktivni mulj špikan standardnom otopinom farmaceutika koncentracije 10 mg/L

Na svakom grafu prikazano je iskorištenje (η %) s obzirom na pojedino otapalo i farmaceutik.

Prvo otapalo koje se koristilo u eksperimentu bio je metanol (MeOH). Analizom rezultata može se zaključiti da je metanol ujedno i najbolji izbor otapala. Iskorištenje se za pojedine farmaceutike, prilikom uporabe metanola kao otapala, kreće od minimalnih 3,84% dobivenih pri ekstrakciji cefdinira iz čvrstog uzorka koncentracije 5 mg/L, do maksimalnih 87,73% dobivenih ekstrakcijom albendanzola iz čvrstog uzorka koncentracije 1 mg/L.

Slijedeće otapalo koje se koristili bio je etanol (EtOH). Etanol se pokazao kao vrlo dobro otapalo. Pri uporabi etanola kao otapala iskorištenja se kreću od minimalnih 3,43% dobivenih pri ekstrakciju metoklopramida i maksimalnih 86,69% dobivenih pri ekstrakciji hidroksiklorokina. Zanimljivo je da je i minimalno i maksimalno iskorištenje dobiveno pri analizi ekstrakta dobivenih iz aktivnog mulja špikanog s najmanjom koncentracijom farmaceutika (1 mg/L). Prilikom korištenja etanola kao otapala, može se vidjeti da za antihelmintike (ALB, FEB, PZQ) i antiemetika (MCP) povećanjem koncentracije standardne otopine kojom se špika mulj također se povećava iskorištenje reakcije. Kod ostalih farmaceutika i drugih otapala to nije slučaj.

Kao posljednje otapalo koristila se smjesa metanol:voda u omjeru 1:1. Primjenom te smjese otapala došlo je do poteškoća u eksperimentalnom dijelu. Dobiveni ekstrakti bili su gusti te se

nisu mogli dobro pročistiti filtriranjem. Sustav metanol:voda pokazao se kao najlošije otapalo, iskorištenja su puno manja nego kod uporabe druga dva otapala što se može vidjeti iz grafičkog prikaza.

Metanol se pokazao kao najbolje otapalo jer u prosjeku ima bolje iskorištenje od ostala dva otapala koja su se analizirala.

5. ZAKLJUČAK

Kao što je već rečeno, cilj rada bio je validirati metodu ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja. U kemijskoj analizi najbitnije je da rezultati budu pouzdani jer se na temelju njih donose važne odluke. Iz tog razloga svako istraživanje okoliša, ali i općenito, mora uključivati osiguranje kvalitete mjernih podataka. Provedbom validacije zaključeno je da je metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Međutim, dobivenim rezultatima može se zaključiti da ultrazvučna ekstrakcija nije najbolja metoda za estrahiranje farmaceutika iz aktivnog mulja. Može se koristiti pri analizi aktivnog mulja kako bi se utvrdilo da li mulj sadrži pojedine farmaceutike, ali nije pogodna za uklanjanje farmaceutika iz aktivnog mulja jer iskorištenje u većini slučajeva ne prelazi zahtijevanih minimalnih 50%. Međutim, ukoliko se ova metoda ipak izabere u ovome eksperimentu je potvrđeno slijedeće:

- Kao najbolje otapalo za ultrazvučnu ekstrakciju pokazao se metanol, iako je i etanol pokazao slične rezultate, sustav metanol:voda(1:1) pokazao je dobre rezultate samo kada je riječ o niskoj koncentraciji farmaceutika u aktivnom mulju (1 mg/L).
- Metanol se pokazao kao vrlo dobro otapalo za estrahiranje albendanzola i febantela iz aktivnog mulja, dok se etanol pokazao kao dobro otapalo za ekstrakciju prazikvantela iz aktivnog mulja .
- Također se može zaključiti da je metoda učinkovitija pri nižim koncentracijama farmaceutika u aktivnom mulju, dok se za analizu koncentracije 5 mg/L niti jedno otapalo nije pokazalo pogodnim.
- Metoda nije pogodna kada se sumnja na visoke koncentracije cefdinira ili hidroksiklorokina u aktivnom mulju. Primjenom svih otapala u niti jednom ekstraktu koncentracije 10 mg/L prilikom analize na HPLC-u ovi farmaceutici nisu detektirani.

6. LITERATURA:

- [1] M. Kaštelan-Macan, M. Petrović, Analitika okoliša, (ožujak 2013.), str. 75, 140-165, 206-209, 339-349.
- [2] M. Periša i S. Babić: Farmaceutici u okolišu, Kem. Ind. 65 (9-10) (2016), str. 471–482.
- [3] Antibiotici u okolišu, Hrvatska:
<http://www.novolist.hr/Vijesti/Hrvatska/Sava-ponovo-zagadena-antibioticima-iz-domace-farmaceutske-industrije> (preuzeto 6.8.2018.)
- [4] Antihelmintici: <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2954> (preuzeto 9.8.2018.)
- [5] N. T. Crosby, Determination of veterinary residues in food, Woodhead Publishing Limited, 2007, str. 240-245.
- [6] Antihelmintici: <http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> (preuzeto 22.8.2018.)
- [7] Albendazole structure:
<http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/images/v32270/cas-54965-21-8.gif> (preuzeto 10.8.2018.)
- [8] K. Divya, B. Narayana, Journal of the Association of Arab Universities for Basic and Applied Sciences (2016) 19, str. 23–28.
- [9] Febantel:
https://www.krka.biz/media/products/hr/vet/gen_pdf/2012/dehinel_plus_flavour_pil.pdf (preuzeto 10.8.2018.)
- [10] Febantel structure:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sial/33981?lang=en®ion=HR> (preuzeto 10.8.2018.)
- [11] R. Yang, T. Zhang, J. Yu, Y. Liu, Y. Wang, Z. He, In vitro/vivo assessment of praziquantel nanocrystals: Formulation, characterization, and pharmacokinetics in beagle dogs, Asian journal of pharmaceutical sciences, (2017.), str. 1-2.
- [12] W.Wang, L. Wang, Y.-S. Liang, Susceptibility or resistance of praziquantel in human schistosomiasis, Parasitology Research, 111(5), (2012.), str. 1871–1873.

- [13] Prazikvantel struktura: <https://www.medchemexpress.com/Praziquantel.html> (preuzeto 13.8.2018.)
- [14] S. Kalenić, B. Bedenić, Medicinska mikrobiologija, poglavlje 15. Antibakterijski lijekovi, (2013.), str. 221-251.
- [15] D. R. P. Guay , Cefdinir: Cefdinir: An Advanced-Generation, Broad-Spectrum Oral Cephalosporin, Clinical therapeutics, (2002), str. 473–477.
- [16] Cefdinir struktura: <https://www.medchemexpress.com/Cefdinir.html> (preuzeto 15.8.2018.)
- [17] D. G. Waller, A.P. Sampson, Medical Pharmacology and Therapeutics, Chemotherapy of infections, (2018)., str. 588–591.
- [18] Nitrofurantoin struktura: <http://epomedicine.com/clinical-cases/nitrofurantoin-effective-skin-infections/> (preuzeto 15.8.2018.)
- [19] M. Peng, K. O. Darko, T. Tao, Y. Huang, Q. Su, C. He, T. Yin, Z. Liu, X. Yang, Combination of Metformin with Chemotherapeutic Drugs via Different Molecular Mechanisms, Cancer Treatment, Reviews Cancer Treatment Reviews, (2017), str. 24-29.
- [20] Kemoterapeutici: <http://mediko.sveznadar.info/20Lijekovi/80Citostatici/Citostatici.html> (preuzeto 16.8.2018.)
- [21] A. Casian, S. Sangle, D. P. D'Cruz , New use for an old treatment: Hydroxychloroquine as a potential treatment for systemic vasculitis, Autoimmunity Reviews, (2018.), str. 660–664.
- [22] Hidroksiklorokin struktura: <https://www.healthtap.com/topics/hydroxychloroquine> (preuzeto 17.8.2018.)
- [23] S. Barni, F. Petrelli, M. Cabiddu, Cardiotoxicity of antiemetic drugs in oncology: An overview of the current state of the art. Critical Reviews in Oncology/Hematology, (2016). , str. 125–134.
- [24] J. B. Leonard, K. M. Munir, H.K. Kim, Metoclopramide induced pheochromocytoma crisis, The American Journal of Emergency Medicine, 36(6), (2018)., 1124.e1–1124.e2.
- [25] L. L. Brunton, B. A. Chabner, B. C. Knollmann, Goodman & Gilman's, The Pharmacological basis of therapeutics, The McGraw-Hill Companies, Inc., 12th edition, (2011.), str. 1184.

- [26] Metoklopramid struktura:
<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/metoclopramide2998036462511?lang=en®ion=HR> (preuzeto 19.8.2018.)
- [27] Aktivni mulj: <https://www.azuvoda.hr/sekundarni-tretman/uredaj-na-bazi-aktivnog-mulja/> (preuzeto 23.8.2018)
- [28] Aktivni mulj:
<https://repositorij.pmf.unizg.hr/islandora/object/pmf%3A4296/datastream/PDF/view>
(preuzeto 23.8.2018.)
- [29] Obrada aktivnog mulja:
http://www.grad.hr/rescue/materijali/Izvjestaji_1/Izvjestaj_br_6_Analiza_trzista (preuzeto 23.8.2018.)
- [30] B. Tušar, Pročišćavanje otpadnih voda, Kigen d.o.o., Zagreb, 2009., str. 355-400.
- [31] D. Vouk, D. Malus, S. Tedeschi, Muljevi s komunalnih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, Sveučilište u Zagrebu Građevinski fakultet, Zagreb, (2010.), str. 342-349.
- [32] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, (2003.), str. 2-11, 241-253.
- [33] H. Drmić, A. Režek Jambrak, Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, Croatian journal of food science and technology, (2010.), str. 22-26.
- [34] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, (1999.), str. 692-697.
- [35] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 5.Izdanje, (2012.) str. 93-97.
- [36] HPLC metoda: http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm (preuzeto 26.8.2018.)
- [37] H. J. Kim, Advantages of Photo Diode Array for UV-Vis spectrophotometer, Lab Asia 11, (2004.),str. 27-28.
- [38] P. W. Scott, Tandem Techniques, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, (1997.), str. 53-54.
- [39] ICH Harmonised Tripartite Guideline on Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). ICH Secretariat, 2006, str. 10-12.
- [40] Active sludge: https://en.wikipedia.org/wiki/Activated_sludge

7. POPIS KRATICA:

1. $A_{i,E}$ – površina kromatografske krivulje analita iz ekstrakta
2. $A_{i,STD}$ - površina kromatografske krivulje analita u standardnoj otopini
3. ALB - albendazol
4. ATP – adenzin-trifosfat
5. CEF – cefdinir
6. DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)
7. DNK – deoksiribonukleinska kiselina
8. FEB – febantel
9. GC – plinska kromatografija
10. HCQ – hidroksiklorokin
11. HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti
12. LC – tekućinska kromatografija
13. LOD – granica detekcije
14. LOQ – granica kvantifikacije
15. MCP – metoklopramid
16. MDK – maksimalna dopuštena koncentracija neke tvari u okolišu
17. NTF – nitrofurantoin
18. PZQ – prazikvantel
19. RNK – ribonukleinska kiselina
20. RSD – relativna standardna devijacija
21. SD – standardna devijacija
22. SFC – fluidna kromatografija pri superkričnim uvjetima
23. UV/Vid – ultraljubičasto/vidljivo zračenje

8. ŽIVOTOPIS

Zovem se Kristina Bule, [REDACTED]

Pohađala sam osnovnu školu Vukomerec i srednju školu X. gimnazija Ivan Supek, u Zagrebu. Osnovnu i srednju školu završila sam sa odličnim uspjehom. Nakon završetka srednje škole, 2014. godine, upisala sam se na Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, na preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. Stručnu praksu odradila sam u tvrtki „JANAF“ (Jadranski naftovod d.o.o.) u Zagrebu u odjelu „Sigurnost i zaštita okol