

# Utjecaj abiotičkih procesa na farmaceutike u vodenom okolišu

---

**Dabić, Dario**

**Doctoral thesis / Disertacija**

**2020**

*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:149:577276>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-07-11**



*Repository / Repozitorij:*

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





Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I  
TEHNOLOGIJE

Dario Dabić

**UTJECAJ ABIOTIČKIH PROCESA NA  
FARMACEUTIKE U VODENOM OKOLIŠU**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Kandidat **Dario Dabić**

predao je dana: 15. siječnja 2020. doktorski rad izrađen pod  
mentorstvom prof. dr. sc. Sandre Babić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Povjerenstvo za ocjenu doktorskog rada u sastavu:

Prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Danijela Ašperger, Sveučilište u Zagrebu Fakultet  
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević, Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet

pozitivno je ocijenilo doktorski rad doktoranda Darija Dabića, a  
Fakultetsko vijeće Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Sveučilišta u Zagrebu na sjednici održanoj dana 27. travnja 2020.  
prihvatilo je ocjenu i odobrilo obranu doktorskoga rada pred  
povjerenstvom u istom sastavu.

Obrana doktorskoga rada održana je dana 12. svibnja 2020.

D e k a n

Prof. dr. sc. Tomislav Bolanča



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND  
TECHNOLOGY

Dario Dabić

**THE CONTRIBUTION OF ABIOTIC  
ELIMINATION PROCESSES TO THE  
FATE OF PHARMACEUTICALS IN THE  
AQUATIC ENVIRONMENT**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2020



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I  
TEHNOLOGIJE

Dario Dabić

# **UTJECAJ ABIOTIČKIH PROCESA NA FARMACEUTIKE U VODENOM OKOLIŠU**

DOKTORSKI RAD

Mentor: Prof. dr. sc. Sandra Babić

Zagreb, 2020.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND  
TECHNOLOGY

Dario Dabić

**THE CONTRIBUTION OF ABIOTIC  
ELIMINATION PROCESSES TO THE  
FATE OF PHARMACEUTICALS IN THE  
AQUATIC ENVIRONMENT**

DOCTORAL THESIS  
Supervisor: Prof. Sandra Babić

Zagreb, 2020

**Bibliografski podatci:**

*UDK:* 615:628.3:543.54(043.3)  
*Znanstveno područje:* Prirodne znanosti  
*Znanstveno polje:* Kemija  
*Znanstvena grana:* Primijenjena kemija  
*Institucija:* Sveučilište u Zagrebu  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije  
Zavod za analitičku kemiju

*Voditelj rada:* Prof. dr. sc. Sandra Babić  
*Broj stranica:* 165  
*Broj slika:* 54  
*Broj tablica:* 33  
*Broj literaturnih izvora:* 297  
*Datum obrane:* 12. 5. 2020.  
*Sastav povjerenstva za obranu:* Prof. dr. sc. Irena Škorić  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Prof. dr. sc. Danijela Ašperger  
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Sanda Rončević  
Prirodoslovno-matematički fakultet

*Rad je pohranjen u:* Knjižnici Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Marulićev trg 20

Nacionalnoj i sveučilišnoj knjižnici u Zagrebu,  
Hrvatske bratske zajednice b.b.

Biblioteci Sveučilišta u Osijeku,  
Europska avenija 24

Biblioteci Sveučilišta u Rijeci,  
Dolac 1

Biblioteci Sveučilišta u Splitu,  
Livanjska 5

Tema doktorskog rada

**UTJECAJ ABIOTIČKIH PROCESA NA FARMACEUTIKE  
U VODENOM OKOLIŠU**

prihvaćena je na sjednici Fakultetskog vijeća Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, održanoj dana 25. rujna 2017. godine, te na sjednici Senata Sveučilišta u Zagrebu održanoj dana 14. studenoga 2017. godine.



## ZAHVALE

Zahvaljujem mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pruženoj prilici izrade doktorata i rada na projektu. Hvala na svom uloženom vremenu, trudu i ispravicima tijekom poslijediplomskog studija.

Zahvaljujem članovima komisije na stručnim sugestijama koje su rad učinile boljim. Osim toga, zahvaljujem prof. Ireni Škorić na pomoći tijekom doktorata kada god je zatrebalo uz riječi ohrabrenja tako da su mnogi izazovi uspješno riješeni, te prof. Danijeli Ašperger na svim lijepim riječima i podršci u mnogim prilikama tijekom zadnjih nekoliko godina. Zahvaljujem izv. prof. Sandi Rončević na svim ispravicima doktorske disertacije, ali i za mnogo više od toga. Zahvaljujem doc. Bojani Žeguri na prenesenim znanjima i vrlo zanimljivom iskustvu rada u sterilnim uvjetima prilikom određivanja genotoksičnosti.

Hvala i mentorici dr. Renati Kobetić na diplomskom studiju koja me uvela u svijet znanosti, čije je nesebično zalaganje za mlade ostavilo kod mene zauvijek traga i pomoglo na doktorskom studiju sa znanstvenim i onim drugim izazovima. Također, da nije bilo strogoće i pravednosti profesorice Stjepane Raguž, teško da bih zavolio, upisao i završio sve studije kemije, tako da veliko hvala na tome, nije zaboravljeno.

Hvala Šimi na podršci, kada god je to bilo potrebno. Također, hvala Mirti na razgovorima i prenesenom znanju, bilo je lijepo dijeliti ured, samo šteta što nije duže trajalo. Hvala i ostalim kolegama sa ZAK-a.

Iako mi nisu bili potpuno jasni „proces“ u izradi doktorata koji dovode do toga da mnoge zahvale budu poprilično dirljive i emotivne, sada mogu zaključiti kako mi je jasno, tako da će se i moja zahvala opravdano produžiti.

Najveća hvala, samo u počecima kolegici, ali vrlo brzo pravoj prijateljici Martini, bez koje bi ovih nekoliko proteklih godina bile nezamislive. Hvala na svom prenesenom znanju, razumijevanju, podršci i sugestijama kada su nailazili problemi, bili oni znanstveni ili ne. I to u bilo koje vrijeme, kada god mi je bilo potrebno! Hvala i njenoj obitelji, Draženu i Franu na podršci, te bezbrižnim i ugodnim druženjima.

Svatko u životu ponekad u nekim stvarima bude više manje oštećen, ali zato mu se to ponekad i višestruko vrati. Potrebna ustrajnost bila bi nezamisliva bez Slavice i Tanje koje su cijelo vrijeme bile oslonac u svim prilikama od samih početaka. Da bi na kraju sve to ispalo savršeno dolaskom Kristine. Veliko vam hvala na podršci i silnoj pomoći kada god je trebalo „usmjerenje“. Takve geste i rezultati utrošene silne energije se ne moraju vidjeti nikad, ali zato barem ni neće nikad izaći iz pamćenja. Hvala i Boži na svim bezbrojnim skuhanim kavama i na jedinstvenoj energiji koja podiže i vraća u realnost. Iako su se navedeni uvijek držali po strani, to ne umanjuje njihov veliki doprinos što znaju svi oni koji su ih upoznali. Ostaje pomalo tužna činjenica kako će teško biti prihvatiti okolnosti, odnosno blizinu trenutka kada nećemo više moći raditi skupa. Moji „anđeli čuvari“, zajedno s Martinom, znaju koliko su mi znač(il)e i koliko vrijede.

Veliko hvala Sonji, Klaudiji i Kuli na stalnoj potpori i ohrabrenju, te iskrenom prijateljstvu, hvala na svemu što smo skupa prošli. Hvala i Tomi na pomoći kad god je zatrebalo te druženju uz *macchiato*.

Riječi zahvale onima koji to svakodnevno zaslužuju, nekako su mojom krivicom teško pronalazile put. Zato barem sada imam priliku zahvaliti najviše mojim divnim roditeljima i cijeloj obitelji (sekama Ines i Ireni, šogoru Hrvoju, baki, didi, teti, striki...) na SVEMU! Zbog nećakinja Nine i Ene, mnogo puta, svi problemi su se odjednom činili nebitnima...

Ovaj rad je izrađen uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 „Sudbina farmaceutika u okolišu i tijekom naprednih postupaka obrade vode“



## SAŽETAK

Abiotički procesi mogu značajno doprinijeti manjoj postojanosti farmaceutika u površinskim vodama. Sukladno tome, unutar doktorske disertacije istražen je utjecaj abiotičkih procesa na razgradnju farmaceutika hidroksiklorokina i metoklopramida u vodenom okolišu uporabom optimirane i validirane kromatografske metode, HPLC-PDA i HPLC-MS/MS. Ispitana je hidrolitička stabilnost, pri čemu je ustanovljeno kako su oba farmaceutika otporna na hidrolitičku razgradnju. Također, razvijene metode primijenjene su za praćenje fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina i metoklopramida pod utjecajem umjetnog Sunčeva zračenja. Ispitana je fotolitička razgradnja u destiliranoj deioniziranoj vodi te prirodnim i sintetskim otpadnim vodama. Rezultati su pokazali kako je izravna fotoliza odgovorna za razgradnju obaju farmaceutika i kako je posebno značajna u slučaju metoklopramida.

Neizravna fotoliza značajno je utjecala na vrijeme poluraspada hidroksiklorokina u riječnoj, izvorskoj i morskoj vodi. Značajno različita vremena poluraspada, pod utjecajem ksenonske svjetiljke ( $500 \text{ W m}^{-2}$ ), dobivena su pri različitim vrijednostima pH. Najbrža razgradnja uočena je pri  $\text{pH} = 9$  ( $t_{1/2} = 0,09 \text{ h}$ ), a najsporija pri  $\text{pH} = 4$  ( $t_{1/2} = 23,1 \text{ h}$ ). I u slučaju metoklopramida ( $250 \text{ W m}^{-2}$ ) vrijednost pH utjecala je na brzinu razgradnje, ali je vrijeme poluraspada u području pH relevantnom za vode u okolišu bilo kraće od 10 minuta.

Ispitivanjem utjecaja sastojaka prirodnih voda (nitrata, huminskih kiselina, klorida, bromida, sulfata, hidrogenkarbonata i željezovih(III) iona), utvrđeno je da nastankom hidroksilnih radikala dolazi do ubrzane razgradnje hidroksiklorokina. Drugi utjecaji, poput djelovanja određenih sastojaka vode kao hvatača radikala i zasjenjenja svjetlosti, manje su izraženi. U slučaju metoklopramida, neizravna fotoliza usporava razgradnju, jer prisutne tvari u prirodnim vodama (huminske kiseline, nitrati i dr.) također apsorbiraju svjetlo. U svim slučajevima kinetika je slijedila reakciju pseudo-prvog reda, osim za fotolitičku razgradnju metoklopramida u morskoj vodi, čija kinetika razgradnje odgovara dvoeksponencijalnoj funkciji (brzini razgradnje u dva stupnja). Sastav matice (velika koncentracija kloridnih iona) uzrokovao je sporiju fotolitičku razgradnju metoklopramida u morskoj vodi.

Spektroradiometrijski su određeni kvantni prinosi razgradnje obaju farmaceutika i ovisili su o vrijednosti pH, odnosno udjelu pojedine specije farmaceutika. Kvantni prinosi razgradnje

hidroksiklorokina za vrijednosti pH od 4 do 9 iznosili su  $(2,64 - 453,49) \cdot 10^{-4}$ , te za metoklopramid  $(35,83 - 22,98) \cdot 10^{-4}$  za raspon vrijednosti pH od 4 do 11.

Budući da abiotičkim procesima mogu nastati razgradni produkti toksičniji od početnog spoja, ispitana je toksičnost prema bakteriji *Vibrio fischeri* i genotoksičnost prema *Salmonella typhimurium* uporabom SOS/*umu-c* testa. Oba farmaceutika, kao i njihovi fotolitički produkti nisu toksični, prema navedenim testnim vrstama. Iznimka su smjese fotolitičkih produkata hidroksiklorokina za koje je 30 minutni test pokazao inhibiciju luminiscencije bakterije *Vibrio fischeri* (do 27 %). Nadalje, identificirano je nekoliko, do sada nepoznatih, razgradnih produkata za oba farmaceutika te su predloženi putovi razgradnje. Razgradni produkti nastali su kao rezultat hidroksilacije aromatskog prstena i dealkilacije na bočnom amino-ogranku. U slučaju metoklopramida uočeno je i fotodekloriranje, a u morskoj vodi i nukleofilna supstitucija atoma klora bromom.

Na temelju provedenih istraživanja može se zaključiti kako fotoliza može značajno doprinijeti razgradnji obaju farmaceutika u okolišu.

**Ključne riječi:** farmaceutici, hidroksiklorokin, metoklopramid, abiotički procesi, razgradni produkti, kvantni prinos, toksičnost

## SUMMARY

Abiotic processes can contribute considerably to degradation routes of pharmaceuticals in the environment. This doctoral thesis explores the role of abiotic processes in the degradation of hydroxychloroquine and metoclopramide in natural aquatic environments. Development and validation of appropriate chromatographic methods for their detection, as well as tests confirming their hydrolytic stability were performed.

The developed chromatographic methods (HPLC-PDA and HPLC-MS/MS) were used to monitor the photolytic degradation of hydroxychloroquine and metoclopramide in different water matrices (distilled deionised water, natural waterbodies and different samples of synthetic wastewater) under the effect of simulated solar radiation. The results showed that direct photolysis is responsible for the degradation of both pharmaceuticals, showing a larger contribution for metoclopramide.

Indirect photolytic degradation of hydroxychloroquine in rivers, water springs, and seawater significantly affects its half-life. Largely different half-lives under the influence of a Xe lamp ( $500 \text{ W m}^{-2}$ ) were obtained for different pH values, commonly found in the aquatic environment. The fastest degradation was observed at pH = 9 ( $t_{1/2} = 0.09 \text{ h}$ ) and the slowest at pH = 4 ( $t_{1/2} = 23.1 \text{ h}$ ). In the case of metoclopramide at  $250 \text{ W m}^{-2}$ , the pH also affected the rate of degradation, but the half-life for pH = 9 was less than 10 min.

Examination of the influence of natural water constituents (nitrates, humic acids, chlorides, bromides, sulfates, bicarbonates, and ferric(III) ions) showed that the formation of hydroxyl radicals increases degradation of hydroxychloroquine. For this compound, radical-scavenging properties and light screening effects due to these matrix constituents are less pronounced. In the case of metoclopramide, indirect photolysis decreased degradation due to the presence of light absorptive substances. In all cases, the kinetics followed a pseudo-first-order character, except for the photolytic degradation of metoclopramide in seawater in which the degradation kinetics corresponded to a two-stages function. Slower degradation of metoclopramide in seawater was observed due to the presence of chloride and bromide ions.

Quantum yields were determined using spectroradiometer for both pharmaceuticals, and values depended on the proportion of each compound in the mixture. Quantum yields of hydroxychloroquine were  $(2,64 - 453,49) \cdot 10^{-4}$  in the range of pH from 4 to 9, and quantum yields of metoclopramide  $(35,83 - 22,98) \cdot 10^{-4}$  for pH range from 4 to 11.

Since degradation products could potentially be more toxic than the original compounds, toxicity to *Vibrio fischeri* and genotoxicity to *Salmonella typhimurium* with SOS/umu-c test were examined. Only the photolytic products of hydroxychloroquine presented acute toxicity, with inhibition of *Vibrio fischeri* luminescence (up to 27%) being observed for a 30 minutes test. Furthermore, several degradation products for both pharmaceuticals were identified and degradation pathways were proposed. The degradation products were the result of hydroxylation of the aromatic ring and dealkylation on the amino-side chain. In the case of metoclopramide, photodechlorination was also observed, and in seawater and nucleophilic substitution of chlorine atoms by bromine.

Based on this research, it can be concluded that the contribution of photolysis to both pharmaceuticals is crucial for their respective environmental degradation routes.

**Keywords:** pharmaceuticals, hydroxychloroquine, metoclopramide, abiotic processes, degradation products, quantum yield, toxicity

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. OPĆI DIO.....	3
2.1. Farmaceutici kao zagađivala u okolišu .....	3
2.2. Rasprostranjenost farmaceutika u prirodnim i otpadnim vodama .....	9
2.3. Hidroksiklorokin .....	12
2.4. Metoklopramid .....	14
2.5. Abiotički procesi farmaceutika u okolišu.....	15
2.5.1. Hidroliza.....	17
2.5.2. Izravna fotoliza.....	19
2.5.2.1. Kvantni prinos .....	24
2.5.3. Neizravna fotoliza .....	30
2.6. Razgradni i transformacijski produkti .....	35
2.7. Kromatografske tehnike u analizi farmaceutika u okolišu.....	39
2.8. Toksičnost .....	44
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	50
3.1. Materijali .....	50
3.1.1. Farmaceutici .....	50
3.1.2. Kemikalije .....	50
3.1.3. Reagensi korišteni za određivanje inhibicije bioluminiscencije .....	50
3.1.4. Reagensi korišteni za određivanja genotoksičnosti i citotoksičnosti .....	51
3.1.5. Uzorci površinskih voda.....	51
3.2. Instrumenti .....	51

3.2.1. Uređaj za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem .....	52
3.2.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s PDA detektorom .....	53
3.2.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa.....	53
3.2.4. Uređaj za nuklearnu magnetsku rezonanciju .....	54
3.2.5. Luminometar .....	54
3.3. Metode rada.....	55
3.3.1. Priprava temeljnih standardnih otopina hidroksiklorokina i metoklopramida.....	55
3.3.2. Priprava otopina pufera za hidrolitičku razgradnju.....	55
3.3.3. Priprava otopina pufera za fotolitičku razgradnju.....	56
3.3.4. Priprava otopina za ispitivanje utjecaja sastava vode na fotolitičku razgradnju....	56
3.3.5. Karakterizacija prirodnih voda i huminskih kiselina .....	57
3.3.6. Osvjetljavanje otopina farmaceutika umjetnim Sunčevim zračenjem .....	59
3.3.7. Kromatografska analiza.....	61
3.3.8. Snimanje uzoraka nuklearnom magnetskom rezonancijom.....	62
3.3.9. Određivanje kvantnog prinosa .....	63
3.3.10. Procjena akutne toksičnosti.....	64
3.3.11. Procjena genotoksičnosti i citotoksičnosti .....	65
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	67
4.1. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina .....	68
4.1.1. Utjecaj pH i matice na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina.....	73
4.1.2. Identifikacija razgradnih produkata i putevi razgradnje hidroksiklorokina.....	89
4.1.3. Određivanje toksičnosti hidroksiklorokina i njegovih fotolitičkih produkata .....	96
4.2. Fotolitička razgradnja metoklopramida .....	100
4.2.1. Utjecaj pH i matice na fotolitičku razgradnju metoklopramida.....	102
4.2.2. Identifikacija razgradnih produkata i putovi razgradnje metoklopramida.....	113



4.2.3. Određivanje toksičnosti metoklopramida i njegovih fotolitičkih produkata.....	118
4.3. Razmatranja vezana uz ponašanje farmaceutika u okolišu .....	120
5. ZAKLJUČAK .....	121
6. LITERATURA.....	123
7. PRILOZI.....	148

## 1. UVOD

Farmaceutici predstavljaju mnogobrojnu i raznoliku skupinu spojeva koju većinom čine složeni organski spojevi. Oni posjeduju određena farmakološka svojstva pa sukladno tome, imaju važnu ulogu u zdravlju ljudi i životinja. Ali, budući da završavaju u okolišu prisutan je i njihov negativan utjecaj na okoliš i žive organizme. Poznatiji primjeri utjecaja farmaceutika poput: diklofenaka, sintetskih estrogena i metformina odnose se na ponašanje riba (smrtnost [1], agresivno ponašanje [2] i feminiziranost [3] te izumiranje supova (lat. *Gyps bengalensis*) u Pakistanu [4]). Glavni izvor ispuštanja farmaceutika u okoliš vezan je uz postrojenja za obradu otpadnih voda [5–7], a značajno mu pridonose i bolničke otpadne vode koje se miješaju s komunalnim vodama [8]. Nije zanemarivo ni njihovo unošenje putem komunalnih termalnih voda [9]. Zbog boljeg razumijevanja razloga zabrinutosti glede njihovog ispuštanja, neizostavno je osvrnuti se na podatak kako čak 97 % vode na Zemlji čini morska voda, dok 3 % čine slatke vode. Budući da se od ukupnog postotka slatke vode 2 % odnosi na vodu u ledu i snijegu na polovima, samo preostali 1 % dostupan je za ljudsku upotrebu [10, 11].

Kada farmaceutici dospiju u okoliš oni podliježu različitim procesima, poput: sorpcije i desorpcije te abiotičke ili biotičke razgradnje. Koji će se procesi odvijati ovisit će o fizikalno-kemijskim svojstvima farmaceutika, kao i prisutnim uvjetima u okolišu. Ako u okolišu dođe do abiotičke razgradnje, nastaju razgradni ili transformacijski produkti. Međutim, to ne uvjetuje nužno i smanjenje negativnog djelovanja, jer novonastali produkti mogu biti toksičniji od početne molekule farmaceutika. Osim navedenog, u slučaju da nastaju manje toksični razgradni produkti, to još uvijek ne rješava problem njihovog negativnog učinka na okoliš (zbog njihove pseudo-postojanosti). S obzirom na to da su abiotički procesi često presudni za konačnu sudbinu i ponašanje farmaceutika u okolišu, cilj rada bio je razumijevanje kemijskih i ekoloških aspekata do sada neistraženih farmaceutika hidrosiklorokina i metoklopramida. Mnogobrojna dosadašnja istraživanja [12–19] različitih farmaceutika potvrđuju kako je nužno pratiti njihovu sudbinu i ponašanje u okolišu, kao i njihov biološki utjecaj. Hidrosiklorokin i metoklopramid posebno su zanimljivi zbog njihove potencijalne postojanosti, bioakumulacije i velike potrošnje te nepoznate toksičnosti njihovih mogućih razgradnih produkata. Uz prethodno rečeno, ovi farmaceutici nisu zastupljeni u znanstvenim istraživanjima kao posljedica tzv. *Matthew* efekta [20]. Naime, kao posljedicu navedenog efekta znanstvenici istražuju farmaceutike zastupljene u znanstvenoj literaturi, a ne

one koji nisu istraženi i detektirani u prethodnim istraživanjima, iako je moguće da su oni i štetniji za okoliš [21].

Prvi dio ovoga istraživanja obuhvaćao je razvoj analitičkih metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s različitim detektorima (detektorom s nizom dioda i spregnutom spektrometrijom masa) u svrhu kvantitativnog određivanja farmaceutika hidrosiklorokina i metoklopramida te praćenja njihove razgradnje. Nakon optimizacije metoda, uslijedila je njihova validacija, kako bi se potvrdilo da metoda zadovoljava sve potrebne kriterije za praćenje ispitivanih farmaceutika i njihove razgradnje.

Glavni cilj istraživanja bio je ispitati značajne parametre koji utječu na hidrolitičku i fotolitičku razgradnju, pritom odrediti koeficijente brzine razgradnje i identificirati strukture novonastalih produkata te predložiti puteve razgradnje. Spomenuto je obuhvaćalo ispitivanje utjecaja različitih vrijednosti pH, različitog sastava matice: nitrata, huminskih kiselina, hidrogenkarbonata, sulfata, klorida, bromida i željezovih(III) iona uz njihove različite koncentracije u vodama iz okoliša. Također, cilj je bio ispitati akutnu toksičnost (*Vibrio fischeri*), citotoksičnost i genotoksičnost (*Salmonella typhimurium*) izabranih farmaceutika i nastalih razgradnih produkata.

U konačnici, cilj je doktorske disertacije prikazati nova saznanja o hidrosiklorokinu i metoklopramidu u prirodnim vodama, odnosno istražiti doprinos abiotičkih procesa navedenih farmaceutika na glavne značajke ekosustava. Kako se upotreba farmaceutika vraća poput bumerang efekta [22], nužno je saznati i spriječiti daljnje zagađenje i negativni utjecaj na ljude, floru i faunu. Uz sve prethodno rečeno, saznanja o fotolitičkoj razgradnji mogu biti od pomoći pri razvoju ili poboljšanju novih lijekova [23].

## 2. OPĆI DIO

### 2.1. Farmaceutici kao zagađivala u okolišu

Prema Svjetskoj zdravstvenoj organizaciji (engl. *World health organisation*, WHO) farmaceutici su sintetski ili prirodni kemijski spojevi, čiji aktivni sastojak, svojim pozitivnim utjecajima, doprinosi zdravlju ljudi i životinja [24]. Najčešće su to organske molekule s raznovrsnim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima. Karakterizira ih različita kemijska struktura, molekulska masa (pretežito između 200 i 1 000 Da) te farmakološko i fiziološko djelovanje. Farmaceutici su sve kemijske tvari namijenjene za uporabu u medicinskoj dijagnostici, liječenju ili sprječavanju bolesti kako u ljudskoj, tako i u veterinarskoj medicini. Uglavnom se klasificiraju prema njihovoj biološkoj aktivnosti i terapijskoj namjeni, odnosno dijele se na: antibiotike, analgetike, antineoplastike, antidepresive, antihistaminike, antimalarike,  $\beta$ -blokatore, narkotike i dr. [25, 26]. Također, mogu se podijeliti prema kemijskoj strukturi na: kinolone, cefalosporine, peniciline i dr. Ostale klasifikacije uključuju način djelovanja aktivne tvari, a primjer su antimetaboliti i alkilirajući agensi kod antineoplastika [27]. Unatoč manjoj uporabi određenih grupa, pojedini su farmaceutici biološki izrazito aktivni pri vrlo niskim koncentracijama i od posebnog su utjecaja na okoliš, budući da imaju negativan učinak na određene organizme. Njima pripadaju endokrino aktivni farmaceutici, odnosno hormoni (poput etinilestradiola). U okolišu su pronađeni različiti farmaceutici, a na **slici 1** prikazani su najzastupljeniji farmaceutici u okolišu.

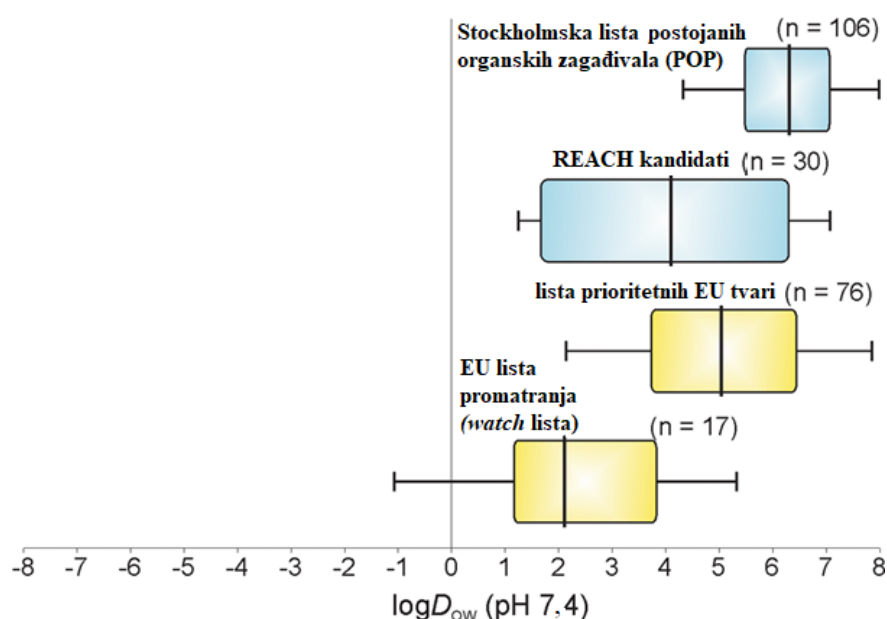


**Slika 1.** Najčešće pronađeni farmaceutici u okolišu (preuzeto iz [28])

Kemijska postojanost može se definirati kao sposobnost tvari da se zadrži u okolišu. Navedeni parametar propisan je u okviru Stockholmske konvencije [29] i koristi se pri odabiru kandidata organskih zagađivala u okolišu, sklonih bioakumulaciji i toksičnosti. Na međunarodnoj konvenciji u Stockholmu problem postojanih organskih zagađivala priznat je na međunarodnoj razini, a ugovorom su propisane mjere, alati i aktivnosti kojima je cilj spriječiti ili barem smanjiti utjecaj organskih zagađivala na okoliš [30–32]. Kanadska agencija za zaštitu okoliša postavila je kriterij prema kojemu se postojanim zagađivalom smatra tvar s vremenom poluraspada dužim od 60 dana u vodi i 180 dana u tlu [29]. Bioakumulacija se može definirati na nekoliko načina. Prema OECD-u (engl. *Organisation for Economic Co-operation and Development*) glavni kriterij za predviđanje bioakumulacije definiran je kemijskim parametrom  $\log K_{ow}$ , kojim se opisuje lipofilnost. Kemikalije s vrijednošću  $\log K_{ow} \geq 3$  smatraju se tvarima koje mogu prodrijeti u lipide i bioakumulirati se [33], što potvrđuje i prisutnost kemikalija (farmaceutika) u biološkim sustavima [34]. Navedenim, često iskazivanim parametrom, nije uzeto u obzir ionizacijsko stanje molekule, a ono također može utjecati na njihovu bioakumulaciju. Zbog spomenutih razloga, primijenjuje se faktor razdiobe ( $D_{ow}$ ), koji, za razliku od koeficijenta razdiobe oktanol-voda ( $K_{ow}$ ), uzima u obzir i

pH, odnosno stupanj ionizacije. Primjerice, bazični farmaceutici postoje kao organski kationi pri fiziološkim vrijednostima pH i onim relevantnim za okoliš, što utječe na membrane koje sadrže polarne i nabijene fosfolipide i membranske proteine. Dakle, može se očekivati da  $\beta$ -blokatori (propranolol,  $pK_a = 9,45$  [35]) budu skloni bioakumulaciji [34].

Međutim, sama problematika zagađivala u okolišu nije jednostavna, jer su u okolišu, osim farmaceutika, pronađeni i njihovi metaboliti te transformacijski i razgradni produkti. Metaboliti, uz pomoć enzima ili mikroorganizama u tijelu ljudi i životinja, nastaju kao posljedica mnogih biokemijskih reakcija u ljudskom organizmu. Metaboličke reakcije uključuju primarno procese: oksidacije, redukcije i hidrolize, čime posljedično nastaju polarnije molekule [18]. Nakon toga, dolazi do procesa: glukuronidacije, acetilacije i sulfatacije, čiji rezultat su hidrofilni metaboliti, koji se izlučuju urinom i/ili izmetom [36]. Unatoč tome što metaboliti mogu pokazivati farmakološku aktivnost i opasnost za okoliš, dugo vremena je u ciljanoj analizi bila zapostavljena njihova identifikacija u okolišu [37]. Isto tako, samo manji broj istraživanja nije usmjeren isključivo na farmaceutike nego i na njihove fotoproducte i metabolite [38, 39]. Na slici 2 vidljivo je kako novija istraživanja (poput liste za praćenje, engl. *watch list*) idu sve više u smjeru praćenja organskih spojeva nižih vrijednosti  $\log D_{ow}$ , čije ponašanje u okolišu još nije poznato.

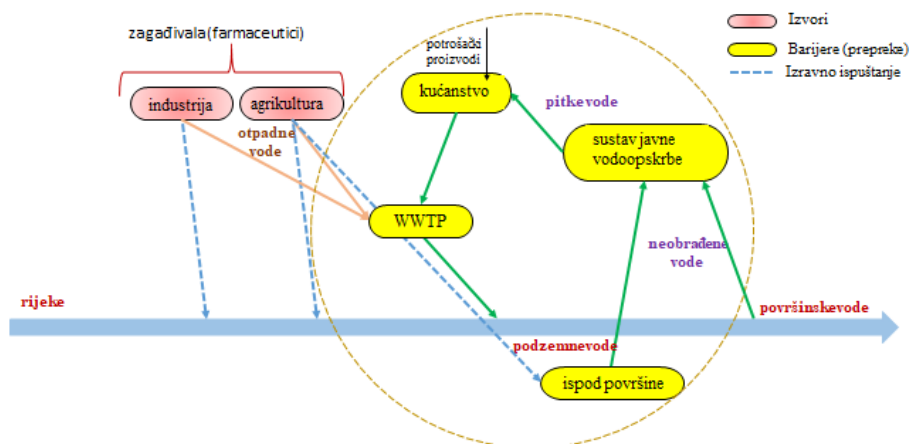


**Slika 2.** Prikaz vrijednosti  $\log D_{ow}$  (pH = 7,4) karakterističnih za zagađivala regulirana različitim dokumentima (preuzeto iz [40])

---

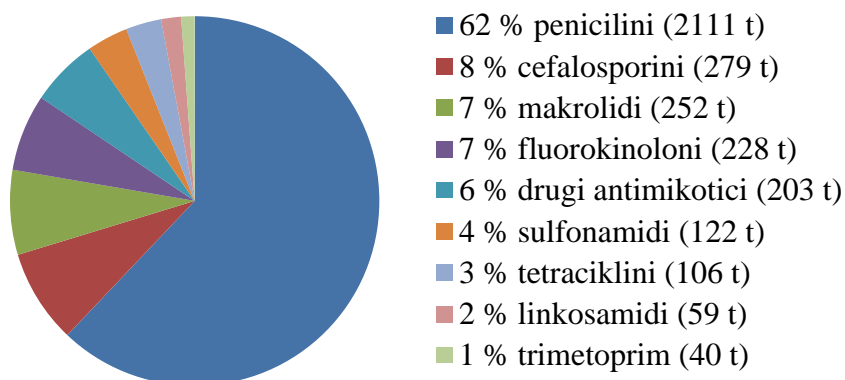
Budući da su farmaceutici detektirani globalno pri niskim koncentracijama u pitkim vodama, tlu i sedimentu, pripadaju kemikalijama s nedovoljno istraženim rizikom za ljudsko zdravlje pa se nazivaju „novim zagađivalima“ (engl. *emerging contaminants*) [41–43]. Iako je njihova prisutnost u okolišu poznata već desetljećima [44, 45], tek se prema članku 8.c direktive 2008/105/EC o standardima kvalitete okoliša u području vodne politike (što je odobreno direktivom 2013/39/EU) [46], obvezuje Europsku komisiju da razvije i provede strategiju zaštite voda u okolišu od farmaceutskih zagađivala. Prema preporukama zajedničkog istraživačkog centra i uz odobrenje država članica, Europska komisija prihvatila je i publicirala listu za praćenje tvari unutar direktive o vodama (engl. *Water Framework Directive*, WFD), na kojoj se nalazi samo određeni broj farmaceutika (njih desetak). Naime, kako je utvrđeno u članku 8.b Direktive 2008/105/EZ, one mogu predstavljati opasnost za ekosustav. Upravo zato, potrebno je i njihovo praćenje unutar članica Unije, uključujući i Republiku Hrvatsku. Na listi za praćenje nalaze se tvari koje bi mogle štetno djelovati na ljudsko zdravlje i vode u okolišu. Ta lista obnavlja se svake dvije godine, a trenutno su aktualni farmaceutici poput: estriola, etinil-estradiola, ciprofloksacina, amoksicilina, makrocikličkih antibiotika, itd., dok je diklofenak maknut s liste, nakon što je istražena njegova pojavnost u vodama. Osim navedene liste, unutar Europske unije djeluje regulativa primijenjivana na sve kemikalije, tzv. REACH regulativa koja se odnosi na registraciju, evaluaciju, autorizaciju i ograničavanje kemikalija. Jedan od zadataka regulative je očuvanje i sigurnost okoliša i ljudi.

Postrojenja za obradu otpadnih voda u velikoj mjeri pridonose prisutnosti farmaceutika u okolišu [48], ali i ne samo ona nego primjerice i nepropisno odlaganje. Na **slici 3** prikazano je kako ispuštanje različitih zagađivala dovodi do njihove prisutnosti u djelomično zatvorenom kružnom toku voda, najčešće između postrojenja za obradu otpadnih voda, kućanstva, sustava javne vodoopskrbe i podzemnih voda.



**Slika 3.** Shema toka zagađivala (farmaceutika) iz različitih izvora [40]

Zbog sličnosti u strukturama određenih farmaceutika moguće je njihovo svrstavanje u grupe. Time se omogućava bolje razumijevanje njihove sudbine i mogućeg toksičnog djelovanja. Međutim, čak i tvari iz iste skupine djelovanja mogu imati potpuno različite strukture i svojstva, što dovodi do njihovih drukčijih sudbina i ponašanja u okolišu. Na **slici 4** prikazana je potrošnja antibiotika, pri čemu se čak 3 400 t antibiotika potroši na godišnjoj razini samo u zemljama Europske unije [49].



**Slika 4.** Potrošnja antibiotika uporabljenih za liječenje ljudi u 2012. [49]

Najveća potrošnja zabilježena je u: Francuskoj (719 t), Italiji (622 t), Velikoj Britaniji (415 t) i Njemačkoj (297 t), dok su države: Cipar, Estonija i Luksemburg imale potrošnju manju od 10 t. Ipak, najniža potrošnja je na Islandu, tek 2,5 t. Navedene brojke odnose se samo na



---

antibiotike koji su upotrijebljeni za liječenje ljudi, a upečatljiv podatak može biti kako se više od 50 % antibiotika upotrebljava u veterinarskoj medicini [49].

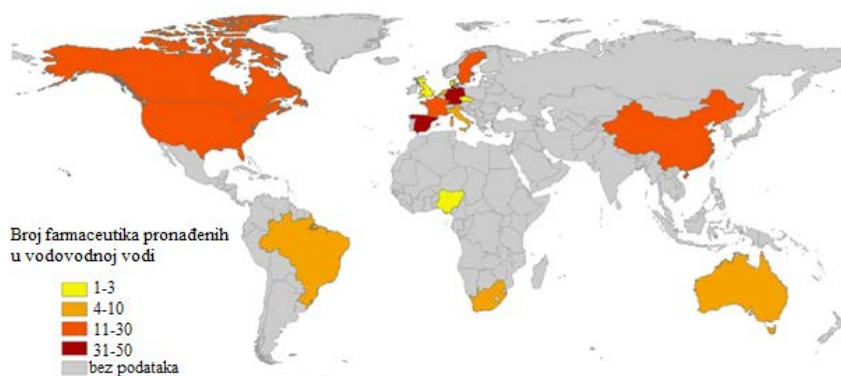
Neupitan je pozitivan utjecaj farmaceutika na zdravlje ljudi, ali već je duži niz godina poznat i problem neprimjerenog zbrinjavanja otpadnih voda, koje među ostalim, sadrže i farmaceutike [50, 51]. Njihov učinak se ne odražava samo na vodu nego i na mnogobrojnu hranu, od mesa do salate. Pokretljivost farmaceutika i drugih spojeva (pesticida, sredstava za osobnu njegu) u okolišu jest problem koji utječe na njihovu sveprisutnost. Naime, farmaceutici su pronađeni u salati [52], mrkvi i ječmu [53], ribi [54], prašini u kući [55], ljudskim noktima [16], kozmetici [56], mlijeku i piletini [57], ljudskom urinu [58] te vodovodnoj vodi [40]. Njihov broj nije ograničen samo na dosadašnje, postojeće farmaceutike, jer je porastom proizvodnje novih kemijskih tvari, a time i farmaceutika, povećana i mogućnost njihove veće zastupljenosti u okolišu. U 2004. godini broj kemijskih tvari, prema jedinstvenom identifikacijskom broju (koji dodjeljuje CAS), iznosio je 23 milijuna, pri čemu je gotovo 7,7 milijuna kemijskih spojeva komercijalizirano [59]. Osim toga, broj mogućih novih kemijskih tvari hipotetski je neograničen pa je tako 2015., prema CAS-u, indeksirano gotovo 100 milijuna kemikalija. Za očekivati je kako će potrošnja farmaceutika i dalje rasti jer se: povećava broj stanovnika na svjetskoj razini, raste udio starije populacije, znanost napreduje te se kontinuirano ulaže u liječenje ljudi razvitkom novih lijekova [60, 61]. Ovaj evidentan porast može pridonijeti zabrinjavajućem, negativnom učinku na okoliš, ukoliko se kemikalije, tj. farmaceutici ne budu zbrinjavali na primjeren način. Barcelo i sur. [62] navode da je u Europskoj uniji registrirano 106 211 kemikalija, od čega je 70 000 u uporabi, a prema američkoj agenciji za hranu i lijekove (engl. *Food and Drug Administration*, FDA) odobreno je više od 10 000 aktivnih farmaceutskih tvari. Procjenjuje se da će se na farmaceutike, na globalnoj razini, u 2021. godini potrošiti 11,5 trilijuna USD, a za očekivati je i daljnji porast tog trenda [63]. Opravdana zabrinutost glede prisutnosti farmaceutika u okolišu dovela je do povećane usmjerenosti na istraživanja i učestalije procjene rizika [32, 64–67]. Naime, prema navedenom, razlozi sve veće zabrinutosti proizlaze iz: stalnog porasta potrošnje farmaceutika, njihovog nedovoljno kontroliranog otpuštanja u okoliš, neistraženosti utjecaja različitih procesa kojima podliježu, biološke aktivnosti, otpornosti bakterija na antibiotike i kronične toksičnosti smjese farmaceutika. Za očekivati je kako će navedeni problemi biti sve prisutniji

---

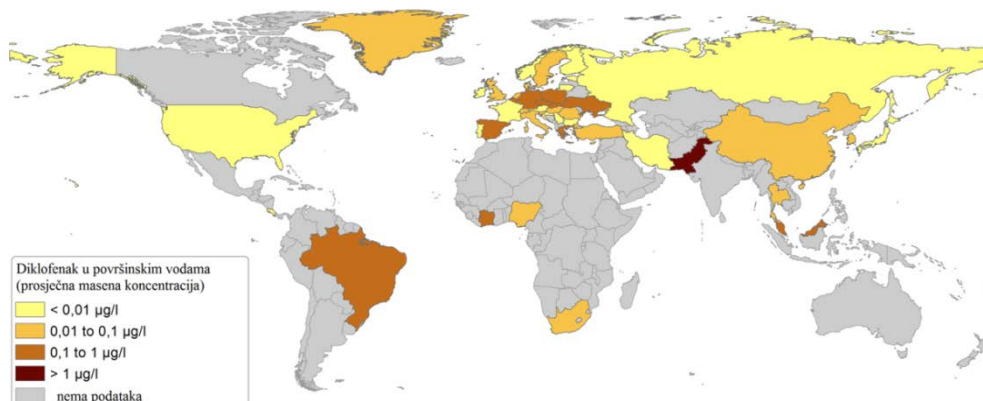
i kako će izazivati sve veću zabrinutost ukoliko se sustavno i globalno ne provedu mjere koje će to spriječiti ili barem umanjiti unos farmaceutika u okoliš [32, 68, 69].

## 2.2. Rasprostranjenost farmaceutika u prirodnim i otpadnim vodama

Povećano izvješćivanje o prisutnosti farmaceutika u okolišu počinje sredinom 1980-ih godina. Prema izvješću njemačke Agencije za okoliš [70] pronađeno je ukupno 156 farmaceutika u vodama (površinskim, podzemnim, pitkim, otpadnim vodama te sedimentu, tlu, otpadnom mulju i stajnjaku), od čega 19 metabolita. U površinskim vodama većina farmaceutika (131) nalazila se tada uglavnom u koncentracijskom rasponu  $0,1 - 1,0 \mu\text{g L}^{-1}$ . Izvješćivanje o sudbini i ponašanju farmaceutika nastavljeno je do danas, ali sada s povećanom zabrinutošću glede njihovih učinaka na okoliš. Iako je praćenje farmaceutika sve prisutnije, podatci o prevladavajućim koncentracijama još uvijek su izostavljeni. Pretragom literature (1016 izvornih znanstvenih i 150 preglednih članaka) temeljenoj na određivanju farmaceutika, Beek i sur. [71] zaključili su kako su u okolišu prisutne puno veće koncentracije nego li su predviđene. Ustanovljeno je kako su ljudski i veterinarski farmaceutici (čak 631) pronađeni u 71 zemlji, što uključuje svih 5 UN-ovih regija. Zanimljiv je podatak da su: diklofenak, karbamazepin, ibuprofen, sulfametoksazol i naproksen pronađeni u više od 45 zemalja, što dodatno potvrđuje kako je sveprisutnost farmaceutika globalni problem. Unatoč rečenom, stvarno stanje nije poznato, budući da većina istraživanja potječe iz Kine ili Španjolske pa su takva istraživanja uglavnom lokalno usmjerena (na manji broj rijeka) i odnose se samo na određene grupe farmaceutika (psihijatrijske, određene antibiotike, itd.). Na **slici 5** može se uočiti u kojim područjima i u kojem broju su pronađeni farmaceutici u vodovodnoj vodi. Prema novijim istraživanjima, riječ je o većem broju zemalja, odnosno, farmaceutici u okolišu pronađeni su u 75 zemalja [70]. Ovo može biti posljedica većeg broja istraživanja ili većeg unosa farmaceutika. Na **slici 6** dana je prosječna koncentracija diklofenaka, dok je prema njemačkoj agenciji [70] koncentracija diklofenaka u vodama u okolišu značajno ovisila o lokaciji (u Litvi je iznosila  $2,933 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$ , a u Španjolskoj  $18,74 \mu\text{g L}^{-1}$ ).



**Slika 5.** Prikaz broja farmaceutika pronađenih u vodovodnoj vodi (preuzeto iz [71])



**Slika 6.** Prosječna određena koncentracija diklofenaka (preuzeto iz [71])

Prema Hughes i sur. [72] istraživanja koja su provedena uglavnom u razdoblju od 2005. do 2010., pokazala su prisutnost 203 farmaceutika u slatkovodnim vodama, pronađenima u 41 zemlji. Međutim, navedena meta-analiza ne uključuje podatke o mnogim neistraženim područjima, poput: Argentine, Sibira, Afrike. Naime, u određenim dijelovima Sjeverne Amerike postoji vrlo mali broj istraživanja. Uvažavajući rečeno, može se zaključiti kako su farmaceutici u okolišu prisutniji više nego li je ustanovljeno, a tome pridonose i metodološki nedostaci prilikom uzorkovanja, budući da značajno utječu na reprezentativnost rezultata [72]. Dodatna zabrinutost zbog prisutnosti farmaceutika u vodama može biti usmjerena na istočne zemlje, jer više od 2,9 bilijuna ljudi živi u Kini, Indiji, Pakistanu i Bangladešu, što uključuje 40 % ukupne populacije [73]. Ovo se posebno odnosi na Kinu i Indiju koje su se nametnule s brzim rastom ekonomije, što u konačnici utječe na okoliš [74, 75]. Posljednja istraživanja

pokazuju da su pronađene znatno veće koncentracije  $17\beta$ -estradiola (3 140 puta), estriola (20 000 puta), ciprofloksacina (125 puta), sulfametoksazola (100 puta), paracetamola (215 puta) i naproksena (171 puta) u vodama oko Afrike, u odnosu na Europu [76].

Nadalje, veliki interes usmjeren je i na veterinarske farmaceutike [12, 77–79], zbog velikih količina koje se upotrebljavaju za životinje. Samo u Njemačkoj u 2003. upotrijebljeno je 668,8 tona antibiotika i 31,3 tone endoparazita (na godišnjoj razini) u stočarstvu i čak oko 67 000 kg hormona za koje je poznato kako već u vrlo malim količinama utječu na okoliš [80]. Upravo te „male“ količine nalaze se u okolišu, tj. u prirodnim vodama [81, 82], bez obzira na koji su način u njih dospjele. Radi se o koncentracijama  $\text{ng L}^{-1}$  i  $\mu\text{g L}^{-1}$ , a za neke farmaceutike pronađene su i veće koncentracije u određenim područjima [83]. U **tablici 1** prikazane su koncentracije 16 farmaceutika pronađenih u površinskim vodama.

**Tablica 1.** Prosječna i maksimalna koncentracija 16 farmaceutika pronađenih u površinskim vodama (brojevi u zagradi predstavljaju broj uzoraka) (preuzeto iz [71])

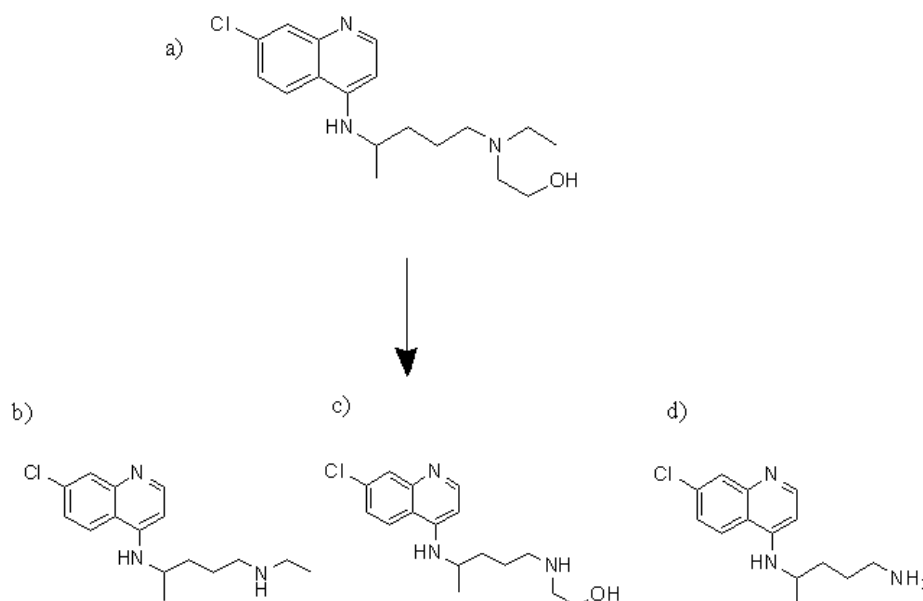
Farmaceutici	Istočna Europa		Zapadna Europa i dr.		Globalno	
	prosječna; ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	najveća ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	prosječna ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	najveća ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	prosječna ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )	najveća ( $\mu\text{g L}^{-1}$ )
diklofenak	0,111 (420)	4,2	0,020 (6301)	18,74	0,032 (7071)	18,74
karbamazepin	0,131 (302)	7,6	0,188 (24776)	8,05	0,187 (25115)	8,05
ibuprofen	0,183 (529)	11,7	0,097 (6264)	303,0	0,108 (6950)	303,0
sulfametoksazol	0,033 (139)	0,3	0,068 (7789)	29,0	0,095 (8599)	29,0
naproksen	0,023 (403)	0,85	0,057 (2666)	12,3	0,050 (3229)	32,0
estron	0,001 (262)	0,07	0,004 (1632)	1,25	0,016 (2228)	5,0
estradiol	0,0005 (20)	0,003	0,005 (183)	0,012	0,003 (297)	0,012
etinil-estradiol	0,002(57)	0,08	0,005 (1238)	0,28	0,043 (1530)	5,9
trimetoprim	0,012 (22)	0,174	0,022 (2598)	10,0	0,037 (3060)	13,6
paracetamol	0,028 (68)	0,61	0,046 (629)	230,0	0,161 (937)	230,0
ciprofloksacin	0,002 (22)	0,03	0,008 (343)	13,6	18,99 (672)	6500
ofloksacin	0,0003 (11)	0,004	0,123 (451)	8,77	0,278 (760)	17,70
estriol	0,002 (131)	0,08	0,002 (536)	0,48	0,009 (790)	0,48
norfloksacin	0,004 (15)	0,057	0,009 (274)	1,15	3,457 (628)	520,0
acetilsalicilna kiselina	0,062 (29)	0,73	0,002 (107)	0,36	0,922 (254)	20,96
klofibrična kiselina	0,009 (48)	0,42	0,023 (2796)	7,91	0,022 (2947)	7,91

Bez obzira na prisutnost i negativne učinke farmaceutika, oni imaju ključnu ulogu u razvoju i očuvanju društva, te je neosporno da su oni i dalje nužni u modernoj medicini [63, 84]. Procjenjuje se kako je godišnja proizvodnja početkom 21. st., iznosila približno 200 000 t antibiotika što je dovelo do opravdane zabrinutosti glede posljedica na okoliš, floru, faunu te zdravlje ljudi [79]. Zabranom uporabe antibiotika kao promotora rasta te ograničavanjem njihove upotrebe, znatno je smanjenja potrošnja. Kolika je zapravo stvarno potrebna količina farmaceutika, nije lako utvrditi. No, poznato je da mnogi farmaceutici nisu primjereno korišteni, iako se mnogi lijekovi mogu dobiti samo uz liječnički recept [85]. Može se zaključiti kako je osim potrebe za saznanjima o prisutnim koncentracijama farmaceutika u okolišu, potrebno istražiti i kojim procesima podliježu farmaceutici u okolišu i kakvo je njihovo djelovanje na ekosustav.

### **2.3. Hidroksiklorokin**

Fluorokinoloni pripadaju antimikrobnim agensima koji imaju široko djelovanje te se učinkovito upotrebljavaju u liječenju protiv bakterijskih uzročnika bolesti (u liječenju ljudi i životinja). Strukturno gledajući, hidroksiklorokin (**slika 7. a**) je sličan fluorokinolonima. Točnije, hidroksiklorokin je *p*-aminokinolin, ne sadrži fluor i pripada grupi kemoterapeutika. Svrstava se, poput njegovog derivata klorokina, u skupinu antimalarika, jer je prvenstveno (više od pedeset godina) korišten u te svrhe. O njegovoj važnosti najbolje svjedoči podatak: od malarije kao najčešće prevladavajuće zarazne parazitske bolesti oboljelo je 2002. približno 500 milijuna ljudi u svijetu. Od ukupnog broja, između 1 i 3 milijuna sa smrtnim posljedicama, pri čemu su najviše obolijevala i stradavala djeca mlađa od sedam godina [88]. Danas se koristi i kao kemoprofilaksa [86, 87]. On je i protuupalni lijek (antireumatik) koji modificira bolest, tako što djeluje kao blagi imunosupresiv. Upotrebljava se za reumatoidni artritis, eritemski lupus, a i u dermatologiji [89]. Također, upotrebljava se i za liječenje Sjörgenova sindroma [90] i Q-groznice [91]. Osim navedenog, novije kliničke studije pokazuju da hidroksiklorokin ima potencijalne protutumorske učinke [92].

Prema farmakokinetičkim podacima, glavni način izlučivanja hidroksiklorokina je renalnim putem, pri čemu 23 – 25 % ostaje u nepromijenjenom obliku, a veći dio završi u obliku metabolita [87]. Hidroksiklorokin metabolizira u jetri, pri čemu mogu nastati tri aktivna metabolita (**slika 7.**): b) desetil-klorokin (DCQ), c) desetil-hidroksiklorokin (DHCQ) i d) bisdesetil-klorokin (BDCQ) [93].

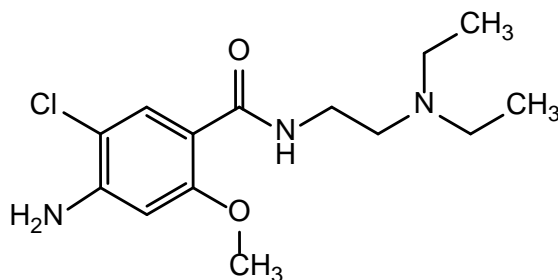


**Slika 7.** Hidroksiklorokin i njegovi metaboliti koji nastaju u ljudskom tijelu

Hidroksiklorokin se proizvodi u velikim količinama, potencijalno je sklon bioakumulaciji ( $\log K_{ow} = 3,03$ ) i postojan je u okolišu (BIOWIN 1 = 0,1249, BIOWIN 5 = - 0,0746) [94]. Prema linearnim modelima vrijednosti BIOWIN, može se procijeniti vjerojatnost biorazgradnje organskih zagađivala u prisutnosti mikroorganizama iz okoliša u aerobnim uvjetima [95]. Ukoliko su vrijednosti BIOWIN-a manje od 0,5, onda ta tvar ne podliježe biorazgradnji.

## 2.4. Metoklopramid

Sulfonamidi su, poput fluorokinolona, poznati i često korišteni sintetski antibiotici širokog spektra za prevenciju i liječenje od bolesti i infekcija [96]. Strukturno gledajući (**slika 8.**), metoklopramid je supstituirani benzamid i derivat *p*-aminobenzojeve kiseline.



**Slika 8.** Strukturna formula metoklopramida

Metoklopramid je sličan prokainamidu i sulpiridinu [97] pa ga se može svrstati u sulfonamide. Također, strukturni je analog lidokainu. U Sjedinjenim Američkim Državama koristi se od 1979. i jedini je lijek odobren od FDA za liječenje gastropareze (tipične za ljude s dijabetesom koji imaju usporeno pražnjenje crijeva). Prema procjeni iz 2010., lijek je tada koristilo više od 2 milijuna Amerikanaca [98]. Metoklopramid je i antiemetik, antagonist dopamina te se upotrebljava protiv mučnina i povraćanja (često nakon postoperativnih zahvata [99]). Upotrebljava se i za liječenje žgaravice za bolesnike s gastroezofagealnom refluksnom bolešću (GERB) [100].

U ljudskom organizmu, metoklopramid se uglavnom metabolizira u manje istražen monodietilmetoklopramid, koji nastaje kao posljedica *N*-dealkilacije. Na temelju BIOWIN-vrijednosti (BIOWIN 1 = 0,325; BIOWIN 5 = 0,121), metoklopramid se potencijalno smatra biološki nerazgradivim farmaceutikom. Velika potrošnja (kao i kod hidrosiklorokina) te drugi fizikalno-kemijski parametri (poput  $\log K_{ow} = 1,69$ ), utječu na nužnost potrebe istraživanja do sada nepoznate sudbine i ponašanja metoklopramida.



## 2.5. Abiotički procesi farmaceutika u okolišu

Poznato je kako je sudbina farmaceutika u okolišu određena biotičkim i abiotičkim procesima te razdiobom između različitih dijelova okoliša (zraka, vode, sedimenta i tla) [101–103]. U abiotičke procese razgradnje svrstava se: hidroliza, fotoliza i oksidacija te redukcija i kompleksiranje [36], a u biotičke samo biorazgradnja.

Mnogi farmaceutici koji završe u okolišu, prolaze kroz biokemijsku obradu otpadnih voda, što dovodi do zaključka da nisu biorazgradivi ili pak da je njihova koncentracija kao supstrata nedovoljna da bi ih razgradile bakterije, gljivice ili neki drugi mikroorganizmi. Ipak, za neke je farmaceutike (npr. ibuprofen), biorazgradnja svojstvena, a samim time i povećana učinkovitost njihova uklanjanja iz otpadnih voda. Osim toga, biorazgradnja dolazi više do izražaja ako su farmaceutici prisutni u tlu i sedimentu. Prema rečenom, abiotički procesi iznimno su značajni procesi koji određuju sudbinu farmaceutika u okolišu, budući da isključivo biorazgradnja nije dovoljna za učinkovitu razgradnju (potpunu mineralizaciju) većine do sada istraženih farmaceutika [104]. Ipak, za neke farmaceutike (poput sulfonamida) biorazgradnja, uz fotolizu, značajno smanjuje postojanost farmaceutika u okolišu [105]. Oksidacija je manje relevantan abiotički proces koji utječe na sudbinu farmaceutika u okolišu. Ona može dovesti i do gubitka određenih funkcionalnih skupina, a time i do potpuno drukčijih fizikalno-kemijskih svojstava novonastalog transformiranog produkta. Oksidacija obuhvaća reakcije vezane uz dezinfekciju (kloriranje, ozoniranje) ili napredne oksidacijske procese (hidroksiliranje) pa je karakteristična za procese u postrojenjima obrade voda. Uz spomenuto, mogući su i oksidacijski procesi kod reakcija farmaceutika s mineralima ili huminskim tvarima. Sorpcija se također može svrstati u abiotičke procese. Međutim, kod sorpcije rezultat smanjenja koncentracije farmaceutika u okolišu nije posljedica razgradnje ili transformacije osnovnog farmaceutika, kao kod fotolize ili hidrolize u okolišu.

Postojanost farmaceutika u okolišu može ovisiti o prisutnim uvjetima: koncentraciji farmaceutika, vrijednosti pH, izvoru svjetlosti, intenzitetu zračenja i dr. Za uočavanje razlike između izravne fotolize i ukupne fotolize (izravne i neizravne), nužno je ispitati fotolitičku razgradnju u destiliranoj deioniziranoj vodi i prirodnoj vodi.



U **tablici 2** navedena su vremena poluraspada većeg broja farmaceutika u destiliranoj deioniziranoj i riječnoj vodi. Prema prikazanom, može se uočiti doprinos neizravne fotolize u razgradnji farmaceutika. Iako nisu prikazivani tablično, određeni spojevi mogu biti fotolitički stabilni (npr. fluorfenikol [106]). Neovisno o tome što se fotoliza smatra jednim od najvažnijih abiotičkih puteva razgradnje, ne mora nužno biti tako. Naime, Kunkal i sur. [107] prema *in situ* istraživanju, provedenom u 12,5 km dugačkom dijelu toka rijeke Gründlach (Nürnberg, Njemačka), ustanovili su kako od deset istraživanih farmaceutika za njih osam fotoliza ne predstavlja značajan put razgradnje. To se posebno odražava na bezafibrat i metoprolol za koje fotolitička razgradnja nije relevantan put (njihove) eliminacije u rijekama. Jedino se pokazala značajnom za diklofenak, za koji je utvrđeno kako je do 50 % ukupne njegove razgradnje posljedica fotolize, a djelomičan utjecaj je moguć i za sotalol. Naime, razlog tome može biti u prirodnom svjetlu koje je, u pravilu, slabijeg intenziteta od izvora zračenja upotrebljivanih u laboratorijskim uvjetima (živine i ksenonske svjetiljke). Upravo zato, može se očekivati i njihova sporija razgradnja, u realnim uvjetima, a naročito ukoliko je prisutna bujna vegetacija i oblačno vrijeme. Za acetaminofen, ovisno o godišnjem dobu, vrijeme poluraspada iznosi 35 ili 56 h [108]. Zanimljivo je da benzo Diazepini (diazepam, lorazepam, oksazepam i alprazolam), unatoč tome što su strukturno vrlo slični, ne samo da nemaju približna vremena poluraspada nego se razlikuju i za nekoliko redova veličine. Za oksazepam izravnom fotolizom (uz ukupno zračenje od  $7,5 \cdot 10^5 \text{ J m}^{-2}$  koje dopire do tla) potrebna su približno četiri ljetna sunčana dana, diazepamu je potrebno pet takvih dana, lorazepamu manje od jednog dana, dok je za alprazolam potrebno više od sedam mjeseci (u slučaju alprazolama vrijednost vrijeme poluraspada je dobiveno ekstrapoliranjem nakon 204 h osvjetljavanja jer bi u suprotnom predugo trajala razgradnja, tj. eksperiment) [109].

**Tablica 2.** Vremena poluraspada farmaceutika u destiliranoj deioniziranoj i riječnoj vodi [110–115]

Farmaceutik	$M_r$	$pK_a$	$\log K_{ow}$	$t_{1/2}$ (h) u destiliranoj deioniziranoj vodi	$t_{1/2}$ (h) u riječnoj vodi
gemfibrozil	250,33	4,7	3,4	91,4	14,8
propranolol	259,34	9,5	3,48	4,4	1,1
naproksen	230,26	4,2	3,2	1,9	1,4
ibuprofen	206,28	5,3	4	205	14,8
karbamazepin	236,27	13,9	2,45	38,5	12,8
estron	270,37	10,4	4,1	4,7	2,3
17 $\beta$ -estradiol	276,41	10,4	4	41,7	2,0
17 $\alpha$ -etinilestradiol	296,41	10,3	4,2	28,4	2,3
ketoprofen	254,28	3,1	3,12	0,042	0,068
estriol	288,4	10,5	2,45	38,2	2,9
atovarstatin	558,64	4,3	5,7	6,9	0,6
sulfametoksazol	253,28	5,7	0,89	0,86	5,4
difloksacin	399,39	6,6; 8,0	0,68	0,84	0,34
sarafloksacin	385,36	5,9; 9,1	-0,69	2,62	0,49

### 2.5.1. Hidroliza

Hidroliza podrazumijeva reakciju neke tvari (analita, supstrata) s vodom koja djeluje kao nukleofil, pri čemu može doći do supstitucije, eliminacije ili fragmentacije određenog dijela analita, što dovodi do nastanka razgradnih ili transformirajućih produkata. Najčešće se radi o: farmaceuticima, pesticidima, solima, hidratiziranim metalnim kompleksima, polisaharidima, esterima, amidima i adenzin trifosfatu.

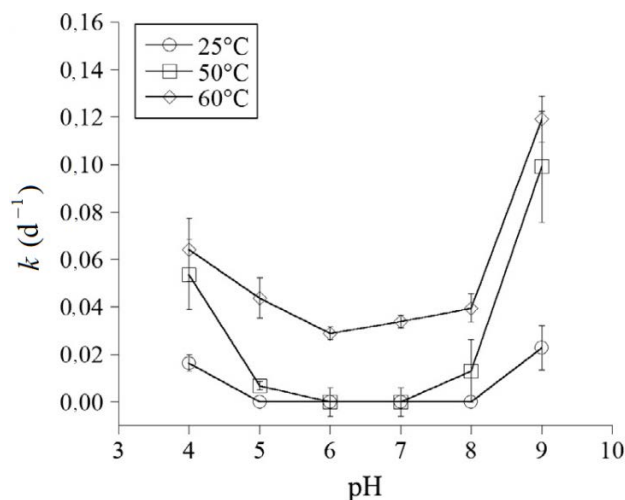
Nužno je znati koji su farmaceutici skloni hidrolitičkoj razgradnji, jer se u procjeni rizika s ekotoksikološkog stajališta može očekivati njihova manja prisutnost u okolišu. S druge strane, to može biti pozitivno za određene antibiotike. Naime, hidrolitička nestabilnost posljedično dovodi do manje prisutnosti tog antibiotika, što umanjuje stvaranje otpornosti bakterija na taj ili neki strukturno sličan antibiotik [116]. Primjerice, penicilin je jedan od najviše korištenih antibiotika te zbog toga može biti jedan od prisutnijih farmaceutika u okolišu. Međutim, to

---

nije slučaj, budući da sadrži  $\beta$ -laktamski prsten, koji se hidrolitički razgrađuje. U okolišu se penicilin nalazi u manjim koncentracijama i manja je učestalost njegove detekcije nego li se očekuje s obzirom na količinu njegove uporabe. Važno je spoznati procese kojima podliježu pojedini farmaceutici u okolišu i koji je njihov učinak glede ekotoksikološkog utjecaja.

Iako su neki farmaceutici strukturno vrlo slični, različiti učinci nekog procesa ili čak potpuno drugi procesi mogu biti odgovorni za razgradnju. Za farmaceutike je uglavnom karakteristično da ne podliježu hidrolizi u kiselim uvjetima i enzimski kataliziranim reakcijama hidrolize u ljudskom ili životinjskom organizmu te se najčešće smatraju hidrolitički stabilnim spojevima [117]. Kada dospiju u vodeni sustav nepromijenjenoga oblika, pretpostavka je (na temelju dosadašnjih istraživanja) da ne hidroliziraju [38]. Primjerice, izrazito istraživani farmaceutici poput: ciprofloksacina [118], propranolola, metoprolola [119], ibuprofena, naproksena [38] i trimetoprima [120] hidrolitički su stabilni. Za razliku od njih, sulfonamidi [119],  $\beta$ -laktami [121] i tetraciklini [120] skloni su hidrolizi. Međutim, prilikom definiranja hidrolitičke stabilnosti, važno je ispitati i navesti vrijednost pH, jer ona može značajno utjecati na stupanj hidrolize. Tako je tilozin hidrolitički stabilan, ali za područje vrijednosti pH od 4 do 9, a pri pH 2 i 11 hidrolizira, što u ovom slučaju nije relevantno za vode u okolišu [120]. Kako bi rezultati ispitivanja hidrolitičke razgradnje bili relevantni i usporedivi potrebno je provoditi standardizirane testove, poput: OECD, ISO i DIN testova. Kuster i sur. [122] navode da su jedino takvi testovi visoko pouzdani. Ipak, ukoliko su rezultati dobiveni uz određene modifikacije pripadajućeg testa, potrebno ih je sve navesti i objasniti. U suprotnom, istraživanja koja ne sadrže potrebne informacije nisu vjerodostojna, ni značajna u procesu prikupljanja podataka, zbog zaštite okoliša. Navedeni testovi uključuju provođenje hidrolize pri različitim vrijednostima pH i temperaturama relevantnima za okoliš.

Na **slici 9** na primjeru amfenikola prikazana je ovisnost koeficijenta hidrolitičke razgradnje o vrijednosti pH pri različitim temperaturama. Navedene temperature su viših vrijednosti nego li u stvarnim uvjetima u okolišu. Naime, hidroliza se inače iz eksperimentalnih razloga ispituje na 20 °C, a kako je prosječna temperatura 12 °C u slatkim i 9 °C u slanim vodama [123], dobiveni rezultati se ekstrapoliraju [124] na navedene temperature.

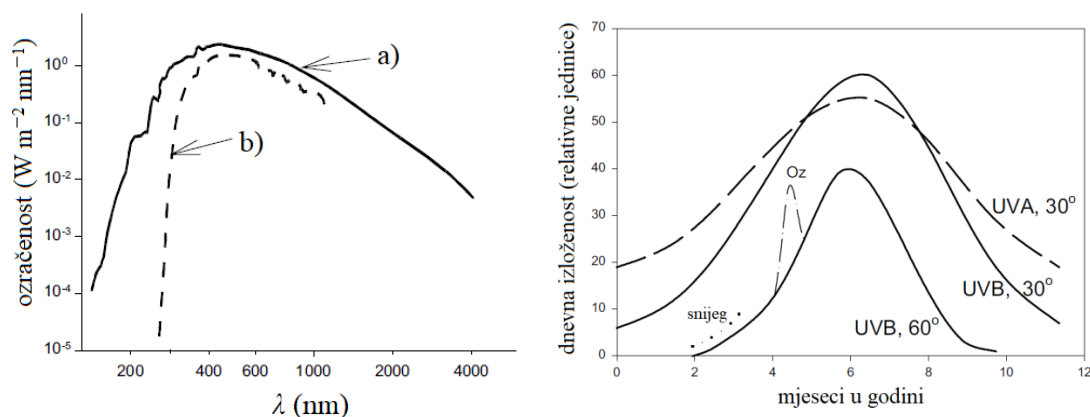


**Slika 9.** Utjecaj vrijednosti pH i temperature na koeficijente hidrolitičke razgradnje kloramfenikola (preuzeto iz [125])

### 2.5.2. Izravna fotoliza

Sunčeva svjetlost je cjelokupan spektar elektromagnetskog zračenja koji se kroz Zemljinu atmosferu filtrira i prigušuje. Intenzitet je veći na gornjoj granici atmosfere, a slabi kako se približava tlu, zbog upijanja i raspršenja na molekulama plinova. Vidljivi dio zračenja čini prosječno 40 – 50 % Sunčeva zračenja, dok UV zračenje čini 8 % ukupnog zračenja koje dopire do Zemljine atmosfere (oko 6 % do razine mora). Ultraljubičasto zračenje može se podijeliti u nekoliko grupa, s tim da granice između valnih duljina nisu jako strogo definirane. UV-C definira se za raspon valnih duljina 200 – 280 nm, no praktički to zračenje nije relevantno za okoliš, jer se apsorbira u atmosferi. UV-B nalazi se u području 280 – 315 nm, a UV-A u području 315 – 400 nm i ono je 10 do 100 puta obilnije (intenzivnije) [126, 127]. Na njihov odnos utječu razlike u raspršenju i apsorpciji, a one ovise o nekoliko čimbenika: zemljopisnoj širini, zenitnom kutu, oblaku i debljini ozonskog omotača [126]. Oba područja vrlo su značajna za sudbinu farmaceutika u okolišu, a o pojedinom farmaceutiku (apsorpcijskom spektru i kvantnom prinosu) ovisi učinkovitost izravne fotolize [128–130]. Na **slici 10** (lijeva slika) može se vidjeti ovisnost solarne ozračenosti o valnim duljinama, iz čega je vidljivo da se ozračenost ispod 300 nm drastično smanjuje. Na **slici 10** (desna slika) prikazana je dnevna doza izloženosti zračenju, ovisno o mjesecu u godini. Prikazane su relativne godišnje varijacije UV-A i UV-B zračenja na zemljopisnoj širini od 30° i UV-B na

60°. Oznaka *Oz* predstavlja oštećenje ozona (slično kao na Antarktiku u proljeće), čime je povećana izloženost UV-B zračenju, kao i za snijeg koji udvostručuje izloženost navedenom zračenju.



**Slika 10.** Solarna ozračenost koja ovisi o valnoj duljini (lijeva slika), a) predstavlja ozračenost izvan atmosfere, b) na razini mora; ovisnost dnevne izloženosti o mjesecu u godini (desna slika) (preuzeto iz [126])

Sunčevo zračenje dovodi do apsorpcije svjetla od strane farmaceutika, a time i do aktivacije njihovih fotokemijskih reakcija. Posljedica toga nastanak je fotolitičkih produkata koje je teško predvidjeti, jer molekule u pobuđenom stanju imaju drukčiju raspodjelu energije i elektronske konfiguracije nego li kada su u osnovnom stanju. Termodinamički gledano, pobuđena molekula ima veći sadržaj energije nego molekula u osnovnom stanju, a time i veći broj mogućih reakcijskih putova, odnosno veći broj potencijalnih produkata. Među nastalim fotoproduktima su i hidroksilirani produkti, budući da i voda pod utjecajem Sunčeva zračenja stvara hidroksilne radikale (jednadžba 1) [131].



Mnogi prirodni procesi, kao i ponašanje zagađivala prisutnih u okolišu, ovise o raznim čimbenicima, ponajprije o strukturi (prirodi osnovnog i pobuđenog stanja) i energiji zračenja [132]. U kemiji zagađivala prevladavaju dijabatski procesi, što znači da molekule trebaju svjetlo kako bi svladale početnu energijsku prepreku. Kada je energija apsorbiranog zračenja

---

slična ili veća od energije kovalentne veze, može doći do njezina cijepanja, pa se takav proces naziva fotoliza.

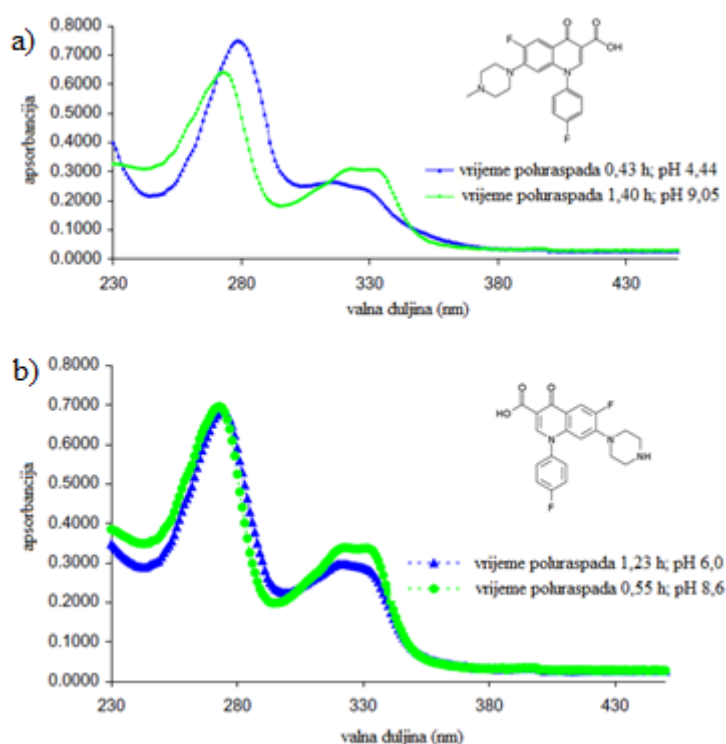
U procesu fotolize najčešće vidljivo zračenje nije dovoljno za pucanje ugljik-ugljik veze za koju je potrebno  $348 \text{ kJ mol}^{-1}$ , jer energija fotona valne duljine 400 nm odgovara  $300 \text{ kJ mol}^{-1}$ . Stoga, pripadajuće energije vidljivog zračenja nisu dovoljne za pucanje navedenih veza nego su potrebne kraće valne duljine [127].

S obzirom na to da je za farmaceutike koji dospiju u okoliš iz postrojenja za obradu otpadnih voda očekivano da budu hidrolitički stabilni, fotoliza uz sorpciju, postaje jedini relevantni abiotički proces koji utječe na sudbinu farmaceutika u vodenom sustavu. Naime, neki farmaceutici pokazuju dobra sorpcijska svojstva, a njihovo uklanjanje postiže se vezanjem na različite adsorbense. Primjerice, korištenjem aktivnog ugljika u obliku granula i praha iz otpadnih voda moguće je ukloniti 90 % estrogena [133, 134]. Prema tome, moguće je da fotoliza u okolišu bude dominantan proces za mnoge farmaceutike, budući da sadrže različite funkcionalne kromofore (konjugirane aromatske prstenove,  $\pi$  konjugirane sustave, nitro-skupine, furane, fenole, heteroatome) pa podliježu izravnoj i neizravnoj fotolizi. Brojna istraživanja potvrđuju [129, 135–137] kako se upravo fotolitička razgradnja smatra jednim od najvažnijih putova odgovornih za razgradnju organskih zagađivala, posebno u površinskim vodama. Koliki utjecaj na brzinu fotolitičke razgradnje ima izravna fotoliza može se uočiti na ketoprofenu, čije vrijeme poluraspada u destiliranoj deioniziranoj vodi iznosi samo 2,4 min i to pri  $250 \text{ W m}^{-2}$  [123]. Strukturno gledajući, ketoprofen je derivat propionske kiseline koji sadrži benzofenon, što dovodi do toga da je karbonilni ugljik jako konjugiran zbog delokalizacije elektrona susjednih aromatskih skupina. Niža je, stoga, energija  $n-\pi^*$  prijelaza pa nastaje reaktivno tripletno stanje. Rezultat toga je izrazito brza fotolitička razgradnja. S druge pak strane, neki farmaceutici, poput tetraciklina, neosjetljivi su na fotolitičku razgradnju [138], te ni izravna ni neizravna fotoliza ne predstavlja značajan put njihove razgradnje u okolišu, niti u postrojenjima za obradu voda.

Općenito, na sudbinu farmaceutika u okolišu utjecat će brojni čimbenici koji će u konačnici određivati hoće li se, koliko brzo i kako neki farmaceutik fotolitički razgraditi. Primjerice, razgradnja će ovisiti o: strukturi i prisutnim kromofornim skupinama (apsorpcijskom spektru farmaceutika), kvantnom prinosu i koncentraciji zagađivala, prisutnosti drugih tvari

(anorganskih iona i organskih tvari), njihovoj koncentraciji te vrijednosti pH sredine. Nadalje, na fotolitičku razgradnju utjecat će i: dubina, zamućenje vode, godišnje doba, geografska širina, vremenski uvjeti i intenzitet Sunčeva zračenja [139].

Na **slici 11a** može se uočiti kako veća apsorbancija nekog farmaceutika pri valnim duljinama oko 330 nm, ne znači nužno bržu razgradnju, jer je bolje preklapanje apsorpcijskih spektara farmaceutika i Sunčeva zračenja. Tako za difloksacin, pri pH = 4,44 vrijeme poluraspada iznosi 0,43 h, a pri pH = 9,05 vrijeme poluraspada iznosi 1,40 h. Naime, brža razgradnja može biti rezultat djelovanja drugih čimbenika. Značajan utjecaj na brzinu razgradnje ima kvantni prinos, koji može biti različit za različite specije nekog farmaceutika, prisutne pri različitim vrijednostima pH. Na **slici 11b** vidljivo je kako je sarafloksacin drukčiji slučaj, jer tu veća apsorbancija u području oko 330 nm može biti posljedica brže razgradnje,  $t_{1/2} = 0,55$  h pri pH = 8,6 u odnosu na pH = 6,0 pri kojem je  $t_{1/2} = 1,23$  h [111].



**Slika 11.** Apsorpcijski spektri a) difloksacina i b) sarafloksacina s pripadajućim vremenima poluraspada ovisno o vrijednostima pH (preuzeto iz [111])

---

Prema tome, za farmaceutike koji apsorbiraju Sunčevo zračenje izravna fotolitička razgradnja predstavlja važan put koji određuje njihovu sudbinu u okolišu. Međutim, čak i za isti farmaceutik s pripadajućim vrijednostima  $pK_a$ , prisutne su različite ionizirane specije iste molekule, ovisno o vrijednosti pH. One pak mogu imati potpuno različita fizikalno-kemijska svojstva te tako uzrokovati drukčije ponašanje farmaceutika (npr. različita vremena poluraspada), što znatno otežava razumijevanje i prikupljanje podataka o ponašanju farmaceutika u okolišu. Ciprofloksacin iz skupine fluorokinolona, acetoaminofen iz skupine nesteroidnih protuupalnih lijekova, propranolol iz skupine  $\beta$ -blokatora te sulfametoksazol iz skupine sulfonamida, primjeri su farmaceutika kod kojih je izravna fotoliza glavni mehanizam njihove razgradnje u okolišu. Za to je prvenstveno odgovorno preklapanje apsorpcijskog spektra farmaceutika i spektra Sunčeva zračenja pri  $\lambda \geq 290$  nm te kvantni prinos tog farmaceutika. Osim izravne fotolize, značajan put razgradnje može biti i neizravna fotoliza, zbog nastanka različitih pobuđenih i reaktivnih vrsta koje reagiraju s farmaceuticima [140, 141]. U tom slučaju, udio izravne fotolize koji je odgovaran za fotolitičku razgradnju, određuje se eksperimentalno, bez prisutnosti tvari koje mogu voditi k neizravnoj fotolizi. Naime, u površinskim se vodama fotokemijska razgradnja pokazala kao glavni eliminacijski put sulfonamida u vodama u okolišu [142, 143], ali i u otpadnim vodama [144] pa fotolitička razgradnja u takvim vodama odgovara najčešće ukupnoj (izravnoj i neizravnoj) fotolizi. Nadalje, neki antibiotici (poput ciprofloksacina) sadrže kinolonski prsten, te su skloni fotolitičkoj razgradnji ( $t_{1/2} = 1,2$  min u destiliranoj deioniziranoj vodi), ali ne i hidrolitičkoj razgradnji [118]. Stoga, može se samo pretpostaviti kako i hidrosiklorokin koji sadrži kinolinski prsten nije sklon hidrolitičkoj nego fotolitičkoj razgradnji pri relevantnim uvjetima za okoliš. Naravno, to ne mora biti tako, jer je primjerice flumekvin koji pripada skupini kinolona, neosjetljiv na fotolitičku razgradnju, ali je i hidrolitički stabilan [145].



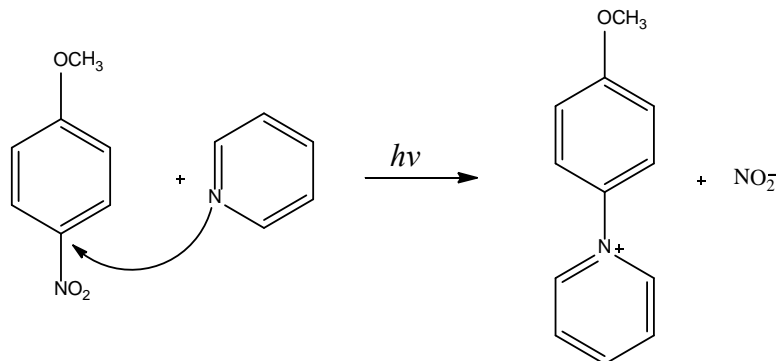
### 2.5.2.1. Kvantni prinos

*Kvantni prinos* ( $\phi$ ) izrazito je značajan parametar kojim se može procijeniti učinkovitost razgradnje. Poznat je i pod nazivima *kvantno iskorištenje* i *kvantni iscrpak*. Definiran je kao: omjer količine molekula  $n_A$  koje podliježu određenom fotokemijskom (ili fotofizikalnom) procesu i količine apsorbiranih fotona  $n_F$  koje se mjere u molovima ili mjernoj jedinici Einstein pa je dimenzija kvantnog prinosa bez dimenzije ili mol Einstein<sup>-1</sup>. Za kemijsku reakciju, to je omjer broja molekula koje reagiraju u određenoj reakciji i broja fotona koje su apsorbirale molekule [132]. S obzirom na to da je intenzitet Sunčeva zračenja promjenjiv jer ovisi o brojnim parametrima, tj. utjecajima, jedan od načina za dobivanje rezultata koji su međusobno usporedivi, upravo je pomoću kvantnog prinosa [146]. To je jedan od najvažnijih, ali i složenijih parametara u fotokemiji. Iako je strogo gledajući, definiran samo za monokromatsko zračenje [147], može se odrediti i za polikromatsko zračenje, ali bi u tom slučaju bolje bilo govoriti o *relativnoj učinkovitosti procesa*, a ne o kvantnom prinosu.

Za određivanje kvantnog prinosa monokromatskim zračenjem u puferiranim otopinama, može se koristiti nekoliko različitih izvora zračenja (živina (Hg) svjetiljka, ksenonska (Xe) svjetiljka, natrijska (Na) svjetiljka itd.), pri čemu svaki od njih ima određene prednosti i nedostatke. Najčešće korišteni izvor zračenja relevantan za okoliš je Xe svjetiljka koja emitira polikromatsko zračenje u rasponu od 300 do 800 nm. Općenito, vrijednost kvantnog prinosa kreće se između 0 i 1. Međutim, vrijednosti mogu biti i veće od jedan, ukoliko fotokemijski produkt podliježe sekundarnim ili lančanim reakcijama [132].

Fotonska ozračenost (engl. *photon irradiance*) izvora svjetlosti može se eksperimentalno odrediti pomoću aktinometra ili spektralnog radiometra te njihove kombinacije. Prema OECD priručniku 316 [148] preporuka je: koristiti aktinometre u kombinaciji sa spektralnim radiometrom. Za određivanje kvantnog prinosa potrebno je odabrati prikladan aktinometar, a da bi neka tvar bila aktinometar mora zadovoljavati određene uvjete. Svaki aktinometar, osim potrebnih svojstava, ima i određene nedostatke, tako da je cilj: izabrati optimalni. On bi trebao biti termički stabilan, neosjetljiv na svjetlo, a kvantni prinos bi mu trebao biti točno poznat za veći broj valnih duljina. Kao takav, neovisan je o valnoj duljini. Isto tako, trebao bi biti jednostavan za pripravu (sintezu), čist i po mogućnosti spektrofotometrijski odrediv. Osim toga, bitno je da njegovi fotoprodukti ne apsorbiraju UV-Vis zračenje u području u kojem

određeni analit, tj. aktinometar apsorbira. Pojedini aktinometar odabire se na temelju apsorpcijskog spektra farmaceutika i apsorpcijskog spektra aktinometra, što znači da su im slični apsorpcijski spektri, odnosno da se preklapaju [149]. Prema OECD-u i IUPAC-ovim preporukama, kalijev ferioksalat je praktičan i pouzdan aktinometar za UV-Vis područje. Dulin i Mill razradili su uporabu *p*-nitroanisola i piridina (PNA-PYR) te *p*-nitroacetofenona i piridina (PNAP/PYR) kao kemijskih aktinometara. Ovo su izrazito primjenjivani aktinometri u području 300 – 370 nm [150] koji se temelje na nukleofilnoj fotosupstituciji pobuđenog stanja derivata nitrobenzena piridinom (**slika 12.**). Svakako, njihova velika prednost je u mogućnosti ugađanja vremena poluraspada koja mogu varirati od nekoliko minuta do nekoliko dana. Tako se PNA/PYR koristi za vremena poluraspada od nekoliko minuta do 12 h, a PNAP/PYR za mjerenja od nekoliko sati do dva mjeseca, što ovisi o koncentraciji piridina. Prednost je i u tome što se kvantni prinos ne mijenja u području 313 – 366 nm. Također, kinetika fotorazgradnje im je pseudo-prvog reda. No, da bi se aproksimirala kinetika pseudo-prvog reda, koncentracija piridina treba biti u većem suvišku, barem 10 do 1 000 puta veća u odnosu na PNA.



**Slika 12.** Nukleofilna supstitucija piridinom na *p*-nitroanisolu

Za odabir koncentracije piridina, zbog usklađivanja vremena poluraspada aktinometra PNA s farmaceutikom (analitom), upotrebljava se sljedeća jednadžba (2):

$$\phi = 0,44 [\text{PYR}] + 0,00028 \quad (2)$$

I u slučaju PNAP prema jednadžbi 3:

$$\phi = 0,0169 \text{ [PYR]} \quad (3)$$

U velikom broju radova upotrijebljene su prethodne jednadžbe, a naveli su ih Dullin i Mill. Međutim, Laszakovits i sur., 2016. godine [151] napominju kako je potrebna revizija široko prihvaćenih aktinometara. Naveli su da izvorna jednadžba za PNA predviđa 27 % manje zračenja fotona nego li je to u stvarnosti, i to za često upotrebljavani i karakterizirani ferioksalatni aktinometar. Prema ovome, zapravo je kvantni prinos za PNA/PYR niži nego što on zapravo jest. No, kvantni prinos ovisi i o koncentraciji piridina, a računa se prema jednadžbi 4:

$$\phi = 0,29 \text{ [PYR]} + 0,00029 \quad (4)$$

I za PNAP prema jednadžbi 5:

$$\phi = 0,0074 \text{ [PYR]} + 0,000011 \quad (5)$$

Polikromatsko Sunčevo zračenje često se koristi u studijama fotolitičke razgradnje farmaceutika u okolišu i kod određivanja kvantnog prinosa. Iako je kvantni prinos strogo definiran za monokromatsko zračenje (jednadžba 6), upotrebljava se i u slučaju polikromatskog izvora zračenja [148].

$$\phi_c = \frac{k_c}{k_{akt}} \left( \frac{\varepsilon_{akt,\lambda}}{\varepsilon_{c,\lambda}} \right) \phi_{akt} \quad (6)$$

Oznaka  $k_c$  je koeficijent brzine reakcije analita, npr. farmaceutika ( $s^{-1}$ ),  $k_{akt}$  je koeficijent brzine reakcije aktinometra ( $s^{-1}$ ),  $\varepsilon_{c,\lambda}$  je molarni apsorpcijski koeficijent za analit ( $dm^3 cm^{-1} mol^{-1}$ ),  $\varepsilon_{akt,\lambda}$  je molarni apsorpcijski koeficijent za aktinometar ( $dm^3 cm^{-1} mol^{-1}$ ),  $\phi_c$  je kvantni prinos analita i  $\phi_{akt}$  kvantni prinos aktinometra.

Za polikromatsko zračenje pojavljuje se dodatni parametar  $I_\lambda$  koji predstavlja intenzitet izvora svjetlosti pri određenoj valnoj duljini (Einstein  $cm^{-2} s^{-1}$ ), a to je zapravo ulazna brzina snopa (fluencije) fotona;  $E_{n,p,o}^0$ . Fluencija predstavlja množinski izraz za fluks fotona iz sferičnog

spektralnog izvora zračenja. Prema tome, jednadžba 7 prikazuje određivanje kvantnog prinosa za polikromatsko zračenje upotrebom spektrometra i aktinometra.

$$\phi_c = \frac{k_c}{k_{akt}} \left( \frac{\sum I_\lambda \varepsilon_{akt,\lambda}}{\sum I_\lambda \varepsilon_{c,\lambda}} \right) \phi_{akt} \quad (7)$$

Prednosti spektralnog radiometra su u brzini i pouzdanosti, dok su nedostaci prisutni kod upotrebe više različitih izvora svjetlosti te kod nepravilne geometrije fotoreaktora [148]. Uporabom spektrometra omogućava se računanje kvantnog prinosa na sljedeći način: nakon mjerenja spektralne brzine fluencije ( $E_{o,\lambda}^0$ ;  $\text{W m}^{-2}$ ), nužno je izmjerenu fizikalnu veličinu pretvoriti u spektralnu brzinu fluencije fotona,  $E_{p,o,\lambda}^0$  (Einstein  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) (prema jednadžbi 8).

$$E_{p,o,\lambda}^0(\lambda) = \frac{E_{o,\lambda}}{h c N_A} \quad (8)$$

Oznaka  $\lambda$  je valna duljina emitirane svjetlosti (m),  $h$  je Planckova konstanta ( $6,626 \cdot 10^{-34} \text{ J s}$ ),  $c$  je brzina svjetlosti korigirana za refraktivni indeks loma (1,33) koja uz korekciju iznosi  $2,25 \cdot 10^8 \text{ m s}^{-1}$ , a  $N_A$  je Avogadrova konstanta ( $6,022 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ ). Ako se radi o višestrukim (pulsiranim) svjetlosnim impulsima, što je slučaj kod Xe svjetiljke, koristi se oznaka  $E_{p,o,n}^0$ . Prema rečenom, nužno je iskazati odnos  $E_{p,o,n}^0(\lambda)$  o  $\phi(\lambda)$ . Slijedi da je koeficijent brzine izravne fotolitičke razgradnje reaktanta, npr. farmaceutika koncentracije  $C$  ( $\text{mol L}^{-1}$ ) u vodenoj otopini pri određenoj valnoj duljini  $r(\lambda)$  ( $\text{mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$ ) iskazan jednadžbom 9:

$$r(\lambda) = \left( -\frac{dC}{dt} \right)_\lambda \quad (9)$$

$$r(\lambda) = E_{n,p,o}^0(\lambda) \left( \frac{A}{V} \right) (1 - 10^{-[\alpha(\lambda) + \varepsilon(\lambda)C]l}) \left( \frac{\varepsilon(\lambda) C}{\alpha + \varepsilon(\lambda) C} \right) \phi_\lambda \quad (10)$$

Budući da su farmaceutici prisutni u razrijeđenoj otopini, odnosno u destiliranoj deioniziranoj vodi, koeficijent prigušenja otapala na određenoj valnoj duljini  $\alpha(\lambda)$  jednak je 0 ( $\text{cm}^{-1}$ ) pa se prethodni izraz (jednadžba 10) može izraziti na sljedeći način (jednadžbe 11 – 12):

$$r(\lambda) = \left(-\frac{dC}{dt}\right)_\lambda = 2,303 E_{n,p,o}^0(\lambda)\varepsilon(\lambda) \left(\frac{A}{V}\right) C l \phi_\lambda \quad (11)$$

$$k(\lambda) = 2,303 E_{n,p,o}^0(\lambda)\varepsilon(\lambda) \left(\frac{A}{V}\right) l \phi_\lambda \quad (12)$$

i prema jednadžbama 13 i 14:

$$\left(-\frac{dC}{dt}\right)_\lambda = k(\lambda) \cdot C \quad (13)$$

$$\ln \frac{C}{C_0} = k(\lambda)t \quad (14)$$

može se iskazati konačan oblik (jednadžba 15) na temelju kojeg se može izračunati kvantni prinos analita (farmaceutika):

$$\phi(\lambda) = \frac{k(\lambda)}{2,303 \left(\frac{A}{V}\right) l \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} (E_{n,p,o}^0(\lambda)\varepsilon(\lambda))d\lambda} \quad (15)$$

Oznaka  $E_{n,p,o}^0(\lambda)$  je ulazna brzina fluencije fotona (engl. *incident photon fluence rate*) ( $\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ili Einstein  $\text{m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) za određeno područje valnih duljina,  $A$  je površina reakcijske otopine izložene zračenju ( $\text{m}^2$ ),  $V$  je volumen reakcijske ( $\text{dm}^3$ ),  $\varepsilon(\lambda)$  je molarni apsorpcijski koeficijent reaktanta pri određenoj  $\lambda$  ( $\text{dm}^3 \text{mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$ ), ali za isto područje kao i ulazna brzina fluencije fotona,  $l$  je efektivno zračenje apsorpcije duljine puta fotokemijskog reaktora (dubina otopine) (cm),  $\phi(\lambda)$  kvantni prinos izravne fotolize neke tvari pri određenoj  $\lambda$  (bez dimenzije ili  $\text{mol Einstein}^{-1}$ ) [152].

Nadalje, u **tablici 3** navedene su vrijednosti kvantnih prinosa razgradnje nekih farmaceutika čiji se podatci uglavnom odnose na Xe svjetiljku. Međutim, kvantni prinosi su određivani i za druge vrste izvora svjetlosti (poput Hg svjetiljke), pri čemu su korišteni različiti parametri, poput: intenziteta svjetlosti, valne duljine, aktinometara, matice, otapala te vrijednosti pH, koje pak znaju čak biti i nenavedeni. To ukazuje na nemogućnost usporedbe i reproducibilnosti rezultata. Prema tome, za karbamazepin, kvantni prinos iznosio je

---

$\phi = 1,5 \cdot 10^{-4}$  (Pyrex, Hg svjetiljka za područje 313 – 578 nm) te  $\phi = 1,3 \cdot 10^{-4}$  (Xe svjetiljka, 765 W m<sup>-2</sup>, PNA/PYR) što je vrlo slično (radi se o istom redu veličine) s obzirom na različite izvore osvjetljavanja i eksperimentalne uvjete. Međutim, kvantni prinos u istim uvjetima iznosi  $\phi = 6,4 \cdot 10^{-5}$  pri pH 2,9 te  $\phi = 2,9 \cdot 10^{-6}$  pri pH 4,0 što ukazuje da se pri promjeni jedne jedinice vrijednosti pH kvantni prinos umanjio 2,2 puta. Kvantni prinos razgradnje sulfametoksazola pri pH 3,2 je čak 13 puta veći nego pri pH 8,4. Nedosljednost u prikazivanju i navođenju svih bitnih podataka stvara probleme pri daljnjoj primjeni izračunatih kvantnih prinosa. Također, nedostatna je i količina literaturnih podataka za realne uvjete pod utjecajem Sunčeva zračenja, budući da su istraživanja uglavnom usmjerena na laboratorijske uvjete. Sve navedeno predstavlja važne podatke koji, u konačnici, utječu na kvantni prinos, odnosno poznavanje sudbine farmaceutika u okolišu. Jedan od načina kako pridonijeti poznavanju i praćenju sudbine farmaceutika u okolišu može biti određivanjem kvantnog prinosa.

Prema literaturnim podacima, u nekim slučajevima za isti su farmaceutik, pod istim ili sličnim uvjetima, dobivene potpuno različite vrijednosti kvantnog prinosa, a u nekim slučajevima razlike su i za nekoliko redova veličine. Posebno je ovo uočljivo ukoliko je kvantni prinos razgradnje određivan pri vrijednosti pH koja je blizu vrijednosti pK<sub>a</sub> farmaceutika. Također, za veliki broj farmaceutika nema dostupnog izmjerenog (izračunatog) kvantnog prinosa, tako da bi se, u tom smjeru, istraživanja svakako trebala nastaviti. Problemi proizlaze i zbog različitih, primijenjivanih eksperimentalnih uvjeta te različitih načina određivanja, što dodatno umanjuje pouzdanost i usporedivost vrijednosti kvantnih prinosa za farmaceutike. U konačnici, kvantni prinosi upotrebljavaju se kao ulazni podatak u odgovarajući računalni program (poput ABIWAS-a). To omogućuje procjenu vremena poluraspada farmaceutika u okolišu, pri čemu se uzima u obzir i: intenzitet svjetlosti (Sunčeva zračenja), geografska širina, godišnje doba te dubina vode.

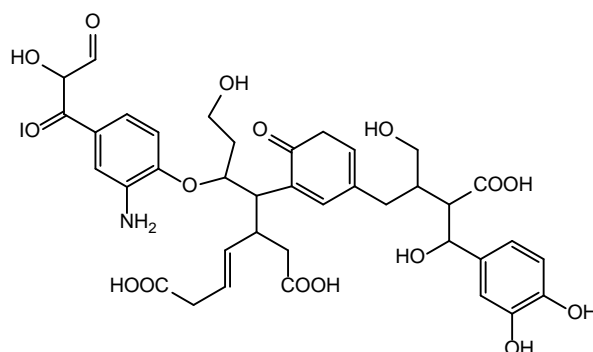
**Tablica 3.** Kvantni prinosi razgradnje farmaceutika

Farmaceutik	Uvjeti osvjetljavanja	Kvantni prinos	Literatura
sulfametoksazol	Xe svjetiljka, aktinometar (PNA/PYR) pH nepoznat	0,02	[153]
	Xe svjetiljka pH (5,0; 6,3; 7,3)	$(17,2; 2,76; 2,42) \cdot 10^{-8}$	[154]
	Prirodno svjetlo, PNA/PYR (pH 5,3; 6,9)	0,50; 0,09	[155]
sulfadiazin (SH)	Prirodno svjetlo, PNA/PYR pH 6,1	$0,4 \cdot 10^{-3}$	[156]
sulfadiazin (S <sup>-</sup> )	Prirodno svjetlo, PNA/PYR pH 7,6	$1,2 \cdot 10^{-3}$	[156]
levoflosacin	Xe svjetiljka, PNA/PYR	$8,26 \cdot 10^{-3}$	[139]
enrofloksacin		$6,97 \cdot 10^{-2}$	
difloksacin		$3,13 \cdot 10^{-2}$	
sarafloksacin		$3,97 \cdot 10^{-2}$	
naproksen	Xe svjetiljka, radiometar; PNA(P)/PYR; pH 5,5	0,026	[123]
propranolol		0,0052	
propranolol		0,0052	
17 $\alpha$ -etinilestradiol		0,0048	
diklofenak	Hg svjetiljka, aktinometar (atrazin)	0,066	[157]
	Hg svjetiljka, PNA(P)/PYR	0,094	[158]
ketoprofen	Hg svjetiljka, aktinometar (atrazin)	0,759	[157]
atenolol		0,036	
ibuprofen	Xe svjetiljka, aktinometar (ferioksalat)	0,33	[159]
lorazepam	Xe svjetiljka, spektrometar	$7,8 \cdot 10^{-5}$	[109]
oksazepam		$4,45 \cdot 10^{-6}$	
diazepam		$4,3 \cdot 10^{-6}$	
alprazolam		$3,4 \cdot 10^{-6}$	
tetraciklin	Xe svjetiljka, umjesto snimanja spektrometrom uzete su tablične vrijednosti proizvođača, pH 6,0	$3,4 \cdot 10^{-4}$	[138]

### 2.5.3. Neizravna fotoliza

Provođenje fotolitičke razgradnje u destiliranoj deioniziranoj vodi omogućuje određivanje utjecaja izravne fotolize za određeni farmaceutik. Ovakvi uvjeti nisu primjereni uvjetima u okolišu, ali služe za određivanje doprinosa izravne i neizravne fotolize. Upravo se utjecaj neizravne fotolize značajno odražava na vremena poluraspada određenih farmaceutika, a

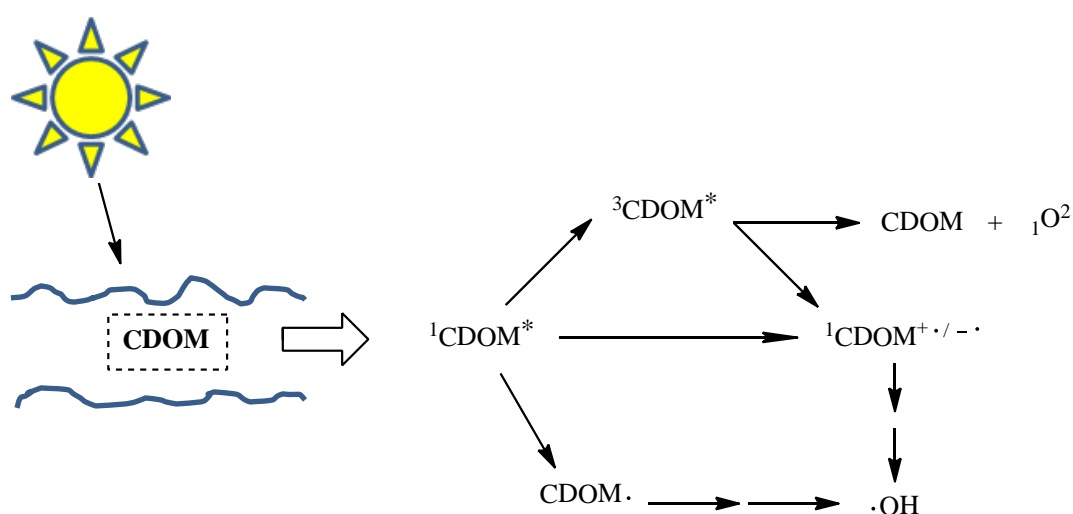
ponajviše kod onih farmaceutika koji nisu skloni izravnoj fotolizi. Naime, to je prvenstveno vidljivo kod farmaceutika koji nemaju kromoforne skupine pa ne apsorbiraju Sunčevo zračenje u području iznad 290 nm, što je posebno karakteristično za makrolide. Prirodni sastojci u vodi (huminske kiseline, nitrati, halogenidi, hidrogenkarbonati, ioni željeza i ostali prisutni ioni u vodi) značajno utječu na fotolitičku razgradnju farmaceutika i drugih zagađivala. Među navedenim tvarima, prisutnost huminskih kiselina ima značajnu ulogu u pokretljivosti i biodostupnosti različitih tvari u prirodnim vodama, posebno u kompleksiranju metala. Prema Aikenu i sur. [160] huminske tvari mogu biti definirane kao *grupa prirodnih, biogenih, heterogenih organskih tvari žute do crne boje, visokih molekulskih masa, otpornih na toplinu*. Također, mogu se definirati i kao slabi elektroliti kiselog karaktera micelarne strukture koje sadrže karboksilne i fenilne skupine. Odlikuje ih relativno velika molekulska masa (približno 500 Da za fulvinske kiseline i 1 000 000 Da za huminske kiseline), različita topljivost u vodi (ovisno o vrijednosti pH) te različito zadržavanje na hidrofobnim smolama [160, 161]. Međutim, molekulske mase variraju, pa se tako za huminske kiseline mogu nalaziti u rasponu od 2 000 do 1 300 000 Da. Stoga je i za očekivati da huminske kiseline nemaju nužno jednako djelovanje na brzinu razgradnje zagađivala [162]. Huminske tvari dijele se na: huminske kiseline (topljive pri  $\text{pH} > 2$ ), fulvinske kiseline (hidrofilne građe topljive pri svim pH) te humine (netopljive u vodi) [163]. Huminske kiseline, zajedno s fulvinskim kiselinama, pripadaju kromofornim otopljenim organskim tvarima te čine do 80 % otopljenog organskog ugljika. Glavni predstavnik otopljenih organskih tvari su huminske kiseline koje se nalaze u polimernom obliku, a čija je struktura monomera prikazana na **slici 13** te varira ovisno o izvoru.



**Slika 13.** Prikaz modela monomera huminske kiseline (preuzeto iz [162])

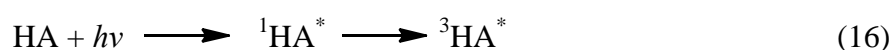


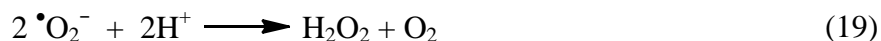
Uglavom je riječ o: ketonima, aldehydima, kinonima, supstituiranim fenolima, karboksilnim kiselinama, ugljikohidratima te zasićenim i nezasićenim ugljikovodicima [164]. Za huminske kiseline karakteristično je da sa smanjenjem vrijednosti pH postaju hidrofobnije, a to dovodi do njihove netopljivosti u vodi pri vrijednostima pH manjima od 2 [10]. One djeluju kao fotosenzibilizatori, tako da kromoforne frakcije DOM apsorbiraju Sunčevo zračenje što omogućuje stvaranje reaktivnih fotokemijskih vrsta: hidroksilnih radikala, singletnog kisika, tripletnog pobuđenog stanja i dr. (**slika 14.**). Također, mogu djelovati kao hvatači radikala (engl. *scavengers of radicals*) te prigušivači (filtri) Sunčeva zračenja (engl. *irradiation filter*).



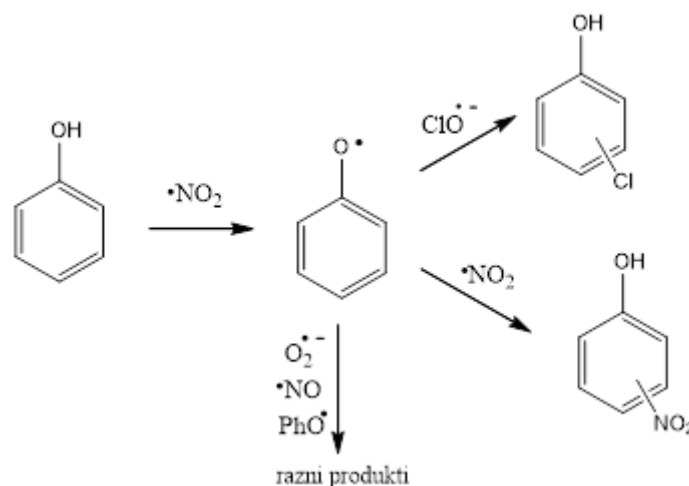
**Slika 14.** Pojednostavljeni prikaz nastajanja fotokemijski reaktivnih vrsta  
(modificirano prema Sharplessa i sur. [165])

Nadalje, poznato je da pod utjecajem UV zračenja huminske kiseline prelaze u pobuđeno stanje ( $^3\text{HA}^*$ ) (jednadžba 16), a to dovodi do ubrzavanja razgradnje izravnom reakcijom s analitom. Do ubrzanja može doći i neizravnim putem, kada zapravo huminske kiseline prvo reagiraju s kisikom (jednadžbe 17 i 18). U ovom (drugom) slučaju, može nastati vodikov peroksid (jednadžba 19) te iz njega hidroksilni radikali (20) i druge reaktivne vrste, poput superoksida (18) i singletnog kisika (17):





I nitrati, poput huminskih kiselina, zbog fotokemijske reaktivnosti i prisutnosti u okolišu značajno utječu na sudbinu i ponašanje mnogobrojnih farmaceutika. Naime, kada se nitrati izlože Sunčevu zračenju, nastaju izrazito reaktivni hidroksilni radikali ( $E^\circ = 2,59 \text{ V}$ ) koji su skloni reakciji s organskim zagađivalima [166]. Isto tako, nitriranjem mogu nastati i novi razgradni produkti (nitro-spojevi) koji su se pokazali toksičnima. Posebno je ovo značajno za aromatske spojeve bogate elektronima, poput fenola [167, 168] (slika 15.).



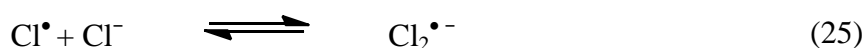
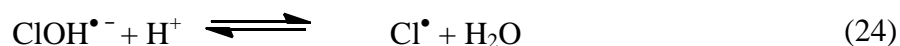
**Slika 15.** Procesi nitriranja i halogeniranja fenola [169]

I nitriti mogu (poput nitrata) utjecati na ponašanje i sudbinu zagađivala. Ako su u okolišu prisutni u sličnim koncentracijama kao nitrati, njihov fotokemijski utjecaj je znatno izraženiji, jer apsorbiraju Sunčevo zračenje pri većim valnim duljinama te imaju veći kvantni prinos [167]. U prisutnosti nitrata nastaju fotoreaktivne prijelazne vrste (jednadžbe 21 i 22), među kojima prevladavaju hidroksilni radikali, glavni odgovorni za ubrzanje fotokemijskih reakcija [170].





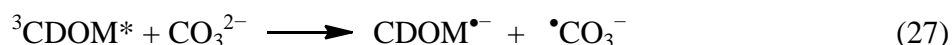
I halogenidi mogu djelovati na farmaceutike i druga zagađivala (**slika 15.**) stvaranjem reaktivnih radikala [171, 172], pri čemu mogu nastati novi halogenirani (toksični) razgradni produkti. Khanra i sur. [173] navode da kloridni ioni mogu reagirati s hidroksilnim radikalima stvarajući  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  (jednadžbe 23 – 25):



Nadalje, sastavni dio voda su i hidrogenkarbonati i sulfati koji uglavnom djeluju kao hvatači radikala te na taj način usporavaju razgradnju zagađivala. Prema jednadžbi 26, reakcijom neselektivnih i reaktivnih hidroksilnih radikala nastaju selektivniji i manje reaktivni karbonatni radikali [174, 175]. Značajnije je to za područje vrijednosti pH od 7 do 8, budući da su hidrogenkarbonati prevladavajuća specija u odnosu na ugljikov dioksid i karbonate.



Karbonatni radikali mogu reagirati s tripletnim pobuđenim stanjem kromofornih skupina otopljene organske tvari (jednadžba 27), a to vrijedi i za bromide.

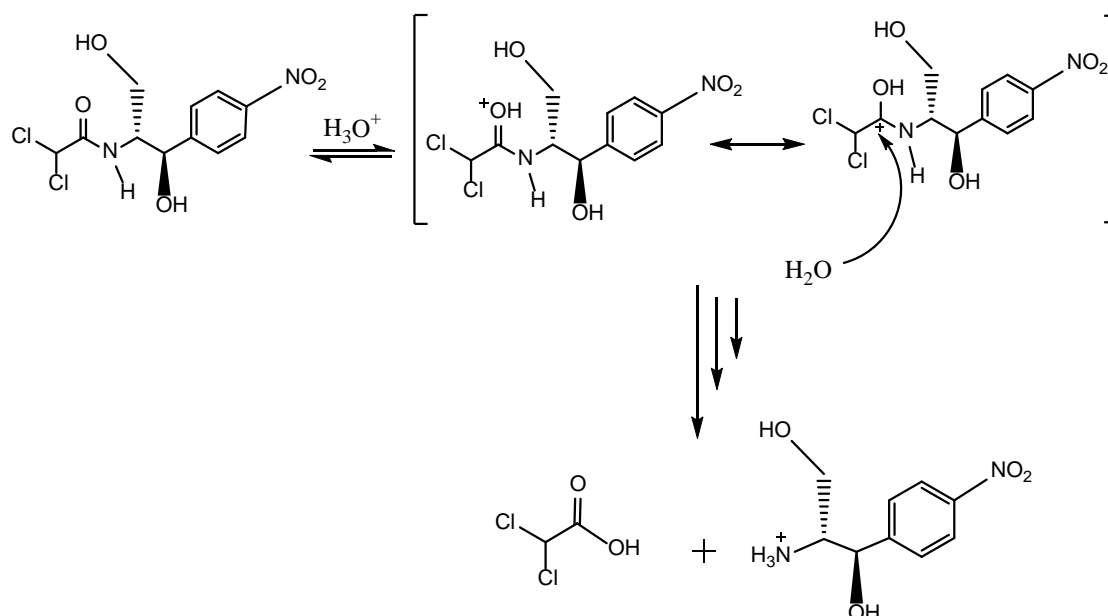


Željezovi ioni skloni su stvaranju hidroksilnih radikala (jednadžba 28 i 30) i fotokemijski aktivne specije željeza [176] (jednadžba 29). Osim toga, mogu kompleksirati s makrocikličkim spojevima i stvarati fotokemijski aktivnije spojeve podložnije razgradnji [177, 178], ali i s halogenidima, stvarajući pritom reaktivne radikale [179]. Istraživanja potvrđuju kako se u prirodnim vodama u okolišu (morima, oceanima, estuarijima) odvija fotokloriranje aromatskih spojeva [180, 181].



## 2.6. Razgradni i transformacijski produkti

Prethodno navedeni abiotički procesi dovode do toga da u okolišu nisu prisutni samo farmaceutici, već i njihovi razgradni i transformacijski produkti. Ovisno o vrsti farmaceutika i drugim uvjetima u vodama u okolišu mogu nastati razgradni/transformacijski produkti, kao posljedica fotolitičke ili hidrolitičke razgradnje. Nastanak hidrolitičkih produkata može se dogoditi u neutralnim, kiselim ili lužnatim uvjetima. Međutim, hidrolitička razgradnja se, za razliku od fotolize, odvija u osnovnom stanju pa je jednostavnije pretpostaviti mehanizam razgradnje. Poznato je da su određene grupe spojeva i funkcionalne skupine sklone hidrolizi. Tebes-Stevens i sur. [182] navode kako se programskim alatima može predvidjeti za: geminalne diole, acil halogenide, acikličke i cikličke anhidride da vrlo lako hidroliziraju, neovisno o vrijednosti pH sredine. Iako su laktoni, nitrili, epoksidi, imidi, veza dušik-sumpor, laktami, također sklone hidrolizi, osim značajnog utjecaja vrijednosti pH na stupanj hidrolize, ovdje možemo govoriti i o utjecaju drugih čimbenika (poput steričkog efekta i dr.). Za hidrolizu amidne veze kloramfenikola (točne mase 345,0 Da) detektiran je razgradni produkt (točne mase 231,1 Da). Primjera radi, u nastavku je predložen mehanizam hidrolize u kiseloj sredini (**slika 16.**).



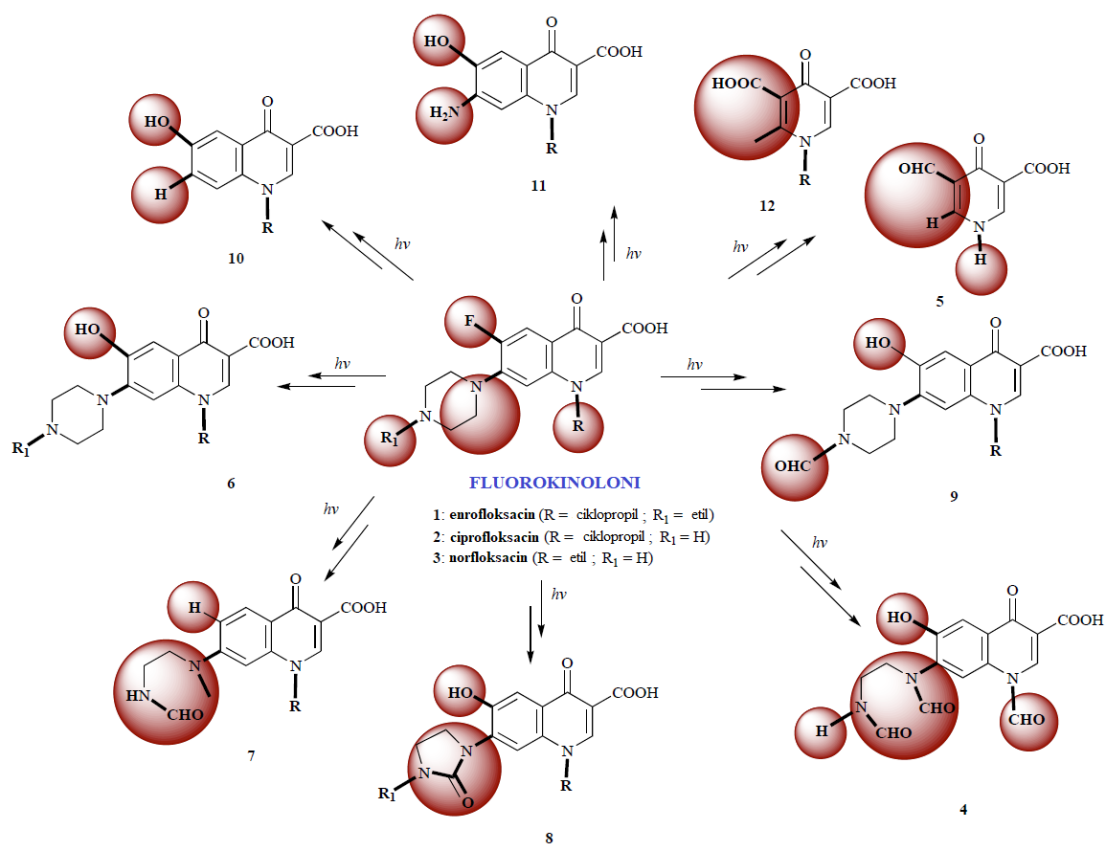
**Slika 16.** Primjer predloženog mehanizma hidrolitičke razgradnje kloramfenikola

Nadalje, fotolitička razgradnja može imati pozitivan utjecaj na okoliš ukoliko razgradnjom toksičnog farmaceutika nastaju takvi razgradni produkti koji nemaju štetno djelovanje prema istom testnom organizmu [183–187]. Međutim, djelovanje može biti i negativno tako što nastaju toksičniji razgradni produkti u odnosu na početni farmaceutik [188–192]. Analogno tome, primijećeno je za sulfapiridin, koji je strukturno sličan metoklopramidu, kako razgradnjom nastaju toksičniji produkti [193]. Također, fotolitička razgradnja ne mora imati utjecaja na promjenu toksičnosti pa je tako za sulfametoksazol ustanovljeno kako su vrijednosti  $EC_{50}$  ostale iste i prije i nakon fotolitičke razgradnje [194].

Iako je teško točno predvidjeti koje će se fotokemijske reakcije odvijati na spojevima prisutnima u okolišu, određeni obrasci fotolitičke razgradnje mogu se predvidjeti i predložiti. Naime, karbonilna skupina je najčešća skupina koja prevladava među mnogobrojnim organskim kromoforima, uključujući i farmaceutike. Stoga su fotokemijske promjene, karakteristične za skupinu spojeva koji sadrže karbonilnu skupinu, od posebnog značenja. Reakcije karbonilnih skupina u pobuđenom stanju ovise o vrstama funkcionalnih auksokroma koje se nalaze u blizini, bilo da se, primjerice, radi o elektron-donirajućim ili elektron-odvlačećim skupinama. Tri glavne vrste reakcija su:  $\alpha$ -cijepanje (homolitičko cijepanje R-CO veze, apstrakcija (redukcija) vodika i adicija karbonilne skupine na dvostruku C=C vezu. Tipične reakcije su redukcije s intermolekulskim vodikom i fragmentacije Norrish I i

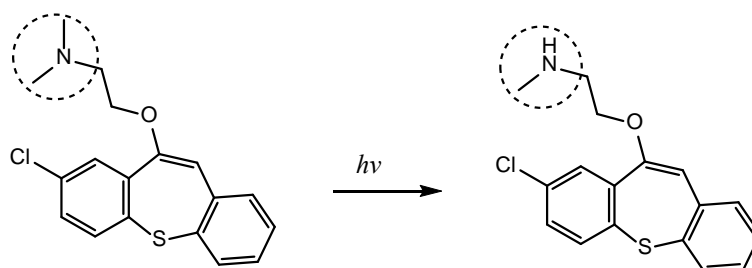
Norrish II. Homolitičko cijepanje veze između karbonilnog i  $\alpha$ -ugljika uključuje nastajanje acilnih i alkilnih radikala, a najčešće reakcije koje se odvijaju su: dekarbonilacija, disproporcioniranje te ponovna kombinacija radikala. Kod ketona koji sadrže vodik u  $\gamma$ -položaju intramolekulskom reakcijom vodika nastaje 1,4-biradikal koji se uglavnom ciklizira ili cijepa u  $\beta$ -položaju. U slučaju cijepanja  $\beta$ -veze odvija se tzv. Norrishova fotoreakcija tipa II, prema kojoj fotoeliminacijom nastaje keton s manjim brojem ugljikovih atoma. Nadalje, nitroaromske skupine djeluju kao radikali te podliježu intermolekulskoj apstrakciji vodika ili pregrađivanju u nitritni ester; arilni kloridi podložni su homolitičkom i/ili heterocikličkom cijepanju; alkeni su skloni E/Z izomerizaciji kao i oksidaciji; N-oksidne skupine pregrađuju se u oksaziridin, pri čemu konačni produkt ovisi o međuproduktu; produkti koji sadrže slabu C–H vezu skloni su fotofragmentaciji s prijenosom vodika ili elektron-proton prijenosom [135].

Na **slici 17** prikazana je shema nastalih fotolitičkih produkata fluorkinolona koji, kao i hidrosiklorokin, pripada sličnoj skupini spojeva (kinolinima). Sukladno rečenom, navedeni su putovi razgradnje, među kojima određeni mehanizmi (poput solvolize halogenida na kinolonskom prstenu, hidroksilacije kinolonskog prstena) mogu biti karakteristični i za hidrosiklorokin.



**Slika 17.** Shema nastajanja fotolitičkih produktata enrofloksacina, ciprofloksacina i norfloksacina (preuzeto iz [195])

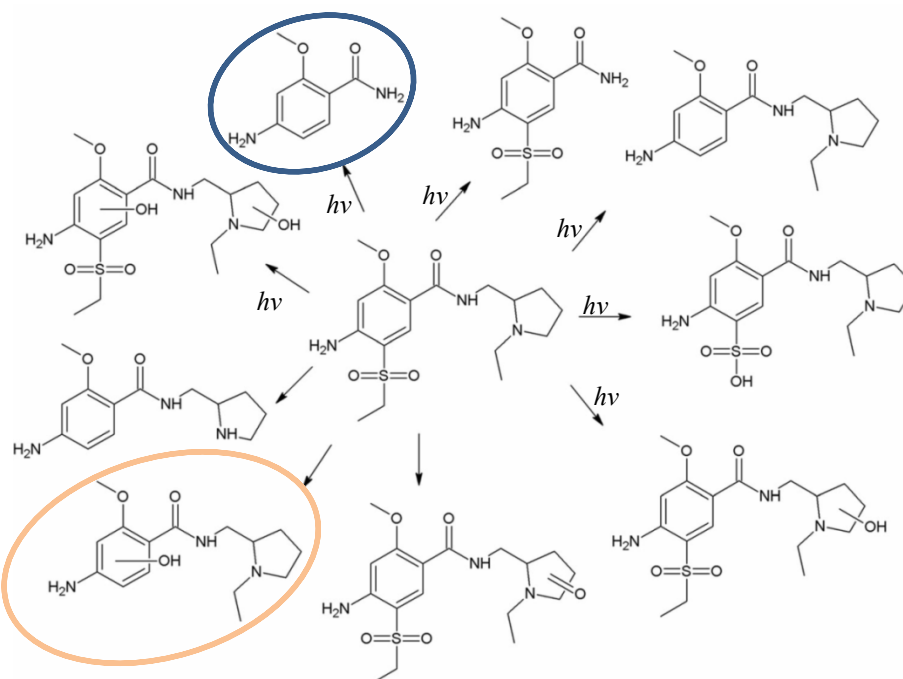
Bočni ogranak hidrosiklorokina na kraju lanca sadrži tercijarnu amino-skupinu. Na **slici 18** prikazana je dealkilacija zotepina, koja također može biti relevantna za hidrosiklorokin.



**Slika 18.** Primjer dealkilacije zotepina i nastanak njegovog fotoproducta (preuzeto iz [196])

Prikazani nastali fotoproducti jednog predstavnika sulfonamida (amisulprida) na **slici 19** upućuju na to kojim vrstama fotolitičkih reakcija podliježu sulfonamidi pa potencijalno i

metoklopramid. Međutim, metoklopramid ne sadrži SO<sub>2</sub> skupinu, stoga nije za očekivati potpuno analogan pristup razgradnje (npr. desulfonacije). Na navedenom primjeru može se uočiti hidroksilacija benzamidnog prstena i hidroliza amidne veze, što može biti slučaj i za metoklopramid.



**Slika 19.** Nastanak različitih fotoprodukata amisulprida (preuzeto iz [197, 198])

## 2.7. Kromatografske tehnike u analizi farmaceutika u okolišu

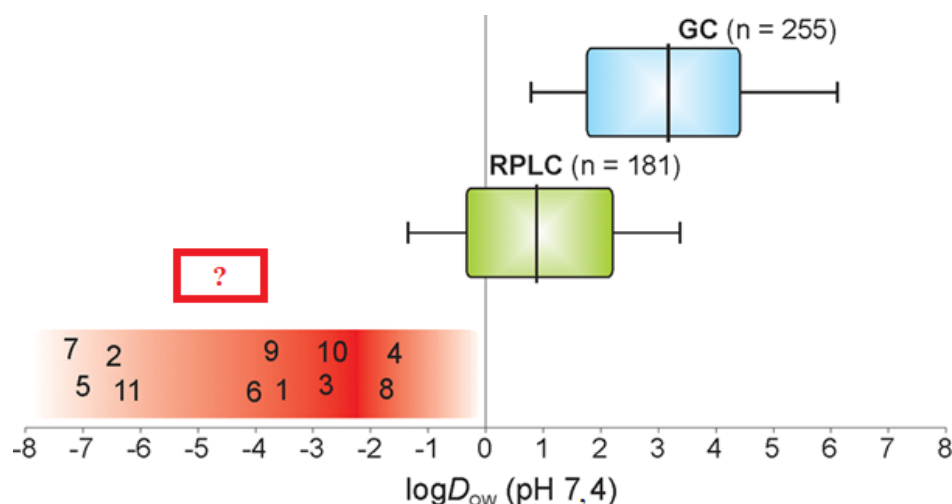
Prije razvoja modernih analitičkih tehnika poput spektrometrije masa, hidroksiklorokin i metoklopramid su, kao i mnogi drugi farmaceutici, određivani UV-Vis spektrofotometrijskim i potenciometrijskim metodama te kapilarnom elektroforezom. Ključne promjene u mnogim saznanjima o farmaceuticima u okolišu dogodile su se upotrebom metode HPLC-MS/MS [199–202]. Naime, korištenje spektroskopske tehnike, primjerice nuklearne magnetske rezonancije za identifikaciju farmaceutika i razgradnih produkata, dodatno je otežano, budući da se farmaceutici nalaze u smjesama u vrlo niskim koncentracijama. Upravo zato, ove tehnike ne primijenjuju se u tolikoj mjeri kao, primjerice, kromatografska tehnika, nego samo kao dodatna potvrda pri identifikaciji razgradnih produkata, što često nije lako ostvarivo i



zahtijeva pripremu uzorka. Sukladno tome, kromatografska separacija vezana sa spektrometrijom masa nametnula se kao jedna od najvažnijih tehnika u analizi farmaceutika i njihovih produkata [201]. Jedna od najvećih prednosti spektrometrije masa je visoka osjetljivost, koja omogućuje kvalitativno i kvantitativno određivanje tragova analita. Za nastajanje iona u plinovitoj fazi primijenjuju se različite metode ionizacije prilagođene različitim svojstvima analita i količini energije predane tijekom ionizacijskog procesa. Elektroraspršenje je jedan od najzastupljenijih načina ionizacije uzorka izravno iz otopine jer se može upotrebljavati za vrlo različite grupe spojeva širokog raspona masa [203–205], a zbog svoje blage ionizacije i za proučavanje nekovalentnih interakcija [206]. Da je elektroraspršenje iznimno vrijedna tehnika, potvrđuje i Nobelova nagrada za kemiju koju je J. B. Fenn s K. Tanakaom i K. Wüthrichom dobio 2002. g., jer je za njeno povezivanje sa spektrometrom masa na jedinstven način omogućena identifikacija i strukturna analiza bioloških makromolekula [207]. Njena prednost je i kompatibilnost sa svim analizatorima. Upravo je kvadripolni analizator masa optimalan izbor u kvantitativnoj analizi, a njegovim spajanjem u seriju omogućava se fragmentacija iona. Praćenje fragmentnih iona u kvalitativne i kvantitativne svrhe može se provesti na nekoliko načina: praćenjem jedne odabrane reakcije (engl. *single/selected reaction monitoring*, SRM), praćenjem uzastopnih reakcija, praćenjem više odabranih reakcija (engl. *multiple reaction monitoring*, MRM) ili usporednim praćenjem reakcija (engl. *parallel reaction monitoring*, PRM). Ipak, u neciljanoj analizi (*non-target analysis*) bolji izbor je upotreba tekućinskog kromatografa ultravisoke djelotvornosti povezanog sa spektrometrom masa visoke razlučivosti, poput spektrometra masa koji mjeri vrijeme preleta (UPLC-Q-ToF). Zbog velikog broja analita koji uključuju i razgradne produkte, u analizama se sve više primijenjuje spektrometrija masa visoke razlučivosti, poput tehnika s analizatorima (Q)-ToF-MS ili Orbitrap. To omogućuje lakšu identifikaciju između izobarnih masa uz pripadajući standard. Nadalje, kada elektroraspršenje nije prikladan način ionizacije, primijenjuje se njena komplementarna tehnika, kemijska ionizacija pri atmosferskom tlaku. Naime, osim u analizi manje polarnih spojeva i visokoj osjetljivosti, njena prednost je i u manjem utjecaju soli prisutnih u matici. Nedostatak je termički raspad analita zbog zagrijavanja pri raspršivanju [208]. Iako je još uvijek pozornost usmjerena na relativno hidrofobne farmaceutike, analiza polarnijih i halogeniranih zagađivala u okolišu dovodi do većeg izazova u pogledu kromatografije [40], ali i veće potrebe, zbog njihove

prisutnosti i manje istraženosti u okolišu. Primjerice, zanimljiv je podatak da je više od stotinu nepoznatih halogeniranih zagađivala pronađeno u serumu polarnog medvjeda [209]. Za određivanje takvih hidrofilnih i halogeniranih spojeva u vodi potrebno je koncentriranje, budući da se analiti mogu nalaziti pri vrlo niskim koncentracijama ( $< 10 \text{ ng L}^{-1}$ ) uz prisutan utjecaj matice. U tu i druge svrhe (poput uklanjanja interferencija matice), ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid phase extraction*, SPE) je najkorištenija tehnika za ekstrakciju polarnih organskih spojeva iz uzoraka vode. Uporabom različitih sorbensa, moguće je SPE koristiti za različite grupe spojeva [210, 211].

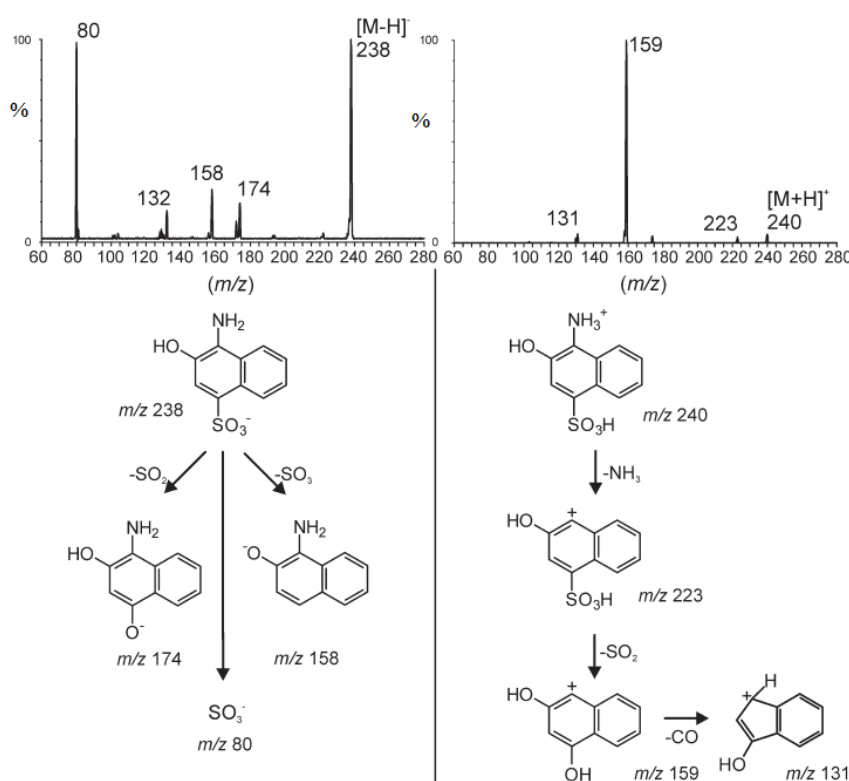
Na slici 20 može se zamijetiti kako se plinska kromatografija češće upotrebljava za hidrofobnije spojeve većih vrijednosti  $\log D_{ow}$ , a kromatografija obrnutih faza za spojeve s  $D_{ow}$  manjim od 2. Iz prikaza na slici može se uočiti nedostatak odgovarajuće tehnike za spojeve negativnih vrijednosti  $\log D_{ow}$ .



**Slika 20.** Odabir tehnike u ovisnosti o vrijednostima  $\log D_{ow}$  (preuzeto iz [40])

Analiza jako polarnih i bazičnih spojeva prilično je problematična od samih početaka razvoja metode HPLC. Za takve analite kod kojih kromatografija obrnutih faza nije zadovoljavajuća, razvojem kolone HILIC (engl. *hydrophilic interaction liquid chromatography column*) [212], drastično je porasla upotreba polarne nepokretne faze pa time i analize polarnih spojeva. Međutim, kod uporabe kolone HILIC, razvijanje metode je znatno složenije u odnosu na slučajeve kada se koristi kolona C18, a nije im ni mehanizam razdvajanja u potpunosti razjašnjen. Nadalje, odabir optimalne pokretne faze i njegove vrijednosti pH važni su parametri, jer kod detektora u spektrometriji masa može doći do supresije iona [213].

Fizikalno-kemijska svojstva analita uvelike određuju način provođenja mjerenja. Pozitivni ili negativni način snimanja kod elektroraspršenja odnosi se na polaritet priključene kapilare. Naime, ako je metalna kapilara kroz koju prolazi analit, kroz primijenjeno električno polje priključena na pozitivan kraj izvora napona, tada pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi [214]. Iako se češće koristi pozitivni način rada, spojevi koji imaju kisele skupine, poput karboksilnih kiselina, snimaju se u negativnom načinu rada dajući ion  $[M-H]^-$  te i to treba uvažiti prilikom identifikacije razgradnih produkata. Na **slici 21** dan prikazano je kako se u pozitivnom načinu rada značajno gubi intenzitet signala pri  $m/z = 80$ .



**Slika 21.** Primjer ESI-MS spektra i prijedlog fragmentacije molekulskog iona (1-amino-2-hidroksi-naftalen-4-sulfonske kiseline) u negativnom (lijevo) i pozitivnom (desno) ionizacijskom načinu rada (preuzeto iz [212])

Mnogi se polarni spojevi ponašaju kao slabe kiseline. U kromatografiji obrnutih faza postizanje pravilnog, simetričnog oblika kromatografske krivulje (kromatografske vrpce) i povećanje vremena zadržavanja takvih spojeva može se postići na nekoliko načina. Jedan način je ugađanje vrijednosti pH pokretne faze, što se postiže korištenjem mravljom ili octenom kiselinom. Međutim, dodatkom kiseline dolazi do smanjenja intenziteta signala za

anione snimljene u negativnom načinu rada pri ionizaciji elektroraspršenjem. Ukoliko se doda amonijev acetat, utoliko amonijev ion s analitom (anionom) tvori ionski par, što rezultira užom krivuljom. Ako se ta analogija upotrijebi i za određivanje jako bazičnih spojeva tako da se dodaju anionski protuioni, poput pentafluorpropanske ili heksafluorbutanske kiseline, to dovodi do znatnog smanjenja intenziteta signala analita u pozitivnom načinu rada. Za slabe baze koje se bolje određuju u pozitivnom načinu rada pomoću iona  $[M+H]^+$ , unatoč ionskom karakteru, može se postići zadovoljavajuće vrijeme zadržavanja, ali je zato za postizanje željenog oblika krivulje potrebno dodati prikladni aditiv, npr. mravlju kiselinu. Ipak, na taj način se i smanjuje osjetljivost bazičnih dušikovih spojeva u pozitivnom načinu rada. Neutralnim farmaceuticima (diazepamu, karbamazepinu, ciklofosfamidu) i makrocikličkim antibioticima (klaritromicinu, eritromicinu) odgovara neutralna vrijednost pH pokretne faze.

Glede sastava pokretne faze, za makrocikličke antibiotike je potreban veći udio organske faze. Ukoliko su spojevi amfoterni, potrebno je ugoditi vrijednost pH, kako bi molekula bila neutralno nabijena. Za kromatografsko određivanje poseban izazov su dipolarni ioni (tzv. *zwitter* ioni). U većini slučajeva upotrebljava se pokretna faza s vrijednosti pH u kiselom području te ionizacija elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. Međutim, zabilježeni su problemi s analizom antibiotika, amfoternih tetraciklina, zbog stvaranja stabilnih metalnih kompleksa i jakih interakcija sa slobodnim silanolnim skupinama na nepokretnoj fazi kromatografske kolone, što se može spriječiti dodatkom EDTA prije ekstrakcije. Poseban izazov je određivanje herbicida glifosata, točnije biorazgradnih produkata aminometilfosfonske kiseline (engl. *aminomethylphosphonic acid*, AMPA), zbog njihove polarnosti. Jedna takva molekula sadrži samo jedan ugljikov atom, što dovodi do problema s ekstrakcijom, vremenom zadržavanja i detekcijom. Jedna od strategija je uvođenje fluorescentne skupine, derivatizacijom s fluoren-9-ilmetoksikarbonilom (FMOC-om). Također, može se koristiti i kapilarna elektroforeza vezana sa spektrometrom masa (CE-MS), ali zbog injektiranja manjih volumena, svega nekoliko nanolitara, ograničena je kvantifikacija [212]. Usprkos svemu navedenom, moguće je postići, u vrlo kratkom vremenu, određivanje velikog broja farmaceutika i drugih zagađivala, a to potvrđuju brojna istraživanja [215–221].

## 2.8. Toksičnost

Prema Zakonu o otrovima NN 27/1999 *otrovi su tvari prirodnoga ili sintetskoga podrijetla i proizvodi od tih tvari koji uneseni u ljudsko tijelo ili u dodiru s ljudskim tijelom mogu ugroziti život i zdravlje ljudi ili štetno djelovati na okoliš te tvari čijom razgradnjom ili uništavanjem nastaju otrovne tvari* [222]. Na pitanje što su otrovi, odnosno koje su tvari toksične, još u 16. st. Paracelsus je odgovorio kako su: sve tvari otrov, samo je stvar doze (lat. *sola dosis facit venenum*). Međutim, unatoč malim dozama (koncentracijama), brojne studije ukazuju na biološko djelovanje farmaceutika i drugih spojeva prisutnih u okolišu s toksičnim, mutagenim i teratogenim posljedicama na različite organizme [223].

Postoje razni parametri kojima se može iskazivati procjena štetnog učinka, tj. toksičnosti. Određivanjem postotka otopljenog kisika i kemijskom potrošnjom kisika ne iskazuju se potrebne informacije o biološkim učincima. Ribe, rakovi i alge, u odnosu na mikroorganizme, imaju ograničenja u dugotrajnosti testova i većim volumenima uzoraka. Ribe, miševi i račići imaju smanjenu reproducibilnost i duže vrijeme trajanja testova, a uz to je potrebna i posebna oprema te je s etičke strane kontroverznija metoda ispitivanja. Bez obzira na pojedine nedostatke, postoje mnoge prikladne metode i različiti načini određivanja toksičnosti na različitim specijama [224].

U **tablici 4** navedeni su neki farmaceutici koji su pokazali toksično djelovanje. Usprkos tome što su koncentracije farmaceutika pri kojima je provedeno ispitivanje nekoliko redova veličine veći od onih u prirodnim vodama, njihov nepovoljan učinak može biti i dalje prisutan jer se ti spojevi kontinuirano ispuštaju u okoliš pa dolazi do kroničnog utjecaja na određene mikroorganizme. Uz rečeno, za određene je farmaceutike dokazano da, ukoliko se u okolišu nalaze u prisutnosti drugih spojeva, može doći do sinergističkog učinka [194]. To znači da je veća toksičnost dviju ili više tvari nego što se očekuje od zbroja pojedinačnih tvari, tj. njihovih individualnih učinaka na toksičnost. Nadalje, sve više bakterija pokazuje otpornost prema antibioticima i to ne samo za iste ili strukturno slične antibiotike. Lijekovi koji sadrže sulfonamide imaju smanjeno antibakterijsko djelovanje zbog povećane otpornosti bakterije na iste. Njihovo djelovanje temelji se na inhibiciji sinteze folne kiseline kod bakterija, i to tako što se ubace na enzimsko mjesto *p*-aminobenzojeve kiseline, što u konačnici sprječava sintezu nukleinskih kiselina. Međutim, bakterije su zato razvile alternativne enzime i putove sinteze

folne kiseline te tako povećale svoju otpornost na sulfonamide. Povrh toga, u više istraživanja [225–227] pokazano je da se mikroorganizmi (npr. bakterije) ili oštećena DNA mogu oporaviti od oštećenja nastalih UV dezinfekcijom. Koliko je otpornost bakterija na antibiotike ozbiljan problem [228–230] pokazuje i sposobnost prenošenja otpornosti na druge bakterije, ako je genetički kôd smješten na *R*-plazmidima [231].

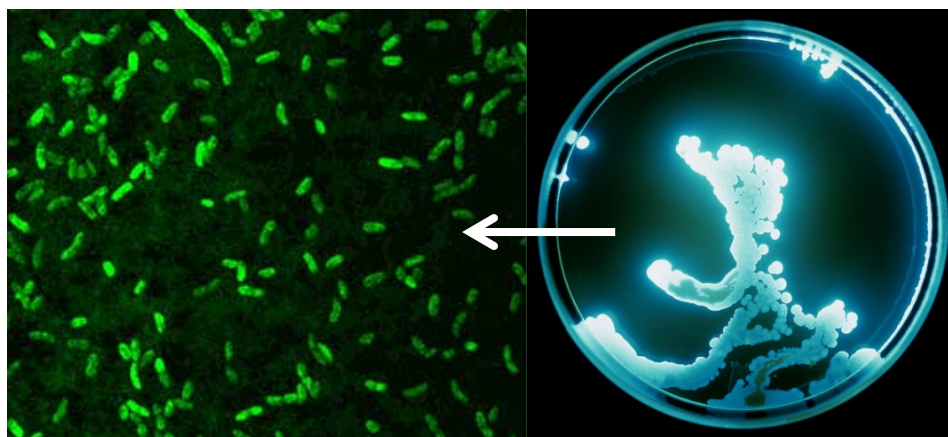
**Tablica 4.** Toksično djelovanje farmaceutika na *Vibrio fischeri*

Odgovorna farmaceutska aktivna tvar	Vrsta	Posljedica na izloženost	Literatura
ofloksacin	<i>Vibrio fischeri</i>	EC <sub>50</sub> = 13,6 µg mL <sup>-1</sup>	[232]
ketoprofen		EC <sub>50</sub> = 15,6 µg mL <sup>-1</sup>	[233]
karbamazepin		EC <sub>50</sub> = 52,2 µg mL <sup>-1</sup>	[234]
sulfametoksazol		EC <sub>50</sub> = 78,1 µg mL <sup>-1</sup>	[234]
ibuprofen		EC <sub>50</sub> = 39,9 µg mL <sup>-1</sup>	[235]
norfloksacin		EC <sub>50</sub> = 22,0 µg mL <sup>-1</sup>	[232]
flumekvin		EC <sub>50</sub> = 19,0 µg mL <sup>-1</sup>	[232]
triklosan		EC <sub>50</sub> = 0,28 µg mL <sup>-1</sup>	[194]
metil triklosan		EC <sub>50</sub> = 0,21 µg mL <sup>-1</sup>	[194]
kloramfenikol		EC <sub>50</sub> = 16,3 mg mL <sup>-1</sup>	[236]
diklofenak		EC <sub>50</sub> = 16,3 mg mL <sup>-1</sup>	[235]
kloramfenikol		EC <sub>50</sub> = 20,7 mg mL <sup>-1</sup>	[237]

Osim saznanja o utjecajima antibiotika na razvijanje otpornosti, neophodno je utvrditi i koji spojevi djeluju toksično na pojedine organizme. Ako neki spojevi ne pokazuju toksično djelovanje prema određenoj vrsti (npr. *Vibrio fischeri*), to nužno ne znači da nisu općenito štetni za okoliš ili ljude ili neki drugi organizam kojim se ispituje toksičnost [183]. Naime, neki spojevi (poput nalidiksične kiseline ili streptomycin-sulfata) pokazuju zakašnjelu toksičnost, što znači da se ne uočava inhibicija (toksičnost) prema *Vibrio fischeri* nakon 30 min, nego nakon 7 h ili 24 h, pa se u tom slučaju radi o inhibiciji rasta ili reprodukcije [236]. Akutna toksičnost jedan je od načina procjene toksičnosti, na temelju koje se može iskazati i kronična toksičnost. Zbog stalne prisutnosti farmaceutika u okolišu pri vrlo niskim koncentracijama, kronična toksičnost se procjenjuje s vodenbuhama *Daphnia magna*. Osim moguće zakašnjele toksičnosti, rezultati čak mogu varirati i kada se radi o istom testnom organizmu *Vibrio fischeri*. Naime, Farré i sur. [233] odredili su akutnu toksičnost za naproksen uporabom liofilizirane bakterije *Vibrio fischeri* (*Microtox*®), pri čemu je



$EC_{50} = 35,6 \mu\text{g L}^{-1}$ , dok je uz tekuću bakteriju *Vibrio fischeri* (*ToxAlert 100*<sup>®</sup>)  $EC_{50}$  iznosio  $21,2 \mu\text{g L}^{-1}$ . Za salicilnu kiselinu vrijednost  $EC_{50}$  je postignuta i iznosila je  $43,1 \mu\text{g L}^{-1}$ , dok u drugom slučaju s liofiliziranim bakterijama nije postignuta. Isidori i sur. [238] procijenjivali su akutnu i kroničnu toksičnost za šest antibiotika na vodenim organizmima. Rezultati su pokazali kako je akutna toksičnost prisutna u koncentracijama antibiotika reda veličine  $\text{mg L}^{-1}$ , dok je kronična toksičnost utvrđena pri koncentracijama  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Tako je ofloksacin genotoksičan, dok su sulfametoksazol i linkomicin mutageni. Za makrolide je uočeno da su vrlo opasni u vodama u okolišu. Iz navedenog se može zaključiti kako je toksičnost različita i za spojeve unutar iste grupe, a razna provedena istraživanja na različitim organizmima pokazala su da su *Daphnia magna* i *Vibrio fischeri* najosjetljiviji testni organizmi. Dalzell i sur. [239] istražili su brzinu testova toksičnosti te ih usporedili ovisno o: osjetljivosti, trošku ulaganja, trošku jednog testa, jednostavnosti upotrebe i značenju. I najosjetljivijim su se pokazali *Vibrio fischeri*, morske Gram negativne bakterije koje imaju svojstvo bioluminiscencije te emitiraju svjetlost kao sastavni dio svojeg metabolizma (**slika 22.**).



**Slika 22.** Prikaz bakterije *Vibrio fischeri* i njezinog svojstva luminiscencije (preuzeto iz [240, 241])

Uz pomoć nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfata NAD(P)H i enzima flavin-reduktaze, flavin-mononukleotid (FMN) reducira se u flavin-mononukleotid ( $\text{FMNH}_2$ ). Njegov reducirani oblik ima važnu ulogu, jer se oksidira uz pomoć kisika, aldehida i enzima luciferaze u FMN (jednadžba 31), pri čemu nastaje plavkasto-zelena svjetlost valne duljine  $490 \text{ nm}$  [242].



Farmaceutici, kao i druga zagađivala, mogu oštetiti bakterijski metabolizam jer dolazi do inhibicije enzimske aktivnosti. Posljedica toga je smanjenje emisije svjetlosti što je u korelaciji s nastalim oštećenjem. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je odrediti akutnu toksičnost, odnosno vrijednosti EC<sub>20</sub> i EC<sub>50</sub>. U tu svrhu upotrebljava se specifični soj *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Prema jednadžbi 32 može se izračunati nastalo smanjenje inhibicije uslijed djelovanja dodane toksične tvari (nakon 5, 15 i 30 min). Oznaka IT<sub>T</sub> predstavlja luminiscenciju za vrijeme izlaganja bakterije uzorku koji se ispituje, a IT<sub>0</sub> luminiscencije u vremenu  $t = 0$  min, prije dodanog uzorka. Oznaka KF predstavlja korekcijski faktor određen prema kontrolnom uzorku.

$$\text{INH \%} = 100 - \left( \frac{\text{IT}_T}{\text{IT}_0 \cdot \text{KF}} \right) \cdot 100 \quad (32)$$

Mjerenjem smanjenja inhibicije moguće je iskazati pri kojoj koncentraciji dolazi do 20 % (EC<sub>20</sub>) ili 50 % inhibicije (EC<sub>50</sub>) [233]. Rezultat se također iskazuje u jedinicama toksičnosti (engl. *toxic unit*, TU) prema jednadžbi 33, jer je TU izravno proporcionalan toksičnosti:

$$\text{TU} = 100 / \text{EC}_{50} \quad (33)$$

U slučaju kada se radi o smjesi nepoznatog sastava, rezultat se iskazuje u postotku na sljedeći način (jednadžba 34):

$$\text{TII} = 100 / \text{EC}_{50} \quad (34)$$

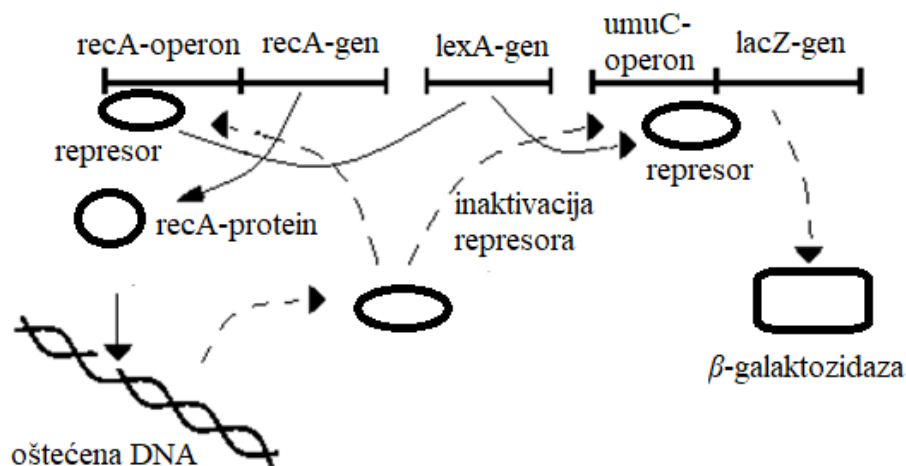
Sukladno Globalno usklađenom sustavu razvrstavanja i označavanja kemikalija od strane Ujedinjenih naroda (engl. *Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals from the United Nations*, GHS) tvari se mogu podijeliti u nekoliko kategorija. Tvari s vrijednostima  $\text{EC}_{50} \leq 1 \text{ mg L}^{-1}$  su izrazito toksične;  $1 \text{ mg L}^{-1} < \text{EC}_{50} \leq 10 \text{ mg L}^{-1}$  toksične, a  $10 \text{ mg L}^{-1} < \text{EC}_{50} \leq 100 \text{ mg L}^{-1}$  štetne [243]. Isto tako, veličina TU može se iskazati na identičan način.

Toksični učinak na *Vibrio fischeri*, osim farmaceutika, imaju i druga različita zagađivala. Razgradnjom farmaceutika nastaju produkti koji mogu biti toksičniji od početnih farmaceutika od kojih su nastali. Važno je ispitati i toksičnost nastale smjese (početna molekula s razgradnim produktima) na ekosustav. Dakle, može se zaključiti kako je test inhibicije luminiscencije s *Vibrio fischeri* osjetljiv, jednostavan za rukovanje, relativno brz i



reproducibilan. Međutim, rad s *Vibrio Fischeri* zahtijeva veća početna ulaganja. U suprotnom, bez prikladne instrumentacije, rad može biti dugotrajan [244].

Da prisutnost kemikalija u okolišu može oštetiti DNA ili uzrokovati mutacije nije novina, kao ni to da neki farmaceutici i razgradni produkti pokazuju genotoksična i citotoksična svojstva [245, 246]. Međutim, za mnoge spojeve prisutne u okolišu nije istraženo kakvo im je biološko djelovanje. Jedan od primarnih načina procjene genotoksičnosti za određenu tvar te posebno za smjese tvari (zagađivala) prisutnih u okolišu, je SOS/*umu-c* test. On je standardiziran i potvrđen prema njemačkoj DIN klasifikaciji i međunarodnom ISO standardu te se primjenjuje u procjeni genotoksičnosti otpadnih voda. Na **slici 23** shematski je prikazan SOS/*umu-c* test na molekularnoj razini.



**Slika 23.** Prikaz SOS/*umu-c* testa na molekularnoj genskoj razini (preuzeto iz [247])

Naime, SOS odgovor čini serija procesa sa ciljem popravka oštećenja molekula DNA koja su nastala djelovanjem mutagena, a u slučaju većih oštećenja nisu uspješno popravljena. Kod bakterija nalaze se pod kontrolom dva proteina modulatora: Lex-A koji ga blokira (supresor) i Rec-A koji ga omogućava (represor). U prisutnosti određene količine Lex-A proteina SOS geni su blokirani. Povećanjem broja jednolančanih DNA i trinukleotida te oligonukleotida, Rec-A (represor) protein se aktivira tako što konformacijskim promjenama nastaje proteaza i iskazuje proteolitičku aktivnost na Lex-A, na način da kida dimer. To dovodi do aktivacije

SOS gena i nesmetanog odvijanja procesa transkripcije i translacije, čime nastaje funkcionalni protein. Operon *umu-C* koji sintetizira DNA polimerazu povezan je s operonom lac-Z (laktozom-Z), tj. genom za  $\beta$ -galaktozidazu. *Umu-C* je izabran jer više od ostalih sudjeluje u procesima mutageneze, posebice u onima izazvanim kemijskim mutagenima.

Dakle, test se zasniva na sposobnosti genotoksina da induciraju ekspresiju *umu* operona, pri čemu je *umu-C* gen presudan za bakterijsku mutagenezu. Pri tome, genetski modificirani bakterijski soj *Salmonella typhimurium* TA1535 pSK1002 koristi sjedinjeni *umu-C-lacZ* gen ili soj *Salmonella typhimurium* NM2009. Određivanje genotoksičnog efekta provodi se mjerenjem aktivacije SOS odziva u bakteriji, koji je specifično uzrokovan oštećenjem DNA u stanici, tako da se spektrofotometrijski prati aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze. Identifikacija tvari koje mogu proizvesti genetska oštećenja (uzrokovana povećanom količinom jednolančane jezgre DNA i oligonukleotida: O- i N-alkilacije, adukata, depurinizacije, depirimidacije, deaminacije itd.) temelji se na indukciji *umu-C* operona, odnosno mjerenju  $\beta$ -galaktozidaze.

---

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

### 3.1. Materijali

#### 3.1.1. Farmaceutici

Svi eksperimenti provedeni su uporabom analitičkih standardā visoke čistoće, hidrosiklorokin-sulfata (HPLC čistoće, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; CAS-broja 747-36-4), metoklopramid-hidroklorida (*p.a.* čistoće, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; CAS-broja 7232-21-5) i desetil-hidrosiklorokin-dihidroklorida (LGC-standard, Luckenwalde, Njemačka; CAS-broja 4298-15-1).

#### 3.1.2. Kemikalije

Anorganske soli ( $\text{NaNO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot (\text{H}_2\text{O})_9$ ,  $\text{HCl}$ ,  $\text{NaOH}$ ,  $\text{NH}_3$ ) analitičke čistoće nabavljene su od Kemike (Zagreb, Republika Hrvatska). Destilirana deionizirana voda (otpornosti 18,2 M $\Omega$  cm) pripravljena je pomoću Millipore Simplicity UV sustava (Millipore Corporation, Billerica, USA). Acetonitril, metanol i mravlja kiselina su HPLC čistoće i pribavljeni od J. T. Bakera (Deventer, Nizozemska). Huminske kiseline, mesni ekstrakt i urea pribavljeni su od proizvođača Sigma-Aldrich (Švicarska). Limunska kiselina-monohidrat, natrijev fosfat i borna kiselina (*p.a.* čistoće) upotrijebljeni su za pripremu puferских otopina. Navedene kemikalije primijenjene su za provedbu hidrolitičke i fotolitičke razgradnje hidrosiklorokina i metoklopramida.

#### 3.1.3. Reagensi korišteni za određivanje inhibicije bioluminiscencije

Liofilizirana bakterija *Vibrio fischeri* (LCK484 LUMISmini) pribavljena je od Hach Lange (Varaždin, Republika Hrvatska). Za procjenu toksičnosti kemikalije su bile analitičke čistoće. Pripravljene otopine i Petrijeve zdjelice sterilizirane su u autoklavu. Bakterijski reagensi ( $\text{NaCl}$ , agar, glicerol,  $\text{CaCO}_3$ , pepton, kvašćev ekstrakt) kao i rekonstitucijski reagensi ( $\text{NaCl}$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MgSO}_4$ , glicerol, glukoza, rafinoza) pribavljeni su od Kemike (Zagreb, Republika Hrvatska). Rekonstitucijskoj otopini ugođena je vrijednost pH na 7,1 dodatkom klorovodične kiseline. Za ispitivanje prikladnosti luminiscencije bakterijske suspenzije

upotrijebljene su sljedeće referentne tvari:  $\text{ZnSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$  ( $\gamma = 109,9 \text{ mg L}^{-1}$ ) pribavljene od Lach-Nera (Češka) te  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  ( $\gamma = 22,6 \text{ mg L}^{-1}$ ) od Kemike (Zagreb, Republika Hrvatska).

### 3.1.4. Reagensi korišteni za određivanja genotoksičnosti i citotoksičnosti

Ampicilin, D-(+)-glukoza (anhidrid), dinatrijeva sol glukoze-6-fosfata, 4-(2-hidroksietil)piperazin-1-etanosulfonska kiselina (HEPES),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  i natrijev dodecil-sulfat nabavljeni su od Sigma-Aldricha (Švicarska); nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat (NADP), NaCl,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  i  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$  pribavljeni su od Mercka (Darmstadt, Njemačka). Nadalje, *o*-nitrofenil- $\beta$ -D-galaktopiranozid (ONPG), KCl,  $\beta$ -merkaptotanol i  $\text{MgSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$  nabavljeni su od Flukae (Buchs, Švicarska) te liofilizirani Aroclor 1254 (inducirana jetra muškog štakora post-mitohondrijskom frakcijom S9 pribavljena od Moltoxa (Sjedinjene Američke Države).

### 3.1.5. Uzorci površinskih voda

Provedeno je uzorkovanje triju različitih uzoraka realnih voda: morske, riječne i izvorske (podzemne). Morska voda uzorkovana je na Brijunima (srpanj 2018.), riječna na rijeci Savi u Zagrebu (rujan 2018.), a izvorska na izvoru Vrelo u Fužinama (listopad 2016.). Uzorci su prikupljeni u tamne staklene boce. Uzorci (0,5 L) su unutar 24 h spremljeni, u plastičnim bocama u zamrzivač, do upotrebe. Uzorci voda su karakterizirani (**tablica 5.**) različitim analitičkim metodama (**poglavlje 3.3.5.**).

## 3.2. Instrumenti

Za eksperimentalne potrebe ovoga rada upotrijebljeni su sljedeći instrumenti:

- analitička vaga XS204 DeltaRange (Mettler Toledo 15, Greifensee, Švicarska)
- uređaj za pročišćavanje vode (Millipore Simplicity UV sustav, Millipore Corporation, Billerica, USA)
- Pall Life Science uređaj za filtraciju (Washington, SAD)
- pH-metar s kombiniranom staklenom i referentnom elektrodom (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska)
- uređaj za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem

- f) tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-PDA)
- g) tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa (HPLC-MS/MS)
- h) tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti povezan sa spektrometrom masa visoke razlučivosti (2D-UHPLC-QTOF) (Santa Clara, Kalifornija, SAD)
- i) Perkin Elmer LAMBDA 35 spektrofotometar u ultraljubičastom i vidljivom području (Massachusetts, USA); snimljeno uz širinu pukotine od 1 nm
- j) uređaj za nuklearnu magnetsku rezonanciju (NMR, Bruker)
- k) luminometar (Hach-Lange, Njemačka)
- l) infracrveni spektrometar Perkin-Elmer Spectrum One FT-IR (Massachusetts, USA)
- m) Büchi rotirajući isparivač (New Castle, Delaware, SAD)

### 3.2.1. Uređaj za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem

Fotolitička razgradnja hidrosiklorokina i metoklopramida provedena je u uređaju za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem SunTest CPS+, Atlas (Linsengericht, Njemačka) (**slika 24.**). Detaljniji prikaz upotrijebljenog sustava zračenja nalazi se na **slici 28.**, a uvjeti rada u **poglavlju 3.3.**



**Slika 24.** Uređaj za osvjetljavanje umjetnim Sunčevim zračenjem SunTest CPS+, Atlas (300 – 800 nm)

### 3.2.2. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s PDA detektorom

Analiza uzoraka hidrolitičke i fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina provedena je na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (Waters 2795 Alliance HPLC sustav s 2996 PDA detektorom, Waters, Milford, Massachusetts) (**slika 25.**) pri čemu je snimanje i obrada rezultata provedena pomoću Mass Lynx programskog paketa. Uređaj se sastoji od detektora s nizom dioda, vakuumnog degazera, kvarterne pumpe, jedinice za smještaj i termostatisane kromatografske kolone.



**Slika 25.** Waters 2795 Alliance HPLC sustav s 2996 PDA detektorom

### 3.2.3. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa

Za analizu uzoraka hidrolitičke i fotolitičke razgradnje metoklopramida upotrijebljen je sustav tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezan sa spektrometrom masa (Agilent serije 1200 s Agilentovim 6410 trostrukim kvadripolnim analizatorom masa; Foster City Kalifornija, SAD) (**slika 26.**). Tekućinski kromatograf sastoji se od vakuumnog degazera, automatskog uzorkivača i binarne pumpe. Spregnuti MS/MS sustav ima mogućnost ionizacije elektrasprišenjem ili kemijskom ionizacijom pri atmosferskom tlaku. Mjerenja i obrada dobivenih rezultata napravljeni su pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data acquisition Triple Quad B.01.04 (B84).



**Slika 26.** Mass Hunter Agilent Series 1200 HPLC sistem spojen s trostrukim kvadripolnim spektrometrom masa Agilent 6410 s elektroraspršenjem kao izvorom ionizacije

### 3.2.4. Uređaj za nuklearnu magnetsku rezonanciju

Uzorci su, nakon provedene fotolitičke razgradnje, upareni tako da je uklonjeno otapalo te su potom otopljeni u deuteriranom otapalu DMSO- $d_6$ . Otopine hidroksiklorokina i metoklopramida prije i nakon provedene fotolitičke razgradnje snimljene su na Institutu Ruđera Boškovića, upotrebom spektrometra Bruker Avance 300 MHz (magnet 7 T) pri 300 MHz za  $^1\text{H}$  i 75 MHz za  $^{13}\text{C}$  jezgru.

### 3.2.5. Luminometar

Mjerenje bioluminiscencije *Vibrio fischeri* (NRRL B-11177) provedeno je luminometrom LUMIStox 300 Hach Lange (Düsseldorf, Njemačka) (slika 27.), na radnoj temperaturi instrumenta ( $15\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ ), čemu je prethodilo čuvanje kiveta u termostatiranom bloku dvadeset minuta prije početka izvođenja testa (isto na  $15\text{ °C}$ ). Uređaj ima mogućnost prepoznavanja boje uzorka u testu s luminiscirajućim bakterijama, što je i upotrijebljeno za obojene uzorke. Uređaj nudi mogućnost rada s linearnim ili geometrijskim nizom.



**Slika 27.** Luminometar i termostatirani blok, HACH LANGE, LUMISTox 300

### 3.3. Metode rada

#### 3.3.1. Priprava temeljnih standardnih otopina hidroksiklorokina i metoklopramida

Odvagom mase pojedinog standarda na analitičkoj vagi pripravljene su temeljne standardne vodene otopine (TSO) koje su čuvane u mraku na 4 °C. Iz TSO prije provođenja svakog eksperimenta, priređene su radne standardne otopine farmaceutika hidroksiklorokina,  $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  i metoklopramida,  $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ . Nakon pripreme TSO određenog farmaceutika, pripravljene su radne otopine s kojima je ispitivana hidrolitička i fotolitička razgradnja.

#### 3.3.2. Priprava otopina pufera za hidrolitičku razgradnju

Za procjenu hidrolitičke stabilnosti hidroksiklorokina i metoklopramida pripremljeni su puferi (radne otopine) vrijednosti pH 4, 7 i 9. Pufer pH = 4 pripremljen je miješanjem 38,6 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $c_0 = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$  te 61,5 mL limunske kiseline,  $c_0 = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Otopina pufera pH = 7 pripremljena je miješanjem 29,6 mL NaOH,  $c_0 = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  i 50 mL  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ,  $c_0 = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  te 20,7 mL destilirane deionizirane vode. Otopina pufera pH = 9 pripremljena je miješanjem 21,3 mL NaOH,  $c_0 = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  i 50 mL  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $c_0 = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  u KCl,  $c_0 = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$  te 28,7 mL destilirane deionizirane vode. Nakon pripreme otopina provjerena je, i po potrebi ugođena, vrijednost pH pufera na željenu vrijednost.



---

Pripravljene vodene otopine hidroksiklorokina i metoklopramida za ispitivanje hidrolitičke razgradnje u navedenim puferima propuhivane su argonom visoke čistoće zbog uklanjanja prisutnog zraka. Potom je jedan dio uzoraka zamrznut da ne bi došlo do hidrolize, a drugi dio stavljen u inkubator na 50 °C u mraku tijekom 120 h.

### 3.3.3. Priprava otopina pufera za fotolitičku razgradnju

Za ispitivanje utjecaja pH na fotolitičku razgradnju, puferske otopine pripravljene su na sljedeće načine: za pripravu 200 mL otopine vrijednosti pH 4,00 otopljeno je 420,0 mg monohidrata limunske kiseline u približno 190 mL vode, nakon čega su ugođeni pH i volumen otopine; natrijev dihidrogenfosfat (240,00 mg) upotrijebljen je za pripravu 200 mL puferske otopine za vrijednosti pH raspona 7 – 8; za pripravu pH = 9 otopljeno je 152,5 mg borne kiseline u odmjerne tikvici od 250 mL. Koncentracije svih puferskih otopina kod fotolitičke razgradnje iznosile su 10 mol L<sup>-1</sup> te je za ugađanje navedenih vrijednosti vrijednosti pH upotrijebljena sumporna kiselina ili natrijeva lužina. Puferske otopine su najčešće odmah korištene, a u suprotnom, čuvane su u mraku na 4 °C preko noći.

### 3.3.4. Priprava otopina za ispitivanje utjecaja sastava vode na fotolitičku razgradnju

Temeljna standardna vodena otopina huminskih kiselina (HA) koncentracije 30 mg L<sup>-1</sup> pripravljena je uz korištenje 3 % (v/v) koncentracije 1 mol L<sup>-1</sup> NH<sub>3</sub>, zbog slabije topljivosti huminskih kiselina u vodi kod vrijednosti pH relevantnih za okoliš. Vrijednost pH navedene otopine ugođena je na 6,00. Iz temeljne otopine HA razrijeđivanjem su pripravljene otopine različitih koncentracija, u rasponu od 1 mg L<sup>-1</sup> do 17,5 mg L<sup>-1</sup>. Otopine nitrata, klorida, bromida, sulfata, hidrogenkarbonata i željezovih(III) iona pripravljene su odvagom određene mase njihovih soli, koje su potom otopljene u destiliranoj deioniziranoj vodi uz dodani farmaceutik iz TSO-e. Za ispitivanje utjecaja sastava vode na fotolitičku razgradnju farmaceutika pripremljene su sintetske otpadne vode različitog sastava. Sintetska otpadna voda farmaceutske industrije pripravljena je otapanjem 25 mg limunske kiseline, 15 mg askorbinske kiseline, 115 mg Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 mg saharoze u 500 mL vodovodne vode, a otopljeni organski ugljik (DOC, engl. *dissolved organic carbon*) iznosio je 0,547 mg mL<sup>-1</sup> [248]. Sintetska kanalizacijska voda pripravljena je na sličan način (prema OECD-u) [249],

ali sastava sličnijeg izlaznoj (tretiranoj) otpadnoj vodi s manjim udjelom ukupnog organskog ugljika. Pripravljena je otapanjem 1,2 g uree, 4,4 g mesnog ekstrakta, 6,4 g peptona, 0,08 g  $\text{MgSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$ , 0,16 g  $\text{CaCl}_2 \cdot (\text{H}_2\text{O})_2$ , 1,12 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0,28 g NaCl u 500 mL vodovodne vode, pri čemu je koncentracija otopljenog organskog ugljika iznosila  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ .

### 3.3.5. Karakterizacija prirodnih voda i huminskih kiselina

Navedeni anioni i kationi (**tablica 5.**) određeni su ionskom kromatografijom, a željezo je određeno metodom spektrometrije masa s induktivno spregnutom plazmom, ICP-MS. Hidrogenkarbonati su određeni potenciometrijskom titracijom. Rezultati su iskazani u  $\text{mg L}^{-1}$ . Pomoću parametra ukupnog organskog ugljika (engl. *total organic carbon*, TOC) određen je NPOC (engl. *non-purgeable organic carbon*,  $\text{mg L}^{-1}$ ), a konduktometrijskom metodom određena je električna provodnost, izražena u  $\text{mS cm}^{-1}$ .

**Tablica 5.** Kemijska karakterizacija morske, riječne i izvorske vode

Vrsta, $\gamma$ ( $\text{mg L}^{-1}$ )	Morska voda	Riječna voda	Izvorska voda
$\text{HCO}_3^-$	159	227	10,7
$\text{Cl}^-$	22000	7,6	1,7
$\text{SO}_4^{2-}$	3900	12	1,8
$\text{Br}^-$	66	–	–
$\text{NO}_2^-$	0,40	0,22	<0,020
$\text{NO}_3^-$	0,26	5,5	7,4
$\text{Na}^+$	11000	5,5	2,0
$\text{Fe}_{(\text{tot})}$	123	12,5	2,26
$\text{Mg}^{2+}$	1500	13	0,49
$\text{Ca}^{2+}$	438	61	2,0
NPOC	1,111	1,268	0,2622
pH	7,49	7,54	6,87
$\sigma$ ( $\text{mS cm}^{-1}$ )	55,6	0,418	0,0359

Huminske kiseline su okarakterizirane, jer njihov sastav može utjecati na ponašanje i sudbinu farmaceutika. Vrijednosti apsorbancije pri specifičnim valnim duljinama koriste se za općenitu karakterizaciju prirodnih organskih tvari. Metoda određivanja vrijednosti SUVA brza je i jednostavna u odnosu na druge tehnike karakterizacije, stoga je često primjenjivana. Temelji se na sljedećoj jednadžbi (35):

$$\text{SUVA (L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}) = \frac{\text{UV}_{254} (\text{cm}^{-1})}{\text{DOC (L mg}^{-1}) \cdot 100 (\text{cm m}^{-1})} \quad (35)$$

Ovisno o izmjerenim, tj. izračunatim vrijednostima SUVA, tumače se udjeli pojedinih vrsta. Vrijednosti  $\text{SUVA}_{254} > 6$  ukazuju na veliki udio hidrofobnih huminskih kiselina sa značajnim aromatskim karakterom. Zbog različitih podjedinica huminskih kiselina (fenoli, benzojeve kiseline, anilinski derivati, polieni, policiklički aromatski ugljikovodici) dolazi do prelaska elektrona od  $\pi\text{-}\pi^*$  što omogućuje određivanje vrijednosti SUVA pri 280 nm. Različiti omjeri specifičnih valnih duljina apsorpcije ( $E_2/E_3$  kao  $A_{250}/A_{365}$  i  $E_4/E_6$  kao  $A_{465}/A_{665}$ ) korišteni su za spektralnu karakterizaciju huminskih tvari (**tablica 6.**).

**Tablica 6.** Karakterizacija komercijalnih huminskih kiselina (Sigma-Aldrich)

$E_2/E_3$	$E_4/E_6$	$\text{SUVA}_{254}$	$\text{SUVA}_{280}$	$\text{SUVA}_{365}$	Aromatičnost (%)
2,5	3,7	6,4	5,6	2,6	45,6

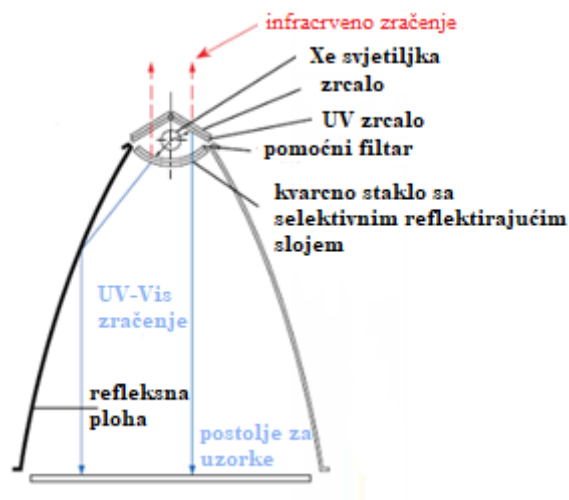
Niži omjeri  $E_4/E_6$  i  $E_2/E_3$  ukazuju na veće molekularne mase huminskih kiselina. Manje vrijednosti  $E_2/E_3$ , kao i vrijednosti  $\text{SUVA}_{254}$ , ukazuju i na veću aromatičnost koja je određena prema sljedećoj jednadžbi 36 [250].

$$\% \text{ aromatičnosti} = 6,52 \cdot \text{SUVA}_{254} + 3,63 \quad (36)$$

Metoda infracrvene spektroskopije (FTIR) provedena je na Perkin-Elmer Spectrum One FTIR spektrometru u rasponu od 4000 do 500  $\text{cm}^{-1}$ , a uzorak za karakterizaciju izmjeren je na pločici NaCl. Rezultati su prikazani u **tablici 1.P** u prilogu.

### 3.3.6. Osvjetljavanje otopina farmaceutika umjetnim Sunčevim zračenjem

a) Eksperimenti fotolitičke razgradnje odabranih farmaceutika provedeni su u uređaju SUNTEST CPS+ prema uputama u priručniku OECD 316 [148]. Uređaj sadrži ksenonsku svjetiljku koja emitira zračenje slično prirodnom Sunčevom svjetlu u rasponu 300 – 800 nm s pulsiranim kolimiranim izvorom svjetlosti. Debljina optičkog izvora pokraj ksenonske svjetiljke iznosi 3 mm. Za umanj enje infracrvenog zračenja u uređaju je korišten obloženi kvarcni filtar (slika 28.).



**Slika 28.** Shema fotoreaktora SUNTEST CPS+ (uz dopuštenje Atlasa)

Intenzitet zračenja tijekom svih eksperimenata s hidrosiklorokinom održavan je na  $500 \text{ W m}^{-2}$ , a za metoklopramid na  $250 \text{ W m}^{-2}$ , pri temperaturi od  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , u oba slučaja. Prije početka svakog eksperimenata ksenonska svjetiljka upaljena je 20 min ranije, zbog stabiliziranja njenog zračenja. Vodene otopine hidrosiklorokina množinske koncentracije  $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  korištene su u svim eksperimentima, osim kod ispitivanja utjecaja

---

početne koncentracije na fotolitičku razgradnju. Otopine su osvjetljavane u kvarcnim posudama, volumena 50 mL, pri čemu je visina otopine iznosila 3 cm. Udaljenost između svjetiljke i površine otopine uzorka u kvarcnoj posudici bila je 14 cm. Alikvoti od 300  $\mu\text{L}$  uzimani su u određenim vremenskim intervalima te nakon toga analizirani metodama HPLC-PDA ili HPLC-MS/MS. Svi eksperimenti fotolitičke razgradnje provedeni su u triplikatima. Kako bi se utvrdilo da je smanjenje početne koncentracije farmaceutika posljedica isključivo fotolitičke razgradnje, a ne hidrolitičke i termičke razgradnje ili adsorpcije farmaceutika na stijenke kvarcne posudice, primijenjeni su kontrolni uzorci koji su osvjetljavani na isti način kao i uzorci. Kvarcne posudice umotane su u aluminijsku foliju kako bi se zaštitili od izlaganja zračenju, nakon čega su, po završetku osvjetljavanja uzoraka, i analizirani pripadajućom metodom.

**b)** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina ( $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) pod prirodnim Sunčevim zračenjem provedena je 29. lipnja 2019., u vrijeme sunčanog dana (Trešnjevka, Zagreb), ali i vrlo kratke naoblake u nekim trenucima provođenja eksperimenata. Eksperiment je počeo s hidroksiklorokinom u izvorskoj vodi u 10:00 h, a potom i s hidroksiklorokinom u riječnoj i morskoj vodi, s početkom u 12:00 h. Temperatura dana iznosila je prosječno 30 °C. Kontrolni uzorak hidroksiklorokina u izvorskoj vodi ukazuje da se nije termički raspao. Razgradnja je ispitana samo za hidroksiklorokin, jer je pokazao veću postojanost u okolišu od metoklopramida.

**c)** Nakon provedenih razgradnji i analize, obradom podataka izračunati su koeficijenti brzine razgradnje hidroksiklorokina ( $k$ ), odnosno vremena poluraspada ( $t_{1/2}$ ) prema sljedećim izrazima, karakterističnim za reakcije prvog reda:

$$\ln\left(\frac{c_t}{c_0}\right) = -k \cdot t \quad (37)$$

gdje je  $c_0$  početna koncentracija spoja pri  $t = 0$  min, a  $c_t$  koncentracija u vremenu izlaganja Sunčevu zračenju. Koeficijenti brzine reakcije razgradnje određeni su iz nagiba pravca koji prikazuje ovisnost  $\ln(c_t/c_0)$  o  $t$ .

Iz prethodne jednadžbe (37) može se izraziti vrijeme poluraspada:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k} \quad (38)$$

### 3.3.7. Kromatografska analiza

#### 3.3.7.1. Optimalni uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s detektorom s nizom dioda

Kako bi se pratila hidrolitička i fotolitička razgradnja farmaceutika, razvijena je analitička metoda na instrumentu HPLC-PDA (Waters 2795 Alliance HPLC sustav s 2996 PDA detektorom). Na koloni Kinetex C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 μm, 100 Å, Phenomenex) ispitan je utjecaj sastava pokretne faze različitih otapala (acetonitrila, metanola, destilirane deionizirane vode), udjela navedenih otapala te vrijednosti pH na kromatografsko razlučivanje. Nakon toga odabrani su optimalni uvjeti: 0,1 % mravlja kiselina u destiliranoj deioniziranoj vodi kao eluens A i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu kao eluens B s brzinom protoka 0,5 mL min<sup>-1</sup> i temperaturom kolone 40 °C. Gradijentno eluiranje započelo je s 94 % vode, što je održavano prvih 8 min, a potom je udio eluensa A linearno smanjivan do 50 %, tijekom sljedećih 15 min. Zadnjih 5 min udio eluensa A linearno je rastao do 94 %. Uravnoteženje (engl. *equilibration time*) je trajalo 5 min. Volumen injektiranja iznosio je 20 μL. Hidroksiklorokin i njegovi razgradni produkti detektirani su pri 343,4 nm.

Granice detekcije (LOD) i kvantifikacije (LOQ) procijenjene su standardnim odstupanjem ( $s$ ) kao  $\text{LOD} = 3,3 \cdot s'_0$  i  $\text{LOQ} = 10 \cdot s'_0$ , pri čemu je  $s'_0$  izračunat kao  $s'_0 = s_0/\sqrt{n}$ . Oznaka  $s_0$  predstavlja procjenu standardnog odstupanja 10 ponovljenih mjerenja hidroksiklorokina za otopinu niske koncentracije,  $c(\text{HCQ}) = 9,0 \cdot 10^{-7}$  mol L<sup>-1</sup>.

### 3.3.7.2. Optimalni uvjeti tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane s trostrukim kvadripolnim spektrometrom masa

Za razdvajanje i identifikaciju razgradnih produkata metoklopramida korišten je sustav HPLC Agilent 1200 (Santa Clara, CA, USA), spojen s trostrukim kvadripolnim spektrometrom masa Agilent 6410, s elektroraspršenjem kao izvorom ionizacije. Korištena je C18 kolona Kinetex (100 mm × 2,1 mm, 5 μm, 100 Å, Phenomenex). Za analizu je korištena 0,1 % mravlja kiselina u destiliranoj deioniziranoj vodi (eluens A) i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu (eluens B). Brzina protoka iznosila je 0,2 mL min<sup>-1</sup>. Zbog kraćeg trajanja analize, korišteno je izokratno eluiranje tijekom 6 min, uz sastav pokretne faze: 85 % A i 15 % B. Za identifikaciju razgradnih produkata korišteno je gradijentno eluiranje, sa ciljem učinkovitijeg razdvajanja razgradnih produkata. Početni uvjeti podrazumijevali su 90 % vode tijekom 5 min, nakon čega je gradijent linearno (do 10. min) opadao do 80 % te je tako održavan sljedećih 10 min. Vrijeme uravnotežanja iznosilo je 5 min, a ostali kromatografski uvjeti bili su identični za obje metode. Volumen injektiranja iznosio je 5 μL. Dobiveni spektri masa snimljeni su u području  $m/z = 30 - 1000$ . Dušik je korišten kao pomoćni plin (engl. *auxiliary gas*) i zaštitni plin (engl. *sheath gas*). Napon kapilare iznosio je 4000 V, temperatura desolvacijskog plina 350 °C, napon kolizijske ćelije 135 V. Tlak raspršivača iznosio je 35 psi; protok plina za sušenje (engl. *drying gas*) 11 L min<sup>-1</sup>. Energije sraza iznosile su 5 – 30 eV u pozitivnom ionizacijskom načinu rada.

Nadalje, LOD i LOQ procijenjene su standardnim odstupanjem kao:  $LOD = 3,3 \cdot s'_0$  i  $LOQ = 10 \cdot s'_0$ , pri čemu je  $s'_0$  izračunat kao  $s'_0 = s_0/\sqrt{n}$ . Za određivanje  $s_0$  primjenjena je  $c(\text{MCP}) = 3,0 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ .

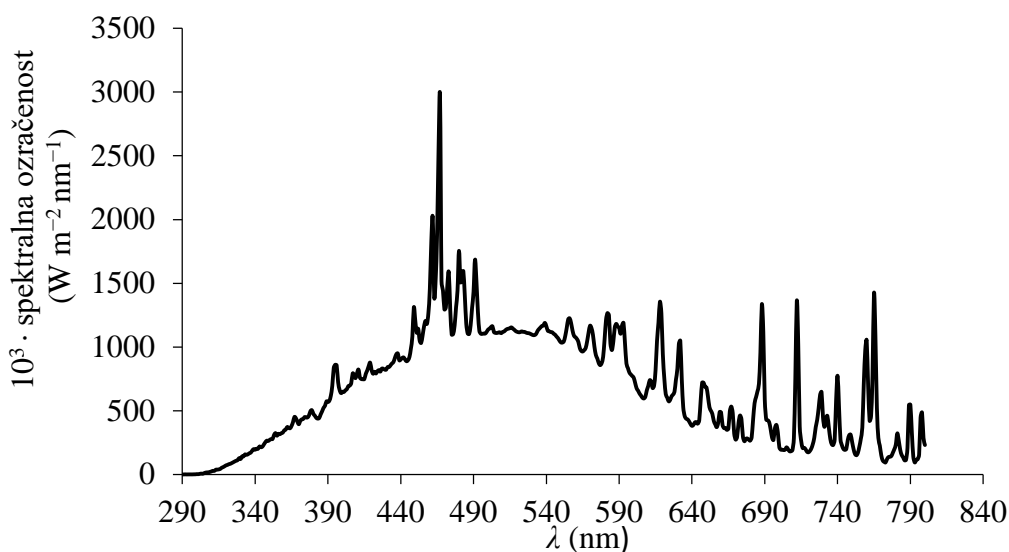
### 3.3.8. Snimanje uzoraka nuklearnom magnetskom rezonancijom

Standard razgradnog produkta desetil-hidroksiklorokina i fotolitičke reakcijske smjese, dobivene pri pH = 7 nakon razgradnje hidroksiklorokina, otopljeni su u cjevčici NMR debljine 5 mm, u deuteriranom otapalu DMSO-*d*<sub>6</sub>. Korišten je NMR spektrometar (Bruker Avance 300 na rezonancijskoj frekvenciji od 300 MHz za <sup>1</sup>H jezgru). Hidroksiklorokin nije

bio topljiv u DMSO- $d_6$ , što je uzeto u obzir pri asignaciji. Vrijednosti  $^1\text{H}$  NMR kemijskog pomaka ( $\delta$ ) izraženi su u odnosu na referentnu tvar DMSO (2,54 ppm). Asignacija je provedena temeljem kemijskih pomaka, intenziteta signala, veličine i multipliciteta konstanti sprezanja H–H.

### 3.3.9. Određivanje kvantnog prinosa

Početno spektralno zračenje  $E_{o,\lambda}$  u fotolitičkim eksperimentima mjereno je u području 250 – 800 nm, upotrebom dvaju spektrometra, prethodno umjerenih za raspon valnih duljina od 250 do 450 nm (International light, ILT950-UV) i za raspon valnih duljina od 450 do 800 nm (International light, ILT900-R) (slika 29.). Oba spektrometra su prilikom mjerenja namještena na istu poziciju na kojoj se, inače, nalazio uzorak tijekom mjerenja.



**Slika 29.** Spektralno zračenje Xe svjetiljke unutar CPS+ komore pri  $250 \text{ W m}^{-2}$  u području od 290 do 800 nm



Kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina i metoklopramida izračunat je prema jednadžbi 39 za polikromatsko zračenje [251].

$$\phi_{app} = \frac{k_a}{2,303 \left(\frac{A}{V}\right) l \sum_{290}^{400} (E_{p,o,n}^0(\lambda) \varepsilon(\lambda))} \quad (39)$$

Pri čemu  $\phi_{app}$  predstavlja prividni kvantni prinos hidroksiklorokina ili metoklopramida (bez mjerne jedinice),  $k_a$  je oznaka za koeficijente fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina ili metoklopramida ( $s^{-1}$ ), dok  $\sum_{290}^{400} (E_{p,o,n}^0(\lambda) \varepsilon(\lambda))$  predstavlja sumu apsorbiranih fotona za područje valnih duljina 290 – 400 nm. Nadalje,  $E_{p,o,n}^0(\lambda)$  je oznaka za brzinu fluencije fotona (engl. *photon fluence rate*) za svaku valnu duljinu od od 290 do 400 nm ( $Einstein\ m^{-2}\ s^{-1}$ ),  $\varepsilon_\lambda$  su molarni apsorpcijski koeficijenti hidroksiklorokina ili metoklopramida ( $dm^3\ cm^{-1}\ mol^{-1}$ ) koji su određeni prema Lambert-Berrovu zakonu iz apsorpcijskog spektra farmaceutika,  $l$  je put zračenja od izvora zračenja do otopine (14 cm),  $A$  površina reakcijske (kvarcne) posudice ( $1,662 \cdot 10^{-3}\ m^2$ ), a  $V$  je volumen otopine ( $0,040\ dm^3$ ). Spektroradiometrom izmjerena spektralna brzina fluencije ( $E_{o,\lambda}$ ), prema jednadžbi 8, pretvorena je u spektralnu brzinu fluencije fotona, ( $E_{p,o,\lambda}$ ).

### 3.3.10. Procjena akutne toksičnosti

Procjena akutne toksičnosti pomoću kulture bakterija *Vibrio fischeri* provedena je na standardnim otopinama hidroksiklorokina i metoklopramida, na smjesi hidroksiklorokina s njegovim razgradnim produktima i smjesi metoklopramida s njegovim razgradnim produktima te na kraju samim razgradnim produktima, bez prisutnog hidroksiklorokina ili metoklopramida. Početna koncentracija, prije razgradnje, iznosila je  $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$  za hidroksiklorokin i  $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5}\ mol\ L^{-1}$  za metoklopramid. Ukupno vrijeme provedbe fotolitičke razgradnje metoklopramida iznosilo je 180 min pri snazi zračenja od  $250\ W\ m^{-2}$ , dok je za hidroksiklorokin iznosilo 46 h pri snazi zračenja od  $500\ W\ m^{-2}$ .

Mjerena je inhibicija luminiscencije prije i nakon 30 minutnog izlaganja uzorka s *Vibrio fischeri* na luminometru na  $15\ ^\circ C$ . Procjena akutne toksičnosti provedena je metodom

---

modificiranom prema normi HRN EN ISO 11348-1:2010 *Kvaliteta vode – određivanje inhibitornog učinka vodenih uzoraka na emisiju svjetla bakterije Vibrio fischeri* (Test sa svjetlećim bakterijama) – 1. Dio: *Metoda u kojoj se upotrebljavaju svježe pripremljene bakterije* (ISO 11348-1:2007; EN ISO 11348-1:2008). Norma je modificirana, jer su korišteni drugi reagensi za pripravu sterilne podloge i otopine za resuspenziju, što je navedeno u kemikalijama. Također, prema navedenoj normi, primijenjen je linearni niz za pripravu otopina i mjerenja te izračuna.

Od soja liofilizirane bakterije *Vibrio fischeri* pripravljena je kultura iste svježe bakterije, koja je zatim korištena za daljnje mjerenje. Bakterijske suspenzije pripravljene su svježe prije svakog mjerenja, a radne otopine farmaceutika pripravljene su sa steriliziranom destiliranom deioniziranom vodom. Svi uzorci pripravljene su na isti način kao i za eksperimente fotolitičke razgradnje pojedinog farmaceutika. Osmolaritet svakog uzorka ugođen je dodatkom natrijeva klorida, kako bi se izbjegla hipoosmoza ili hiperosmoza. Konačni osmolaritet testnih uzoraka iznosio je  $20 \text{ g L}^{-1}$ . Vrijednost pH ugođena je na 7,0 kako bi se spriječio utjecaj lažne inhibicije bioluminiscencije uzrokovan vrijednošću pH otopine, a ne uzorkom. Prije svakog mjerenja luminiscencije bakterija je reaktivirana s 2 % NaCl, nakon čega je suspenzija *Vibrio fischeri* spremljena na  $15 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  na 20 min. Linearnim nizom, prema ISO standardu, pripravljene su otopine s 2 % NaCl. Eksperimenti su provedeni u kivetu, miješanjem 1,5 mL početnog uzorka i 0,5 mL bakterijske suspenzije *Vibrio fischeri*. Trajanje testa iznosilo je 30 min, pri čemu je kod obrade podataka korišten korekcijski faktor u slučaju manjih odstupanja (unutar raspona 0,9 – 1,1). Eventualno u slučaju većih odstupanja, ponovno je pripravljena bakterijska suspenzija. Tijekom mjerenja korištena je korekcija na obojene uzorke, kada je to bilo potrebno.

### 3.3.11. Procjena genotoksičnosti i citotoksičnosti

Određivanje citotoksičnosti i genotoksičnosti provedeno je na farmaceuticima: hidrosiklorokinu i metoklopramidu te njihovoj smjesi s nastalim razgradnim produktima tijekom fotolitičke razgradnje i na samim razgradnim produktima. Najveća ispitivana koncentracija otopina oba farmaceutika je  $100 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$  za standardne otopine. Za procjenu

toksičnosti razgradnih produkata otopine su pripravljene u sterilnoj destiliranoj deioniziranoj vodi na identičan način kao što je provedena fotolitička razgradnja farmaceutika. Mjerenja su provedena prema testu SOS/*umu-c* [252] s metaboličkom aktivacijom (+S9) i bez metaboličke aktivacije (–S9) na soju bakterija *Salmonella typhimurium* prema modificiranom postupku [253] norme ISO 13829: 2000 *Water quality – Determination of genotoxicity of water and waste water using umu-test*. Genotoksični potencijal smjese fotorazgradnih produkata procijenjen je korištenjem testa SOS/*umu-c* sa sojem bakterija *Salmonella typhimurium* TA1535 koja sadrži umnoženi plazmid pSK1002 spojen s *umuC-lacZ* genima te otpornim genom na ampicilin. Testovi su provedeni na mikrotitarskim pločicama u triplicatima. Stopa bakterijskog rasta ( $G$ ) (engl. *bacterial growth rate*) određena je mjerenjem apsorbancije ( $A$ ) na 600 nm (jednadžba 40), a aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze ( $U$ ) na 420 nm (jednadžba 41). Stopa bakterijskog rasta izračunata je prema sljedećoj jednadžbi:

$$G = \frac{(\text{uzorak } A_{600} - \text{slijepa proba } A_{600})}{(\text{kontrolni uzorak } A_{600} - \text{slijepa proba } A_{600})} \quad (40)$$

Vrijednosti omjera rasta  $< 0,5$ , što predstavlja  $> 50$  % inhibicije rasta biomase, indikacija je citotoksičnosti uzorka. Aktivnost  $\beta$ -galaktozidaze izražena je u relativnim jedinicama te je izračunata korištenjem sljedeće jednadžbe:

$$U = \frac{(\text{uzorak } A_{420} - \text{slijepa proba } A_{420})}{(\text{uzorak } A_{600} - \text{slijepa proba } A_{600})} \quad (41)$$

Indukcijski omjer ( $IR$ ) izračunat je prema jednadžbi 42:

$$IR = \frac{1}{G} \frac{(\text{uzorak } A_{420} - \text{slijepa proba } A_{420})}{(\text{kontrolni uzorak } A_{420} - \text{slijepa proba } A_{420})} \quad (42)$$

Uzorak s indukcijskim omjerom od 1,5 smatran je genotoksičnim, pri čemu je destilirana deionizirana voda smatrana negativnom kontrolom. 4-nitrokinolin-*N*-oksid (NQNO: 0,25 mg mL<sup>-1</sup> i 5 mg mL<sup>-1</sup>) korišten je kao pozitivna kontrola u slučaju metaboličke aktivacije, a aflatoxin B1 (AFB1; 5 mg mL<sup>-1</sup>) u slučaju bez metaboličke aktivacije.

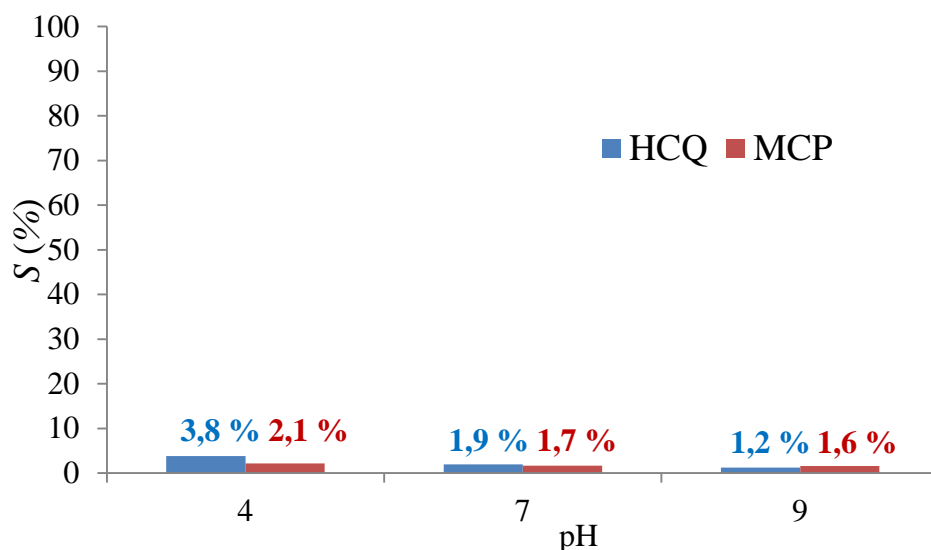
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

U cilju praćenja fotolitičke i hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina (HCQ) razvijena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda. U slučaju metoklopramida (MCP) korištena je metoda tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti, vezana s trostrukim kvadripolnim spektrometrom masa koja je omogućila praćenje izrazito brze fotolitičke razgradnje metoklopramida. Razvijene kromatografske metode validirane su ispitivanjem svih izvedbenih značajki. Određena je linearnost, selektivnost/specifičnost, osjetljivost, točnost, granica detekcije, granica kvantifikacije (LOQ), radno područje, preciznost i robustnost u destiliranoj deioniziranoj vodi. Za hidroksiklorokin LOQ iznosila je  $2,55 \cdot 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$  ( $85,4 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ) što je omogućilo kvantifikaciju od 0,9 % početne koncentracije, odnosno praćenje 99,1 % razgradnje. Za metoklopramid LOQ u destiliranoj deioniziranoj vodi iznosila je  $5,22 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$  ( $15,6 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ ), što je omogućilo kvantifikaciju od 0,156 % početne koncentracije, odnosno praćenje 99,84 % razgradnje. Prema podacima u **tablici 2.P** i **tablici 3.P** može se zaključiti da su obje metode prikladne za navedenu namjenu.

Promjena koncentracije obaju farmaceutika praćena je kao promjena površine ispod kromatografske krivulje  $A/A_0$ , pri čemu je  $A$  površina ispod kromatografske krivulje farmaceutika nakon određenog vremena  $t$ , a  $A_0$ , površina ispod kromatografske krivulje otopine farmaceutika prije osvjetljavanja. Prema utvrđenoj linearnosti, odnosno mogućnosti kromatografskih metoda da u određenom području daju odziv proporcionalan koncentraciji analita u uzorku, može se izvesti da vrijednost  $A/A_0$ , odgovara vrijednosti  $c/c_0$ .

Prije provođenja fotolitičke razgradnje, ispitana je hidrolitička razgradnja za oba farmaceutika. Iako je za farmaceutike uglavnom karakteristično da su (pretežno) hidrolitički stabilni spojevi, hidroliza je važan abiotički put njihove razgradnje u okolišu, što je osobito važno za one farmaceutike koji su otporni na razgradnju mikroorganizmima. Nakon provedbe eksperimenata hidrolitičke razgradnje pri pH = 4, 7 i 9 i pri temperaturi od 50 °C s početnom koncentracijom  $c_0(\text{HCQ}) = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  i  $c_0(\text{MCP}) = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ , dobiveni rezultati pokazali su vrlo mali stupanj hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina i metoklopramida (< 5 %) pri navedenim vrijednostima pH. Za poluraspad navedenih farmaceutika pri 25 °C potrebno je više od godinu dana budući da hidroliziraju manje od 10 %

pri primijenjenim uvjetima [254]. Sukladno tome, ispitivani spojevi smatraju se hidrolitički stabilnima (**slika 30.**) pa dodatna istraživanja nisu provedena.



**Slika 30.** Hidrolitička stabilnost hidroksiklorokina ( $c_0(\text{HCQ}) = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) i metoklopramida ( $c_0(\text{MCP}) = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) pri  $50 \text{ }^\circ\text{C}$  tijekom pet dana

#### 4.1. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina

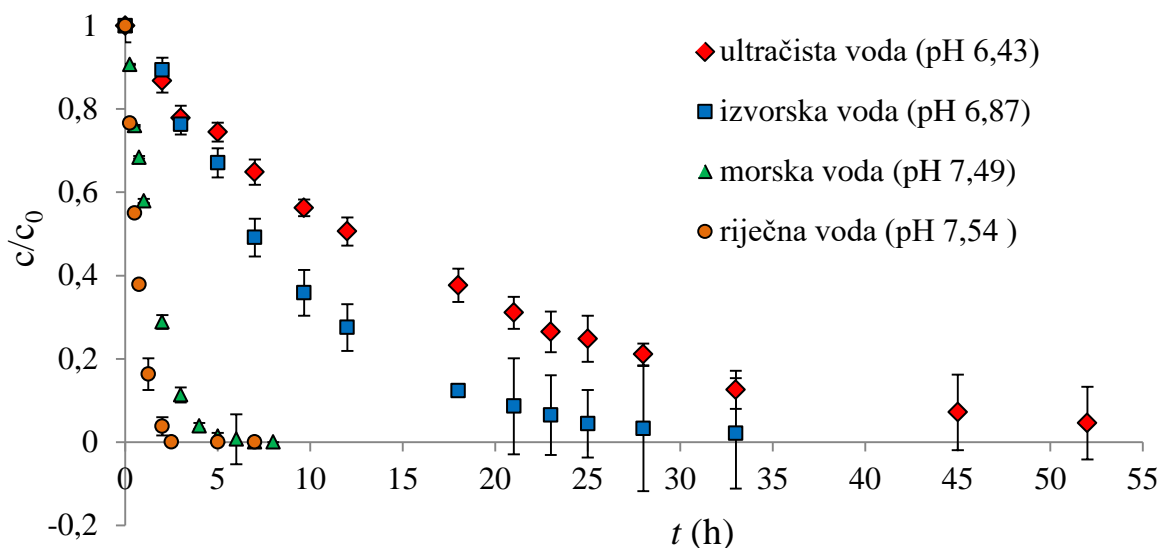
Budući da se fotoliza smatra jednim od najvažnijih procesa razgradnje farmaceutika u okolišu, posebno u površinskim vodama, istražen je njen utjecaj na sudbinu i ponašanje hidroksiklorokina u okolišu. Kod fotolitičkih reakcija razgradnje, koncentracija farmaceutika uglavnom se proporcionalno smanjuje s vremenom, što odgovara reakciji pseudo-prvog reda. Na temelju podataka smanjenja površine ispod kromatografskih krivulja, tj. smanjenja koncentracije farmaceutika tijekom izlaganja otopina Sunčevu zračenju, uočeno je da se fotolitička razgradnja hidroksiklorokina ponaša kao reakcija pseudo-prvog reda.

Istražen je utjecaj početne koncentracije hidroksiklorokina na njegovu fotolitičku razgradnju te je određeno da početna koncentracija ima utjecaja (**tablica 7.**). Međutim, ako se pri nižim koncentracijama uzmu u obzir i odstupanja, ta razlika i nije tako značajna, posebno ne u realnim uvjetima. Prema vremenima poluraspada, brža fotolitička razgradnja hidroksiklorokina događa se pri njegovim manjim početnim koncentracijama. To znači da se u prirodnim uvjetima u okolišu može očekivati još brža fotolitička razgradnja u površinskim vodama.

**Tablica 7.** Utjecaj početne koncentracije hidroksiklorokina na njegovu fotolitičku razgradnju u destiliranoj deioniziranoj vodi

$c_0$ (mol L <sup>-1</sup> )	$6,0 \cdot 10^{-6}$	$1,8 \cdot 10^{-5}$	$3,0 \cdot 10^{-5}$
$k$ (h <sup>-1</sup> ) · 10 <sup>3</sup>	$103,2 \pm 11,7$	$80,0 \pm 14$	$60,0 \pm 1,8$
$t_{1/2}$ (h)	$6,7 \pm 0,77$	$9,0 \pm 1,3$	$11,6 \pm 0,35$
$R^2$	0,9989	0,9980	0,9978

Kako bi se dobio bolji uvid u potencijalnu postojanost hidroksiklorokina u vodama u okolišu, istraživanja kinetike fotolitičke razgradnje provedena su u destiliranoj deioniziranoj, izvorskoj, morskoj i riječnoj vodi. Na **slici 31** prikazana je promjena koncentracije hidroksiklorokina ( $c/c_0$ ) u ovisnosti o vremenu osvjjetljavanja.



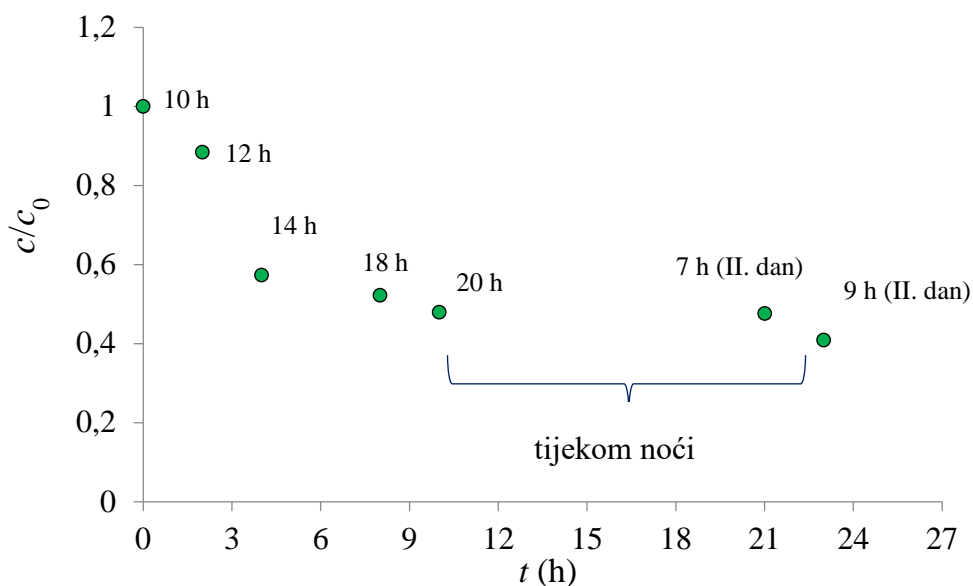
**Slika 31.** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina ( $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5}$  mol L<sup>-1</sup>) u različitim uzorcima površinskih voda s pripadajućim standardnim odstupanjima ( $n = 3$ )

U svim eksperimentima potvrđena je linearna ovisnost  $\ln(c/c_0)$  o vremenu ( $t$ ) uz koeficijent determinacije  $R^2 > 0,99$ , što pokazuje kako je fotolitička razgradnja pseudo-prvog reda (**tablica 8.**). Kontrolni uzorci potvrđuju kako je uočeno smanjenje koncentracije hidroksiklorokina isključivo posljedica fotolize. Vremena poluraspada hidroksiklorokina u destiliranoj deioniziranoj vodi ( $t_{1/2} = 11,6$  h) i izvorskoj vodi ( $t_{1/2} = 5,5$  h) pokazuju da je fotolitička razgradnja hidroksiklorokina relativno spor proces. Ipak, znatno brža razgradnja uočena je za hidroksiklorokin u riječnoj ( $t_{1/2} = 0,42$  h) i morskoj vodi ( $t_{1/2} = 0,80$  h), što se može pripisati utjecaju sastava prirodnih voda.

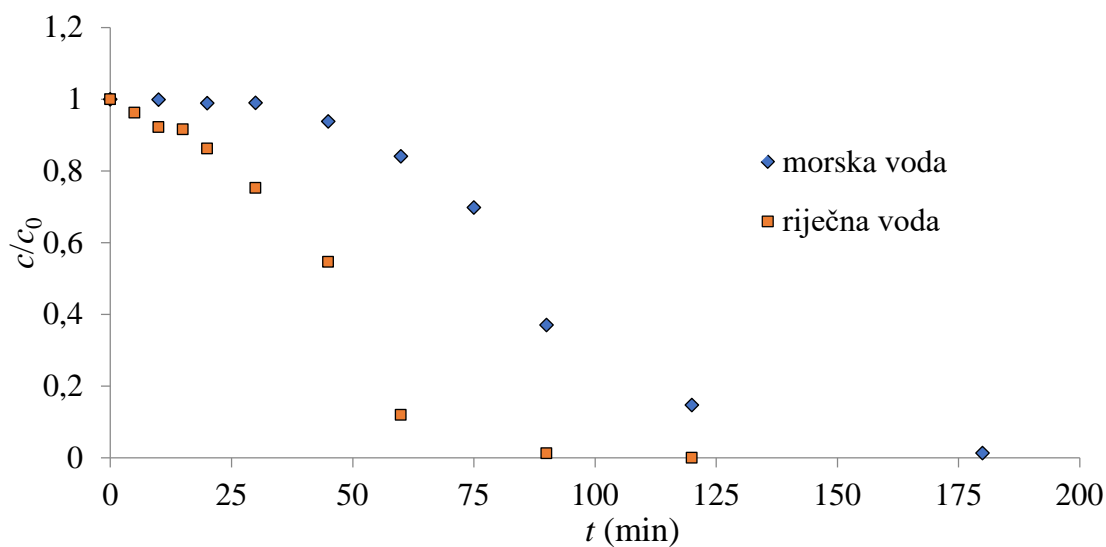
**Tablica 8.** Koeficijenti fotolitičke razgradnje ( $k$ ), vremena poluraspada ( $t_{1/2}$ ) sa standardnim odstupanjima i koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) hidroksiklorokina u različitim uzorcima površinskih voda pod utjecajem Xe svjetiljke ( $500 \text{ W m}^{-2}$ )

	Destilirana deionizirana voda	Izvorska voda	Morska voda	Riječna voda
$k \text{ (h}^{-1}) \cdot 10^3$	$60,0 \pm 1,8$	$126,0 \pm 9,6$	$864 \pm 22,8$	$1656 \pm 5,7$
$t_{1/2} \text{ (h)}$	$11,6 \pm 0,35$	$5,5 \pm 0,43$	$0,80 \pm 0,022$	$0,42 \pm 2 \cdot 10^{-4}$
$R^2$	0,9978	0,9967	0,9923	0,9909

Osim provođenja razgradnje uz umjetno Sunčevo zračenje, ispitana je fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u uzorcima, prethodno navedenih, površinskih voda (izvorska, riječna i morska) pod utjecajem prirodnog Sunčeva zračenja. Na **slici 1.P** dan je primjer eksperimentalnog postava provođenja fotolitičke razgradnje na balkonu. Rezultati vremena poluraspada dobiveni su iz grafičkog prikaza sa **slike 32 i 33**. Najsporija fotolitička razgradnja hidroksiklorokina uočena je u izvorskoj vodi, s vremenom poluraspada ( $t_{1/2} = 9$  h) (**slika 32.**) u odnosu na morsku vodu ( $t_{1/2} = 1,3$  h) i riječnu vodu ( $t_{1/2} = 0,80$  h) (**slika 33.**). Rezultati ukazuju da je fotolitička razgradnja brža u kontroliranim (laboratorijskim) uvjetima nego li u realnim uvjetima pod prirodnim Sunčevim zračenjem.



**Slika 32.** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u izvorskoj vodi pod utjecajem prirodnog Sunčeva zračenja (29. lipnja 2019.)

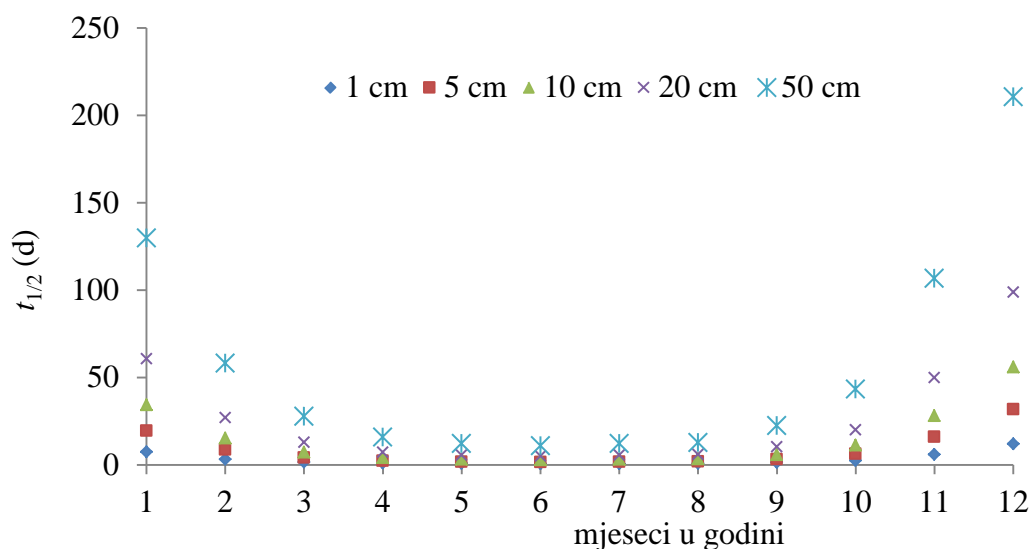


**Slika 33.** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u morskoj i riječnoj vodi pod utjecajem prirodnog Sunčeva zračenja (29. lipnja 2019.)

Neujednačenost brzine fotolitičke razgradnje pod utjecajem prirodnog Sunčeva zračenja može biti i posljedica kraće povremene naoblake pa se može zaključiti da se hidroksiklorokin u tom slučaju, tijekom zimskih mjeseci, znatno sporije razgrađuje. Uzevši u obzir i dubinu vode, za



očekivati je kako je potrebno veće vrijeme poluraspada farmaceutika u realnim uvjetima nego u laboratorijskim. To posebno vrijedi za morsku vodu, gdje je zbog veće dubine vode manji utjecaj fotolitičke razgradnje. Za takve procjene koristi se kvantni prinos, pomoću kojeg se mogu izračunati vremena poluraspada pojedinog farmaceutika u programu ABIWAS s navedenim parametrima (dubina vode, intenzitet Sunčeva zračenja, itd.). Na **slici 34**, isključivo na temelju kvantnog prinosa i molarnih apsorpcijskih koeficijenata za hidroksiklorokin, procijenjena su vremena poluraspada u destiliranoj vodi, ovisno o mjesecu u godini i dubini vode. Može se uočiti kako intenzitet zračenja i dubina vode imaju ključnu ulogu glede brzine fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina, što je izraženije u zimskom periodu u odnosu na ljetne sunčane dane. Prema navedenom, može se vidjeti važnost određivanja vrijednosti kvantnog prinosa. Procijenjena vremena poluraspada temelje se isključivo na izravnoj fotolizi pa je zanemaren izrazit doprinos neizravne fotolize za mnoge farmaceutike, uključujući i hidroksiklorokin i metoklopramid.



**Slika 34.** Vremena poluraspada hidroksiklorokina u ovisnosti o mjesecu u godini i dubini vode

Rad u laboratorijskim kontroliranim uvjetima omogućuje preračunavanje eksperimentalnih podataka za različite intenzitete Sunčeva zračenja. Ovo je važno zbog toga što laboratorijski uvjeti uglavnom dovode do brže razgradnje nego li je to slučaj u realnim uvjetima pod utjecajem Sunčeva zračenja. Primjera radi, ugađanje intenziteta Xe svjetiljke na  $500 \text{ W m}^{-2}$  odgovara  $50 \text{ W m}^{-2}$  za 290 – 400 nm. Ukoliko sunčani dan u ljetnom periodu ima ozračenost od  $29 \text{ W m}^{-2}$ , odnosno fluenciju (UV dozu) od  $7,5 \cdot 10^5 \text{ J m}^{-2}$ , onda jedan ljetni

sunčani dan odgovora 3,45 h osvijetljavanja pri  $500 \text{ W m}^{-2}$ . Prema tome, vrijeme poluraspada u navedenim uvjetima od 5,5 h za hidroksiklorokin u izvorskoj vodi pod Xe svjetiljkom, odgovara vremenu poluraspada kraćem od dva ljetna sunčana dana.

Provedena fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u sintetskoj kanalizacijskoj otpadnoj vodi ( $t_{1/2} = 0,545 \text{ h}$ ) bila je brža nego u sintetskoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije ( $t_{1/2} = 0,713 \text{ h}$ ) (**tablica 9.**). Razlog tome može biti veća prisutnost otopljenog organskog ugljika kod sintetske kanalizacijske otpadne vode u odnosu na sintetsku otpadnu vodu farmaceutske industrije (posebno to vrijedi u odnosu na prirodne uzorke voda: riječne, izvorske, morske). Naime, pobuđeno tripletno stanje organskih tvari ubrzava fotolitičku razgradnju različitih farmaceutika, primjerice sulfametoksazola i trimetoprima [101, 255]. Može se zaključiti da je hidroksiklorokin sklon fotolitičkoj razgradnji i u otpadnim vodama.

**Tablica 9.** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u sintetskim otpadnim vodama

	Sintetska otpadna voda farmaceutске industrije	Sintetska kanalizacijska otpadna voda
$k \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$0,972 \pm 0,012$	$1,272 \pm 0,108$
$t_{1/2} \text{ (h)}$	$0,713 \pm 0,0075$	$0,545 \pm 0,048$
$R^2$	0,9724	0,9749

#### 4.1.1. Utjecaj pH i matice na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina

Ispitivanja na različitim uzorcima voda pokazala su da matica utječe na brzinu fotolitičke razgradnje. Tragom rečenog, sljedeći eksperimenti provedeni su kako bi se ispitaio utjecaj vrijednosti pH i pojedinih tvari, uobičajeno prisutnih fotosenzibilizatora u površinskim vodama poput: huminskih kiselina, nitrata, klorida, bromida, hidrogenkarbonata, sulfata i željezovih(III) iona. Odabrane su one koncentracije koje su relevantne za vode u okolišu. Eksperimenti su provedeni na način da je standardnoj otopini hidroksiklorokina ( $c_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) dodana određena tvar, čiji se utjecaj ispitivao u destiliranoj deioniziranoj vodi.

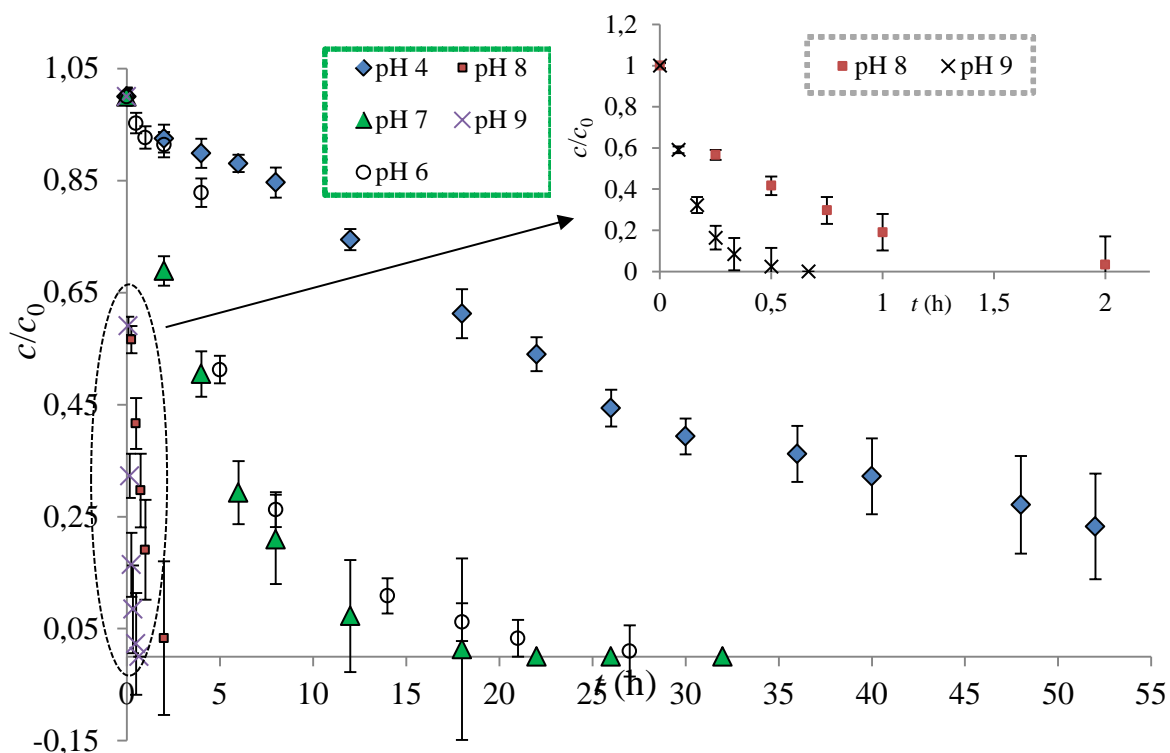
#### 4.1.1.1. Utjecaj vrijednosti pH na brzinu fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

Kako bi se ispitaio utjecaj na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina upotrijebljene su puferirane otopine za područje  $\text{pH} = 4 - 9$ , koje je relevantno za vode u okolišu. S povećanjem vrijednosti pH došlo je do porasta brzine fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina. Najbrža razgradnja uočena je na  $\text{pH} = 9$ . U **tablici 10** prikazani su rezultati provedene fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina, pri različitim vrijednostima pH.

**Tablica 10.** Koeficijenti brzine fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina ( $k$ ) sa standardnim odstupanjima ( $n = 3$ , 95 % interval pouzdanosti) i koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) pri različitim vrijednostima pH

pH	4	6	7	8	9
$k \cdot 10^2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$3,0 \pm 0,1$	$15,0 \pm 1,9$	$24,0 \pm 0,6$	$167,0 \pm 3,0$	$763,2 \pm 25,2$
$t_{1/2} \text{ (h)}$	$23,1 \pm 0,7$	$4,6 \pm 0,6$	$2,9 \pm 0,1$	$0,42 \pm 0,01$	$0,09 \pm 0,01$
$R^2$	0,9927	0,9975	0,9916	0,9966	0,9987

Prema **slici 35** hidroksiklorokin je potpuno razgrađen (ispod LOQ) nakon 40 min pri  $\text{pH} = 9$  te nakon 22 h pri  $\text{pH} = 7$ , dok pri  $\text{pH} = 4$  potpuna razgradnja nije postignuta čak ni nakon 52 h. Rezultati ukazuju kako vrijednost pH ima izrazito značajno ulogu na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina. Stoga, posebno je važno osigurati upotrebom puferiranih otopina da je vrijednost pH stalna tijekom provedbe fotolitičke razgradnje, što je na kraju eksperimenta i provjereno te je uvrđeno da nije došlo do promjene vrijednosti pH.



**Slika 35.** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u puferima pri vrijednostima pH 4, 6, 7, 8 i 9

#### 4.1.1.2. Utjecaj vrijednosti pH na kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina

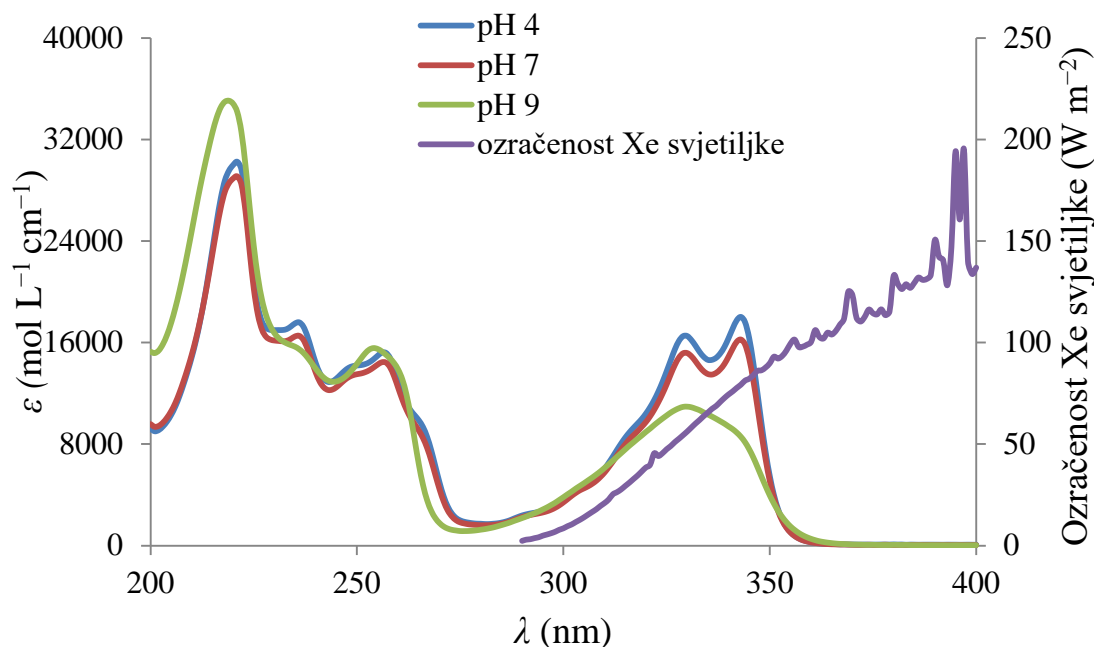
Kvantni prinos smatra se jednim od najvažnijih čimbenika u fotokemiji, kojim se može procijeniti učinkovitost razgradnje. Određivanjem kvantnog prinosa razgradnje hidroksiklorokina povećana je mogućnost usporedbe, odnosno relevantnost dobivenih rezultata. Isto tako, moguće je koristiti kvantni prinos kao ulazni podatak u odgovarajuće računalne programe kako bi se predvidjelo vrijeme poluraspada, uz utjecaje i drugih parametara, poput: dubine vode, geografske širine i godišnjeg doba. S obzirom na to da za različite specije može biti različit kvantni prinos razgradnje, određeni su kvantni prinosi razgradnje hidroksiklorokina u destiliranoj deioniziranoj vodi u pH području 4 – 9. Prividni kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina u destiliranoj deioniziranoj vodi iznosio je  $\phi = 4,72 \cdot 10^{-4}$ , odnosno, niži je nego za ciprofloksacin ( $\phi \cong 0,01 - 0,047$ ) [256]. U navedenom radu pokazano je da vrijednost pH utječe na kvantni prinos razgradnje ciprofloksacina, što je vidljivo i kod hidroksiklorokina (**tablica 11.**). Porastom vrijednosti pH

raste i kvantni prinos pa je pri pH = 9 kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina ( $\phi = 0,0453$ ) znatno veći nego pri nižim vrijednostima pH (primjerice: za pH = 4 iznosi  $\phi = 0,000264$ , a za pH = 7 iznosi  $\phi = 0,00194$ ). Kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina pri pH = 9, brojčano odgovara kvantnom prinosu razgradnje ciprofloksacina ( $\phi = 0,045$ ) pri istoj vrijednosti pH.

**Tablica 11.** Prividni kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina pri različitim pH

pH	4	6	7	8	9
$\phi_{app} \cdot 10^4$	2,64	11,96	19,36	135,75	453,49

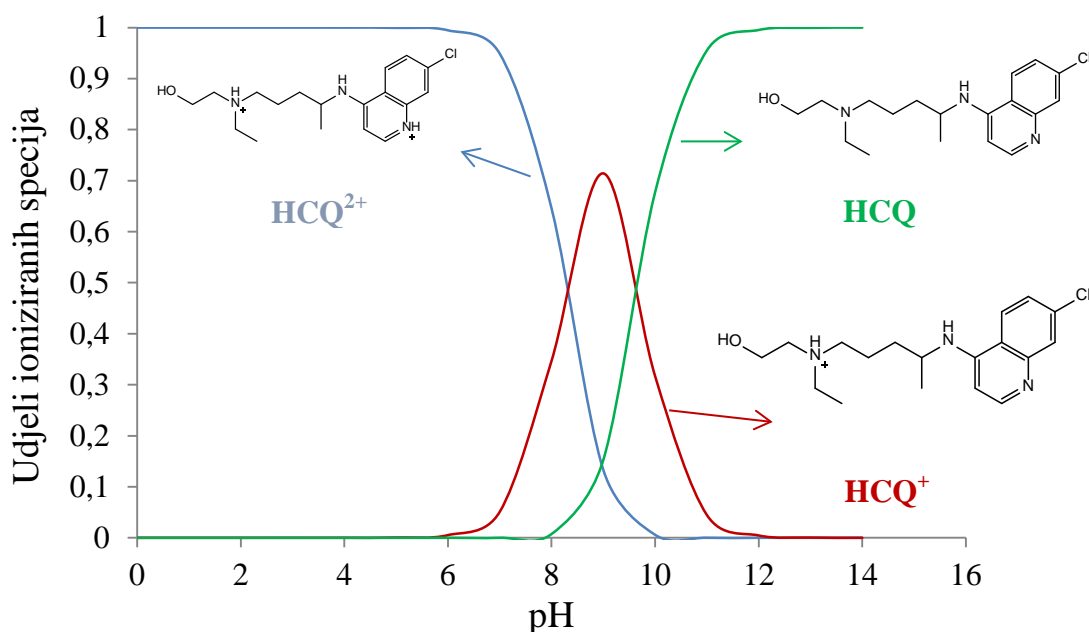
Prema apsorpcijskom spektru hidroksiklorokina (**slika 36.**) može se uočiti da apsorbira zračenje u području valnih duljina relevantnih za okoliš, pri valnim duljinama većim od 290 nm, pri čemu mu je apsorpcijski maksimum pri 343 nm, što pak odgovara elektronskom energijskom prijelazu  $n \rightarrow \pi^*$ .



**Slika 36.** Apsorpcijski spektri hidroksiklorokina ( $c_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $b = 1 \text{ cm}$ ) pri pH 4, 7, 9 i spektar ozračenosti ksenonske svjetiljke

Različito fotokemijsko ponašanje mnogih farmaceutika (primjerice: sulfapiridina, metoprolola, fluorokinolona) uvjetovano je vrijednostima  $pK_a$ , odnosno udjelima protoniranih ili deprotoniranih heterocikličkih funkcionalnih skupina [155, 257].

Hidroksiklorokin pripada bazičnim tvarima s eksperimentalno određenim vrijednostima  $pK_a = 8,27$  i  $pK_a = 9,67$  [258], što znači da je hidroksiklorokin protoniran kao  $HCQ^{2+}$  pri  $pH = 4$  (slika 37.).



**Slika 37.** Odnos udjela ionizirane i neutralne specije hidroksiklorokina i vrijednosti pH

Dok je u neutralnoj otopini pri  $pH = 7$  hidroksiklorokin pretežno protoniran (95 %) kao  $HCQ^{2+}$  te 5 % kao  $HCQ^+$ , u lužnatoj je sredini pri  $pH = 9$  oko 15 % neutralne forme hidroksiklorokina. Dakle, brža fotorazgradnja hidroksiklorokina pri većim vrijednostima pH može biti rezultat većeg udjela  $HCQ^+$  i njegove brže fotolitičke razgradnje u odnosu na  $HCQ^{2+}$ . U skladu s rečenim, protonirana specija hidroksiklorokina ima niži kvantni prinos. Može se zaključiti, sukladno očekivanom, kako manji kvantni prinos razgradnje hidroksiklorokina dovodi do njegove sporije fotolitičke razgradnje. Izravna fotorazgradnja neće ovisiti samo o kvantnom prinosu nego i o preklapanju apsorpcijskog spektra farmaceutika sa spektrom Sunčeva zračenja. Iako je pri manjim vrijednostima pH (npr.  $pH = 4$ ) apsorbanacija svjetlosti veća za valne duljine iznad 290 nm, nedovoljan je to čimbenik

da i fotorazgradnja bude brža i to zbog kvantnog prinosa koji je u ovom slučaju prevladavajući čimbenik. Također, promjenom od manjih prema većim vrijednostima pH, dolazi do batokromnog pomaka. Odnosno, manji kvantni prinos razgradnje u destiliranoj deioniziranoj vodi i u kiselim uvjetima (pH = 4) rezultira manjim doprinosom izravne fotolitičke razgradnje hidrosiklorokina, pri navedenim uvjetima. Posljedično, za pretpostaviti je kako bi u tom slučaju neizravna fotoliza mogla imati značajnu ulogu u fotokemijskoj razgradnji hidrosiklorokina [259]. Brža fotorazgradnja u lužnatoj sredini ukazuje na to da deprotoniranje povećava elektronsku gustoću hidrosiklorokina, što povećava mogućnost elektrofilnih napada reaktivnih kisikovih vrsta. U studijama fotorazgradnje estriola [260] i atenolola [261] uočeno je da je deprotoniranjem olakšana i povećana mogućnost reakcije hidrosilnih radikala s kinolinskim prstenom hidrosiklorokina. Deprotoniranjem dolazi do povećane elektronske gustoće hidrosiklorokina pa je kinolinski prsten podložniji napadu hidrosilnih radikala. Reakcija između kinolinskog prstena i hidrosilnih radikala u vodenoj otopini potvrđena je pulsnom radiolizom [262]. Zbog prisutnosti dužeg konjugiranog sustava na aromatskom prstenu i mezomernog učinka klorovog atoma, pretpostavlja se da se hidrosilacija olakšano odvija na kinolinskom prstenu, što dodatno potvrđuje brz nastanak hidrosiliranih fotoprodukata. Također, delokalizacija nepodijeljenog elektronskog para na kisikovu atomu i  $\pi$  elektrona na kinolinskom prstenu može utjecati na fotolitičku reaktivnost hidrosiklorokina [263].

Za ispitivanje utjecaja vrijednosti pH na fotolitičku razgradnju preporuča se, prema priručniku OECD-a, uporaba puferirane otopine. Ipak, u nekim istraživanjima praćenje utjecaja vrijednosti pH nije provedeno u puferiranim otopinama nego samo s ugođenim početnim vrijednostima pH [136, 264–266]. Moguća prednost ovakvog načina rada je što tada nisu prisutne dodatne tvari koje tvore pufer pa je time smanjena i mogućnost njihovog utjecaja na fotolitičku razgradnju. S druge strane, u puferiranim otopinama ne dolazi do promjene vrijednosti pH, a osim toga, puferi ne bi trebali utjecati na razgradnju, jer ne apsorbiraju zračenje u području u kojem odabrani farmaceutici apsorbiraju. Stoga je, u ovom radu fokus na upotrebi puferiranih otopina. Ipak, napravljena su istraživanja utjecaja vrijednosti pH na fotolitičku razgradnju hidrosiklorokina bez pufera. Rezultati ugađanja vrijednosti pH otopina hidrosiklorokina ( $c_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) na 4, 7 i 9 s  $\text{H}_2\text{SO}_4$  ili  $\text{NaOH}$  ukazuju kako je brzina fotolitičke razgradnje pri pH = 4 ( $k = 0,03 \text{ h}^{-1}$ ) jednaka kao i u slučaju kada je korišten pufer ( $k = 0,03 \text{ h}^{-1}$ ), jer je pH ostao isti na početku i na kraju razgradnje (**slika 2.P**). Međutim, kada

je pH ugođen na 7, fotolitička razgradnja nije bila jednaka razgradnji u puferiranim otopinama vrijednosti pH = 7 ( $k = 0,24 \text{ h}^{-1}$ ) i vrijednosti pH = 9 ( $k = 7,63 \text{ h}^{-1}$ ), nego sporija ( $k = 0,084 \text{ h}^{-1}$  pri pH = 7) i ( $k = 0,144 \text{ h}^{-1}$  pri pH = 9). Razlog tome je što se s početnih pH = 7, nakon provedene fotolize, pH snizio na 4,68. Također, i pri pH = 9 došlo je do smanjenja pH na 4,69. Pretpostavka je da su ugljikov dioksid i potencijalno razgradni produkti odgovorni za nastalu promjenu vrijednosti pH. A ovo je prvi puta, prema dostupnim saznanjima, da je proučavan utjecaj na dva načina. Na temelju rečenog, može se zaključiti kolika je važnost navođenja takvih podataka prilikom provođenja razgradnje, posebno u slučajevima u kojima pH ima ključnu ulogu. Dakle, rezultati mogu jako varirati zbog promjene vrijednosti pH tijekom fotolitičke razgradnje, ukoliko se ne koriste puferi. U takvim slučajevima, neophodno je održavati vrijednosti pH stalnima.

#### 4.1.1.3. Utjecaj huminskih kiselina na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

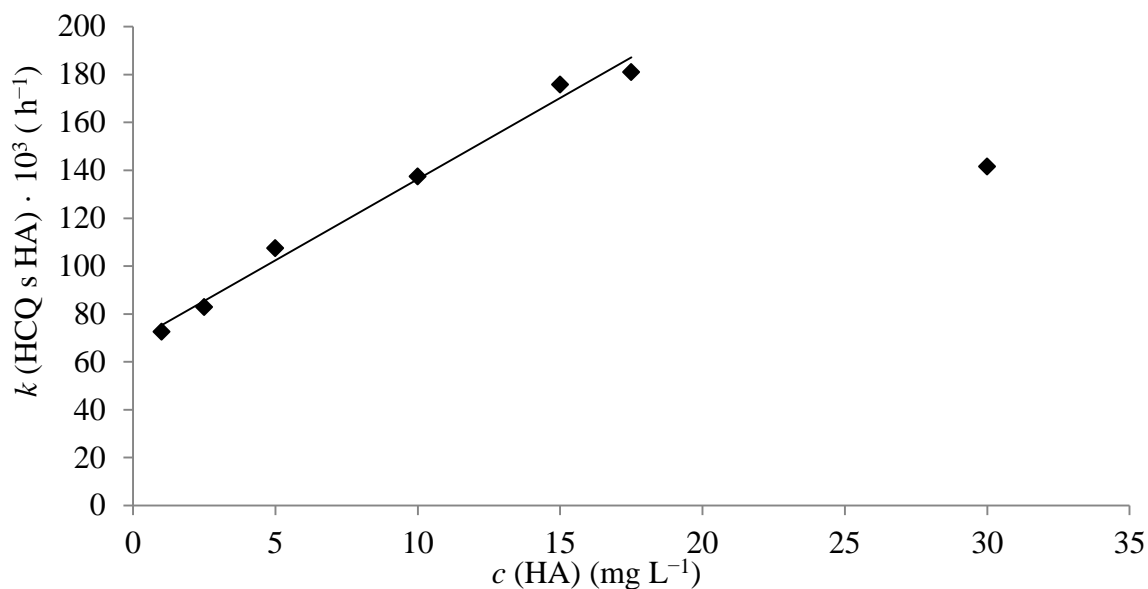
Sveprisutne huminske kiseline značajno utječu na ponašanje i sudbinu farmaceutika u površinskim vodama, izazivajući njihovu razgradnju putem neizravne fotolize [260, 267]. Procesi poput: fotosenzibilizacije, apsorpcije svjetlosti i hvatanja radikala [268], ukazuju na kompleksnost njihova djelovanja. U slučaju karbamazepina, diklofenaka, propranolola i ofloksacina, uočeno je da huminske kiseline imaju različit utjecaj na fotolitičku razgradnju. Karbamazepin i diklofenak podliježu bržoj fotolitičkoj razgradnji kada se izlože Sunčevom zračenju u prisutnosti huminskih kiselina, dok je kod propranolola i ofloksacina rezultat istoga sporija fotolitička razgradnja [269]. Prema dostupnoj literaturi, nije poznat doprinos neizravne fotolize (npr. huminskih kiselina) na razgradnju hidroksiklorokina. Stoga je u ovom radu ispitan utjecaj huminskih kiselina pri različitim koncentracijama koje se mogu mijenjati ovisno o lokaciji i sezoni. Moreira-Turcq i sur. [260] navode kako godišnja doba značajno utječu na količinu prisutnih otopljenih organskih tvari, što znači da su njihove najveće koncentracije pronađene u rijekama i tijekom rane jeseni [270]. Rezultati fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina, uz prisutnost huminskih kiselina (**tablica 12.**), ukazuju na njihovo dvojako djelovanje. Međutim, ukupan doprinos očituje se u ubrzanju fotolitičkoj razgradnji hidroksiklorokina od strane huminskih kiselina, pod djelovanjem Xe svjetiljke.



**Tablica 12.** Utjecaj huminskih kiselina na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina ( $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

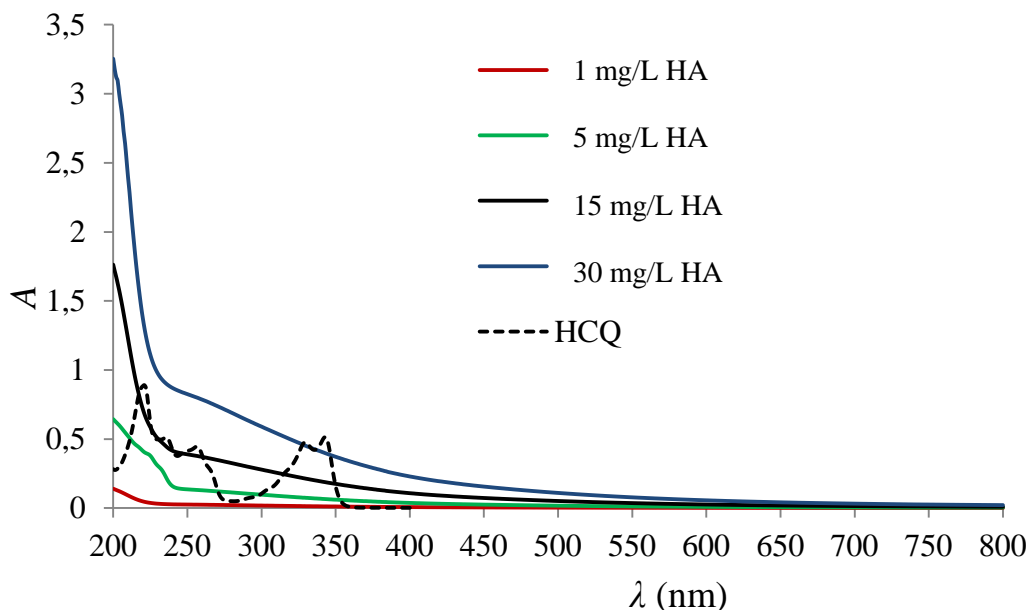
Sastav vode	Koncentracija HA ( $\text{mg L}^{-1}$ )	$k \cdot 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$	$R^2$
HCQ	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$60,0 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,4$	0,9978
huminske kisljine	1	$72,6 \pm 1,2$	$9,6 \pm 0,16$	0,9959
	2,5	$82,8 \pm 1,8$	$8,4 \pm 0,18$	0,9957
	5	$107,4 \pm 1,6$	$6,5 \pm 0,09$	0,9974
	10	$137,4 \pm 10,9$	$5,0 \pm 0,40$	0,9895
	15	$175,8 \pm 1,3$	$3,9 \pm 0,03$	0,9996
	17,5	$181,0 \pm 0,92$	$3,83 \pm 0,02$	0,9903
	30	$141,6 \pm 3,0$	$4,9 \pm 0,10$	0,9974

S porastom koncentracije huminskih kiselina ( $1 - 17,5 \text{ mg L}^{-1}$ ), razgradnja je proporcionalno brža, na što ukazuje linearna korelacija u istome koncentracijskom području huminskih kiselina između koeficijenata fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina s huminskim kiselinama i koncentracije huminskih kiselina (**slika 38.**).



**Slika 38.** Utjecaj koncentracije huminskih kiselina na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina pri  $\text{pH} = 6,0$

S druge strane, povećanjem koncentracije huminskih kiselina od  $30 \text{ mg L}^{-1}$  dolazi do odstupanja od linearnosti, zbog prevladavajućeg efekta zasjenjenja. Posljedica toga je sporija razgradnja pri većoj koncentraciji huminskih kiselina ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) u odnosu na niže koncentracije huminskih kiselina (npr.  $15 \text{ mg L}^{-1}$ ). Naime, smanjenjem ukupne količine dostupne energije zbog apsorpcije UV-Vis zračenja od strane huminskih kiselina (**slika 39.**) umanjuje se doprinos izravne fotolize razgradnji hidroksiklorokina.



**Slika 39.** Spektri UV-Vis hidroksiklorokina ( $c_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) i huminskih kiselina ( $1 - 30 \text{ mg L}^{-1}$ ) u vodenoj otopini

Ovakva posljedica apsorpcije UV-Vis zračenja od strane huminskih kiselina, a ne primarnog analita (hidroksiklorokina), naziva se efekt zasjenjenja (engl. *inner filter effect*). Isto tako, huminske kiseline mogu djelovati kao hvatači radikala te tako usporavati fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina, što je primjerice uočeno u slučaju diklofenaka i karbamazepina [271]. Kako bi se ispitao mehanizam razgradnje, u otopinu hidroksiklorokina i huminskih kiselina dodan je poznati učinkoviti hvatač hidroksilnih radikala, propan-2-ol (IPA) [272]. Cilj je bio utvrditi nastaju li hidroksilni radikali i hoće li dodatak IPA usporiti razgradnju. Rezultati takvih eksperimenata uz HA ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ ) i IPA ( $25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) (**slika 3.P**) pokazali su da je razgradnja bila 4,4 puta sporija ( $k = (40,2 \pm 1,0) \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) nego bez IPA ( $k = (175,8 \pm 1,3) \cdot 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ). Ovo upućuje na činjenicu kako su uglavnom hidroksilni radikali odgovorni za smanjenje koncentracije hidroksiklorokina. Štoviše, predloženi razgradni produkti (**poglavlje 4.1.2.**) ukazuju da su hidroksilni radikali vezani za aromatski prsten

hidroksiklorokina. Osim toga, mogući su i drugi procesi reaktivnih oksidacijskih vrsta koji ubrzavaju fotolitičku razgradnju.

Budući da huminske kiseline apsorbiraju zračenje u širokom području valnih duljina, izračunato je zasjenjenje svjetlosti (engl. *light screening*)  $S_l$  prema jednadžbi 43, predloženoj od strane Walse i sur. [141] sa ciljem procjene utjecaja koje takvo zasjenjenje može imati na fotorazgradnju hidroksiklorokina.

$$S_l = \frac{(1 - 10^{\alpha_\lambda \cdot l})}{2,303 \cdot \alpha_\lambda \cdot l} \quad (43)$$

Oznaka  $\alpha_\lambda$  ( $\text{cm}^{-1}$ ) predstavlja koeficijent zasjenjenja ovisan o valnoj duljini, tj. predstavlja apsorbanciju huminskih kiselina pri određenim valnim duljinama za put zračenja od 1 cm. Slovom  $l$  označena je duljina puta zračenja kroz kvarcnu posudicu (koja je u konkretnom slučaju iznosila 1,5 cm). Za izračun  $S_\lambda$  upotrijebljen je UV-Vis apsorpcijski spektar 300 – 360 nm uz pomak od  $\Delta\lambda = 1$  nm. Koeficijenti brzine fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina s huminskim kiselinama korigirani su tako što su pomnoženi s prosječnom vrijednošću zasjenjenja ( $S_{\Sigma\lambda}$ ). Vrijednosti zasjenjenja huminskih kiselina bile su u rasponu 0,51 – 0,98 (**tablica 13.**).

**Tablica 13.** Izračunato zasjenjenje svjetlosti huminskih kiselina na hidroksiklorokin

$S_{\Sigma\lambda(300-360\text{ nm})}$	HCQ + HA	$k_{(\text{HCQ u destiliranoj deioniziranoj vodi})} \cdot 10^2 S_{\Sigma\lambda} (\text{h}^{-1})$	$k_{(\text{HCQ s HA})} \cdot 10^2 (\text{h}^{-1})$
0,976	HCQ + HA (1 mg L <sup>-1</sup> )	58,6	72,6 ± 1,2
0,881	HCQ + HA (5 mg L <sup>-1</sup> )	52,9	107,4 ± 1,6
0,707	HCQ + HA (15 mg L <sup>-1</sup> )	42,4	175,8 ± 1,3
0,508	HCQ + HA (30 mg L <sup>-1</sup> )	30,5	141,6 ± 3,0

Radi procjene efekta zasjenjenja svjetlosti određeni su faktori zasjenjenja ( $S_{\Sigma\lambda}$ ), koji upućuju na to da je fotolitička razgradnja sporija (ovisno o koncentraciji huminskih kiselina u prirodnim vodama) sukladno izračunatim efektima zasjenjenja. Prema tome, očekivano bi bilo da povećanje koncentracije huminskih kiselina dovodi do smanjenja  $S_{\Sigma\lambda}$  (**slika 4.P**). I to više što su veće količine huminskih kiselina. Međutim, zbog nastanka reaktivnih vrsta od strane

---

huminskih kiselina koje djeluju i kao fotosenzibilizatori, ukupno gledajući razgradnja hidroksiklorokina je brža uz prisutstvo huminskih kiselina nego bez njih.

Budući da je u slanim vodama manja koncentracija huminskih kiselina, može se zaključiti kako će utjecaj huminskih kiselina u slučaju hidroksiklorokina biti izraženiji u riječnim vodama nego u morima ili oceanima. Osim koncentracije huminskih kiselina, zanimljivo je da i različito porijeklo (izvor) huminskih kiselina može utjecati na mehanizam djelovanja i imati različitu fotoreaktivnost [273]. Upravo zato je i provedena karakterizacija huminskih kiselina, kako bi ovi rezultati mogli biti usporedivi u slučaju uporabe huminskih kiselina različitog sastava.

#### 4.1.1.4. Utjecaj nitrata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

Korelacija između nitrata i vremena poluraspada farmaceutika uočena je za mnoge farmaceutike, pri čemu nitrati općenito smanjuju vremena poluraspada farmaceutika [274]. Osim ubrzanja fotolitičke razgradnje, nitrati mogu usporiti fotolitičku razgradnju zbog apsorpcije svjetlosti ili pak uopće ne moraju imati utjecaja [271]. Koncentracije nitrata u okolišu mogu varirati u koncentracijskom području  $0,62 - 62 \text{ mol L}^{-1}$ , ovisno o geografskoj lokaciji i ljudskoj poljoprivrednoj djelatnosti [193]. Upravo su zato u radu korištene različite koncentracije nitrata, a nakana je bila ispitivanje njihova utjecaja na brzinu fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina. Rezultati su pokazali da nitrati značajno ubrzavaju fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina (**tablica 14.** i **slika 5.P**).

**Tablica 14.** Utjecaj nitrata na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina ( $c_0(\text{HCQ}) = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$	$R^2$
HCQ (destilirana deionizirana voda)	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$60,0 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,4$	0,9978
HCQ + nitrati	$6 \text{ mg L}^{-1}$	$78,0 \pm 2,3$	$8,9 \pm 0,26$	0,9679
	$95 \text{ mg L}^{-1}$	$99,6 \pm 3,1$	$6,7 \pm 0,22$	0,9923
	$190 \text{ mg L}^{-1}$	$190,4 \pm 0,6$	$3,7 \pm 0,01$	0,9893
	$380 \text{ mg L}^{-1}$	$237,6 \pm 24,0$	$2,9 \pm 0,03$	0,9956
HCQ + nitrati + IPA	nitrati ( $190 \text{ mg L}^{-1}$ ) IPA ( $25 \text{ mM}$ )	$98,4 \pm 1,6$	$7,0 \pm 0,43$	0,9951
HCQ + nitrati + IPA	nitrati ( $190 \text{ mg L}^{-1}$ ) IPA ( $100 \text{ mM}$ )	$38,8 \pm 0,4$	$17,9 \pm 1,98$	0,9972
HCQ + IPA	IPA ( $25 \text{ mM}$ )	$36,0 \pm 0,9$	$19,3 \pm 0,77$	0,9956

Kako bi se ispitalo jesu li hidroksilni radikali odgovorni za to ubrzanje, u otopinu nitrata koncentracije  $190 \text{ mg L}^{-1}$  dodan je IPA u koncentracijama  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  i  $100 \text{ mmol L}^{-1}$ . Na temelju koeficijenata brzine fotolitičke razgradnje uz  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  IPA i u slučaju  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  IPA (**slika 6.P**) došlo je do usporenja razgradnje hidroksiklorokina. Stoga se može zaključiti kako su većinom hidroksilni radikali odgovorni za smanjenje koncentracije hidroksiklorokina u prisutnosti nitrata. Također, očekivano je da, zbog doprinosa izravne fotolize, reakcija razgradnje hidroksiklorokina neće biti potpuno inhibirana. Međutim, koeficijenti brzine reakcije fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina (**tablica 14.**) uz  $25 \text{ mmol L}^{-1}$  IPA u destiliranoj deioniziranoj vodi (bez nitrata) uz  $100 \text{ mmol L}^{-1}$  IPA s  $190 \text{ mg L}^{-1}$  nitrata pokazuju da je brzina sporija kod razgradnje hidroksiklorokina u destiliranoj deioniziranoj vodi bez dodanih nitrata zbog prisutnosti IPA. Dakle, IPA je djelovao kao hvatač hidroksilnih radikala u oba navedena slučaja. U prilog reakciji hidroksilnih radikala s hidroksiklorokinom ide i potvrđena hidroksilacija kinolinskog prstena metodom pulsne radiolize [275].

#### 4.1.1.5. Utjecaj klorida, bromida i sulfata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

Razliku između brzina fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina u riječnoj i morskoj vodi upućuje na činjenicu prema kojoj sastav matice ima značajnu ulogu. Najveća razlika u sastavu riječne i morske vode odnosi se na koncentraciju klorida, sulfata i bromida, što se može vidjeti u **tablici 5**. Stoga je daljnje istraživanje usmjereno na postojanost hidroksiklorokina u morskim vodama, u kojima salinitet prosječno iznosi 35 ‰. Također, primijenjene su i niže koncentracije navedenih aniona, kako bi se ispitalo njihov utjecaj na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina, u uvjetima sličnima za estuarije. Za kloridne ione poznato je da mogu imati višestruku ulogu na fotokemijsko ponašanje organskih zagađivala pa tako mogu: smanjiti utjecaj izravne fotolize, potaknuti neizravnu fotolizu (fotosenzibilizatori) ili pak uzrokovati fotokloriranje [173]. Budući da su kloridni ioni najprisutniji u morskim vodama, vrlo je vjerojatno da upravo oni mogu utjecati na razgradnju hidroksiklorokina. Stoga su u eksperimentima korištene različite koncentracije kloridnih iona ( $10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1\,000 \text{ mg L}^{-1}$  i  $22\,000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Rezultati ukazuju da kloridi snižuju koeficijent brzine fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina (**tablica 15**. i **slika 7.P**).

**Tablica 15.** Utjecaj klorida, bromida i sulfata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina (u svim eksperimentima  $c_0(\text{HCQ}) = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$	$R^2$
HCQ	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$60,0 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,4$	0,9978
kloridi	$10 \text{ mg L}^{-1}$	$54,0 \pm 1,9$	$12,8 \pm 0,44$	0,9811
	$1\,000 \text{ mg L}^{-1}$	$47,4 \pm 1,2$	$14,6 \pm 0,37$	0,9866
	$22\,000 \text{ mg L}^{-1}$	$45,6 \pm 1,6$	$15,2 \pm 0,52$	0,9967
bromidi	$66 \text{ mg L}^{-1}$	$42,0 \pm 1,9$	$16,5 \pm 0,75$	0,9926
sulfati	$3\,200 \text{ mg L}^{-1}$	$40,2 \pm 1,0$	$17,3 \pm 0,44$	0,9906

Budući da je takva vrsta manje reaktivna, ali selektivnija u odnosu na hidroksilne radikale, usporenje fotorazgradnje može nastati kao rezultat „trošenja“ hidroksilnih radikala prema jednadžbama 23 – 25, navedenima u poglavlju 2.5.3. Reakcija između kloridnih iona i hidroksilnih radikala iznimno je brza  $k = 4,3 \cdot 10^9 \text{ mol L}^{-1} \text{ s}^{-1}$  [276], ali, jedino u kiselim uvjetima pri vrijednostima  $\text{pH} < 5$  stvara radikal  $\cdot\text{Cl}$ . Sljedom rečenog, time opada i vjerojatnost nastanku radikalnog aniona  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  u uvjetima karakterističnim za prirodne vode uporabljene u ovom radu.

Sulfati ( $3\text{--}200 \text{ mg L}^{-1}$ ) slično (poput klorida) usporavaju fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina (**tablica 15.** i **slika 8.P**), tako što reagiraju s hidroksilnim radikalima. Rezultat toga je sporija fotolitička razgradnja hidroksiklorokina u morskoj nego u riječnoj vodi, što je, također, uočeno i u drugim istraživanjima, za druge farmaceutike [277, 278].

#### 4.1.1.6. Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

Hidrogenkarbonati su, poput nitrata i huminskih kiselina, sveprisutni u prirodnom vodenom okruženju i imaju značajnu ulogu u razgradnji mnogobrojnih farmaceutika. Najčešće se nalaze u koncentracijskom rasponu od  $24 \text{ mg L}^{-1}$  do  $268 \text{ mg L}^{-1}$  [279], što su prilično velike količine pa je važno razmotriti i njihov potencijalni utjecaj. Naime, unatoč tome što hidrogenkarbonati ne apsorbiraju Sunčevo zračenje, njihovo djelovanje temelji se na reakcijama s oksidacijskim vrstama, poput hidroksilnih ili sulfatnih radikala [280]. Zbog toga je za očekivati da hidrogenkarbonati mogu usporiti fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina. Međutim, rezultati (**tablica 16.** i **slika 9.P**) utjecaja hidrogenkarbonata ukazuju da je razgradnja ubrzana, a ne očekivano, usporena.

**Tablica 16.** Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina (u svim eksperimentima  $c_0 = 3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$	$R^2$
HCQ	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$60,0 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,4$	0,9978
hidrogenkarbonati	25 mg L <sup>-1</sup>	$72,0 \pm 3,4$	$9,6 \pm 0,45$	0,9851
	160 mg L <sup>-1</sup>	$460,8 \pm 4,1$	$1,5 \pm 0,01$	0,9819
	320 mg L <sup>-1</sup>	$1255,8 \pm 1,6$	$0,6 \pm 0,004$	0,9950

To se može objasniti povećanom vrijednošću pH koju uzrokuju hidrogenkarbonati; otopina je bazičnija što je veća koncentracija hidrogenkarbonata (pH = 6,00 pri  $c_0(\text{HCO}_3^-) = 25 \text{ mg L}^{-1}$ , pH = 6,70 pri  $c_0(\text{HCO}_3^-) = 160 \text{ mg L}^{-1}$  i pH = 7,01 pri  $c_0(\text{HCO}_3^-) = 320 \text{ mg L}^{-1}$ ). Također, do ubrzanja razgradnje aromatskih amina (čijoj skupini pripada hidroksiklorokin) može doći nastankom karbonatnih radikala koji nastaju u prisutnosti hidrogenkarbonata i/ili karbonata [274]. Zbog rečenog, dodatni eksperimenti provedeni su u fosfatnom puferu  $c_0 = 10 \text{ mmol L}^{-1}$  pri pH = 7,5 (**tablica 17.** i **slika 10.P**). Ubrzana razgradnja isključivo je posljedica utjecaja vrijednosti pH, iako u manjoj mjeri može biti i zbog nastanka karbonatnih radikala, ali tek pri većim koncentracijama (160 mg L<sup>-1</sup>).

**Tablica 17.** Utjecaj hidrogenkarbonata na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina ( $c_0(\text{HCQ}) = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u otopinama puferiranim na pH = 7,5

$c_0(\text{HCO}_3^-)$	0 mg L <sup>-1</sup>	25 mg L <sup>-1</sup>	160 mg L <sup>-1</sup>	320 mg L <sup>-1</sup>
$k \cdot 10^2 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$90,6 \pm 2,5$	$90,5 \pm 2,9$	$100,3 \pm 2,5$	$100,5 \pm 7,1$
$t_{1/2} \text{ (h)}$	$0,76 \pm 0,02$	$0,77 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,02$	$0,69 \pm 0,05$
$R^2$	0,9846	0,9790	0,9909	0,9736



#### 4.1.1.7. Utjecaj željezovih(III) iona na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

Prisutstvo željezovih(III) iona u prirodnim vodama pri koncentracijama od 0,0056 do 5,6 mg L<sup>-1</sup> [281] utječe na mnoge fizikalno-kemijske reakcije organskih zagađivala. Pri tome, vrijednost pH ima ključnu ulogu zbog nastanka različitih fotokemijskih specija željeza. Prisutstvo željezovih(III) iona koncentracije 10 mg L<sup>-1</sup> ubrzalo je fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina (**tablica 18.** i **slika 11.P.**).

**Tablica 18.** Utjecaj željezovih(III) iona na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

$$c_0(\text{HCQ}) = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$$

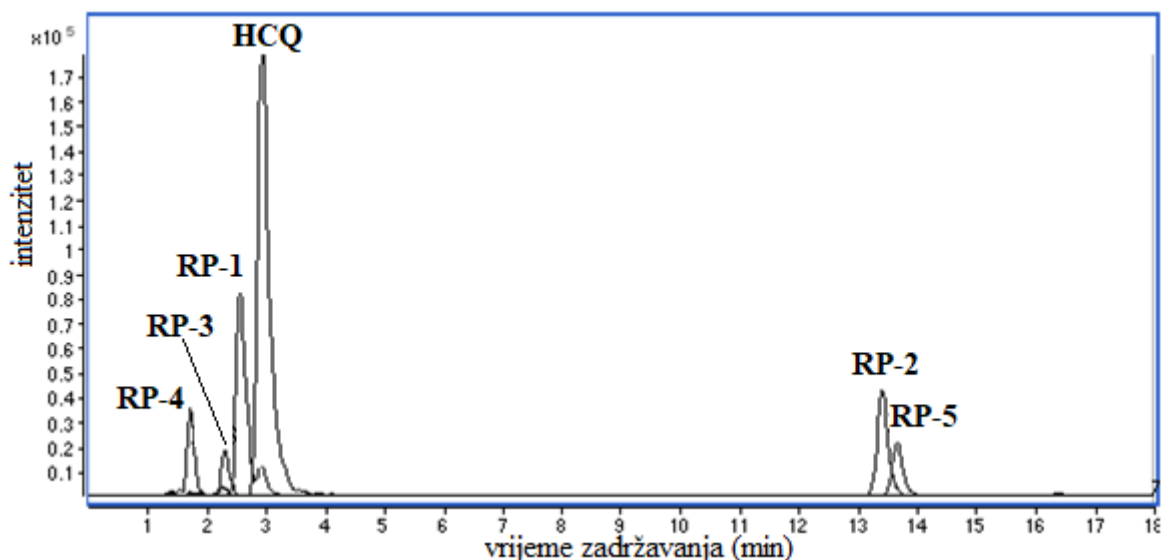
Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (h}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (h)}$	$R^2$
HCQ	$3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$60,0 \pm 1,8$	$11,6 \pm 0,4$	0,9978
željezo(III)	10 mg L <sup>-1</sup>	$196,8 \pm 4,4$	$3,5 \pm 0,08$	0,9840

Unatoč mogućoj kompeticiji u apsorpciji između Fe(OH)<sub>2</sub><sup>3+</sup> iona i hidroksiklorokina u području 300 – 360 nm, fotolitička razgradnja je ubrzana 3,3 puta, uz prisustvo željezovih iona. Rezultat ubrzane razgradnje može biti pripisan hidroksilnim radikalima koji nastaju kroz fotoredoks procese od strane Fe(OH)<sup>2+</sup> [176]. Fotokemijska svojstva Fe<sup>3+</sup> iona značajno uvjetuje specijacija, koja ovisi o vrijednosti pH sredine. U kiselim uvjetima, prevladava kemijski fotoreaktivna specija Fe(OH)<sup>2+</sup>, koja može potaknuti razgradnju. Ipak, u prirodnim vodama u kojima vrijednost pH može biti veća od 7, željezovi ioni prisutni su u koloidnom obliku Fe(OH)<sub>3</sub> te nisu skloni takvom utjecaju [282], što je karakteristično za prirodne vode (riječnu i morsku) u ovom radu budući je njihov pH iznosio 7,5.

#### 4.1.2. Identifikacija razgradnih produkata i putevi razgradnje hidroksiklorokina

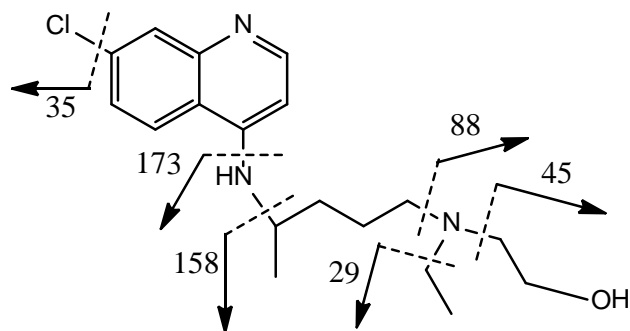
Poznato je kako i fotolitički produkti, zajedno s drugim prisutnim zagađivalima [87], mogu značajno pridonijeti povećanju toksičnosti vode u okolišu. Kawabata i sur. [283] ističu kako razgradni fotoprodukti mogu biti toksičniji od početnih spojeva od kojih su nastali. No, to i nije tolika rijetkost. Sukladno tome, važno je identificirati razgradne produkte, kako bi ih se moglo u okolišu pratiti. Ova saznanja mogu omogućiti njihovo lakše uklanjanje iz postrojenja za obradu otpadnih voda, a time i smanjiti njihov potencijalni rizik za okoliš. Jer, u konačnici, cilj je: stvoriti ukupnu sliku utjecaja abiotičkih procesa na okoliš.

Smanjenje površine ispod kromatografske krivulje hidroksiklorokina u odnosu na njegovu površinu prije osvjetljavanja, ukazivalo je na smanjenje njegove koncentracije. Nadalje, nove kromatografske krivulje detektirane na kromatogramima pripadale su razgradnim produktima. U ovom radu identificirano je ukupno pet razgradnih produkata (RP1– RP5), čije se kromatografske krivulje s pripadajućim vremenima zadržavanja mogu vidjeti na kromatogramu (slika 40.), a njihovi spektri masa na slici 12.P. Tri razgradna produkta (RP-1, RP-3 i RP-4) imaju manja vremena zadržavanja od hidroksiklorokina, a to upućuje da su nastali razgradni produkti polarniji od početnog spoja.



**Slika 40.** Preklopljeni ekstrahirani kromatogrami hidroksiklorokina i razgradnih produkata (RP-1, RP-2, RP-3, RP-5) pri pH 4 nakon 18 h i RP-4 pri pH = 9 nakon 30 min izlaganja hidroksiklorokina umjetnom Sunčevu zračenju

Na **slici 41** prikazana je shema fragmentacije molekularnog iona hidrosiklorokina ( $m/z = 336$ ) na kojoj se može uočiti da se glavni fragmentacijski putovi odnose na gubitak alkilnih skupina vezanih na dušikove atome.



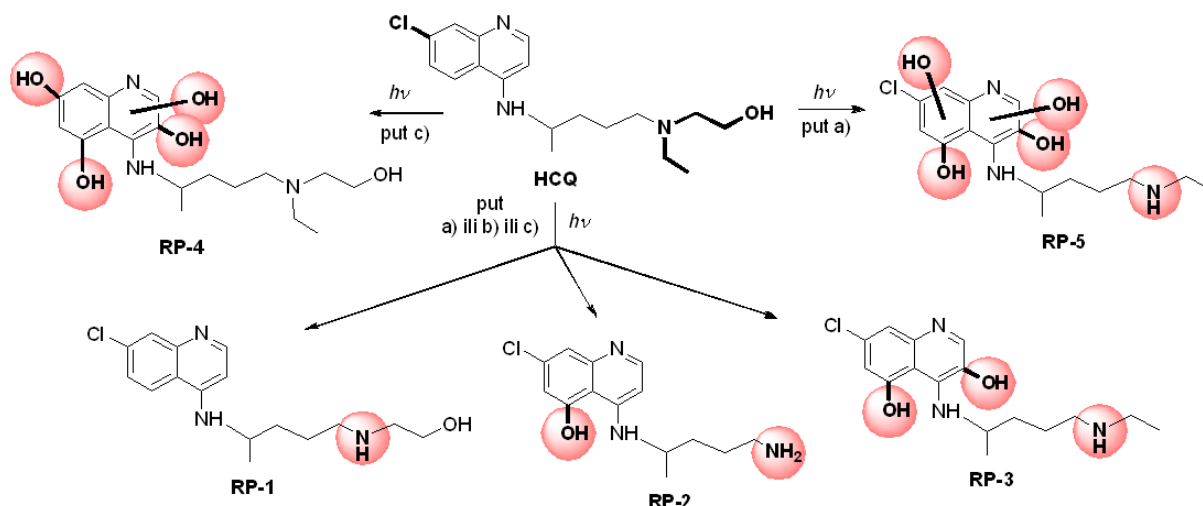
**Slika 41.** Predloženi fragmentacijski putevi razgradnje molekularnog iona hidrosiklorokina ( $m/z = 336$ )

Identifikacija razgradnih produkata omogućena je metodom HPLC-(ESI)-MS/MS i dobivenim saznanjima o vremenima zadržavanja, vrijednostima  $m/z$ , izotopnoj raspodjeli i fragmentacijskim putovima (**tablica 19.**). Razgradni produkti dodatno su analizirani i potvrđeni pomoću  $^1\text{H}$  NMR spektroskopske tehnike.

**Tablica 19.** Rezultati HPLC-MS/MS analize hidroksiklorokina i njegovih fotolitičkih produkata

Kratica	Strukture	<i>m/z</i> - vrijednosti	Vrijeme zadržavanja	Glavni fragmentni ioni	
				<i>m/z</i>	Molekulska formula
<b>HCQ</b>		336	3,1 min	247 179 158	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO
<b>RP-1</b>		308	2,8 min	247 179 130	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>2</sub> C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub> C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> N
<b>RP-2</b>		279	13,3 min	179	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub>
<b>RP-3</b>		324	2,6 min	158	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub> NO
<b>RP-4</b>		368	1,7 min	324	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> ClN <sub>2</sub>
<b>RP-5</b>		356	13,6 min	279	C <sub>14</sub> H <sub>18</sub> ClN <sub>3</sub> O

U radu Babić i sur. [118] pokazano je da nastanak različitih razgradnih produkata fluorokinolona ovisi o uvjetima pri kojima su provedeni eksperimenti fotolize. S obzirom na navedenu činjenicu, a i različitu brzinu razgradnje hidrosiklorokina ovisno o vrijednostima pH, određeni su putovi fotolitičke razgradnje hidrosiklorokina. Putovi razgradnje (**slika 42.**) pokazuju da, ovisno o prisutnim uvjetima, nastaju različiti razgradni produkti.

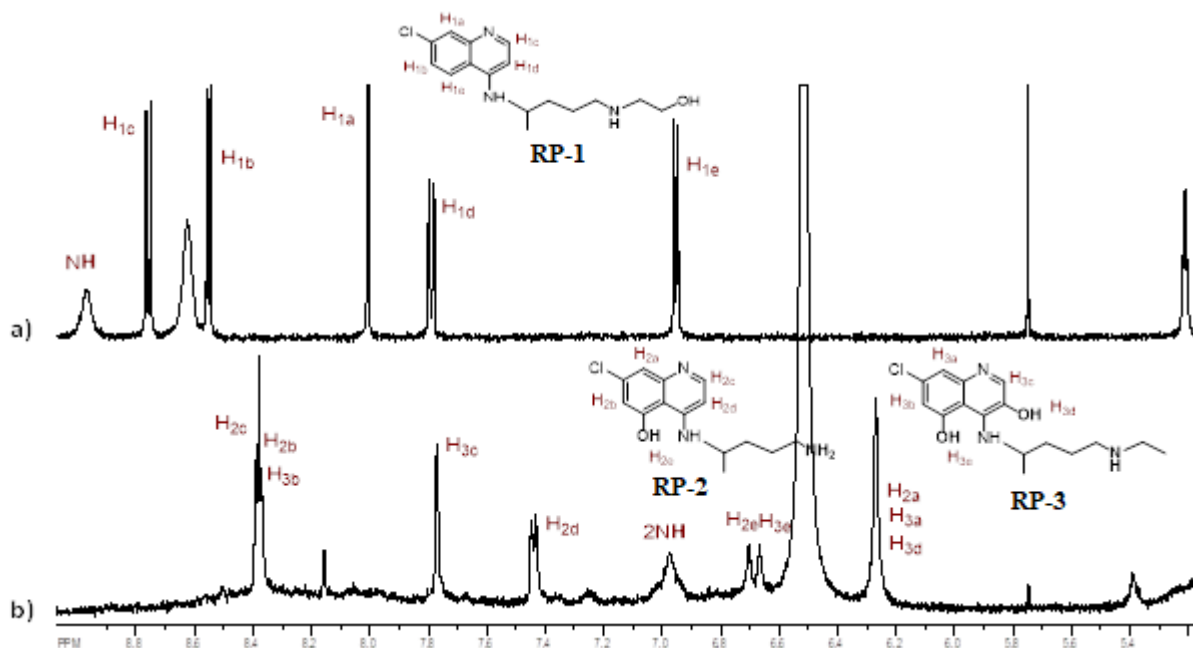


**Slika 42.** Detektirani fotolitički produkti hidrosiklorokina pri pH = 4 (put a), pH = 7 (put b) i pH = 9 (put c)

Važno je uočiti kako pri različitim vrijednostima pH ne nastaju isti razgradni produkti. Vrijednost pH pokazala se kao ključan čimbenik koji utječe na sudbinu i ponašanje hidrosiklorokina u okolišu. Razgradni produkti RP-1, RP-2 i RP-3 nastali su neovisno o pripadajućoj vrijednosti pH (4, 7 i 9) otopine tijekom fotolitičke razgradnje. Razgradni produkt RP-1 dobiven je skraćivanjem bočnog lanca koji je vezan na dušikov atom tako što hidrosiklorokin gubi eten, a to rezultira nastankom desetil-hidrosiklorokina. Produkt RP-2 nastaje primarnim dvostrukim skraćivanjem bočnog lanca na dušikovu atomu (gubitak etilne i hidroksietilne skupine), što dovodi do nastanka amino-skupine, nakon čega slijedi hidroksilacija aromatskog prstena. Tako je kod atenolola uočeno značajnije nastajanje razgradnog produkta pucanjem veze između sekundarnog amina i kinolinskog prstena, dok je kod hidrosiklorokina to manje izraženo.

Nastanak razgradnog produkta RP-3 molekularne mase  $m/z = 323$  posljedica je skraćivanja bočnog lanca i hidroksilacije na kinolinskom prstenu. Točne pozicije položaja na kojima je

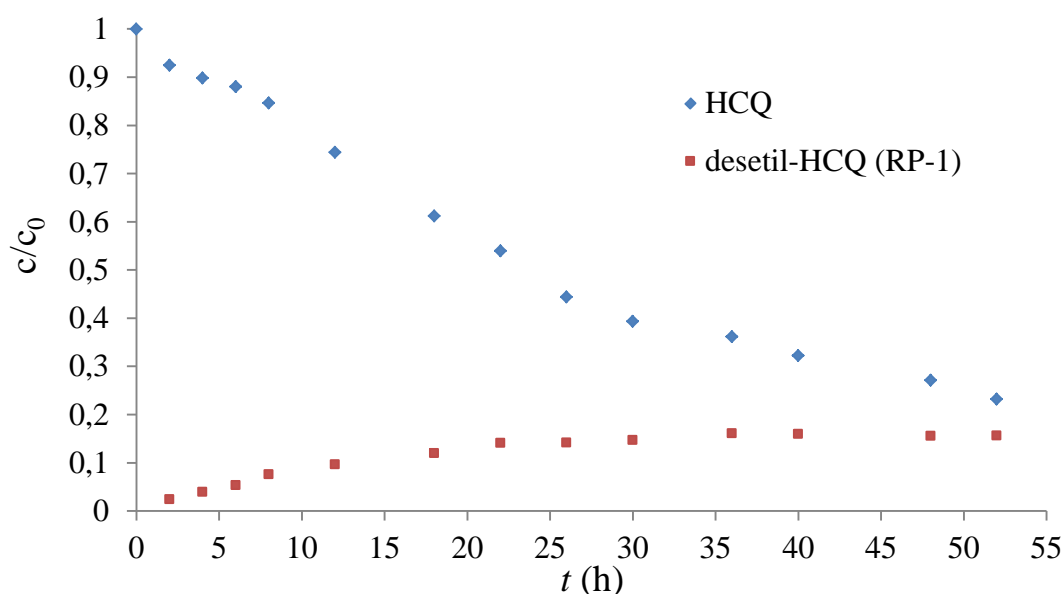
došlo do hidroksilacije ustanovljene su  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom. Jedino za produkt RP-4 nije zamijećen atom klora jer u spektru masa nije uočen karakteristični izotopni signal koji bi ukazivao na njegovo postojanje. Fotorazgradni produkt RP-4 s  $m/z = 368$  nastaje nukleofilnom aromatskom supstitucijom atoma klora hidroksilnom skupinom (solvoliza klora) i višestrukom hidroksilacijom na kinolinskom prstenu na  $\text{pH} = 9$  (put c). Razgradni produkt RP-5 molekularnog iona  $m/z = 356$  (put a) nastaje isključivo na  $\text{pH} = 4$  kao rezultat hidroksilacije aromatskog prstena produkta RP-3 dobivenog u prvom stupnju fotorazgradnje. S obzirom na to da je klor vezan za aromatski prsten, očekivan je proces fotodeklorinacije [284]. Međutim, u primijenjenim fotokemijskim uvjetima relevantnim za okoliš nije došlo do toga te je atom klora ostao i dalje vezan na kinolinski prsten, osim u slučaju produkta RP-4 pri  $\text{pH} = 9$ . Ukupno gledajući, po prvi puta su identificirani razgradni produkti od RP-2 do RP-5 u uvjetima relevantnima za okoliš. Osim što je za produkt RP-4 ujedno i metabolit hidroksiklorokina, zanimljivo je da je on ujedno i razgradni produkt fotolize. Do nukleofilne aromatske supstitucije došlo je jedino u slučaju većih vrijednosti  $\text{pH}$  jer deprotoniranjem smanjuje se udio ioniziranog stanja hidroksiklorokina što dovodi do fotosupstitucije i nastanka produkta RP-4. Također, posebno je zanimljivo da vrijednosti  $\text{pH}$  otopine ne utječu samo na brzinu razgradnje hidroksiklorokina nego i na nastanak različitih produkata. Novonastali produkti mogu imati potpuno različita fizikalno-kemijska i biološka svojstva, što ukazuje na važnost utjecaja vrijednosti  $\text{pH}$  na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina. Strukture razgradnih produkata RP-1 ( $m/z = 308$ ) i RP-2 ( $m/z = 279$ ) dodatno su potvrđene spektroskopski  $^1\text{H}$  NMR (**slika 43.**).



**Slika 43.** (a)  $^1\text{H}$  NMR spektar desetil-hidroksiklorokina (RP-1) u DMSO  $d_6$ , (b) i smjesa RP-2 i RP-3 u DMSO- $d_6$  dobivena pri pH 7 nakon 23 h provođenja fotolize

Na temelju snimljenih  $^1\text{H}$  NMR spektara razgradnih produkata nastalih fotolitičkom razgradnjom hidroksiklorokina i standardne otopine jednog razgradnog produkta (RP-1), potvrđena je struktura RP-1, desetil-hidroksiklorokina. Struktura RP-1 prethodno je potvrđena na temelju vremena zadržavanja, spektra masa te provedene fragmentacije komercijalno dostupnog standarda. Nadalje, strukture razgradnih produkata u smjesi (RP-2, RP-3) također su potvrđene  $^1\text{H}$  NMR spektroskopijom. U aromatskom području od 6,9 i 9,0 nalazi se očekivani broj signala, odnosno četiri dubleta i dva signala za protone  $\text{H}_{1a}$ – $\text{H}_{1e}$  i NH proton. Prema dupliciranim signalima za protone aromatske i heteroaromske jezgre, sličnim kemijskim pomacima, integralima i spregama, NH protonima na heteroaromatskom prstenu, uočene su dvije serije signala vrlo slične strukture. Rečeno također odgovara prethodno pretpostavljenim strukturama produkata RP-2 i RP-3 na temelju spektara masa i provedene fragmentacije. Jedina razlika kod  $^1\text{H}$  NMR spektara odnosi se na postojanje para dubleta prisutnih kod strukture RP-2 u usporedbi sa singletima kod strukture RP-3.

Tijekom fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina ustanovljeno je nastajanje razgradnog produkta  $m/z = 308$ , koji nastaje i kao metabolit u ljudskom tijelu. Upravo zato, moguća je veća prisutnost tog razgradnog produkta u okolišu. Prema **slici 44** može se uočiti da se pri  $\text{pH} = 4$  desetil-hidroksiklorokin nije razgradio nakon 52 h, a to ukazuje da bi mogao biti postojaniji nego hidroksiklorokin. Desetil-hidroksiklorokin u okolišu može nastati fotolitičkom razgradnjom hidroksiklorokina ili može završiti putem postrojenja za obradu otpadnih voda, budući da nastaje u ljudskom tijelu kao metabolit.



**Slika 44.** Profil razgradnog produkta desetil-hidroksiklorokina u odnosu na hidroksiklorokin tijekom fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina ( $300 - 800 \text{ nm}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 4$ ,  $500 \text{ W m}^{-2}$ )



#### 4.1.3. Određivanje toksičnosti hidroksiklorokina i njegovih fotolitičkih produkata

Istraživanja pokazuju da niske razine farmaceutika imaju značajan učinak na vodene organizme, primjerice: na ponašanje riba koje su pokazale agresivno ponašanje [25], na izumiranje supova [26]. Iako se danas mogu pronaći brojna istraživanja vezana uz temu farmaceutika u okolišu, još uvijek je prisutno mnogo nepoznanica. Jedna od njih je ponašanje i sudbina hidroksiklorokina i metoklopramida u okolišu.

Iz prethodnih rezultata fotolitičke razgradnje i provedene identifikacije razgradnih produkata vidljivo je kako vrijednost pH može imati potencijalno značajnu ulogu na postojanost zagađivala i njihovu bioakumulaciju [34, 285]. Razlog tome je što matica također može utjecati na nastanak fotolitičkih produkata s različitim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima u odnosu na produkte nastale izravnom fotolizom. Prema Niu i sur. [264] izravnom fotolizom općenito nastaju razgradni produkti niskog antimikrobnog potencijala. Za reakcije s reaktivnim kisikovim vrstama (primjerice kod sulfonamida) osnovna struktura ostaje netaknuta, što dovodi do postojanja antibakterijske aktivnosti takvih produkata. Slaba postojanost hidroksiklorokina, posebice pri većim vrijednostima pH, ne znači da je hidroksiklorokin eliminiran iz okoliša i da nužno dolazi do smanjenja potencijalne toksičnosti hidroksiklorokina. Naime, primarna eliminacija samo ukazuje na stupanj gubitka početne molekule, a to rezultira nastankom razgradnih ili transformacijskih produkata, koji mogu biti toksični i postojani. S obzirom na to da kraća vremena zadržavanja ukazuju na povećanu hidrofilnost i polarnost nastalih hidroksiliranih produkata hidroksiklorokina, to može uzrokovati smanjenu sorpciju na sediment i bioakumulaciju. Sukladno tome, u okviru ovoga rada provedena su istraživanja akutne toksičnosti i genotoksičnosti.

Akutna toksičnost hidroksiklorokina, smjese hidroksiklorokina i njegovih razgradnih produkata te smjese fotoprodukata ispitana je pomoću *Vibrio fischeri*. Ovo je važno, budući da je za farmaceutike dokazano da se u okolišu nalaze u prisutnosti mnogih drugih spojeva, pri čemu nije zanemariv sinergistički ili aditivni učinak.

Na temelju provedenih mjerenja, može se zaključiti kako ni hidroksiklorokin ni razgradni produkti nisu toksični za ekosustav pri navedenim uvjetima, jer nakon 30 min nije došlo do 50 % inhibicije (**tablica 20.**).

**Tablica 20.** Prikaz luminiscencije prije i nakon provođenja 30 min testa za hidroksiklorokin

<i>Vibrio fischeri</i>	Uzorci tijekom fotolitičke razgradnje						
Vrijeme osvjetljavanja hidroksiklorokina	<b>0 h</b>	4 h	8 h	12 h	24 h	<b>36 h</b>	<b>46 h</b>
% inhibicije luminiscencije	<b>10,96 ± 7,22</b>	6,04 ± 1,71	5,56 ± 3,06	14,32 ± 7,08	13,07 ± 5,89	<b>26,56 ± 6,51</b>	<b>23,84 ± 5,62</b>

Međutim, razgradni produkti utjecali su na smanjenje luminiscencije bakterijske kulture *Vibrio fischeri*, posebno kada je koncentracija hidroksiklorokina bila ispod granice kvantifikacije. Inhibicija luminiscencije prelazila je 20 % kod uzoraka nakon 36 h fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina. Kod navedenih mjerenja nisu postignute vrijednosti EC<sub>50</sub> za uzorke prije osvjetljavanja, odnosno vrijednosti TII za uzorke nakon osvjetljavanja s Xe svjetiljkom. Međutim, za uzorak hidroksiklorokina ( $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) koji je osvjetljavao 36 h inhibicija luminiscencije iznosila je 26,56 %, a za uzorak koji je osvjetljavao 46 h inhibicija je iznosila 23,84 %. Prema rečenom, razgradni produkti mogu djelovati štetno na okoliš. U slučaju veće toksičnosti smjese razgradnih produkata naproksena, u odnosu na sam naproksen, smatra se kako to može biti posljedica gubitka pojedinih kemijskih skupina, čime je omogućeno lakše prodiranje u stanice (zbog manje steričke smetnje [189]), što bi u manjoj mjeri mogao biti slučaj za razgradne produkte hidroksiklorokina. Međutim, ispitivanje kronične toksičnosti za navedene koncentracije može ukazati na stvarniji (primijereniji) utjecaj nastalih fotoprodukata na vodene organizme u okolišu. Njihov nepovoljan učinak može biti još izraženiji, jer se farmaceutici kontinuirano ispuštaju u okoliš pa dolazi do kroničnog utjecaja na određene organizme.

Nije nepoznato da određeni farmaceutici mogu oštetiti genotoksični materijal ljudi i drugih živućih organizama u okolišu [286–288]. Upravo zato se određivanje genotoksičnosti uzoraka voda provodi različitim metodama, među kojima je i test SOS/*umu-c*. Za klorokin, koji je strukturno sličan hidroksiklorokinu, provedena su istraživanja mutagenosti. Prema T. Chatterjee i sur. [289] istraživanja na *Salmonella* sojevima TA97a i TA100 pokazuju da je klorokin slab mutagen s (+S9) i bez metaboličke aktivacije (–S9). Manji mutageni efekt je uočen uz metaboličku aktivaciju, odnosno uz S9. Također, i u istraživanju koje su proveli

E. S. Riccio i sur. [290] klorokin predstavlja minimalni rizik genotoksičnog djelovanja na ljude. Budući da nije poznato nastaju li genotoksični fotolitički produkti hidroksiklorokina, mjerenja su provedena prema testu SOS/*umu-c* s i bez metaboličke aktivacije na soju bakterija *Salmonella typhimurii*. Dakle, ispitivanje citotoksičnog i genotoksičnog utjecaja provedeno je na hidroksiklorokinu i njegovoj smjesi s nastalim fotoproduktima te na smjesi fotoprodukata. Rezultati provedenog testa za standardne otopine hidroksiklorokina te otopina izložene umjetnom Sunčevom zračenju prikazani su u **tablici 21**. Ispitane standardne otopine hidroksiklorokina pri koncentracijama od 6,25 do 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  nisu pokazale genotoksični utjecaj. Također i mjerenja provedena za fotoprodukte hidroksiklorokina ukazuju kako razgradni produkti nisu genotoksični.

**Table 21.** Citotoksični i genotoksični utjecaj hidroksiklorokina i njegovih fotorazgradnih produkata na indukciju SOS-odziva *S. typhimurium* u SOS/*umu-c* testu uz metaboličku aktivaciju (+S9) i bez prisutnosti (–S9) metaboličke aktivacije

	$\gamma$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	–S9		+S9	
		$G^a \pm \text{SD}$	$IR^b \pm \text{SD}$	$G^a \pm \text{SD}$	$IR^b \pm \text{SD}$
kontrola	0	1,00 $\pm$ 0,07	1,00 $\pm$ 0,08	1,00 $\pm$ 0,02	1,00 $\pm$ 0,23
NQNO	0,5	0,72 $\pm$ 0,08	6,17 $\pm$ 1,10	–	–
AFB1	( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) 5 ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	–	–	0,90 $\pm$ 0,04	5,95 $\pm$ 0,37
HCQ	6,25	0,92 $\pm$ 0,01	0,76 $\pm$ 0,12	0,94 $\pm$ 0,09	1,31 $\pm$ 0,35
	12,5	0,96 $\pm$ 0,02	0,80 $\pm$ 0,06	0,94 $\pm$ 0,10	1,11 $\pm$ 0,15
	25	0,94 $\pm$ 0,10	1,00 $\pm$ 0,18	0,90 $\pm$ 0,11	1,25 $\pm$ 0,37
	50	0,94 $\pm$ 0,05	0,72 $\pm$ 0,11	0,84 $\pm$ 0,14	1,17 $\pm$ 0,19
	100	0,95 $\pm$ 0,04	0,86 $\pm$ 0,06	0,88 $\pm$ 0,12	1,16 $\pm$ 0,28
HCQ ( $3,0 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol L}^{-1}$ )	Vrijeme razgradnje (h)	$G \pm \text{SD}$	$IR \pm \text{SD}$	$G \pm \text{SD}$	$IR \pm \text{SD}$
	0	1,09 $\pm$ 0,04	0,88 $\pm$ 0,12	0,99 $\pm$ 0,14	1,15 $\pm$ 0,02
	4	1,00 $\pm$ 0,06	1,16 $\pm$ 0,18	0,98 $\pm$ 0,11	1,25 $\pm$ 0,10
	8	0,95 $\pm$ 0,02	1,41 $\pm$ 0,16	0,96 $\pm$ 0,13	1,37 $\pm$ 0,27
	12	0,99 $\pm$ 0,04	0,92 $\pm$ 0,15	0,98 $\pm$ 0,14	1,12 $\pm$ 0,14
	18	0,98 $\pm$ 0,04	1,02 $\pm$ 0,18	1,00 $\pm$ 0,13	1,12 $\pm$ 0,13
	30	1,04 $\pm$ 0,03	1,20 $\pm$ 0,24	1,06 $\pm$ 0,15	1,05 $\pm$ 0,10
	46	0,99 $\pm$ 0,02	1,12 $\pm$ 0,12	1,03 $\pm$ 0,14	1,15 $\pm$ 0,11

<sup>a</sup> Stopa rasta bakterijskih kolonija ( $G$ ) omjer je broja bakterijskih kolonija u vodenom uzorku i broja bakterijskih kolonija u uzorku kontrole kao čiste vode. Za vrijednost  $G$  manju od 0,5, uzorak se smatra toksičnim za bakterijske kolonije.

<sup>b</sup> Indukcijski omjer ( $IR$ ) je omjer aktivnosti  $\beta$ -galaktozidaze bakterijskih kolonija u uzorku vode i broja bakterijskih kolonija u uzorku kontrole kao čiste vode. Vrijednost  $IR$  veća od 2, smatra se genotoksičnim odgovorom bakterijskih kolonija.

## 4.2. Fotolitička razgradnja metoklopramida

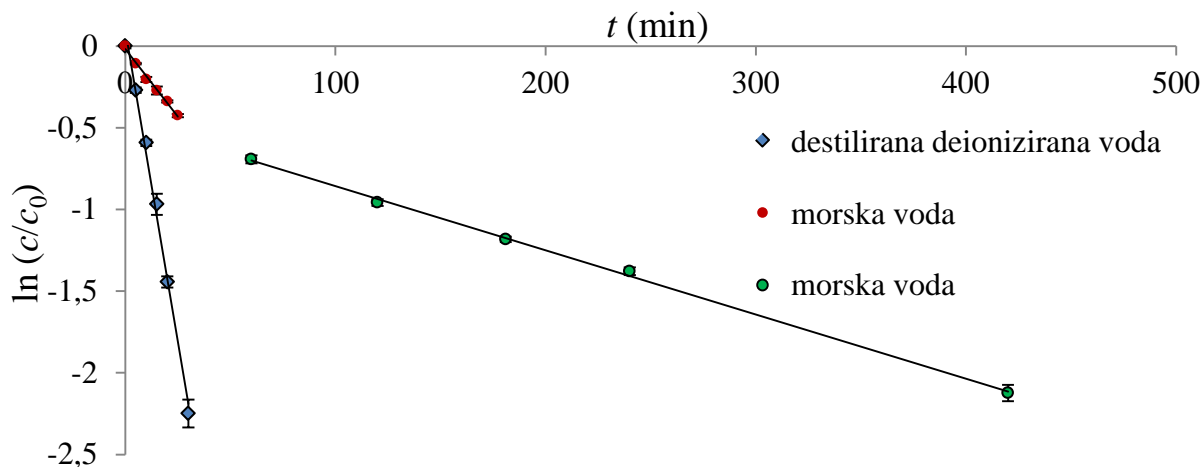
Prema Europskoj farmakopeji, metoklopramid je potrebno zaštititi od Sunčeve svjetlosti kako ne bi došlo do nastanka fotolitičkih produkata. Strukturno gledajući, on pripada skupini supstituiranih derivata benzamida, za koje je karakteristično pucanje veza ugljik-dušik. Također, budući da je na benzamidni prsten vezan atom klora, moguć je i proces fotodekloriranja [291]. Slijedom rečenog, za očekivati je da je metoklopramid podložan brzom fotolitičkoj razgradnji pa je ispitivano njegovo ponašanje u vodama pod utjecajem umjetnog Sunčeva zračenja nižeg intenziteta ( $250 \text{ W m}^{-2}$ ).

Budući da se farmaceutici nalaze u okolišu pri niskim koncentracijama, provedeni su eksperimenti utjecaja početne koncentracije metoklopramida na brzinu njegove razgradnje. Prema rezultatima u **tablici 22** može se zaključiti da se osvijetljavanjem metoklopramida manjih početnih koncentracija smanjuje vrijeme poluraspada. Ubrzana fotolitička razgradnja metoklopramida događa se pri (njegovim) manjim početnim koncentracijama. Međutim, fotolitička razgradnja metoklopramida pri dvostruko manjoj početnoj koncentraciji  $c_0 = 6,35 \cdot 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  u odnosu na  $c_0 = 1,30 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  dovodi do smanjenja vremena poluraspada tek za 0,57 min, dok u slučaju  $c_0 = 1,30 \cdot 10^{-5}$  i  $c_0 = 1,97 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$  razlika vremena poluraspada između navedenih početnih koncentracija iznosi 3,03 min.

**Tablica 22.** Utjecaj početne koncentracije metoklopramida na njegovu fotolitičku razgradnju u destiliranoj deioniziranoj vodi

	$6,35 \cdot 10^{-6}$	$1,30 \cdot 10^{-5}$	$1,97 \cdot 10^{-5}$
$k (\text{min}^{-1}) \cdot 10^3$	$131,8 \pm 1,3$	$118,9 \pm 2,1$	$78,2 \pm 0,2$
$t_{1/2} (\text{min})$	$5,26 \pm 0,05$	$5,83 \pm 0,10$	$8,86 \pm 0,02$
$R^2$	0,9985	0,9954	0,9970

Fotolitička razgradnja metoklopramida ispitana je u uzorcima voda različitog sastava, u: destiliranoj deioniziranoj, izvorskoj, morskoj i riječnoj vodi (**slika 45.**).



**Slika 45.** Fotolitička razgradnja metoklopramida ( $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u različitim vodenim maticama s pripadajućim standardnim odstupanjima ( $n = 3$ )

Vremena poluraspada metoklopramida ( $t_{1/2} = 9,1 \text{ min}$  u destiliranoj deioniziranoj vodi,  $t_{1/2} = 10,5 \text{ min}$  u izvorskoj vodi,  $t_{1/2} = 11,5 \text{ min}$  u riječnoj vodi) pokazuju kako je fotolitička razgradnja metoklopramida izrazito brz proces (**slika 13.P**). U svim eksperimentima linearna regresija ovisnosti  $\ln(c/c_0)$  o vremenu ( $t$ ) pokazuje da je fotolitička razgradnja pseudo-prvog reda s koeficijentom determinacije  $R^2 > 0,95$ , što zadovoljava kriterij prihvatljivosti (**tablica 23.**).

**Tablica 23.** Koeficijenti fotolitičke razgradnje ( $k$ ), vremena poluraspada ( $t_{1/2}$ ) sa standardnim odstupanjima, koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) u različitim vodenim maticama

	Destilirana deionizirana voda	Izvorska voda	Morska voda	Riječna voda
$k (\text{min}^{-1}) \cdot 10^3$	$76,3 \pm 2,2$	$66,0 \pm 0,3$	$16,5 \pm 0,4;$ $3,9 \pm 0,1$	$60,3 \pm 3,4$
$t_{1/2} (\text{min})$	$9,1 \pm 0,26$	$10,5 \pm 0,04$	$42,0 \pm 1,0;$ $176,3 \pm 5,5$	$11,5 \pm 0,64$
$R^2$	0,9954	0,9967	0,9961; 0,9987	0,9934

Kontrolni uzorci potvrđuju kako određena vremena poluraspada odgovaraju isključivo fotolizi. Kinetika pseudo-prvog reda nije uočena kod fotolitičke razgradnje metoklopramida u morskoj vodi. Naime, u morskoj vodi kinetika fotolitičke razgradnje odgovarala je dvoeksponecijalnoj funkciji. Tako je prvih 25 min  $t_{1/2} = 42,0$  min, a nakon toga zabilježeno je usporenje razgradnje, tako da je  $t_{1/2} = 176,3$  min. Primjeri ovakvih razgradnji pronalaze se kod obrade otpadnih voda, jer ozon prvo reagira s drugim prisutnim reaktivnim organskim tvarima, a ne sa zagađivačem (analitom). Nakon nekog vremena reakcija se ubrzava, jer je više ozona dostupno za stvaranje hidroksilnih radikala pa prevladavajuće reagira s analitom [292]. Međutim, kod metoklopramida u morskoj vodi suprotan je slučaj, jer je prva reakcija brža, a tek onda slijedi sporija. Takva kinetika zabilježena je kod oksitetraciklina u lužnatom mediju [285]. Kod fotolitičke razgradnje metoklopramida u morskoj vodi nalaze se bromidni ioni  $\gamma = 66 \text{ mg L}^{-1}$  pa dolazi do nukleofilne supstitucije, kod koje se klor zamjenjuje bromom. Ovo potvrđuje struktura takvog transformacijskog produkta i izotopna raspodjela (**poglavlje 4.2.1.4.**). Također, dodatak bromidnih iona u destiliranu deioniziranu vodu, uz umjetno Sunčevo zračenje, rezultirao je uočavanjem istog transformacijskog produkta. Pretpostavka je da nakon toga dolazi do smanjenja početne koncentracije prisutnih bromida i usporenja razgradnje. Naime, tada utjecaj kloridnih iona dolazi do većeg izražaja pa se uočava 4,2 puta sporija razgradnja.

Nadalje, ispitana je i fotolitička razgradnja metoklopramida u sintetskoj otpadnoj vodi farmaceutske industrije. Sukladno rezultatima izravne i neizravne fotolize, očekivana je sporija razgradnja. Upravo to je i uočeno, razgradnja u sintetskoj otpadnoj vodi približno je dva puta sporija ( $t_{1/2} = 17,1 \pm 0,16$  min) u odnosu na destiliranu deioniziranu vodu.

#### **4.2.1. Utjecaj pH i matice na fotolitičku razgradnju metoklopramida**

Za razliku od hidroksiklorokina, kod kojeg je neizravna fotoliza značajniji proces koji utječe na njegovu razgradnju, kod metoklopramida je to izravna fotoliza. Kako bi se objasnile razlike u vremenima poluraspada, ispitan je utjecaj vrijednosti pH i utjecaji sastava matice (huminskih kiselina, nitrata, klorida, hidrogenkarbonata, sulfata i željezovih(III) iona).

#### 4.2.1.1. Utjecaj pH na brzinu fotolitičke razgradnje i kvantni prinos metoklopramida

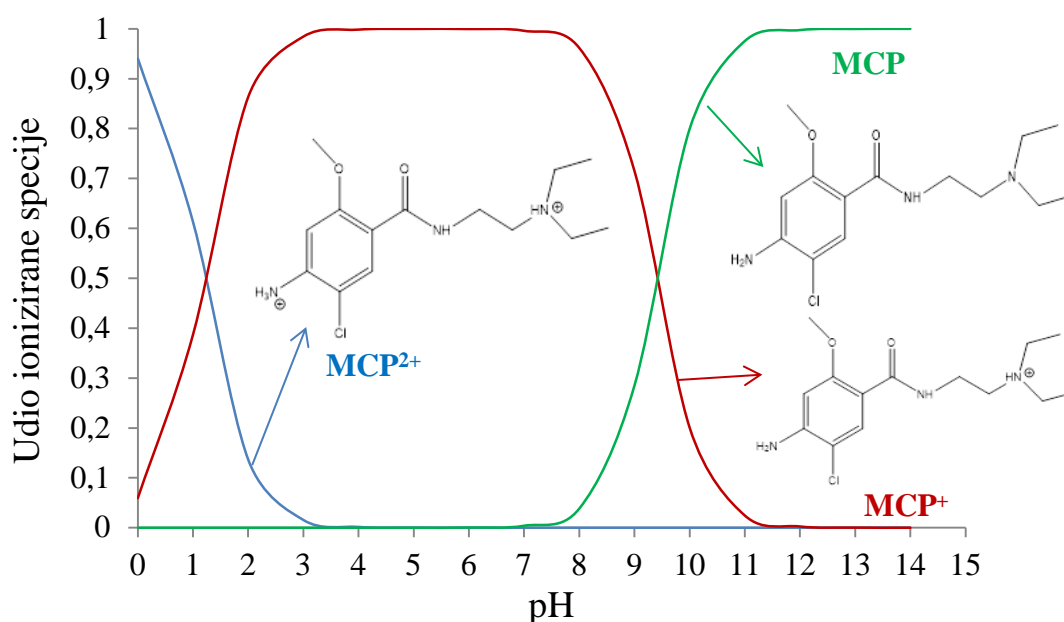
Ispitivanje utjecaja vrijednosti pH vode na fotolitičku razgradnju metoklopramida provedeno je u puferiranim otopinama u rasponu pH 4 – 11. Za razliku od hidroksiklorokina kod kojega je vrijednost pH imala veliki utjecaj na brzinu fotolitičke razgradnje, kod metoklopramida to nije bio slučaj. Koeficijenti brzine reakcije bili su u rasponu  $k = 0,0703$  do  $0,0798 \text{ min}^{-1}$  za pH 4 – 9, osim za pH = 7 gdje je  $k$  bio za 39 % veći nego za pH = 4 (**tablica 24.** i **slika 14.P**). Pri pH = 11 uočena je još sporija razgradnja, čak više od dva puta manja vrijednost  $k$  u odnosu na  $k$  pri pH = 7.

**Tablica 24.** Određeni prividni kvantni prinos, koeficijenti brzine fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $k$ ) sa standardnim odstupanjima ( $n = 3$ , 95 % interval pouzdanosti) i koeficijenti determinacije ( $R^2$ ) pri različitim vrijednostima pH

pH	4	6	7	8	9	11
$\phi_{app} \cdot 10^4$	35,83	36,26	43,55	41,74	30,82	22,98
$k \cdot 10^2$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$7,03 \pm 0,05$	$7,43 \pm 0,10$	$9,78 \pm 0,13$	$7,98 \pm 0,06$	$7,00 \pm 0,05$	$4,40 \pm 0,12$
$t_{1/2}$ (min)	$9,86 \pm 0,06$	$9,33 \pm 0,13$	$7,09 \pm 0,09$	$8,68 \pm 0,06$	$9,90 \pm 0,08$	$15,71 \pm 0,43$
$R^2$	0,9971	0,9912	0,9976	0,9920	0,9873	0,9947

Različita vremena poluraspada posljedica su udjela protoniranih ili deprotoniranih heterocikličkih funkcionalnih skupina metoklopramida. Naime, metoklopramid pripada bazičnim tvarima s izmjerenim vrijednostima  $pK_a$  1,2 i 9,4 [258], što znači da je metoklopramid protoniran kao  $\text{MCP}^+$  pri pH = 4 i pH = 7 (**slika 46.**).





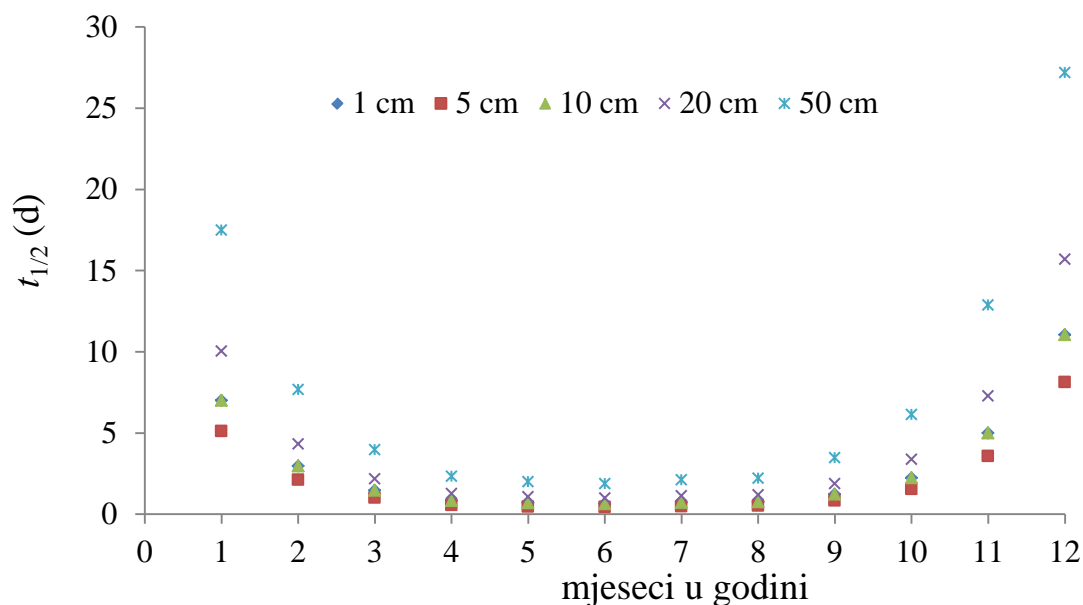
**Slika 46.** Odnos udjela ionizirane specije metoklopramida i vrijednosti pH

Kod pH = 8 je 3,8 % neutralnog oblika metoklopramida, a kod pH = 9 oko 28 %, dok je kod pH = 11 više od 97 % metoklopramida prisutno u neutralnom obliku. Slijedom navedenih podataka, može se zaključiti da je neutralna specija metoklopramida najmanje sklona fotolitičkoj razgradnji ( $t_{1/2} = 15,7$  min). Dakle, brzina razgradnje ovisi o udjelu različitih ioniziranih specija, koje pak ovisi o vrijednostima pH. Posljedično, to može rezultirati različitim kvantnim prinosima. Kako bi se rečeno potvrdilo, određeni su kvantni prinosi razgradnje metoklopramida pri različitim vrijednostima pH, budući da su vrsta i udio pojedine specije u korelaciji s kvantnim prinosom. Rezultati su pokazali da kvantni prinos razgradnje metoklopramida opada s porastom vrijednosti pH. Za pH = 11 kvantni prinos manji je za 55,1 % nego za pH = 8. Veći kvantni prinos ( $\phi = 43,6 \cdot 10^{-4}$ ) dovodi do brže fotolitičke razgradnje pa je kod pH = 7 brža fotolitička razgradnja metoklopramida ( $t_{1/2} = 7,09$  min) nego za druge vrijednosti pH u području 4 – 9. Također, određen je i kvantni prinos metoklopramida u destiliranoj deioniziranoj vodi i iznosio je  $\phi = 39,44 \cdot 10^{-4}$ .

Prema apsorpcijskom spektru metoklopramida, može se uočiti da apsorbira zračenje u području relevantnom za okoliš, a to je pri valnim duljinama većim od 290 nm, pri čemu mu je apsorpcijski maksimum na 310 nm (slika 15.P).

U lužnatoj sredini, posebno pri pH = 11, kod neutralnog oblika metoklopramida, povećana je njegova elektronska gustoća u odnosu na protonirani oblik (MCP<sup>+</sup>). Međutim, to nije (kao kod

hidroksiklorokina) rezultiralo bržom razgradnjom nego je fotolitička razgradnja bila sporija pri većim vrijednostima pH. Sporija razgradnja metoklopramida pri većim vrijednostima pH može biti i posljedica manje apsorpcije. Prema tome, rezultati su pokazali da vrijednost pH ne utječe značajno na fotolitičku razgradnju metoklopramida, osim za  $\text{pH} = 11$ . Iako se razgradnja u otpadnim vodama uglavnom provodi u kiselom mediju, ovo može biti važno kod razgradnje u industrijskim otpadnim vodama. Kao što je navedeno u **poglavlju 3.3.9.**, na isti način su određeni i kvantni prinosi razgradnje metoklopramida. Međutim, u ovom slučaju primijenjene su manje vrijednosti intenziteta zračenja ( $250 \text{ W m}^{-2}$ ). To odgovora ukupnoj ozračenosti (UV dozi) od  $22 \text{ W m}^{-2}$  za područje 300–400 nm, što je karakteristično za oblačni dan tijekom jutarnjih i poslijepodnevni sati za vrijeme sunčanog dana na mediteranu ili za vrijeme sunčanog dana u podne pri većim geografskim širinama [145]. Na temelju kvantnog prinosa u programu ABIWAS procijenjen je utjecaj dubine vode i godišnjeg doba (mjeseca u godini) na vrijeme poluraspada metoklopramida u destiliranoj vodi (**slika 47.**). Može se uočiti da ukoliko neizravna fotoliza nije od primarnog utjecaja (kao u slučaju metoklopramida), onda dubina vode ima dominantnu ulogu na njegovu razgradnju.



**Slika 47.** Vremena poluraspada metoklopramida u ovisnosti o mjesecu u godini i dubini vode

#### 4.2.1.2. Utjecaj huminskih kiselina na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

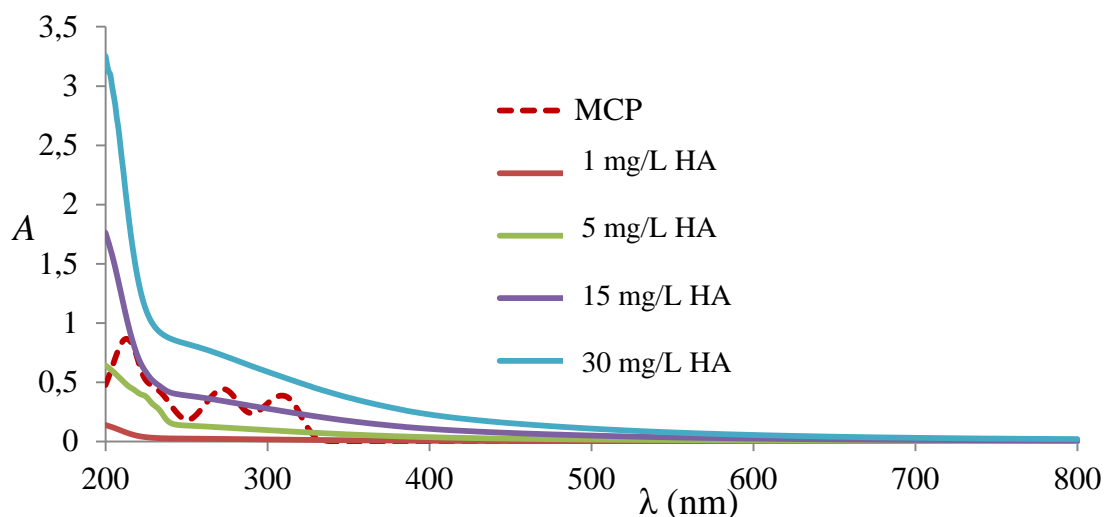
Fotolitička razgradnja metoklopramida provedena je s različitim koncentracijama huminskih kiselina otopljenih u destiliranoj deioniziranoj vodi. Cilj je istražiti utjecaj huminskih kiselina na razgradnju metoklopramida pod utjecajem Sunčeva zračenja. Dok je u slučaju hidroksiklorokina uočeno dvostrano djelovanje huminskih kiselina, kod metoklopramida to nije bio slučaj. Huminske kiseline usporile su razgradnju metoklopramida, tim više što je koncentracija huminskih kiselina bila veća (**tablica 25.** i **slika 16.P.**).

**Tablica 25.** Utjecaj huminskih kiselina na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$	$R^2$
MCP	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$76,3 \pm 2,2$	$9,1 \pm 0,26$	0,9954
huminske kiseline	$1 \text{ mg L}^{-1}$	$56,7 \pm 0,3$	$12,2 \pm 0,07$	0,9758
	$5 \text{ mg L}^{-1}$	$52,6 \pm 0,5$	$13,2 \pm 0,12$	0,9780
	$15 \text{ mg L}^{-1}$	$34,4 \pm 1,2$	$20,2 \pm 0,67$	0,9893
	$30 \text{ mg L}^{-1}$	$26,5 \pm 0,3$	$26,2 \pm 0,26$	0,9939

U prisutnosti huminskih kiselina ( $\gamma = 30 \text{ mg L}^{-1}$ ) vrijeme poluraspada metoklopramida iznosilo je  $t_{1/2} = 27 \text{ min}$  što je 2,2 puta sporije nego uz huminske kiseline manje koncentracije ( $\gamma = 1 \text{ mg L}^{-1}$ ).

Rezultat usporevanja fotolitičke razgradnje posljedica je apsorpcije UV-Vis zračenja huminskih kiselina (**slika 48.**). Kako bi se ustanovio doprinos zasjenjenja svjetlosti na metoklopramid, određeni su parametri  $S_{\Sigma\lambda}$ . Oni upućuju na to da bi fotolitička razgradnja trebala biti sporija, zbog prisutnosti huminskih kiselina u prirodnim vodama, ukoliko nema drugih utjecaja.



**Slika 48.** Prikaz preklapljenih apsorpcijskih spektara otopina metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ) s huminskim kiselinama ( $\gamma = 1 - 30 \text{ mg L}^{-1}$ )

Može se uočiti da za metoklopramid prevladava efekt zasjenjenja. Sukladno tome, povećanje koncentracije huminskih kiselina dovodi do smanjenja  $S_{\Sigma\lambda}$ . Rezultat toga je sporija izravna fotolitička razgradnja metoklopramida. Međutim, eksperimentalno se vrijednosti koeficijenata brzine fotolitičke razgradnje metoklopramida uz huminske kiseline, razlikuju od onih dobivenih množenjem koeficijenta brzine razgradnje metoklopramida u destiliranoj deioniziranoj vodi s faktorom zasjenjenja (**tablica 26.**). Ipak, ta manja odstupanja mogu biti i posljedica ubrzanja drugih učinaka huminskih kiselina (poput nastanka singletnog kisika ili tripletnog stanja).

**Tablica 26.** Utjecaj zasjenjenja huminskih kiselina ( $\gamma = 1, 5, 15$  i  $30 \text{ mg L}^{-1}$ ) na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )

$S_{\Sigma\lambda(300-360 \text{ nm})}$	MCP + HA	$k_{(\text{MCP u destiliranoj deioniziranoj vodi})} \cdot 10^3 S_{\Sigma\lambda} (\text{min}^{-1})$	$k_{(\text{HCO}_s \text{ HA})} \cdot 10^3 (\text{min}^{-1})$
0,817	MCP + HA ( $1 \text{ mg L}^{-1}$ )	62,3	$56,7 \pm 0,3$
0,745	MCP + HA ( $5 \text{ mg L}^{-1}$ )	56,8	$52,6 \pm 0,1$
0,610	MCP + HA ( $15 \text{ mg L}^{-1}$ )	46,5	$34,4 \pm 1,2$
0,451	MCP + HA ( $30 \text{ mg L}^{-1}$ )	34,4	$25,7 \pm 1,5$

#### 4.2.1.3. Utjecaj nitrata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

Koeficijenti brzine fotolitičke razgradnje metoklopramida dobiveni osvjetljavanjem otopine metoklopramida uz prisutnost nitrata (**tablica 27.** i **slika 17.P**) ukazuju da nitrati utječu na razgradnju metoklopramida (zbog apsorpcije svjetlosti nitrata), ali ne u toj mjeri kao huminske kiseline kod kojih je razgradnja još sporija. Dakle, prisutnost nitrata usporava razgradnju metoklopramida, što je u suprotnosti s utjecajem nitrata na hidroksiklorokin.

**Tablica 27.** Utjecaj nitrata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $c_0 = 3,0 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$	$R^2$
MCP (destilirana deionizirana voda)	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$76,3 \pm 2,2$	$9,1 \pm 0,26$	0,9954
nitrati	$6 \text{ mg L}^{-1}$	$66,8 \pm 1,6$	$10,4 \pm 0,25$	0,9972
	$95 \text{ mg L}^{-1}$	$66,7 \pm 2,9$	$10,4 \pm 0,44$	0,9938
	$190 \text{ mg L}^{-1}$	$66,9 \pm 1,4$	$10,4 \pm 0,21$	0,9965
	$380 \text{ mg L}^{-1}$	$59,0 \pm 4,3$	$11,8 \pm 0,83$	0,9912

Jedino je pri velikim koncentracijama nitrata ( $\gamma = 380 \text{ mg L}^{-1}$ ) razgradnja za 13 % sporija u odnosu na preostale (niže) koncentracije nitrata ( $\gamma = 6 - 190 \text{ mg L}^{-1}$ ) te 29,7 % sporija u odnosu na razgradnju bez prisutnih nitrata. Bez obzira što su nitrati prisutni u različitim uzorcima voda i imaju važnu ulogu u razgradnji farmaceutika, može se zaključiti da njihov značaj nije toliko velik u razgradnji metoklopramida. To doprinosi većem utjecaju izravne nego neizravne fotolize.

#### 4.2.1.4. Utjecaj klorida, bromida i sulfata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

Znatno sporija fotolitička razgradnja metoklopramida u morskoj vodi upućuje kako sastav morske vode u tome ima značajnu ulogu. Pretpostavka je da kloridi, bromidi ili sulfati, među najprisutnijim anionima u morskoj vodi, utječu na brzinu fotolitičke razgradnje pa je ispitan njihov utjecaj.

Najveća razlika u sastavu riječne i izvorske u odnosu na morsku vodu, odnosi se na koncentraciju klorida, sulfata i bromida, što je vidljivo u **tablici 5**. Kao što je prethodno navedeno, za kloridne ione poznato je da mogu imati višestruku ulogu na fotokemijsko ponašanje organskih zagađivala. Budući da kloridni ioni zajedno s natrijevim ionima (općenito) čine približno 91 % svih iona prisutnih u morskoj vodi [293], vrlo je vjerojatno da su upravo oni odgovorni za sporiju razgradnju metoklopramida. Upravo zato su sljedeći eksperimenti obuhvaćali ispitivanje utjecaja koncentracije kloridnih iona ( $\gamma = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ,  $1\,000 \text{ mg L}^{-1}$  i  $22\,000 \text{ mg L}^{-1}$ ). Rezultati ukazuju da kloridi smanjuju koeficijent brzine fotolitičke razgradnje metoklopramida i time povećavaju vrijeme poluraspada (**tablica 28.** i **slika 18.P**).

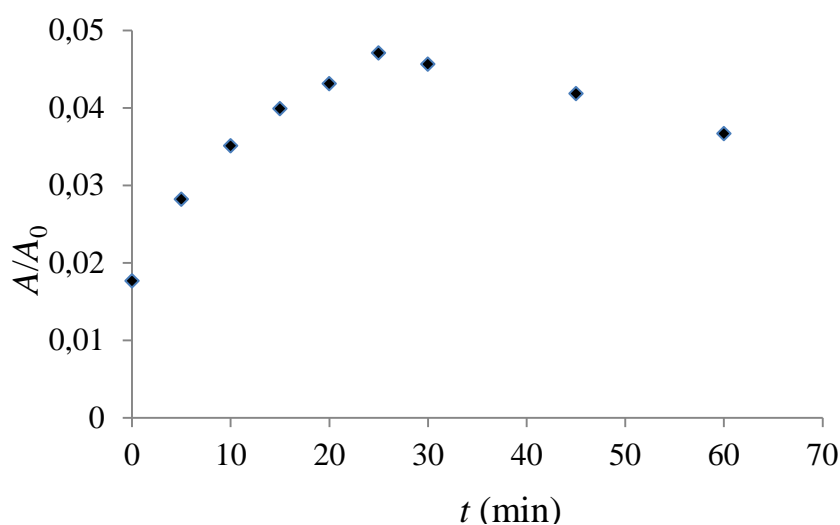
**Tablica 28.** Utjecaj klorida, bromida i sulfata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$	$R^2$
MCP (destilirana deionizirana voda)	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$76,3 \pm 2,2$	$9,1 \pm 0,26$	0,9954
kloridi	$10 \text{ mg L}^{-1}$	$65,1 \pm 1,0$	$10,7 \pm 0,15$	0,9633
	$1000 \text{ mg L}^{-1}$	$32,3 \pm 2,1$	$21,5 \pm 1,4$	0,9982
	$22000 \text{ mg L}^{-1}$	$4,5 \pm 0,06$	$152,9 \pm 1,93$	0,9996
bromidi	$66 \text{ mg L}^{-1}$	$64,8 \pm 0,7$	$10,7 \pm 0,11$	0,9883
sulfati	$3200 \text{ mg L}^{-1}$	$74,9 \pm 1,3$	$9,26 \pm 0,16$	0,9883

Putovi razgradnje metoklopramida su: gubitak klora i hidroksilacija aromatskog prstena. Pretpostavka je da kloridi usporavaju fotolitičku razgradnju zbog velikog suviška kloridnih iona. Sporija solvoliza klora moguća je iz više razloga, budući da nastanak radikalnih aniona  $\text{Cl}_2^{\bullet-}$  može utjecati na nekoliko načina, primjerice: u prijenosu elektrona, oduzimanju vodika i prijenosu halogenog atoma. Posljedično, istraživanja pokazuju kako je fotokloriranje aromatskih spojeva karakteristično za morsku vodu, a osim toga, mogu nastati i fotokemijske specije željeza i klora, te broma (npr.  $\text{FeBr}^{2+}$ ,  $\text{FeCl}^{2+}$  itd.). One svojom reaktivnošću mogu

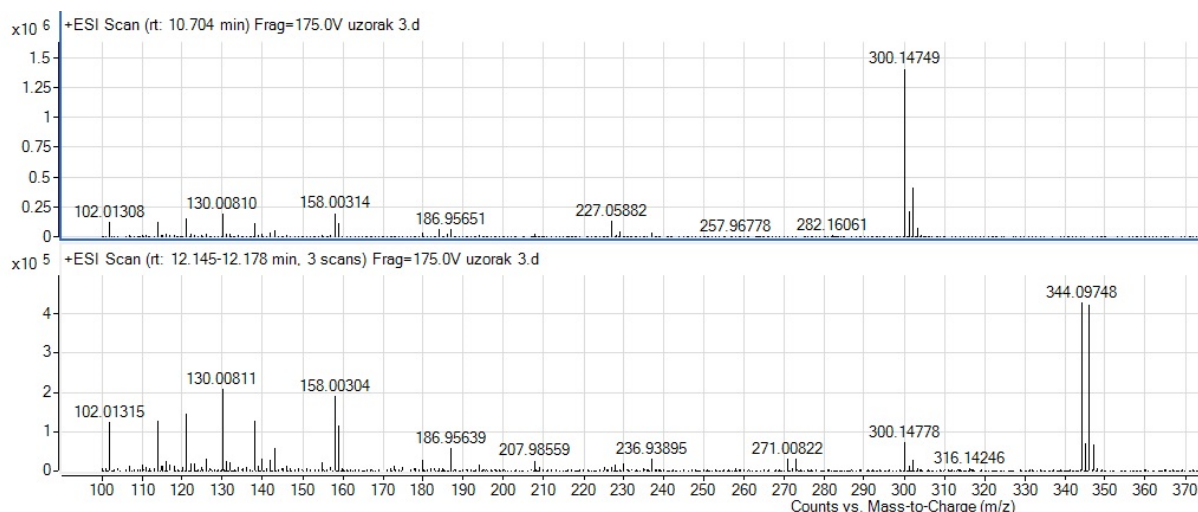
utjecati na fotokemiju metoklopramida. Na primjeru fenola pokazan je njihov utjecaj, pri čemu  $\text{FeBr}^{2+}$  može apsorbirati i u vidljivom području [172].

Osim kloridnih iona, ispitan je utjecaj sulfata (**slika 19.P**) i bromida (**slika 20.P**). Ustanovljeno je da sulfati ( $\gamma = 3200 \text{ mg L}^{-1}$ ) ne utječu na razgradnju (**tablica 28.**). Sukladno tome, ionska jakost nije posebno razmatrana kao čimbenik koji bi utjecao na usporenje razgradnje. Za razliku od sulfata, bromidi, s praktičkog stajališta, imaju značajnu ulogu u razgradnji metoklopramida. Međutim, ono što se uočava u proučavanju njihovog utjecaja nije razgradnja metoklopramida nego transformacija. Prikaz nastajanja transformacijskog produkta, praćenjem površine kromatografske krivulje, vidljiv je na **slici 49**.



**Slika 49.** Nastanak transformacijskog produkta (TP) tijekom fotolitičke razgradnje metoklopramida, uz prisutnost bromidnih iona

Naime, kod identifikacije razgradnih produkata uočena je kromatografska krivulja duljeg vremena zadržavanja ( $t_R = 12,178 \text{ min}$ ) nego za metoklopramid ( $t_R = 10,704 \text{ min}$ ), što je snimljeno na instrumentu visoke razlučivosti (spregnutim kvadripolnim spektrometrom masa s analizatorom masa koji mjeri vrijeme leta, u farmaceutskoj tvrtki PLIVA). Spektar masa za  $m/z = 344,0975$  pokazuje izotopnu raspodjelu karakterističnu za brom (**slika 50.**). U takvim uvjetima dolazi do supstitucije broma klorom.



**Slika 50.** Spektri masa za metoklopramid ( $m/z = 300,1475$ ) i transformacijski produkt koji sadrži brom ( $m/z = 344,0975$ ) te njegova pripadajuća izotopna raspodjela

#### 4.2.1.5. Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

S obzirom na to da hidroksilni radikali ne utječu na fotolitičku razgradnju metoklopramida, pretpostavljeno je da ni hidrogenkarbonati neće utjecati na njegovu razgradnju. Pokazalo se da hidrogenkarbonati usporavaju fotolitičku razgradnju metoklopramida. Ovaj utjecaj značajniji je tek pri velikim koncentracijama hidrogenkarbonata ( $\gamma(\text{HCO}_3^-) = 320 \text{ mg L}^{-1}$ ) (tablica 29. i slika 21.P).

**Tablica 29.** Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$	$R^2$
MCP (destilirana deionizirana voda)	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$76,3 \pm 2,2$	$9,1 \pm 0,26$	0,9954
hidrogenkarbonati	$25 \text{ mg L}^{-1}$	$64,9 \pm 0,6$	$10,7 \pm 0,09$	0,9965
	$160 \text{ mg L}^{-1}$	$59,9 \pm 0,1$	$11,6 \pm 0,01$	0,9982
	$320 \text{ mg L}^{-1}$	$51,6 \pm 0,6$	$13,4 \pm 0,02$	0,9978



Razlog sporijoj fotolitičkoj razgradnji može biti povećana vrijednost pH uslijed veće koncentracije hidrogenkarbonata (pH = 7,17 za  $\gamma(\text{HCO}_3^-) = 25 \text{ mg L}^{-1}$ , pH = 7,55 za  $\gamma(\text{HCO}_3^-) = 160 \text{ mg L}^{-1}$ , pH = 8,26 za  $\gamma(\text{HCO}_3^-) = 320 \text{ mg L}^{-1}$ ).

#### 4.2.1.6. Utjecaj željezovih(III) iona na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

Željezovi(III) ioni dodani su u otopinu metoklopramida kako bi se ispitaio njihov utjecaj na fotolitičku razgradnju metoklopramida u destiliranoj deioniziranoj vodi (**tablica 30** i **slika 22.P**).

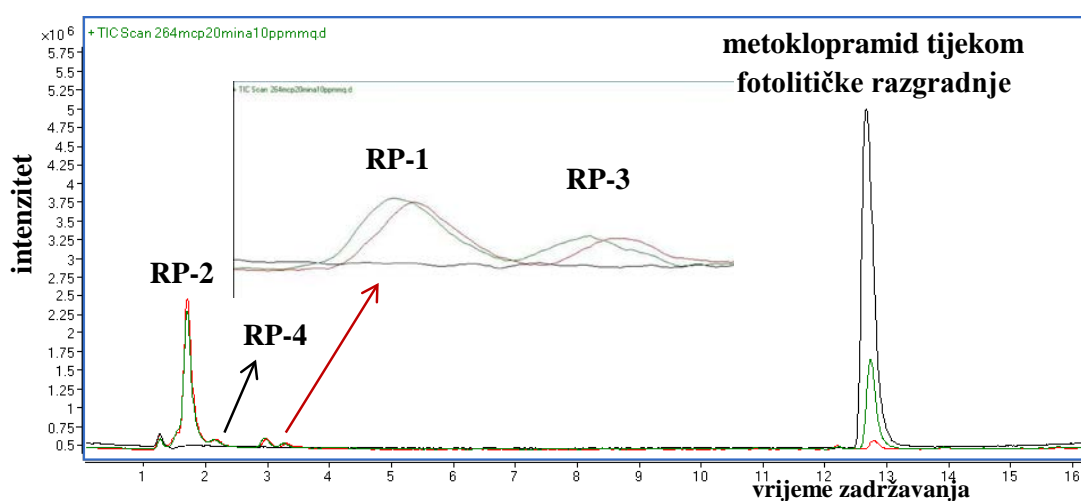
**Tablica 30.** Utjecaj željezovih(III) iona na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

Sastav vode	Koncentracija	$k \cdot 10^3 \text{ (min}^{-1}\text{)}$	$t_{1/2} \text{ (min)}$	$R^2$
MCP (destilirana deionizirana voda)	$3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$	$76,3 \pm 2,2$	$9,1 \pm 0,26$	0,9954
željezo(III)	$10 \text{ mg L}^{-1}$	$122,3 \pm 1,4$	$5,7 \pm 0,06$	0,9996

Kao i za hidroksiklorokin, fotolitička razgradnja metoklopramida ubrzana je željezovim(III) ionima ( $\gamma = 10 \text{ mg L}^{-1}$ ). Nakon dodatka željezovih iona u otopinu metoklopramida, zbog hidrolize  $\text{Fe}(\text{OH})_2^{3+}$  iona, pH iznosio je 3,17. Rezultat ubrzane razgradnje može biti pripisan fotoreaktivnoj speciji  $\text{Fe}(\text{OH})^{2+}$ . Željezovi(III) ioni mogu kompleksirati s metoklopramidom, a tome pridonose supstituenti (poput dušika na podužem bočnom lancu te benzamidni prsten), jer dolazi do pomaka apsorpcije svjetlosti prema većim valnim duljinama. Zanimljivo je primijetiti kako i metalni ioni također utječu na fotolitičku razgradnju farmaceutika. Posebno je ovo značajno za one farmaceutike koji ne sadrže kromoforne skupine, primjerice za makrolide [177].

#### 4.2.2. Identifikacija razgradnih produkata i putovi razgradnje metoklopramida

Rezultat fotolitičke razgradnje metoklopramida može se zamijetiti kao smanjenje njegove koncentracije i nastajanje novih kromatografskih krivulja na kromatogramima tijekom i nakon fotolitičke razgradnje metoklopramida. Na kromatogramu (**slika 51.**) vidljivo je kako nastali razgradni produkti imaju kraća vremena zadržavanja, što ukazuje da fotolizom nastaju polarniji produkti.

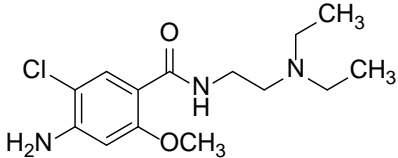
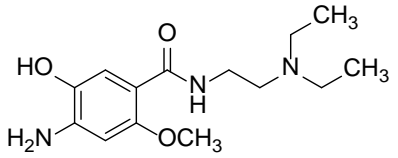
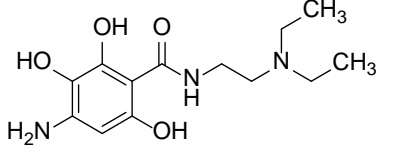
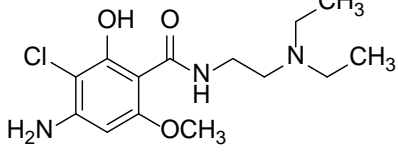
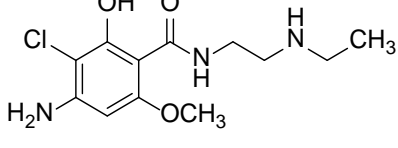


**Slika 51.** Kromatogram standarda metoklopramida i njegovih razgradnih produkata nastalih nakon fotolitičke razgradnje (vrijeme osvjetljavanja 5, 20 i 45 minuta)

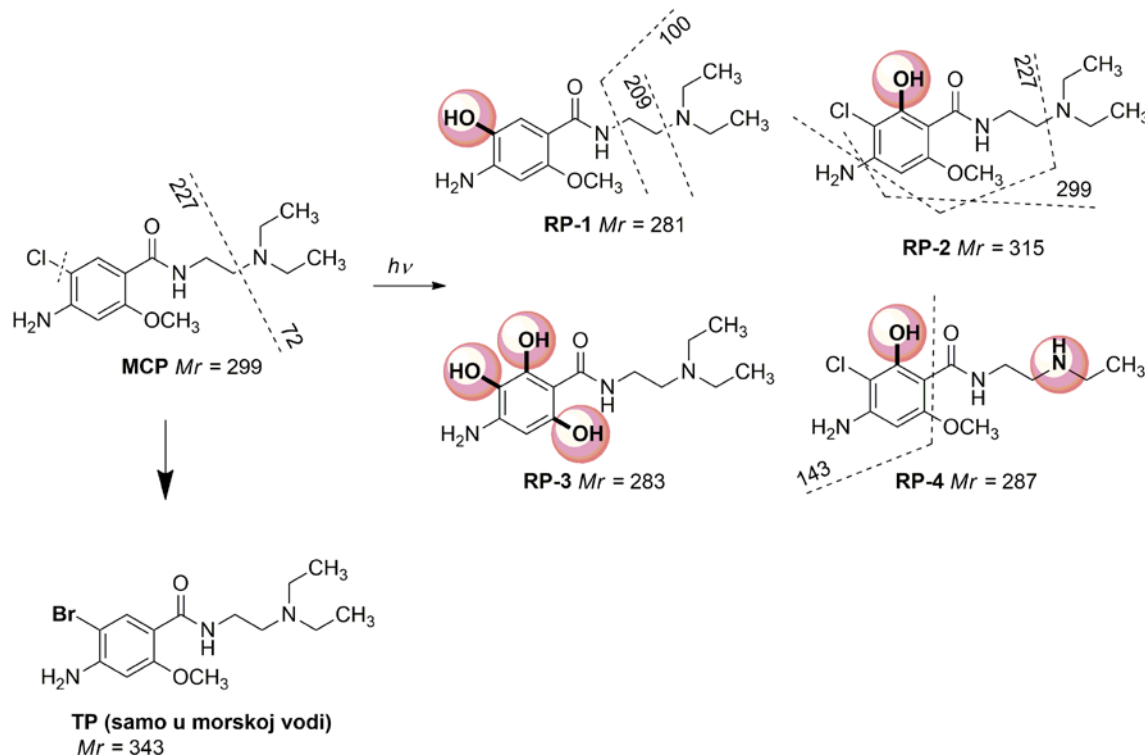
Nakon utvrđivanja mogućih produkata fotolitičke razgradnje metoklopramida, uslijedila je njihova fragmentacija. Fragmentni ioni dobiveni tehnikom ESI-MS/MS prikazani su u **tablici 31.** Također, za dodatnu potvrdu upotrijebljen je i instrument visoke razlučivosti (spregnuti kvadripolni analizator masa i analizator masa s vremenskim preletom iona (Q-ToF)). Na temelju prikupljenih informacija, pretpostavljene su strukture nastalih razgradnih produkata. U prilogu (**slika 23.P**) dan je i kromatogram razgradnih produkata metoklopramida koji su nastali tijekom fotolitičke razgradnje pri  $\text{pH} = 11$ . U okviru ovoga rada nije toliko relevantno koji razgradni produkti nastaju pri vrijednosti  $\text{pH} = 11$ , budući da je pozornost usmjerena na prirodne vode (uobičajeno u okolišu vrijednosti  $\text{pH}$  nisu veće od 9). Ipak, za industrijske otpadne vode može biti korisno uočiti nastanak većeg broja

razgradnih produkata različitih vremena zadržavanja i (većih) masa (poput 454; 340,7; 397,3; 510,6). Nastali razgradni produkti mogu biti skloniji bioakumulaciji [294], uz pretpostavku da su takvi produkti hidrofobniji zbog većeg vremena zadržavanja u odnosu na početnu komponentu na koloni C18; stoga imaju i veće vrijednosti  $\log K_{ow}$ .

**Tablica 31.** Rezultati HPLC-MS/MS analize metoklopramida i njegovih fotolitičkih produkata

Kratica	Strukture	Vrijednosti <i>m/z</i>	Vrijeme zadržavanja	Glavni fragmentni ioni
				<i>m/z</i>
<b>MCP</b>		300,1472	16,674 min	209; 183; 100
<b>RP-1</b>		282,1810	3,124 min	209; 143
<b>RP-2</b>		283,1292	3,548 min	210; 143
<b>RP-3</b>		287	2,178 min	196; 214; 143
<b>RP-4</b>		315	1,705 min	258; 298

Na **slici 52** prikazana je shema fragmentacije molekularnog iona metoklopramida ( $m/z = 300$ ) na kojoj se može uočiti da se glavni fragmentacijski putovi odnose na gubitak alkilnih grupa vezanih na dušikov atom i hidroksilaciju benzamidnog prstena.

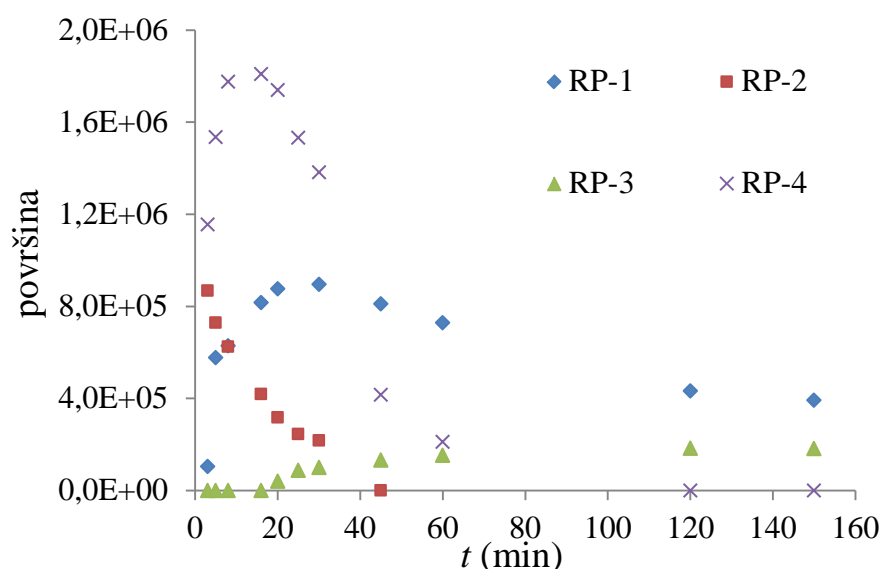


**Slika 52.** Strukture metoklopramida i njegovih razgradnih produkata nastalih fotolitičkom razgradnjom pri  $250 \text{ W m}^{-2}$  tijekom 150 min osvjetljavanja u destiliranoj deioniziranoj vodi i području pH 4 – 9

Na **slici 52** prikazane su strukture uočenih razgradnih produkata, a na **slici 24.P** pripadajući spektri masa. Prvi produkt veće mase ( $m/z = 315$ ) od mase početnog metoklopramida ( $m/z = 300$ ) odgovara produktu hidroksiliranja aromatskog prstena početne molekule metoklopramida. Druga dva fotorazgradna produkta manje mase ( $m/z = 283$  i  $m/z = 282$ ) od početne ( $m/z = 300$ ) nastala su nukleofilnom supstitucijom klora i/ili metoksi-skupine hidroksi-skupinom. Razgradni produkt RP-4 ( $m/z = 287$ ) odgovara rezultatu hidroksilacije benzamidnog prstena i dealkilacije etilne skupine na terciarnom amino-ostatku. Evidentno je da metoklopramid u uvjetima izravnog osvjetljavanja podliježe reakcijama karakterističnim za fotokemiju supstituiranih aromatskih spojeva. Rezultat toga su hidroksilirani derivati metoklopramida. Nakon fotolitičke razgradnje metoklopramida u destiliranoj deioniziranoj vodi (vrijeme osvjetljavanja 60 min), provedena je ekstrakcija čvrstom fazom, poslije čega je

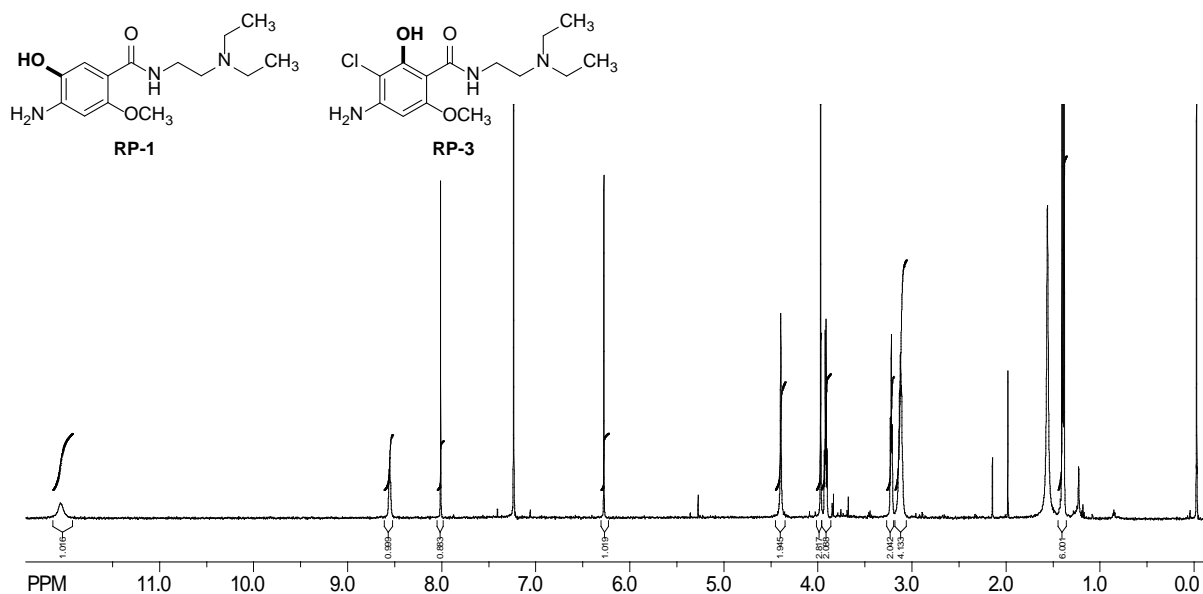
otopina uparena i koncentrirana. To je omogućilo uočavanje sporednog razgradnog produkta,  $m/z = 266$ , čiji se spektar masa može vidjeti na **slici 25.P**. Prema izotopnoj raspodjeli, može se uočiti da navedeni razgradni produkt ne sadrži klor, što znači da nastaje fotodekloriranjem metoklopramida. Također, na **slici 52** navedena je i struktura transformacijskog produkta koji nastaje u morskoj vodi kao posljedica nukleofilne supstitucije klora bromom.

Na **slici 53** prikazani su profili nastajanja i razgradnje fotoprodukata metoklopramida. Može se uočiti da je nakon početnog povećanja (do 60 min) koncentracija RP-3 ostala stalna, a RP-1 se polagano smanjivala.



**Slika 53.** Profili razgradnih produkata metoklopramida nastalih njegovom fotoličkom razgradnjom u destiliranoj deioniziranoj vodi tijekom 150 min na  $250 \text{ W m}^{-2}$

Iz  $^1\text{H}$  NMR spektra koji je snimljen u  $\text{CDCl}_3$  (**slika 54.**) vidljivo je kako je prisutan jedan glavni spoj (prema **slici 54** to bi mogao biti produkt RP-1 ili RP-3) i još neki razgradni spoj u tragovima. Broj signala, integrali i kemijski pomaci mogu se pripisati ili jednom ili drugom razgradnom spoju. Za dodatnu potvrdu, provjerena je izotopna raspodjela te je utvrđeno da nije prisutan klor i da se radi o produktu RP-1.



**Slika 54.**  $^1\text{H}$  NMR spektar fotolitičke smjese metoklopramida u destiliranoj deioniziranoj vodi nakon 150 min osvjetljavanja pri  $250 \text{ W m}^{-2}$

#### 4.2.3. Određivanje toksičnosti metoklopramida i njegovih fotolitičkih produkata

Literaturnim pregledom uočeno je i da nema dostupnih saznanja o akutnoj toksičnosti fotoprodukata metoklopramida, stoga je određivanje akutne toksičnosti na bakterijama *Vibrio fischeri* provedeno je s otopinama metoklopramida, sa smjesom metoklopramida i njegovih razgradnih produkata te s razgradnim produktima. Rezultati određivanja akutne toksičnosti prikazani su u **tablici 32**.

**Tablica 32.** Prikaz luminiscencije prije i nakon provođenja 30 min testa za metoklopramid ( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ )

<i>Vibrio fischeri</i>	Standard	Uzorki tijekom fotolitičke razgradnje					
Vrijeme osvjetljavanja metoklopramida	0 min	10 min	20 min	30 min	45 min	60 min	180 min
% inhibicije luminiscencije	1,96 ± 1,69	1,65 ± 1,72	-1,44 ± 2,38	0,08 ± 0,24	-0,97 ± 2,43	0,02 ± 0,02	6,14 ± 1,23

Metoklopramid nije, u odnosu na hidrosiklorokin i njegove razgradne produkte, niti u jednom slučaju prouzročio smanjenje luminiscencije. Tijekom mjerenja provedena je korekcija na obojanost, jer fotolitičkom razgradnjom metoklopramida dolazi do obojenja otopine (**slika 26.P**). Prikupljeni rezultati ukazuju da metoklopramid i njegovi razgradni produkti, pri mjerenim uvjetima, nisu toksični prema bakteriji *Vibrio fischeri*. Rezultati ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti metoklopramida i njegovih fotorazgradnih produkata na indukciju SOS-odziva *S. typhimurium* u test SOS/*umu-c*, uz metaboličku aktivaciju (+S9) i bez prisutnosti (-S9) metaboličke aktivacije prikazani su u **tablici 33**. Ispitane standardne otopine metoklopramida, pri koncentracijama od 6,25 do 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , nisu citotoksične i genotoksične, kao ni njihovi fotolitički produkti.

**Tablica 33.** Rezultati ispitivanja citotoksičnosti i genotoksičnosti metoklopramida i njegovih fotorazgradnih produkata

		-S9		+S9	
$\gamma(\mu\text{g mL}^{-1})$		$G \pm \text{SD}$	$IR \pm \text{SD}$	$G^a \pm \text{SD}$	$IR \pm \text{SD}$
kontrola	0	$1,00 \pm 0,07$	$1,00 \pm 0,08$	$1,00 \pm 0,02$	$1,00 \pm 0,23$
NQNO	$0,5 (\mu\text{g mL}^{-1})$	$0,72 \pm 0,08$	$6,17 \pm 1,10$	-	-
AFB1	$5 (\mu\text{g mL}^{-1})$	-	-	$0,90 \pm 0,04$	$5,95 \pm 0,37$
MCP	6,25	$0,90 \pm 0,04$	$1,00 \pm 0,17$	$0,95 \pm 0,09$	$1,14 \pm 0,21$
	12,5	$1,06 \pm 0,02$	$0,88 \pm 0,07$	$1,10 \pm 0,07$	$1,13 \pm 0,34$
	25	$1,04 \pm 0,04$	$0,90 \pm 0,12$	$1,04 \pm 0,04$	$1,06 \pm 0,18$
	50	$1,00 \pm 0,04$	$1,07 \pm 0,19$	$0,96 \pm 0,01$	$1,09 \pm 0,14$
	100	$0,93 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,02$	$0,95 \pm 0,03$	$1,21 \pm 0,16$
MCP ( $3,3 \cdot 10^{-5}$ $\text{mol L}^{-1}$ )	Vrijeme razgradnje (min)	$G \pm \text{SD}$	$IR \pm \text{SD}$	$G \pm \text{SD}$	$IR \pm \text{SD}$
	0	$1,01 \pm 0,02$	$0,80 \pm 0,03$	$1,03 \pm 0,07$	$1,15 \pm 0,26$
	5	$0,98 \pm 0,02$	$1,01 \pm 0,02$	$1,07 \pm 0,05$	$1,03 \pm 0,20$
	10	$0,97 \pm 0,05$	$1,07 \pm 0,03$	$0,98 \pm 0,04$	$1,19 \pm 0,11$
	20	$0,96 \pm 0,04$	$1,01 \pm 0,12$	$0,91 \pm 0,06$	$1,43 \pm 0,09$
	30	$0,96 \pm 0,06$	$0,81 \pm 0,16$	$0,86 \pm 0,05$	$1,25 \pm 0,14$
	45	$0,91 \pm 0,10$	$1,21 \pm 0,12$	$0,87 \pm 0,04$	$1,37 \pm 0,24$
	60	$0,98 \pm 0,03$	$0,94 \pm 0,08$	$0,88 \pm 0,03$	$1,30 \pm 0,29$
	180	$0,97 \pm 0,02$	$1,05 \pm 0,13$	$0,91 \pm 0,05$	$1,33 \pm 0,30$
	360	$0,99 \pm 0,01$	$0,92 \pm 0,14$	$0,93 \pm 0,04$	$1,02 \pm 0,20$



### 4.3. Razmatranja vezana uz ponašanje farmaceutika u okolišu

Rezultati ispitivanja abiotskih procesa pokazuju kako fotoliza ima važnu ulogu u određivanju sudbine i ponašanja hidroksiklorokina i metoklopramida u različitim prirodnim površinskim vodama. Dok je s jedne strane fotoliza odgovorna za smanjenje njihove koncentracije, hidroliza nema takvu ulogu, jer su oba farmaceutika hidrolitički stabilna. Budući da hidroksiklorokin pripada skupini derivata kinolina koji imaju postojana, toksična, kancerogena i teratogena svojstva [295], ekološki gledano, postojala je vidna zabrinutost. Međutim, hidroksiklorokin nije pokazao takva djelovanja, što je pozitivno za okoliš, ali to i dalje ne umanjuje potpuno njegovu potencijalnu štetnost. Naime, dugotrajna izloženost farmaceuticima i pri nižim koncentracijama, može dovesti do kroničnih problema koji će u konačnici naštetiti ljudskom zdravlju ili zdravlje drugih organizama odnosno okolišu. Metoklopramid je pokazao kako je izravna fotoliza izuzetno značajan proces razgradnje kojim ne nastaju citotoksični niti genotoksični produkti. Također, nastali produkti nisu, kao ni metoklopramid, toksični prema bakteriji *Vibrio fischeri*. S obzirom na to da vrijednost pH prirodnih voda u složenim vodenim maticama najčešće varira u području vrijednosti pH od 6 do 9 [296], ispitivanje utjecaja vrijednosti pH pokazalo se od izrazite važnosti. Naime, uočena je različita fotoreaktivnost hidroksiklorokina, ovisno u vrijednosti pH, a detektirani su čak i različiti razgradni produkti. Uz spomenuto, sastav matice pokazao se ključnim čimbenikom koji utječe na postojanost hidroksiklorokina u okolišu. Dakle, neizravna fotoliza od posebne je važnosti, jer značajno utječe na smanjivanje koncentracije hidroksiklorokina u okolišu. Za nastale polarnije fotoprodukte može se pretpostaviti da bi mogli biti manje skloni bioakumulaciji nego hidroksiklorokin. Metoklopramid je također pokazao da pH može utjecati, ali s praktičnog gledišta, to je zanemarivo, jer je vrijeme poluraspada manje od 15 min, u svim slučajevima.

Vrijednost  $K_{oc}$  može se procijeniti [297] ako je poznata vrijednost  $\log K_{ow}$ , pa je tako za hidroksiklorokin  $\log K_{oc} = 2,51$ , a za metoklopramid  $\log K_{oc} = 1,75$ . Prema rečenom, može se pretpostaviti da će hidroksiklorokin biti skloniji sorpciji na sediment i tlo. Na temelju manje vrijednosti  $\log K_{oc}$  za metoklopramid, može se pretpostaviti da će njegova sklonost fotolitičkoj razgradnji biti izraženija nego u slučaju hidroksiklorokina. Uz spomenuto, potrebno je uzeti u obzir i vrijednosti  $pK_a$  hidroksiklorokina ( $pK_{a1} = 8,27$ ) i metoklopramida ( $pK_{a2} = 9,4$ ), jer je za očekivati da će doprinos sorpcije biti još veći u slučaju kada je  $pH \pm 1$  od pripadajuće vrijednosti  $pK_a$  farmaceutika.

---

## 5. ZAKLJUČAK

- i. Prva istraživanja pokazala su da niti metoklopramid, a niti hidroksiklorokin nisu podložni hidrolitičkoj razgradnji u vodenom okolišu.
- ii. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina i metoklopramida ispitana je u destiliranoj deioniziranoj vodi, različitim uzorcima prirodnih voda (izvorskoj, morskoj i riječnoj), i sintetskih otpadnih voda (otpadna voda farmaceutske industrije i komunalna otpadna voda). U svim navedenim uzorcima razgradnja je slijedila reakciju pseudo-prvog reda, osim za fotorazgradnju metoklopramida u morskoj vodi, gdje je uočeno da kinetika razgradnje odgovara dvoeksponencijalnoj funkciji.
- iii. Rezultati ukazuju da je fotolitička razgradnja značajan put razgradnje metoklopramida i hidroksiklorokina u vodenom okolišu.
- iv. Potvrđena je hipoteza istraživanja prema kojoj: na ponašanje izabranih farmaceutika u okolišu znatno utječe sastav matice uzorka vode. Sukladno tome, detaljno je ispitan utjecaj pojedine matice na razgradnju pojedinog farmaceutika, što je povezano s nastalim razgradnim produktima (procesima hidroksilacije, fotobromiranja).
- v. Utjecaj vrijednosti pH pokazao se kao izrazito značajan čimbenik koji ne samo da utječe na brzinu fotolitičke razgradnje nego i na nastanak različitih razgradnih produkata kod fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina. Pokazano je da s porastom vrijednosti pH raste i brzina fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina, te da je utjecaj vrijednosti pH bilo potrebno provoditi u puferiranim otopinama.
- vi. Kod fotolitičke razgradnje metoklopramida pH također utječe na brzinu razgradnje (veća vrijednost pH dovodi do sporije razgradnje), ali je izravna fotoliza značajniji čimbenik koji određuje brzinu razgradnje. Osim toga, kod pH = 11 zamijećeni su hidrofobniji fotoprodukti od samog metoklopramida pa bi mogli biti skloniji većoj bioakumulaciji nego metoklopramid.
- vii. Huminske kiseline, nitrati i željezovi ioni odgovorni su za ubrzanje razgradnje hidroksiklorokina, dok su kloridi, bromidi i sulfati odgovorni za smanjenje razgradnje. Hidrogenkarbonati nisu utjecali na brzinu fotolitičke razgradnje, osim što njihovo prisustvo utječe na povećanje pH pa je i razgradnja hidroksiklorokina indirektno brža.
- viii. U slučaju metoklopramida, huminske kiseline, nitrati, bromidi i kloridi usporavaju razgradnju metoklopramida, dok su željezovi(III) ioni odgovorni za ubrzanje

- razgradnje. Hidrogenkarbonati usporavaju razgradnju metoklopramida zbog porasta vrijednosti pH.
- ix. Određeni su kvantni prinosi koji omogućuju usporedbu rezultata i određivanje utjecaja drugih čimbenika, poput: godišnjih doba, dubine vode itd.
  - x. Tijekom fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina određeno je ukupno pet razgradnih produkata (ovisno o vrijednosti pH), među kojima su pojedini otkriveni prvi put. Njegovi razgradni produkti nastali su kao rezultat hidroksilacije aromatskog prstena i dealkilacije na amino-bočnom ogranku.
  - xi. U slučaju metoklopramida određena su četiri razgradna produkta (polarnija nego sam metoklopramid), dok je u morskoj vodi određen i transformacijski produkt, koji nastaje nukleofilnom supstitucijom klora bromom.
  - xii. Procijenjena je toksičnost hidroksiklorokina i metoklopramida te nastalih smjesa pojedinog farmaceutika s njegovim razgradnim produktima, kao i smjesa razgradnih produkata. Prema testu SOS/*umu-c* ni hidroksiklorokin ni metoklopramid i njihovi razgradni produkti nisu genotoksični.
  - xiii. Nastali razgradni produkti nisu pokazali akutnu toksičnost s *Vibrio fischeri*, osim što su razgradni produkti hidroksiklorokina pokazali blagu inhibiciju.

Prema prethodno navedenim saznanjima, može se zaključiti da Sunčevo zračenje ima izrazito važnu ulogu u određivanju sudbine i ponašanja hidroksiklorokina i metoklopramida u vodenom okolišu. Dakle, doprinos fotolize kao abiotičkog procesa na oba farmaceutika vodama od presudne je važnosti za njihovu nepostojanost. Prije nego li neki lijek izađe na tržište, predstoje brojna ispitivanja, kao i ona vezana uz ispitivanje utjecaja na okoliš. Može se samo pretpostaviti kako bi metoklopramid i hidroksiklorokin mogli imati prednost u uporabi pred drugim farmaceuticima jednakih farmakoterapijskih djelovanja. Naime, Švedska je bila prva država koja je 2005. omogućila liječnicima da prepisuju lijekove s najmanjim mogućim utjecajem na okoliš. Također, i Francuska preporučuje uporabu onih farmaceutika koji pokazuju nisku: postojanost, bioakumulaciju i toksičnost. Na temelju provedenih istraživanja o utjecaju abiotičkih procesa na farmaceutike hidroksiklorokin i metoklopramid te procjene toksičnosti, može se pretpostaviti da bi oba farmaceutika mogla biti ekološki prihvatljivi spojevi u okolišu, posebno metoklopramid.

---

## 6. LITERATURA

1. K. A. Kidd, P. J. Blanchfield, K. H. Mills, V. P. Palace, R. E. Evans, J. M. Lazorchak, R. W. Flick, Collapse of a fish population after exposure to a synthetic estrogen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2020) 8897-8901.
2. R. D. MacLaren, K. Wisniewski, C. MacLaren, Environmental concentrations of metformin exposure affect aggressive behavior in the Siamese fighting fish, *Betta splendens*. *PLoS One* 13 (2018) e0197259.
3. Z. Yan, G. Lu, J. Liu, S. Jin, An integrated assessment of estrogenic contamination and feminization risk in fish in Taihu Lake, China, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 84 (2012) 334-340.
4. J. L. Oaks, M. Gilbert, M. Z. Virani, R. T. Watson, C. U. Meteyer, B. A. Rideout, H. L. Shivaprasad, S. Ahmed, M. J. I. Chaudhry, M. Arshad, S. Mahmood, A. Ali, A. A. Khan, Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan, *Nature* 427 (2004) 630-633.
5. D. White, D. J. Lapworth, W. Civil, P. Williams, Tracking changes in the occurrence and source of pharmaceuticals within the River Thames, UK; from source to sea, *Environ. Pollut.* 249 (2019) 257-266.
6. J. H. Writer, I. Ferrer, L. B. Barber, E. M. Thurman, Widespread occurrence of neuro-active pharmaceuticals and metabolites in 24 Minnesota rivers and wastewaters, *Sci. Total Environ.* 461-462 (2013) 519-527.
7. L. Ferrando-Climent, S. Rodriguez-Mozaz, D. Barceló, Incidence of anticancer drugs in an aquatic urban system: From hospital effluents through urban wastewater to natural environment, *Environ. Pollut.* 193 (2014) 216-223.
8. R. Shokouhi, N. Ghobadi, K. Godini, M. Hadi, Z. Atashzaban, Antibiotic detection in a hospital wastewater and comparison of their removal rate by activated sludge and earthworm-based vermifiltration: environmental risk assessment, *Process Saf. Environ. Prot.* 134 (2019) 169-177.
9. G. Jakab, Z. Szalai, G. Michalkó, M. Ringer, T. Filep, L. Szabó, G. Maász, Z. Pirger, Á. Ferincz, Á. Staszny, P. Dobosy, A. C. Kondor, Thermal baths as sources of pharmaceutical and illicit drug contamination, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 27 (2020) 339-410.
10. R. Singh, Membrane Technology Engineering for Water Purification. II. izdanje, Elsevier Ltd., Oxford (2015) str. 81-178.
11. The economist: why the sea is salty, URL: <https://www.economist.com/the-economist-explains/2017/01/24/why-the-sea-is-salty> (Datum pristupa: 6. 2. 2020.)

12. L. J. Carter, E. Harris, M. Williams, J. J. Ryan, R. S. Kookana, A. B. A. Boxall, Fate and uptake of pharmaceuticals in soil-plant systems, *J. Agric. Food Chem.* 62 (2014) 816-825.
13. M. H. Hsu, C. J. Tsai, A. Y. C. Lin, Mechanism and pathways underlying the self-sensitized photodegradation of methotrexate under simulated solar irradiation, *J. Hazard. Mater.* 373 (2019) 468-475.
14. G. Kaushik, M. A. Thomas, The potential association of psychoactive pharmaceuticals in the environment with human neurological disorders, *Sustain. Chem. Pharm.* 13 (2019) 100148.
15. H. Yokota, Y. Taguchi, Y. Tanaka, M. Uchiyama, M. Kondo, Y. Tsuruda, T. Suzuki, S. Eguchi, Chronic exposure to diclofenac induces delayed mandibular defects in medaka (*Oryzias latipes*) in a sex-dependent manner, *Chemosphere* 210 (2018) 139-146.
16. M. Papageorgiou, I. Zioris, T. Danis, D. Bikiaris, D. Lambropoulou, Comprehensive investigation of a wide range of pharmaceuticals and personal care products in urban and hospital wastewaters in Greece, *Sci. Total Environ.* 694 (2019) 133565.
17. B. Kim, K. Ji, C. Kim, H. Kang, S. Lee, B. Kwon, Y. Kho, K. Park, K. Kim, K. Choi, Pharmaceutical residues in streams near concentrated animal feeding operations of Korea – Occurrences and associated ecological risks, *Sci. Total Environ.* 655 (2019) 408-413.
18. I. Robinson, G. Junqua, R. Van Coillie, O. Thomas, Trends in the detection of pharmaceutical products, and their impact and mitigation in water and wastewater in North America, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1143-1151.
19. M. Kalyva, Fate of pharmaceuticals in the environment, A review URL: <http://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:1085088/FULLTEXT01.pdf> (Datum pristupa: 15. 10. 2019.)
20. R. K. Merton, The Matthew Effect in Science, *Science* 159 (1968) 56-63.
21. C. G. Daughton, The Matthew Effect and widely prescribed pharmaceuticals lacking environmental monitoring: Case study of an exposure-assessment vulnerability, *Sci. Total Environ.* 466–467 (2014) 315-325.
22. R. Oldenkamp, The boomerang effect – environmental exposure to pharmaceuticals, *Sustain. Chem. Pharm.* 12 (2019) 2018-2020.
23. G. Cosa, M. Lukeman, J. C. Scaiano, How Drug Photodegradation Studies Led to the Promise of New Therapies and Some Fundamental Carbanion Reaction Dynamics along the Way, *Acc. Chem. Res.* 42 (2009) 599-607.
24. Svjetska zdravstvena organizacija (farmaceutici u vodi za piće), URL: [https://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/diseases-risks/risks/info\\_sheet\\_pharmaceuticals/en/](https://www.who.int/water_sanitation_health/diseases-risks/risks/info_sheet_pharmaceuticals/en/) (Datum pristupa: 10. 1. 2020.)

- 
25. J. Rivera-Utrilla, M. Sánchez-Polo, M. Á. Ferro-García, G. Prados-Joya, R. Ocampo-Pérez, Pharmaceuticals as emerging contaminants and their removal from water A review, *Chemosphere* 93 (2013) 1268-1287.
  26. D. W. Grabe, Antimicrobial Agents, *Semin. Dial.* 23 (2010) 472-474.
  27. K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the Environment, *Annu. Rev. Environ. Resour.* 35 (2010) 57-75.
  28. A. Nikolaou, S. Meric, D. Fatta, Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal. Bioanal. Chem.* 387 (2007) 1225-1234.
  29. Stockholmska koncencija o postojanosti organskih zagađivala URL: [http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/convention\\_text/UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-FULL.English.PDF](http://chm.pops.int/Portals/0/Repository/convention_text/UNEP-POPS-COP-CONVTEXT-FULL.English.PDF) (Datum pristupa: 12. 2. 2020.)
  30. K. Götz, A. Courtier, M. Stein, L. Strelau, G. Sunderer, R. Vidaurre, M. Winker, B. Roig, Elsevier Ltd., Management of Public Health Issues and Risks, London, (2019.), str.189-224.
  31. K. Hughes, J. Paterson, M. E. Meek, Tools for the prioritization of substances on the Domestic Substances List in Canada on the basis of hazard, *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 55 (2009) 382-393.
  32. C. Money, Improving the relevance and efficiency of human exposure assessments within the process of regulatory risk assessment, *Environ. Sci. Process. Impacts* 20 (2018) 12-19.
  33. OECD (2008) *Test No 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes*.
  34. A. Zenker, M. R. Cicero, F. Prestinaci, P. Bottoni, M. Carere, Bioaccumulation and biomagnification potential of pharmaceuticals with a focus to the aquatic environment, *J. Environ. Manage.* 133 (2014) 378-387.
  35. M. A. Calatayud-Pascual, M. Sebastian-Morelló, C. Balaguer-Fernández, M. B. Delgado-Charro, A. López-Castellano, V. Merino, Influence of chemical enhancers and iontophoresis on the in vitro transdermal permeation of propranolol: Evaluation by dermatopharmacokinetics, *Pharmaceutics* 10 (2018) 265.
  36. S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, Occurrence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environ. Int.* 35 (2009) 803-814.
  37. M. Majewsky, T. Glauner, H. Horn, Systematic suspect screening and identification of sulfonamide antibiotic transformation products in the aquatic environment, *Anal. Bioanal. Chem.* 407 (2015) 5707-5717.

- 
38. M. Toński, J. Dołżonek, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, Hydrolytic stability of selected pharmaceuticals and their transformation products, *Chemosphere* 236 (2020) 124236.
39. M. Śliwka-Kaszyńska, A. Jakimska-Nagórska, A. Wasik, A. Kot-Wasik, Phototransformation of three selected pharmaceuticals, naproxen, 17 $\alpha$ -Ethinylestradiol and tetracycline in water: Identification of photoproducts and transformation pathways, *Microchem. J.* 148 (2019) 673-683.
40. T. Reemtsma, U. Berger, H. P. H. Arp, H. Gallard, T. P. Knepper, M. Neumann, J. B. Quintana, P. De Voogt, Mind the Gap: Persistent and Mobile Organic Compounds - Water Contaminants That Slip Through, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 10308-10315.
41. Q. Bu, X. Shi, G. Yu, J. Huang, B. Wang, Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs, *Emerg. Contam.* 2 (2016) 145-147.
42. M. Ashfaq, Y. Li, M. S. U. Rehman, M. Zubair, G. Mustafa, M. F. Nazar, C. P. Yu, Q. Sun, Occurrence, spatial variation and risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in urban wastewater, canal surface water, and their sediments: A case study of Lahore, Pakistan, *Sci. Total Environ.* 688 (2019) 653-663.
43. L. Bijlsma, A. Celma, F. J. López, F. Hernández, Monitoring new psychoactive substances use through wastewater analysis: current situation, challenges and limitations, *Curr. Opin. Environ. Sci. Heal.* 9 (2019) 1-12.
44. C. Hignite, D. L. Azarnoff, Drugs and drug metabolites as environmental contaminants: Chlorophenoxyisobutyrate and salicylic acid in sewage water effluent, *Life Sci.* 20 (1977) 337-341.
45. C. G. Daughton, Cradle-to-cradle stewardship to drugs for minimizing their environmental disposition while promoting human health II Drug disposal, waste reduction, and future directions, *Environ. Health Perspect.* 111 (2003) 775-785.
46. Europska komisija-Farmaceutici u okolišu, URL: [https://ec.europa.eu/health/human-use/environment-medicines\\_en](https://ec.europa.eu/health/human-use/environment-medicines_en) (Datum pristupa: 12. 12. 2019.)
47. Služba Europske komisije za znanost i znanje, URL: <https://ec.europa.eu/jrc/en/science-update/updated-surface-water-watch-list-adopted-commission> (Datum pristupa: 13. 2. 2020.)
48. R. I. L. Eggen, J. Hollender, A. Joss, M. Schärer, C. Stamm, Reducing the discharge of micropollutants in the aquatic environment: The benefits of upgrading wastewater treatment plants, *Environ. Sci. Technol.* 48 (2014) 7683-7689.



- 
49. U. Szymańska, M. Wiergowski, I. Sołtyszewski, J. Kuzemko, G. Wiergowska, M. K. Woźniak, Presence of antibiotics in the aquatic environment in Europe and their analytical monitoring: Recent trends and perspectives, *Microchem. J.* 147 (2019) 729-740.
50. T. Brodin, S. Piovano, J. Fick, J. Klaminder, M. Heynen, M. Jonsson, Ecological effects of pharmaceuticals in aquatic systems-impacts through behavioural alterations, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369 (2014) 20130580.
51. S. Klätte, H. C. Schaefer, M. Hempel, Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems, *Sustain. Chem. Pharm.* 5 (2017) 61-66.
52. Y. H. Chuang, C. H. Liu, J. B. Sallach, R. Hammerschmidt, W. Zhang, S. A. Boyd, H. Li, Mechanistic study on uptake and transport of pharmaceuticals in lettuce from water, *Environ. Int.* 131 (2019) 104976.
53. A. MacHerius, T. Eggen, W. G. Lorenz, T. Reemtsma, U. Winkler, M. Moeder, Uptake of galaxolide, tonalide, and triclosan by carrot, barley, and meadow fescue plants, *J. Agric. Food Chem.* 60 (2012) 7785-7791.
54. M. Saaristo, A. Lagesson, M. G. Bertram, J. Fick, J. Klaminder, C. P. Johnstone, B. B. M. Wong, T. Brodin, Behavioural effects of psychoactive pharmaceutical exposure on European perch (*Perca fluviatilis*) in a multi-stressor environment, *Sci. Total Environ.* 655 (2019) 1311-1320.
55. P. Canosa, I. Rodríguez, E. Rubí, R. Cela, Determination of parabens and triclosan in indoor dust using matrix solid-phase dispersion and gas chromatography with tandem mass spectrometry, *Anal. Chem.* 79 (2007) 1675-1681.
56. Y. Liu, J. Zhang, X. Nie, P. Zhang, X. Yan, K. Fu, Simultaneous determination of 11 preservatives in cosmetics and pharmaceuticals by Matrix solid-phase dispersion coupled with gas chromatography, *Acta Chromatogr.* 6 (2019) 1-7.
57. P. A. Baron, D. C. Love, K. E. Nachman, Pharmaceuticals and personal care products in chicken meat and other food animal products: A market-basket pilot study, *Sci. Total Environ.* 490 (2014) 296-300.
58. A. Beltifa, M. Machreki, A. Ghorbel, A. Belaid, E. Smaoui, F. M. Akrouf, G. Di Bella, N. H. Khedry, T. Reynolds, H. Ben Mansour, J. Van Loon, Human urine contamination with environmental pollutants: Simultaneous determination using UPLC-MS/MS, *J. Water Health* 17 (2019) 371-379.
59. C. G. Daughton, Non-regulated water contaminants: Emerging research, *Environ. Impact Assess. Rev.* 24 (2004) 711-732.



- 
60. C. Alpopi, E. Nica, M. D. Negescu Oancea, P. E. Balu, Aspects of sustainable development in the perspective of the population aging phenomenon, *Qual. Access to Success* 20 (2019) 21-26.
61. T. P. Van Boeckel, S. Gandra, A. Ashok, Q. Caudron, B. T. Grenfell, S. A. Levin, R. Laxminarayan, Global antibiotic consumption 2000 to 2010: An analysis of national pharmaceutical sales data, *Lancet Infect. Dis.* 14 (2014) 742-750.
62. P. Chinnaiyan, S. G. Thampi, M. Kumar, K. M. Mini, Pharmaceutical products as emerging contaminant in water: relevance for developing nations and identification of critical compounds for Indian environment, *Environ. Monit. Assess.* 190 (2018) 288.
63. Farmaceutska industrija i globalno zdravlje, URL: <https://www.ifpma.org/wp-content/uploads/2017/02/IFPMA-Facts-And-Figures-2017.pdf> (Datum pristupa: 7. 2. 2020.)
64. H. Xie, H. Hao, N. Xu, X. Liang, D. Gao, Y. Xu, Y. Gao, H. Tao, M. Wong, Pharmaceuticals and personal care products in water, sediments, aquatic organisms, and fish feeds in the Pearl River Delta: Occurrence, distribution, potential sources, and health risk assessment, *Sci. Total Environ.* 659 (2019) 230-239.
65. K. Arnold, Assessing risks and impacts of pharmaceuticals in the environment on wildlife and ecosystems, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369 (2014) 8436.
66. S. M. Praveena, M. Z. Mohd Rashid, F. A. Mohd Nasir, W. Sze Yee, A. Z. Aris, Occurrence and potential human health risk of pharmaceutical residues in drinking water from Putrajaya (Malaysia), *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 180 (2019) 549-556.
67. P. Paíga, M. Correia, M. J. Fernandes, A. Silva, M. Carvalho, J. Vieira, S. Jorge, J. G. Silva, C. Freire, C. Delerue-Matos, Assessment of 83 pharmaceuticals in WWTP influent and effluent samples by UHPLC-MS/MS: Hourly variation, *Sci. Total Environ.* 648 (2019) 582-600.
68. C. Gómez-Canela, V. Pueyo, C. Barata, S. Lacorte, R. M. Marcé, Development of predicted environmental concentrations to prioritize the occurrence of pharmaceuticals in rivers from Catalonia, *Sci. Total Environ.* 666 (2019) 57-67.
69. Q. Bu, X. Shi, G. Yu, J. Huang, B. Wang, Assessing the persistence of pharmaceuticals in the aquatic environment: Challenges and needs, *Emerg. Contam.* 2 (2016) 145-147.
70. Izvještaj njemačke Agencije za okoliš, URL: [https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2019-06-24\\_texte\\_67-2019\\_database\\_pharmaceuticals-environment\\_0.pdf](https://www.umweltbundesamt.de/sites/default/files/medien/1410/publikationen/2019-06-24_texte_67-2019_database_pharmaceuticals-environment_0.pdf) (Datum pristupa: 19. 9. 2019.)

- 
71. T. aus der Beek, F. A. Weber, A. Bergmann, S. Hickmann, I. Ebert, A. Hein, A. Küster, Pharmaceuticals in the environment-Global occurrences and perspectives, *Environ. Toxicol. Chem.* 35 (2016) 823-835.
72. S. R. Hughes, P. Kay, L. E. Brown, Global Synthesis and Critical Evaluation of Collected from River Systems, 47 (2013) 661-677.
73. M. S. U. Rehman, N. Rashid, M. Ashfaq, A. Saif, N. Ahmad, J. I. Han, Global risk of pharmaceutical contamination from highly populated developing countries, *Chemosphere* 138 (2015) 1045-1055.
74. Y. Li, J. Ding, L. Zhang, X. Liu, G. Wang, Occurrence and ranking of pharmaceuticals in the major rivers of China, *Sci. Total Environ.* 696 (2019) 133991.
75. Y. Li, L. Zhang, X. Liu, J. Ding, Ranking and prioritizing pharmaceuticals in the aquatic environment of China, *Sci. Total Environ.* 658 (2020) 333-342.
76. S. Fekadu, E. Alemayehu, R. Dewil, B. Van der Bruggen, Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge, *Sci. Total Environ.* 654 (2019) 324-337.
77. L. Wöhler, G. Niebaum, M. Krol, A. Y. Hoekstra, The grey water footprint of human and veterinary pharmaceuticals, *Water Res.* X 7 (2020) 100044.
78. A. B. A. Boxall, P. Johnson, E. J. Smith, C. J. Sinclair, E. Stutt, L. S. Levy, Uptake of veterinary medicines from soils into plants, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 2288-2297.
79. Y. S. Ok, S. C. Kim, K. R. Kim, S. S. Lee, D. H. Moon, K. J. Lim, J. K. Sung, S. O. Hur, J. E. Yang, Monitoring of selected veterinary antibiotics in environmental compartments near a composting facility in Gangwon Province, Korea, *Environ. Monit. Assess.* 174 (2011) 693-701.
80. Njemačka agencija za okoliš-farmaceutici u okolišu, URL: <https://www.umweltbundesamt.de/daten/chemikalien/arzneimittel-in-der-umwelt> (Datum pristupa: 10. 9. 2020.)
81. R. Loos, B. M. Gawlik, G. Locoro, E. Rimaviciute, S. Contini, G. Bidoglio, EU-wide survey of polar organic persistent pollutants in European river waters, *Environ. Pollut.* 157 (2009) 561-568.
82. P. A. Segura, M. François, C. Gagnon, S. Sauvé, Review of the occurrence of anti-infectives in contaminated wastewaters and natural and drinking waters, *Environ. Health Perspect.* 117 (2009) 675-684.
83. W. J. Sim, J. W. Lee, E. S. Lee, S. K. Shin, S. R. Hwang, J. E. Oh, Occurrence and distribution of pharmaceuticals in wastewater from households, livestock farms, hospitals and pharmaceutical manufactures, *Chemosphere* 82 (2011) 179-186.

- 
84. A. R. Singh, Modern medicine: Towards prevention, cure, well-being and longevity, *Mens Sana Monogr.* 8 (2020) 17-29.
85. Raspodjela i upotreba veterinarskih lijekova u Danskoj, URL: [https://www.foedevarestyrelsen.dk/english/Animal/AnimalHealth/Veterinary\\_medicine/Pages/default.aspx](https://www.foedevarestyrelsen.dk/english/Animal/AnimalHealth/Veterinary_medicine/Pages/default.aspx) (Datum pristupa: 11. 9. 2019.)
86. H. S. Lim, J. S. Im, J. Y. Cho, K. S. Bae, T. A. Klein, J. S. Yeom, T. S. Kim, J. S. Choi, I. J. Jang, J. W. Park, Pharmacokinetics of hydroxychloroquine and its clinical implications in chemoprophylaxis against malaria caused by plasmodium vivax, *Antimicrob. Agents Chemother.* 53 (2009) 1468-1475.
87. L. Raphael De Moura Ferraz, ; Fabiana, L. Araújo, D. Santos, P. De, A. Ferreira, R. T. Lourenço, M. Junior, T. A. Rosa, L. A. Rolim, P. J. Rolim-Neto, Clinical, pharmacokinetic and technological aspects of the hydroxychloroquine sulfate, *IOSR J. Pharm.* 4 (2014) 2250-3013.
88. J. D. Sachs, P. Malaney, The Economic and Social Burden of Malaria, *Nature* 415 (2002) 680-685.
89. I. H. Yusuf, S. Sharma, R. Luqmani, S. M. Downes, Hydroxychloroquine retinopathy, *Eye (Lond).* 31 (2017) 828-845.
90. M. Tishler, I. Yaron, O. Geyer, I. Shirazi, E. Naftaliev, M. Yaron, Elevated tear interleukin-6 levels in patients with Sjogren syndrome, *Ophthalmology* 105 (1998) 2327-2329.
91. G. J. Kersh, R. Priestley, R. F. Massung, Stability of Coxiella burnetii in stored human blood, *Transfusion* 53 (2013) 1493-1496.
92. C. Verbaanderd, H. Maes, M. B. Schaaf, V. P. Sukhatme, P. Pantziarka, V. Sukhatme, P. Agostinis, G. Bouche, Repurposing drugs in oncology (ReDO) - Chloroquine and hydroxychloroquine as anti-cancer agents, *Ecancermedicalscience* 11 (2017) 1-35.
93. E. W. McChesney, W. D. Conway, W. F. Banks, J. E. Rogers, J. M. Shekosky, A. J. Grace, A. F. Jensen, D. J. Sullivan, Studies of the metabolism of some compounds of the 4-amino-7-chloroquinoline series, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 151 (1966) 482-493.
94. P. H. Howard, D. C. G. Muir, Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce II: Pharmaceuticals, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 6938-6946.
95. Procjena fizikalnih/kemijskih i drugih svojstava u okolišu programskim paketom EPI, URL: <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-05/documents/05.pdf> (Datum pristupa: 4. 1. 2019.)

- 
96. E. Pérez-Trallero, L. Iglesias, Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol, *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* 21 (2003) 520-529.
97. M. Stanley, A. Lautin, J. Rotrosen, S. Gershon, D. Kleinberg, Metoclopramide: Antipsychotic Efficacy of a Drug Lacking Potency, in Receptor Models *Psychopharmacology* 71 (1980) 219-225.
98. T. L. Abell, R. K. Bernstein, T. Cutts, G. Farrugia, J. Forster, W. L. Hasler, R. W. McCallum, K. W. Olden, H. P. Parkman, C. R. Parrish, P. J. Pasricha, C. M. Prather, E. E. Soffer, R. Twillman, A. I. Vinik, Treatment of gastroparesis: A multidisciplinary clinical review, *Neurogastroenterol. Motil.* 18 (2006) 263-283.
99. Z. Desta, G. M. Wu, A. M. Morocho, D. A. Flockhart, The gastroprokinetic and antiemetic drug metoclopramide is a substrate and inhibitor of cytochrome P450 2D6, *Drug Metab. Dispos.* 30 (2002) 336-343.
100. T. Z. Nursal, B. Erdogan, T. Noyan, M. Cekinmez, B. Atalay, N. Bilgin, The effect of metoclopramide on gastric emptying in traumatic brain injury, *J. Clin. Neurosci.* 14 (2007) 344-348.
101. C. C. Ryan, D. T. Tan, W. A. Arnold, Direct and indirect photolysis of sulfamethoxazole and trimethoprim in wastewater treatment plant effluent, *Water Res.* 45 (2011) 1280-1286.
102. S. Ding, J. Wu, M. Zhang, H. Lu, Q. Mahmood, P. Zheng, Acute toxicity assessment of ANAMMOX substrates and antibiotics by luminescent bacteria test, *Chemosphere* 140 (2015) 174-183.
103. L. H. M. L. M. Santos, A. N. Araújo, A. Fachini, A. Pena, C. Delerue-Matos, M. C. B. S. M. Montenegro, Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environment, *J. Hazard. Mater.* 175 (2010) 45-95.
104. L. Yang, Q. Cheng, N. F. Tam, L. Lin, W. Su, T. Luan, Contributions of Abiotic and Biotic Processes to the Aerobic Removal of Phenolic Endocrine-Disrupting Chemicals in a Simulated Estuarine, *Environ. Sci. Technol.* 50 (2016) 4324-4334.
105. Y. Zhang, J. Xu, Z. Zhong, C. Guo, L. Li, Y. He, W. Fan, Y. Chen, Degradation of sulfonamides antibiotics in lake water and sediment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 2372-2380.
106. H. Pouliquen, R. Delépée, M. Larhantec-Verdier, M. L. Morvan, H. Le Bris, Comparative hydrolysis and photolysis of four antibacterial agents (oxytetracycline oxolinic acid, flumequine and florfenicol) in deionised water, freshwater and seawater under abiotic conditions, *Aquaculture* 262 (2007) 23-28.

- 
107. U. Kunkel, M. Radke, Fate of pharmaceuticals in rivers: Deriving a benchmark dataset at favorable attenuation conditions, *Water Res.* 46 (2012) 5551-5565.
108. H. Yamamoto, Y. Nakamura, S. Moriguchi, Y. Nakamura, Y. Honda, I. Tamura, Y. Hirata, A. Hayashi, J. Sekizawa, Persistence and partitioning of eight selected pharmaceuticals in the aquatic environment: Laboratory photolysis, biodegradation, and sorption experiments, *Water Res.* 43 (2009) 351-362.
109. V. Calisto, M. R. M. Domingues, V. I. Esteves, Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments - Kinetics and photodegradation products, *Water Res.* 45 (2011) 6097-6106.
110. A. Yu-Chen, M. Reinhard, Erratum: Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 3000.
111. D. Prabhakaran, P. Sukul, M. Lamshöft, M. A. Maheswari, S. Zühlke, M. Spiteller, Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aqueous systems, *Chemosphere* 77 (2009) 739-746.
112. B. Petrie, R. Barden, B. Kasprzyk-Hordern, A review on emerging contaminants in wastewaters and the environment: Current knowledge, understudied areas and recommendations for future monitoring, *Water Res.* 72 (2015) 3-27.
113. V. Matamoros, A. Duhec, J. Albaigés, J. M. Bayona, Photodegradation of carbamazepine, ibuprofen, ketoprofen and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol in fresh and seawater, *Water. Air. Soil Pollut.* 196 (2009) 161-168.
114. M. Carballa, G. Fink, F. Omil, J. M. Lema, T. Ternes, Determination of the solid-water distribution coefficient ( $K_d$ ) for pharmaceuticals, estrogens and musk fragrances in digested sludge, *Water Res.* 42 (2008) 287-295.
115. G. M. Cárdenas-Youngs, J. L. Beltrán, Dissociation Constants and Octanol-Water Partition Equilibria for Several Fluoroquinolones, *J. Chem. Eng. Data* 60 (2015) 3327-3332.
116. J. J. Lee, S. K. Lee, N. Song, T. O. Nathan, B. M. Swarts, S. Y. Eum, S. Ehrt, S. N. Cho, H. Eoh, Transient drug-tolerance and permanent drug-resistance rely on the trehalose-catalytic shift in *Mycobacterium tuberculosis*, *Nat. Commun.* 10 (2019) 2928.
117. W. A. Arnold, K. McNeill, Chapter 32 Transformation of pharmaceuticals in the environment: Photolysis and other abiotic processes, *Compr. Anal. Chem.* 50 (2007) 361-385.
118. S. Babić, M. Periša, I. Škorić, Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere* 91 (2013) 1635-1642.
119. J. Maszkowska, S. Stolte, J. Kumirska, P. Łukaszewicz, K. Mioduszevska, A. Puckowski, M. Caban, M. Wagil, P. Stepnowski, A. Białk-Bielińska, Beta-blockers in the environment: Part I Mobility and hydrolysis study, *Sci. Total Environ.* 493 (2014) 1112-1121.

- 
120. K. A. Loftin, C. D. Adams, M. T. Meyer, R. Surampalli, Effects of ionic strength, temperature, and pH on degradation of selected antibiotics, *J. Environ. Qual.* 37 (2008) 378-386.
121. A. Białk-Bielińska, S. Stolte, M. Matzke, A. Fabiańska, J. Maszkowska, M. Kołodziejska, B. Liberek, P. Stepnowski, J. Kumirska, Hydrolysis of sulphonamides in aqueous solutions, *J. Hazard. Mater.* 221–222 (2012) 264-274.
122. A. Küster, N. Adler, Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation, *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 369 (2014).
123. A. Y. C. Lin, M. Reinhard, Photodegradation of common environmental pharmaceuticals and estrogens in river water, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 1303-1309.
124. European Commission Joint Research Centre, Technical guidance document on risk assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on risk assessment for new notified substances and Commission Regulation (EC) No 1488/94 on risk assessment for existing substances Part II EUR 20418 EN/2, *Eur. Chem. Bur. Part II* (2003) 7-179.
125. S. M. Mitchell, J. L. Ullman, A. L. Teel, R. J. Watts, Hydrolysis of amphenicol and macrolide antibiotics: Chloramphenicol, florfenicol, spiramycin, and tylosin, *Chemosphere* 134 (2015) 504-511.
126. Johan Moan, Vidljivo i ultraljubičasto zračenje, URL: <https://www.uio.no/studier/emner/matnat/fys/undervisningsmateriale/Moan-lecture.pdf> (Datum pristupa: 15. 4. 2019.)
127. H. Tønneesen (ur.), Photostability of Drugs and Drug Products, poglavlje 1, CRC Press LLC, 2004, str. 12.
128. Z. Lu, J. K. Challis, C. S. Wong, Quantum Yields for Direct Photolysis of Neonicotinoid Insecticides in Water: Implications for Exposure to Nontarget Aquatic Organisms, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 2 (2015) 188-192.
129. J. K. Challis, M. L. Hanson, K. J. Friesen, C. S. Wong, A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps, *Environ. Sci. Process. Impacts* 16 (2014) 672.
130. C. P. Silva, D. L. D. Lima, M. B. Groth, M. Otero, V. I. Esteves, Effect of natural aquatic humic substances on the photodegradation of estrone, *Chemosphere* 145 (2016) 249-255.
131. I. Kim, H. Tanaka, Photodegradation characteristics of PPCPs in water with UV treatment, *Environ. Int.* 35 (2009) 793-802.
132. I. Odak, I. Škorić, Organska fotokemija-Principi i primjena, FKIT, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017, str. 36-38.



- 
133. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvat. Vode* 24 (2016) 119-136.
134. S. A. Snyder, S. Adham, A. M. Redding, F. S. Cannon, J. DeCarolis, J. Oppenheimer, E. C. Wert, Y. Yoon, Role of membranes and activated carbon in the removal of endocrine disruptors and pharmaceuticals, *Desalination* 202 (2007) 156-181.
135. D. Fatta-Kassinos, M. I. Vasquez, K. Kümmerer, Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency, *Chemosphere* 85 (2011) 693-709.
136. V. Calisto, M. R. M. Domingues, V. I. Esteves, Photodegradation of psychiatric pharmaceuticals in aquatic environments - Kinetics and photodegradation products, *Water Res.* 45 (2011) 6097-6106.
137. T. E. Doll, F. H. Frimmel, Fate of pharmaceuticals - Photodegradation by simulated solar UV-light, *Chemosphere* 52 (2003) 1757-1769.
138. Y. Chen, C. Hu, J. Qu, M. Yang, Photodegradation of tetracycline and formation of reactive oxygen species in aqueous tetracycline solution under simulated sunlight irradiation, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 197 (2008) 81-87.
139. G. E. Linke, J. Chen, W. Xiaoxuan, S. Zhang, X. Qiao, C. Xiyun And, X. Qing, Aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents, *Environ. Sci. Technol.* 44 (2010) 2400-2405.
140. H. Xu, W. J. Cooper, J. Jung, W. Song, Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions, *Water Res.* 45 (2011) 632-638.
141. S. S. Walse, S. L. Morgan, L. Kong, J. L. Ferry, Role of dissolved organic matter, nitrate, and bicarbonate in the photolysis of aqueous fipronil, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3908-3915.
142. S. R. Batchu, V. R. Panditi, P. R. Gardinali, Photodegradation of sulfonamide antibiotics in simulated and natural sunlight: Implications for their environmental fate, *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 49 (2014) 200-211.
143. M. Periša, S. Babić, I. Škorić, T. Frömel, T. P. Knepper, Photodegradation of sulfonamides and their N4-acetylated metabolites in water by simulated sunlight irradiation: Kinetics and identification of photoproducts, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20 (2013) 8934-8946.
144. N. D. H. Khaleel, W. M. M. Mahmoud, G. M. Hadad, R. A. Abdel-Salam, K. Kümmerer, Photolysis of sulfamethoxypyridazine in various aqueous media: Aerobic biodegradation and identification of photoproducts by LC-UV-MS/MS, *J. Hazard. Mater.* 244-245 (2013) 654-661.

- 
145. C. Sirtori, A. Zapata, W. Gernjak, S. Malato, A. Agüera, Photolysis of flumequine: Identification of the major phototransformation products and toxicity measures, *Chemosphere* 88 (2012) 627-634.
146. J. K. Challis, M. L. Hanson, K. J. Friesen, C. S. Wong, A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: Defining our current understanding and identifying knowledge gaps, *Environ. Sci. Process. Impacts* 16 (2014) 672-696.
147. J. R. Bolton, I. Mayor-Smith, K. G. Linden, Rethinking the Concepts of Fluence (UV Dose) and Fluence Rate: The Importance of Photon-based Units - A Systemic Review, *Photochem. Photobiol.* 91 (2015) 1252-1262.
148. Guidelines for the test of chemicals, Test No 316 (2008): Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis
149. IUPAC-ovo izvješće o kemijskih aktinometrima, URL: <https://photochemistry.jp/acv/ENGLISH/Chemact.pdf> (Datum pristupa: 25. 8. 2019.)
150. D. Dulin, T. Mill, Development and Evaluation of Sunlight Actinometers, *Environ. Sci. Technol.* 16 (1982) 815-820.
151. J. R. Laszakovits, S. M. Berg, B. G. Anderson, J. E. O'Brien, K. H. Wammer, C. M. Sharpless, P-Nitroanisole/pyridine and p-Nitroacetophenone/pyridine actinometers revisited: Quantum yield in comparison to ferrioxalate, *Environ. Sci. Technol. Lett.* 4 (2017) 11-14.
152. A. C. Reina, A. B. Martínez-Piernas, Y. Bertakis, C. Brebou, N. P. Xekoukoulotakis, A. Agüera, J. A. Sánchez Pérez, Photochemical degradation of the carbapenem antibiotics imipenem and meropenem in aqueous solutions under solar radiation, *Water Res.* 128 (2018) 61-70.
153. M. W. Lam, S. A. Mabury, Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters, *Aquat. Sci.* 67 (2005) 177-188.
154. C. Oliveira, D. L. D. Lima, C. P. Silva, V. Calisto, M. Otero, V. I. Esteves, Photodegradation of sulfamethoxazole in environmental samples: The role of pH, organic matter and salinity, *Sci. Total Environ.* 648 (2019) 1403-1410.
155. A. L. Boreen, W. A. Arnold, K. McNeill, Photochemical Fate of Sulfa Drugs in the Aquatic Environment: Sulfa Drugs Containing Five-Membered Heterocyclic Groups, *Environ. Sci. Technol.* 38 (2004) 3933-3940.
156. A. L. Boreen, W. A. Arnold, 33 Triplet-Sensitized Photodegradation.pdf, 39 (2005) 3630-3638.



- 
157. R. Salgado, V. J. Pereira, G. Carvalho, R. Soeiro, V. Gaffney, C. Almeida, V. V. Cardoso, E. Ferreira, M. J. Benoliel, T. A. Ternes, A. Oehmen, M. A. M. Reis, J. P. Noronha, Photodegradation kinetics and transformation products of ketoprofen, diclofenac and atenolol in pure water and treated wastewater, *J. Hazard. Mater.* 244-245 (2013) 516-527.
158. J. L. Packer, J. J. Werner, D. E. Latch, K. McNeill, W. A. Arnold, Photochemical fate of pharmaceuticals in the environment: Naproxen, diclofenac, clofibrac acid, and ibuprofen, *Aquat. Sci.* 65 (2003) 342-351.
159. D. Vione, P. R. Maddigapu, E. De Laurentiis, M. Minella, M. Pazzi, V. Maurino, C. Minero, S. Kouras, C. Richard, Modelling the photochemical fate of ibuprofen in surface waters, *Water Res.* 45 (2011) 672506736.
160. G. R. Aiken, D. M. McKnight, R. L. Wershaw, P. MacCarthy, Humic Substances in Soil, Sediment, and Water 1985, *Soil Sci.* 142 (1986) 1630-1635.
161. E. M. Thurman, Aquatic Humic Substances BT - Organic Geochemistry of Natural Waters, in E.M. Thurman (Ed.), *Springer Netherlands*, Dordrecht, 1985 str. 273-361.
162. R. von Wandruszka, Humic acids: Their detergent qualities and potential uses in pollution remediation, *Geochem. Trans.* 1 (2000) 10-15.
163. R. Ishiwatari, Macromolecular material (humic substance) in the water column and sediments, *Mar. Chem.* 39 (1992) 151-166.
164. A. Nebbioso, A. Piccolo, Molecular characterization of dissolved organic matter (DOM): A critical review, *Anal. Bioanal. Chem.* 405 (2013) 109-124.
165. C. M. Sharpless, N. V. Blough, The importance of charge-transfer interactions in determining chromophoric dissolved organic matter (CDOM) optical and photochemical properties, *Environ. Sci. Process. Impacts* 16 (2014) 654-671.
166. D. Vione, V. Maurino, C. Minero, E. Pelizzetti, M. A. J. Harrison, R. I. Olariu, C. Arsene, Photochemical reactions in the tropospheric aqueous phase and on particulate matter, *Chem. Soc. Rev.* 35 (2006) 441-453.
167. C. Minero, S. Chiron, G. Falletti, V. Maurino, E. Pelizzetti, R. Ajassa, M. E. Carlotti, D. Vione, Photochemical processes involving nitrite in surface water samples, *Aquat. Sci.* 69 (2007) 71-85.
168. S. Chiron, C. Minero, D. Vione, Occurrence of 2,4-dichlorophenol and of 2,4-dichloro-6-nitrophenol in the Rhône river delta (Southern France), *Environ. Sci. Technol.* 41 (2007) 3127-3133.
169. P. Calza, D. Vione, A. Novelli, E. Pelizzetti, C. Minero, The role of nitrite and nitrate ions as photosensitizers in the phototransformation of phenolic compounds in seawater, *Sci. Total Environ.* 439 (2012) 67-75.

- 
170. G. Mark, H. Korth, H. Schuchmann, C. Von Sonntag, M. Strahlenchemie, S. P. O. Box, D.-M. Germany, The photochemistry of aqueous nitrate ion revisited, 101 (1996) 89-103.
171. Y. Li, X. Qiao, Y. nan Zhang, C. Zhou, H. Xie, J. Chen, Effects of halide ions on photodegradation of sulfonamide antibiotics: Formation of halogenated intermediates, *Water Res.* 102 (2016) 405-412.
172. D. Vione, V. Maurino, S. C. Man, S. Khanra, C. Arsene, R.-I. Olariu, C. Minero, Formation of organobrominated compounds in the presence of bromide under simulated atmospheric aerosol conditions, *ChemSusChem* 1 (2008) 197-204.
173. S. Khanra, C. Minero, V. Maurino, E. Pelizzetti, B. Dutta, D. Vione, Phenol transformation induced by UVA photolysis of the complex  $\text{FeCl}^{2+}$ , *Environ. Chem Lett.* 6 (2008) 29-34.
174. Y. Liu, X. He, X. Duan, Y. Fu, D. Fatta-Kassinos, D. D. Dionysiou, Significant role of UV and carbonate radical on the degradation of oxytetracycline in UV-AOPs: Kinetics and mechanism, *Water Res.* 95 (2016) 195-204.
175. C. H. Liao, S. F. Kang, F. A. Wu, Hydroxyl radical scavenging role of chloride and bicarbonate ions in the  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  process, *Chemosphere* 44 (2001) 1193-1200.
176. N. Brand, G. Mailhot, M. Bolte, Degradation Photoinduced by Fe(III): Method of Alkylphenol Ethoxylates Removal in Water, *Environ. Sci. Technol.* 32 (1998) 2715-2720.
177. D. Vione, J. Feitosa-Felizzola, C. Minero, S. Chiron, Phototransformation of selected human-used macrolides in surface water: Kinetics, model predictions and degradation pathways, *Water Res.* 43 (2009) 1959-1967.
178. L. Tong, P. Eichhorn, S. Pérez, Y. Wang, D. Barceló, Photodegradation of azithromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts, *Chemosphere* 83 (2011) 340-348.
179. H. J. Benkelberg, P. Warneck, Photodecomposition of iron(III) hydroxo and sulfato complexes in aqueous solution: Wavelength dependence of OH and 804- quantum yields, *J. Phys. Chem.* 99 (1995) 5214-5221.
180. D. Vione, V. Maurino, C. Minero, P. Calza, E. Pelizzetti, Phenol chlorination and photochlorination in the presence of chloride ions in homogeneous aqueous solution, *Environ. Sci. Technol.* 39 (2005) 5066-5075.
181. P. Calza, V. Maurino, C. Minero, E. Pelizzetti, M. Segal, M. Vincenti, Photoinduced halophenol formation in the presence of iron(III) species or cadmium sulfide, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 170 (2005) 61-67.

- 
182. C. Tebes-Stevens, J. M. Patel, W. J. Jones, E. J. Weber, Prediction of Hydrolysis Products of Organic Chemicals under Environmental pH Conditions, *Environ. Sci. Technol.* 51 (2017) 5008-5016.
183. E. Vulliet, C. Emmelin, J. M. Chovelon, C. Chouteau, B. Clement, Assessment of the toxicity of triasulfuron and its photoproducts using aquatic organisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 (2004) 2837-2843.
184. N. Ellepola, T. Ogas, D. N. Turner, R. Gurung, S. Maldonado-Torres, R. Tello-Aburto, P. L. Patidar, S. Rogelj, M. E. Piyasena, G. Rubasinghege, A toxicological study on photo-degradation products of environmental ibuprofen: Ecological and human health implications, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 188 (2020) 109892.
185. Q. T. Liu, T. D. Williams, R. I. Cumming, G. Holm, M. J. Hetheridge, R. Murray-Smith, Comparative aquatic toxicity of propranolol and its photodegraded mixtures: Algae and rotifer screening, *Environ. Toxicol. Chem.* 28 (2009) 2622-2631.
186. B. J. Konwick, A. T. Fisk, A. W. Garrison, J. K. Avants, M. C. Black, Acute enantioselective toxicity of fipronil and its desulfinyl photoproduct to *Ceriodaphnia dubia*, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 (2005) 2350-2355.
187. Z. Hao, C. Guo, J. Lv, Y. Zhang, Y. Zhang, J. Xu, Kinetic and mechanistic study of sulfadimidine photodegradation under simulated sunlight irradiation, *Environ. Sci. Eur.* 31 (2019) 40.
188. J. Lin, J. Chen, Y. Wang, X. Cai, X. Wei, X. Qiao, More toxic and photoresistant products from photodegradation of fenoxaprop-p-ethyl, *J. Agric. Food Chem.* 56 (2008) 8226-8230.
189. D. Wojcieszynska, U. Guzik, Naproxen in the environment: its occurrence, toxicity to nontarget organisms and biodegradation, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2020) 1849-1857.
190. M. DellaGreca, M. R. Iesce, M. Isidori, A. Nardelli, L. Previtera, M. Rubino, Phototransformation products of tamoxifen by sunlight in water Toxicity of the drug and its derivatives on aquatic organisms, *Chemosphere* 67 (2007) 1933-1939.
191. Z. Varga, E. Nicol, S. Bouchonnet, Photodegradation of benzisothiazolinone: Identification and biological activity of degradation products, *Chemosphere* 240 (2020) 124862.
192. L. Fan, Y. Huang, T. Huang, K. Zhao, Y. N. Zhang, C. Li, Y. H. Zhao, Photolysis and photo-induced toxicity of pyraclostrobin to *Vibrio fischeri*: Pathway and toxic mechanism, *Aquat. Toxicol.* 220 (2020) 105417.

- 
193. J. Xu, Z. Hao, C. Guo, Y. Zhang, Y. He, W. Meng, Photodegradation of sulfapyridine under simulated sunlight irradiation: kinetics, mechanism and toxicity evolution, *Chemosphere* 99 (2014) 186-191.
194. M. Farré, D. Asperger, L. Kantiani, S. González, M. Petrovic, D. Barceló, Assessment of the acute toxicity of triclosan and methyl triclosan in wastewater based on the bioluminescence inhibition of *Vibrio fischeri*, *Anal. Bioanal. Chem.* 390 (2008) 1999-2007.
195. S. Babic, M. Biosic, I. Skoric, Transformation Products of Pharmaceuticals in the Environment: Formation and Analysis, *Curr. Org. Chem.* 22 (2017) 1-18.
196. M. V. N. K. Talluri, N. R. Kandimalla, R. Bandu, D. Chundi, R. Marupaka, R. Srinivas, Selective separation, detection of zotepine and mass spectral characterization of degradants by LC-MS/MS/QTOF, *J. Pharm. Anal.* 4 (2014) 107-116.
197. M. Gros, M. Williams, M. Llorca, S. Rodriguez-Mozaz, D. Barceló, R. S. Kookana, Photolysis of the antidepressants amisulpride and desipramine in wastewaters: Identification of transformation products formed and their fate, *Sci. Total Environ.* 530-531 (2015) 434-444.
198. J. Trawiński, R. Skibiński, Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 1152-1199.
199. S. D. Richardson, T. A. Ternes, Water analysis: Emerging contaminants and current issues, *Anal. Chem.* 83 (2011) 4616-4648.
200. K. Kummerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use-present knowledge and future challenges, *J. Environ. Manage.* 90 (2009) 2354-2366.
201. T. Kosjek, E. Heath, M. Petrović, D. Barceló, Mass spectrometry for identifying pharmaceutical biotransformation products in the environment, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 1076-1085.
202. B. Huerta, S. Rodríguez-Mozaz, D. Barceló, Pharmaceuticals in biota in the aquatic environment: Analytical methods and environmental implications, *Anal. Bioanal. Chem.* 404 (2012) 2611-2624.
203. A. I. Hamed, R. Ben Said, B. Kontek, A. S. Al-Ayed, M. Kowalczyk, J. Moldoch, W. Oleszek, A. Stochmal, B. Olas, Electrospray ionization mass spectrometry characterization of ubiquitous minor lipids and oligosaccharides in milk of the camel (*Camelus dromedarius*) and their inhibition of oxidative stress in human plasma, *J. Dairy Sci.* 103 (2020) 72-86.
204. O. Raymond, W. Henderson, J. R. Lane, J. Penelope, P. G. Plieger, O. Raymond, W. Henderson, J. R. Lane, J. Penelope, An electrospray ionization mass spectrometric study of beryllium chloride solutions and complexes with crown ether and cryptand macrocyclic

- ligands beryllium chloride solutions and complexes with crown, *J. Coord. Chem.* 0 (2020) 1-16.
205. M. Nshanian, R. Lakshmanan, H. Chen, R. R. O. Loo, J. A. Loo, Enhancing sensitivity of liquid chromatography–mass spectrometry of peptides and proteins using supercharging agents, *Int. J. Mass Spectrom.* 427 (2018) 157-164.
206. D. Dabić, L. Brkljačić, T. Tandarić, M. Žinić, R. Vianello, L. Frkanec, R. Kobetić, The Metal Effect on Self-Assembling of Oxalamide Gelators Explored by Mass Spectrometry and DFT Calculations, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 29 (2018) 103-113.
207. C. V. Robinson, John Fenn (1917-2010), *Nature* 469 (2011) 300.
208. G. L. Glish, R. W. Vachet, The basics of mass spectrometry in the twenty-first century, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2 (2003) 140-150.
209. Y. Liu, E. S. Richardson, A. E. Derocher, N. J. Lunn, H. J. Lehmler, X. Li, Y. Zhang, J. Y. Cui, L. Cheng, J. W. Martin, Hundreds of Unrecognized Halogenated Contaminants Discovered in Polar Bear Serum, *Angew. Chemie - Int. Ed.* 57 (2018) 16401-16406.
210. T. Reemtsma, J. B. Quintana, M. Jekel (ur.) Analytical Methods for Polar Pollutants in Organic Pollutants in the Water Cycle, *Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Germany, 2006*, str. 21-29.
211. H. B. Lee, K. Sarafin, T. E. Peart, M. L. Svoboda, Acidic pharmaceuticals in sewage - Methodology, stability test, occurrence, and removal from Ontario samples, *Water Qual. Res. J. Canada* 38 (2003) 667-682.
212. B. Buszewski, S. Noga, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)-a powerful separation technique, *Anal. Bioanal. Chem.* 402 (2012) 231-247.
213. T. M. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041-1044.
214. N. Galić, Elektroraspršenje – blagi način ionizacije u spektrometriji masa, *Kem. Ind.* 53 (2004) 117-123.
215. Y. Zhang, L. Duan, B. Wang, C. S. Liu, Y. Jia, N. Zhai, L. Blaney, G. Yu, Efficient multiresidue determination method for 168 pharmaceuticals and metabolites: Optimization and application to raw wastewater, wastewater effluent, and surface water in Beijing, China, *Environ. Pollut.* 261 (2020) 114113.
216. S. Huntscha, H. P. Singer, C. S. McArdell, C. E. Frank, J. Hollender, Multiresidue analysis of 88 polar organic micropollutants in ground, surface and wastewater using online mixed-bed multilayer solid-phase extraction coupled to high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1268 (2012) 74-83.

217. S. Terzic, I. Senta, M. Ahel, Illicit drugs in wastewater of the city of Zagreb (Croatia) - Estimation of drug abuse in a transition country, *Environ. Pollut.* 158 (2010) 2686-2693.
218. B. Kasprzyk-Hordern, R. M. Dinsdale, A. J. Guwy, Multi-residue method for the determination of basic/neutral pharmaceuticals and illicit drugs in surface water by solid-phase extraction and ultra performance liquid chromatography-positive electrospray ionisation tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1161 (2007) 132-145.
219. C. Rodrigues, C. Alves, A. J. Santos-neto, C. Fernandes, F. M. Lan, Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1342-1347.
220. J. Martín, J. L. Santos, I. Aparicio, E. Alonso, Multi-residue method for the analysis of pharmaceutical compounds in sewage sludge, compost and sediments by sonication-assisted extraction and LC determination, *J. Sep. Sci.* 33 (2010) 1760-1766.
221. X. Fan, J. Gao, W. Li, J. Huang, G. Yu, Determination of 27 pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water: The benefit of isotope dilution, *Front. Environ. Sci. Eng.* 14 (2020) 1-10.
222. Zakon o otrovima, URL: <http://www.propisi.hr/print.php?id=949>, (Datum pristupa: 6. 2. 2020.)
223. M. Abbas, M. Adil, S. Ehtisham-ul-Haque, B. Munir, M. Yameen, A. Ghaffar, G. A. Shar, M. Asif Tahir, M. Iqbal, *Vibrio fischeri* bioluminescence inhibition assay for ecotoxicity assessment: A review, *Sci. Total Environ.* 626 (2018) 1295-1309.
224. S. Parasuraman, Toxicological screening, *J. Pharmacol. Pharmacother.* 2 (2011) 74-79.
225. M. T. Guo, C. Kong, Antibiotic resistant bacteria survived from UV disinfection: Safety concerns on genes dissemination, *Chemosphere* 224 (2019) 827-832.
226. W. Lin, S. Li, S. Zhang, X. Yu, Reduction in horizontal transfer of conjugative plasmid by UV irradiation and low-level chlorination, *Water Res.* 91 (2016) 331-338.
227. O. M. Lee, H. Y. Kim, W. Park, T. H. Kim, S. Yu, A comparative study of disinfection efficiency and regrowth control of microorganism in secondary wastewater effluent using UV, ozone, and ionizing irradiation process, *J. Hazard. Mater.* 295 (2015) 201-208.
228. J. Liu, O. Gefen, I. Ronin, M. Bar-Meir, N. Q. Balaban, Effect of tolerance on the evolution of antibiotic resistance under drug combinations, *Science* 367 (2020) 200-204.
229. J. P. Oliver, C. A. Gooch, S. Lansing, J. Schueler, J. J. Hurst, L. Sassoubre, E. M. Crossette, D. S. Aga, Invited review: Fate of antibiotic residues, antibiotic-resistant bacteria,



---

and antibiotic resistance genes in US dairy manure management systems, *J. Dairy Sci.* 103 (2020) 1051-1071.

230. K. Lee, D. W. Kim, D. H. Lee, Y. S. Kim, J. H. Bu, J. H. Cha, C. N. Thawng, E. M. Hwang, H. J. Seong, W. J. Sul, E. M. H. Wellington, C. Quince, C. J. Cha, Mobile resistome of human gut and pathogen drives anthropogenic bloom of antibiotic resistance, *Microbiome* 8 (2020) 1-14.

231. G. G. Khachatourians, Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria, *CMAJ* 159 (1988) 1129-1136.

232. T. Backhaus, M. Scholze, L. H. Grimme, The single substance and mixture toxicity of quinolones to the bioluminescent bacterium *Vibrio fischeri*, *Aquat. Toxicol.* 49 (2000) 49-61.

233. M. Farré, I. Ferrer, A. Ginebreda, M. Figueras, L. Olivella, L. Tirapu, M. Vilanova, D. Barceló, Determination of drugs in surface water and wastewater samples by liquid chromatography-mass spectrometry: Methods and preliminary results including toxicity studies with *Vibrio fischeri*, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 187-197.

234. Y. Kim, K. Choi, J. Jung, S. Park, P. G. Kim, J. Park, Aquatic toxicity of acetaminophen, carbamazepine, cimetidine, diltiazem and six major sulfonamides, and their potential ecological risks in Korea, *Environ. Int.* 33 (2007) 370-375.

235. A. H. Dökmeci, I. Dökmeci, H. Ibar, The Determination of Single and Mixture Toxicity at High Concentrations of Some Acidic Pharmaceuticals via *Aliivibrio fischeri*, *Environ. Process.* 1 (2014) 95-103.

236. K. Froehner, T. Backhaus, L. H. Grimme, Bioassays with *Vibrio fischeri* for the assessment of delayed toxicity, *Chemosphere* 40 (2000) 821-828.

237. B. Czech, I. Joško, P. Oleszczuk, Ecotoxicological evaluation of selected pharmaceuticals to *Vibrio fischeri* and *Daphnia magna* before and after photooxidation process, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 104 (2014) 247-253.

238. M. Isidori, M. Lavorgna, A. Nardelli, L. Pascarella, A. Parrella, Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms, *Sci. Total Environ.* 346 (2005) 87-98.

239. D. J. B. Dalzell, S. Alte, E. Aspichueta, A. De la Sota, J. Etxebarria, M. Gutierrez, C. C. Hoffmann, D. Sales, U. Obst, N. Christofi, A comparison of five rapid direct toxicity assessment methods to determine toxicity of pollutants to activated sludge, *Chemosphere* 47 (2002) 535-545.

240. Environmental bio-detection products inc., URL: <https://www.biotoxicity.com/index.php/ebpi-toxicity-tests/aliivibrio-fischeri-toxicity-tests>, (Datum pristupa: 10. 2. 2020.)

- 
241. Fotografije Marianne Engel, URL: <http://www.marengel.ch/Projekte/Vibriofischeri/index.html> (Datum pristupa: 9. 2. 2020.)
242. S. Inouye, NAD(P)H-flavin oxidoreductase from the bioluminescent bacterium, *Vibrio fischeri* ATCC 7744, is a flavoprotein, *FEBS Lett.* 347 (1994) 163-168.
243. Globalno harmonizirani sustav klasifikacije i označavanja kemikalija (GHS), URL: [https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs\\_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf](https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trans/danger/publi/ghs/ghs_rev04/English/ST-SG-AC10-30-Rev4e.pdf) (Datum pristupa: 18. 12. 2020.)
244. Analitički instrumenti i proizvodi za analizu okoliša tvrtke *Moderwater*, URL: <https://www.modernwater.com/monitoring/products/toxicity> (Datum pristupa: 8. 2. 2020.)
245. R. D. Cacciari, F. Menis, M. A. Biondi, E. Reynoso, C. Sabini, H. A. Montejano, M. A. Biasutti, Mechanistic analysis on the photochemistry of the anti-inflammatory drug etoricoxib in aqueous solution Cytotoxicity of photoproducts, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 390 (2020) 112331.
246. M. Česen, T. Eleršek, M. Novak, B. Žegura, T. Kosjek, M. Filipič, E. Heath, Ecotoxicity and genotoxicity of cyclophosphamide, ifosfamide, their metabolites/transformation products and their mixtures, *Environ. Pollut.* 210 (2016) 192-201.
247. S. S. Rao, B. K. Burnison, S. Efler, E. Wittekindt, P. D. Hansen, D. A. Rokosh, Assessment of genotoxic potential of pulp mill effluent and an effluent fraction using ames mutagenicity and Umu-C genotoxicity assays, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10 (1995) 301-305.
248. S. Babić, M. Periša, I. Škorić, Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere* 91 (2013) 1635-1642.
249. OECD-priručnik za ispitivanje utjecaja kemikalija, URL: [https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects\\_20745788](https://www.oecd-ilibrary.org/environment/oecd-guidelines-for-the-testing-of-chemicals-section-4-health-effects_20745788). datum pristupa (15.9.2019.)
250. J. L. Weishaar, M. S. Fram, R. Fujii, K. Mopper, Evaluation of Specific Ultraviolet Absorbance as an Indicator of the Chemical Composition and Reactivity of Dissolved Organic Carbon, 37 (2003) 4702-4708.
251. R. G. Zepp, Quantum yields for reaction of pollutants in dilute aqueous solution, *Environ. Sci. Technol.* 12 (1978) 327-329.
252. G. Reifferscheid, J. Heil, Y. Oda, R. K. Zahn, A microplate version of the SOS/umu-test for rapid detection of genotoxins and genotoxic potentials of environmental samples, *Mutat. Res. Mutagen. Relat. Subj.* 253 (1991) 215-222.



- 
253. B. Žegura, E. Heath, A. Černoša, M. Filipič, Combination of in vitro bioassays for the determination of cytotoxic and genotoxic potential of wastewater, surface water and drinking water samples, *Chemosphere* 75 (2009) 1453-1460.
254. OECD (2004), Guidelines for the Testing of Chemicals: Test No 111: Hydrolysis as a Function of pH.
255. T. D. Trouts, Y.-P. Chin, Direct and indirect photolysis of triclocarban in the presence of dissolved organic matter, *Elem. Sci. Anthr.* 3 (2015) 000050.
256. X. Wei, J. Chen, Q. Xie, S. Zhang, L. Ge, X. Qiao, Distinct Photolytic Mechanisms and Products for Different Dissociation Species of Ciprofloxacin, *Environ. Sci. Technol.* 47 (2013) 4284-4290.
257. J. K. Challis, J. C. Carlson, K. J. Friesen, M. L. Hanson, C. S. Wong, Aquatic photochemistry of the sulfonamide antibiotic sulfapyridine, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 262 (2013) 14-21.
258. D. C. Warhurst, J. C. P. Steele, I. S. Adagu, J. C. Craig, C. Cullander, Hydroxychloroquine is much less active than chloroquine against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*, in agreement with its physicochemical properties, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003) 188-193.
259. C. Gonçaves, S. Pérez, V. Osorio, M. Petrovic, M. F. Alpendurada, D. Barceló, Photofate of oseltamivir (Tamiflu) and oseltamivir carboxylate under natural and simulated solar irradiation: Kinetics, identification of the transformation products, and environmental occurrence, *Environ. Sci. Technol.* 45 (2011) 4307-4314.
260. Y. Chen, K. Zhang, Y. Zuo, Direct and indirect photodegradation of estriol in the presence of humic acid, nitrate and iron complexes in water solutions, *Sci. Total Environ.* 463-464 (2013) 802-809.
261. C. Zeng, Y. Ji, L. Zhou, Y. Zhang, X. Yang, The role of dissolved organic matters in the aquatic photodegradation of atenolol, *J. Hazard. Mater.* 239-240 (2012) 340-347.
262. Z. Zhu, X. Su, J. Yu, T. Zhang, L. Qi, A. Basit, Investigation of reactive oxygen species produced by microwave electrodeless discharge lamp on oxidation of dimethyl sulfide, *Chemosphere* 212 (2018) 1172-1179.
263. J. Lian, Z. Qiang, M. Li, J. R. Bolton, J. Qu, UV photolysis kinetics of sulfonamides in aqueous solution based on optimized fluence quantification, *Water Res.* 75 (2015) 43-50.
264. J. Niu, L. Zhang, Y. Li, J. Zhao, S. Lv, K. Xiao, Effects of environmental factors on sulfamethoxazole photodegradation under simulated sunlight irradiation: Kinetics and mechanism, *J. Environ. Sci. (China)* 25 (2013) 1098-1106.

- 
265. M. M. Kelly, W. A. Arnold, Direct and indirect photolysis of the phytoestrogens genistein and daidzein, *Environ. Sci. Technol.* 46 (2012) 5396-5403.
266. Y. Chen, L. Liu, J. Su, J. Liang, B. Wu, J. Zuo, Y. Zuo, Role of humic substances in the photodegradation of naproxen under simulated sunlight, *Chemosphere* 187 (2017) 261-267.
267. M. Conde-Cid, D. Fernández-Calviño, J. C. Nóvoa-Muñoz, M. Arias-Estévez, M. Díaz-Raviña, A. Núñez-Delgado, M. J. Fernández-Sanjurjo, E. Álvarez-Rodríguez, Degradation of sulfadiazine, sulfachloropyridazine and sulfamethazine in aqueous media, *J. Environ. Manage.* 228 (2018) 239-248.
268. Y. Li, J. Niu, E. Shang, M. Zheng, T. Luan, Effects of nitrate and humic acid on enrofloxacin photolysis in an aqueous system under three light conditions: kinetics and mechanism, *Environ. Chem.* 11 (2014) 333-340.
269. R. Andreozzi, M. Raffaele, P. Nicklas, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere* 50 (2003) 1319-1330.
270. M. B. Wallin, G. A. Weyhenmeyer, D. Bastviken, H. E. Chmiel, S. Peter, S., Sobek, L. Klemedtsson, Temporal control on concentration, character, and export of dissolved organic carbon in two hemiboreal headwater streams draining contrasting catchments, *J. Geophys. Res-Biogeophys.* 120 (2015) 832-846.
271. R. Andreozzi, R. Marotta, N. Paxéus, Pharmaceuticals in STP effluents and their solar photodegradation in aquatic environment, *Chemosphere* 50 (2003) 1319-1330.
272. Y. Chen, S. Yang, K. Wang, L. Lou, Role of primary active species and TiO<sub>2</sub> surface characteristic in UV-illuminated photodegradation of Acid Orange 7, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 172 (2005) 47-54.
273. A. P. S. Batista, A. C. S. C. Teixeira, W. J. Cooper, B. A. Cottrell, Correlating the chemical and spectroscopic characteristics of natural organic matter with the photodegradation of sulfamerazine, *Water Res.* 93 (2016) 20-29.
274. B. Koehler, F. Barsotti, M. Minella, T. Landelius, C. Minero, L. J. Tranvik, D. Vione, Simulation of photoreactive transients and of photochemical transformation of organic pollutants in sunlit boreal lakes across 14 degrees of latitude: A photochemical mapping of Sweden, *Water Res.* 129 (2018) 94-104.
275. S. ni Zhu, D. qi Liu, L. Fan, J. ren Ni, Degradation of quinoline by *Rhodococcus* sp QL2 isolated from activated sludge, *J. Hazard. Mater.* 160 (2008) 289-294.
276. G. V Buxton, C. L. Greenstock, W. P. Helman, A. B. Ross, Critical Review of rate constants for reactions of hydrated electrons, hydrogen atoms and hydroxyl radicals in Aqueous Solution, *J. Phys. Chem. Ref. Data* 17 (1988) 513-886.

- 
277. M. Biošić, M. Mitrevski, S. Babić, Environmental behavior of sulfadiazine, sulfamethazine, and their metabolites, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24 (2017) 9802-9812.
278. C. H. Liao, S. F. Kang, F. A. Wu, Hydroxyl radical scavenging role of chloride and bicarbonate ions in the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV process, *Chemosphere* 44 (2001) 1193-1200.
279. M. W. Lam, K. Tantuco, S. A. Mabury, PhetoFate: a new approach in accounting for the contribution of indirect photolysis of pesticides and pharmaceuticals in surface waters, *Environ. Sci. Technol.* 37 (2003) 899-907.
280. D. Vione, S. Khanra, S. C. Man, P. R. Maddigapu, R. Das, C. Arsene, R.-I. Olariu, V. Maurino, C. Minero, Inhibition vs enhancement of the nitrate-induced phototransformation of organic substrates by the \*OH scavengers bicarbonate and carbonate, *Water Res.* 43 (2009) 4718-4728.
281. Q. Zhao, H. Zhao, X. Quan, S. Chen, Y. Zhang, Photochemical transformation of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) in surface coastal waters: Effects of chloride and ferric ions, *Mar. Pollut. Bull.* 86 (2014) 76-83.
282. C. Li, D. Zhang, J. Peng, X. Li, The effect of pH, nitrate, iron (III) and bicarbonate on photodegradation of oxytetracycline in aqueous solution, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 356 (2018) 239-247.
283. K. Kawabata, K. Sugihara, S. Sanoh, S. Kitamura, S. Ohta, Photodegradation of pharmaceuticals in the aquatic environment by sunlight and UV-A, -B and -C irradiation, *J. Toxicol. Sci.* 38 (2013) 215-223.
284. F. C. Chang, T. C. Chiu, J. H. Yen, Y. S. Wang, Dechlorination pathways of ortho-substituted PCBs by UV irradiation in n-hexane and their correlation to the charge distribution on carbon atom, *Chemosphere* 51 (2003) 775-784.
285. A. Puckowski, K. Mioduszewska, P. Łukaszewicz, M. Borecka, M. Caban, J. Maszkowska, P. Stepnowski, Bioaccumulation and analytics of pharmaceutical residues in the environment: A review, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 127 (2016) 232-255.
286. L. M. Gómez-Oliván, M. Galar-Martínez, S. García-Medina, A. Valdés-Alanís, H. Islas-Flores, N. Neri-Cruz, Genotoxic response and oxidative stress induced by diclofenac, ibuprofen and naproxen in *Daphnia magna*, *Drug Chem. Toxicol.* 37 (2014) 391-399.
287. X. Liu, J. Lee, K. Ji, S. Takeda, K. Choi, Potentials and mechanisms of genotoxicity of six pharmaceuticals frequently detected in freshwater environment, *Toxicol. Lett.* 211 (2012) 70-76.
288. R. D. Snyder, J. W. Green, A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals, *Mutat. Res. - Rev. Mutat. Res.* 488 (2001) 151-169.

- 
289. T. Chatterjee, A. Mukhopadhyay, K. A. Khan, A. K. Giri, Comparative mutagenic and genotoxic effects of three antimalarial drugs, chloroquine, primaquine and amodiaquine, *Mutagenesis* 13 (1998) 619-624.
290. E. S. Riccio, P. S. Lee, R. A. Winegar, D. J. Krogstad, J. C. Mirsalis, Genetic toxicology testing of the antimalarial drugs chloroquine and a new analog, AQ-13, *Environ. Mol. Mutagen.* 38 (2001) 69-79.
291. I. Ahmad, S. Ahmed, Z. Anwar, M. A. Sheraz, M. Sikorski, Photostability and Photostabilization of Drugs and Drug Products, *Int. J. Photoenergy* 2016 (2016) 8135608.
292. D. Bertagna Silva, A. Cruz-Alcalde, C. Sans, J. Giménez, S. Esplugas, Performance and kinetic modelling of photolytic and photocatalytic ozonation for enhanced micropollutants removal in municipal wastewaters, *Appl. Catal. B Environ.* 249 (2019) 211-217.
293. M. I. Pinto, R. Salgado, C. A. T. Laia, W. J. Cooper, G. Sontag, H. D. Burrows, L. Branco, C. Vale, J. P. Noronha, The effect of chloride ions and organic matter on the photodegradation of acetamiprid in saline waters, *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 360 (2018) 117-124.
294. M. E. Valdés, M. V. Amé, M. de los A. Bistoni, D. A. Wunderlin, Occurrence and bioaccumulation of pharmaceuticals in a fish species inhabiting the Suquía River basin (Córdoba, Argentina), *Sci. Total Environ.* 472 (2014) 389-396.
295. B. H. Tuo, J. B. Yan, B. A. Fan, Z. H. Yang, J. Z. Liu, Biodegradation characteristics and bioaugmentation potential of a novel quinoline-degrading strain of *Bacillus* sp isolated from petroleum-contaminated soil, *Bioresour. Technol.* 107 (2012) 55-60.
296. A. Franco, A. Ferranti, C. Davidsen, An unexpected challenge : ionizable compounds in the REACH chemical space, *Int. J. Life Cycle Assess.* 15 (2010) 321-325.
297. T. Scheytt, P. Mersmann, R. Lindstädt, T. Heberer, Determination of sorption coefficients of pharmaceutically active substances carbamazepine, diclofenac, and ibuprofen, in sandy sediments, *Chemosphere* 60 (2005) 245-253.

## 7. PRILOZI

**Tablica 1.P** Asignirane asporpcijske vrpce huminskih kiselina

Valni broj (cm <sup>-1</sup> )	Asignacija
3409 – 3607	OH istežanje karboksilne, fenolne i alkoholne skupine, N–H istežanje (manjeg inteziteta)
2920; 2849	Vrpca alifatskog CH istežanja
1735	C=O istežanje karboksilne skupine
1597	C=C istežanje aromatskog prstena (vibracije kostura)
1462; 1410	C–H asimetrično savijanje CH <sub>3</sub> skupine
1372	Simetrično C=O istežanje karboksilne skupine, C–OH istežanje fenolne skupine and COO <sub>±</sub> asimetrično istežanje
1243	C–O istežanje fenola, estera i arilnih etera
1118 – 1099	C–O istežanje sekundarnih alkohola i/ili etera
1021	C–O istežanje ugljikohidrata

Tablica 2.P Prikaz validacije metode HPLC-PDA za praćenje razgradnje hidroksiklorokina

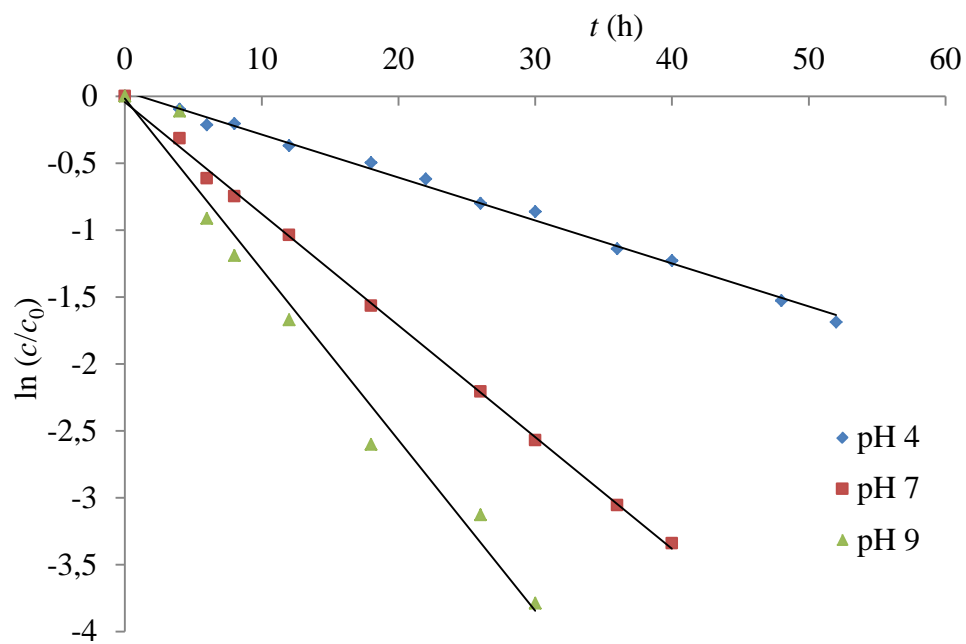
Izvedbena značajka	Kriterij prihvatljivosti	Koncentracija (mol L <sup>-1</sup> )	Rezultat (destilirana deionizirana; izvorska voda)	Zadovoljnost
Specifičnost, selektivnost				DA; DA
Linearnost	$R^2 \geq 0,995$	za radno područje	0,9973; 0,9985	DA; DA
Ponovljivost $c$ (mol L <sup>-1</sup> )	RSD $\leq 10$ %	$3,3 \cdot 10^{-5}$	(1,3; 2,8) %	DA; DA
		$1,2 \cdot 10^{-5}$	(4,3; 4,8) %	DA; DA
		$9,0 \cdot 10^{-7}$	(5,3; 15,5) %	DA; NE
Međupreciznost $c$ (mol L <sup>-1</sup> )	RSD $\leq 15$ %	$3,3 \cdot 10^{-5}$	(11,6; 4,0) %	DA; DA
		$1,2 \cdot 10^{-5}$	(21,6; 3,7) %	NE; DA
		$9,0 \cdot 10^{-7}$	(10,2; 11,5) %	DA; DA
Iskoristivost	90 – 110 %	$3,3 \cdot 10^{-5}$	(97,9) %	DA
		$1,2 \cdot 10^{-5}$	(96,9) %	DA
		$9,0 \cdot 10^{-7}$	(121,6; ) %	NE
Granica detekcije	podatak	–	$7,64 \cdot 10^{-8}$ ; $1,72 \cdot 10^{-7}$	podatak
Granica kvantifikacije	podatak	–	$2,55 \cdot 10^{-7}$ ; $5,76 \cdot 10^{-7}$	podatak
Radno područje	podatak	–	LOQ – $3,0 \cdot 10^{-5}$ ; LOQ – $3,0 \cdot 10^{-5}$	podatak

Tablica 3.P Prikaz validacije metode HPLC-MS/MS za praćenje razgradnje metoklopramida

Izvedbena značajka	Kriterij prihvatljivosti	Koncentracija (mol L <sup>-1</sup> )	Rezultat (destilirana deionizirana; izvorska)	Zadovoljnost
<b>Specifičnost, selektivnost</b>				DA; DA
<b>Linearnost</b>	$R^2 \geq 0,995$	za radna područja	(LOQ – $2,51 \cdot 10^{-6}$ ) 0,9992; 0,9984 (LOQ – $3,30 \cdot 10^{-5}$ ) 0,9975; 0,9991	DA; DA DA; DA
<b>Ponovljivost c (mol L<sup>-1</sup>)</b>	RSD ≤ 10 %	$1,84 \cdot 10^{-5}$	(2,51; 1,70) %	DA; DA
		$7,52 \cdot 10^{-6}$	(3,29; 1,70) %	DA; DA
		$3,01 \cdot 10^{-7}$	(5,62; 6,29) %	DA; DA
<b>Međupreciznost c (mol L<sup>-1</sup>)</b>	RSD ≤ 15 %	$1,84 \cdot 10^{-5}$	(3,08; 2,54) %	DA; DA
		$7,52 \cdot 10^{-6}$	(3,87; 2,17) %	DA; DA
		$3,01 \cdot 10^{-7}$	(4,86; 6,38) %	DA; DA
<b>Iskoristivost</b>	90 – 110 % (izvorska voda)	$1,84 \cdot 10^{-5}$	(108,13) %	DA
		$7,52 \cdot 10^{-6}$	(100,71) %	DA
		$3,01 \cdot 10^{-7}$	(97,91) %	DA
<b>Granica detekcije</b>	podatak	–	$1,73 \cdot 10^{-8}$ ; $2,04 \cdot 10^{-8}$	podatak
<b>Granica kvantifikacije</b>	podatak	–	$5,23 \cdot 10^{-8}$ ; $6,18 \cdot 10^{-8}$	podatak
<b>Radno područje</b>	podatak	–	LOQ – $3,3 \cdot 10^{-5}$ ; LOQ – $3,3 \cdot 10^{-5}$	podatak

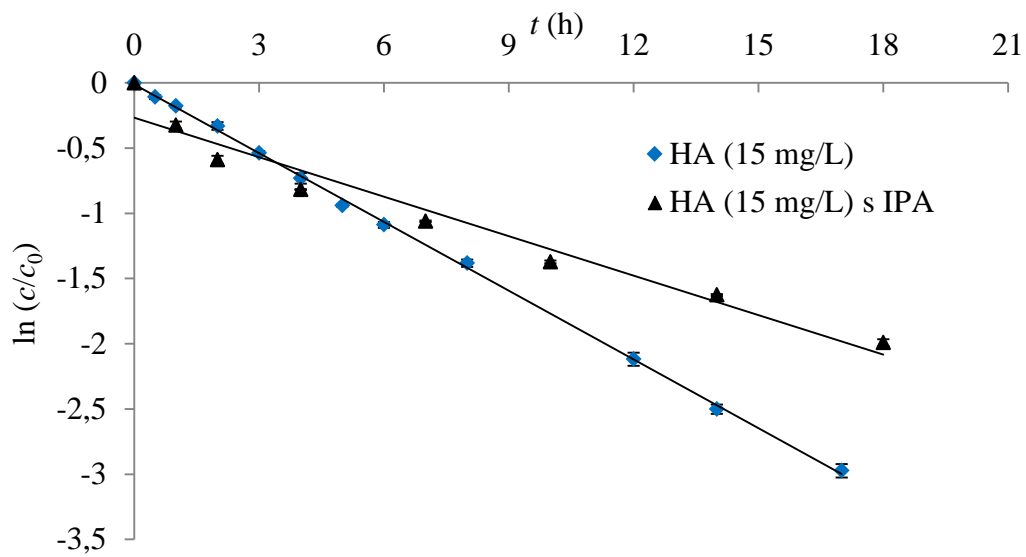


**Slika 1.P** Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina za vrijeme sunčanog dana pod utjecajem prirodnog Sunčeva zračenja

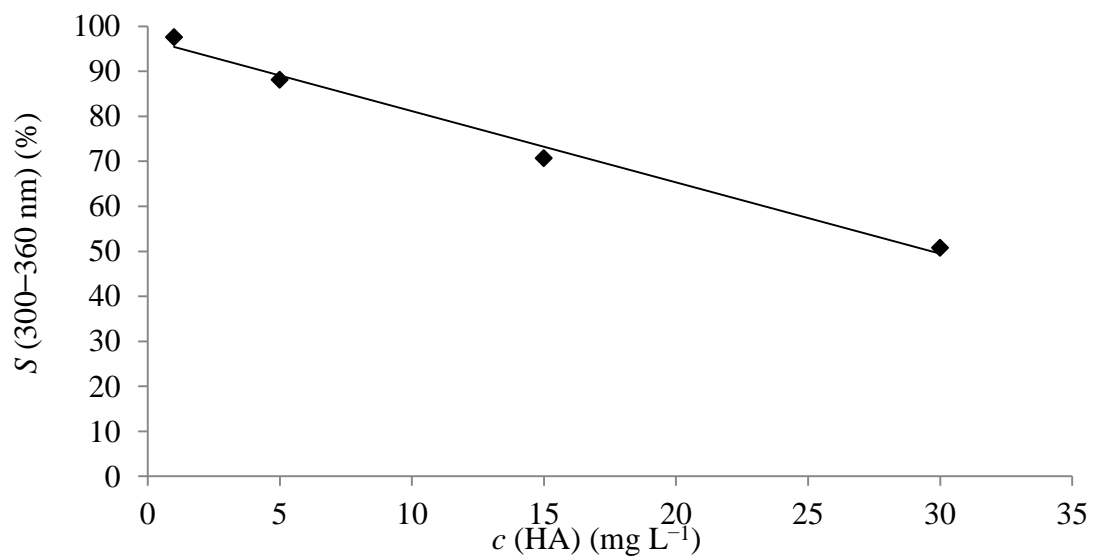


**Slika 2.P** Utjecaj početne vrijednosti pH na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

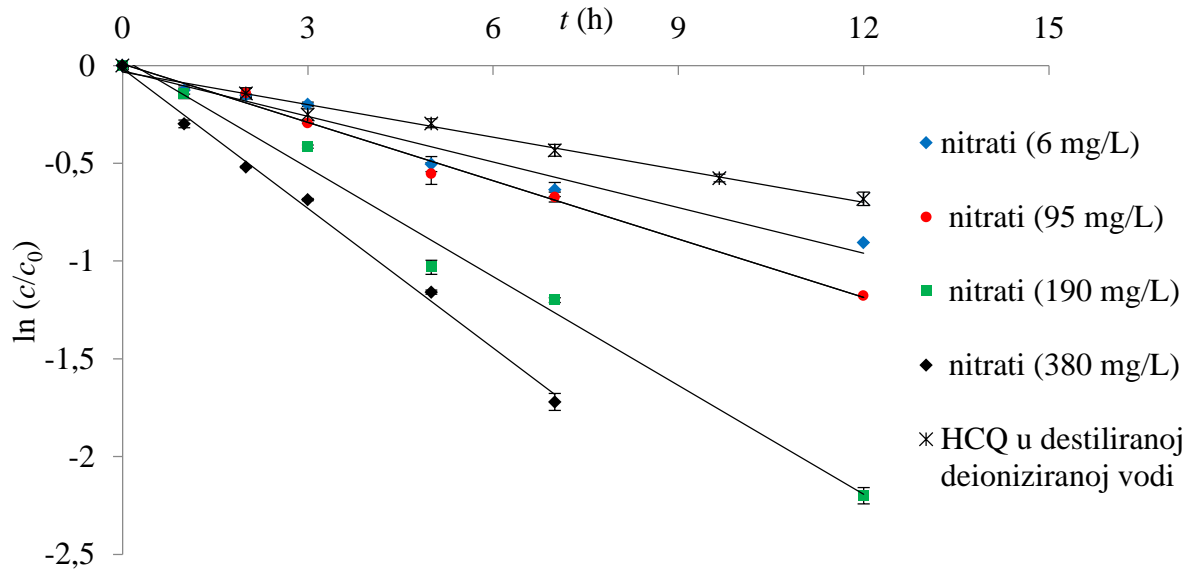




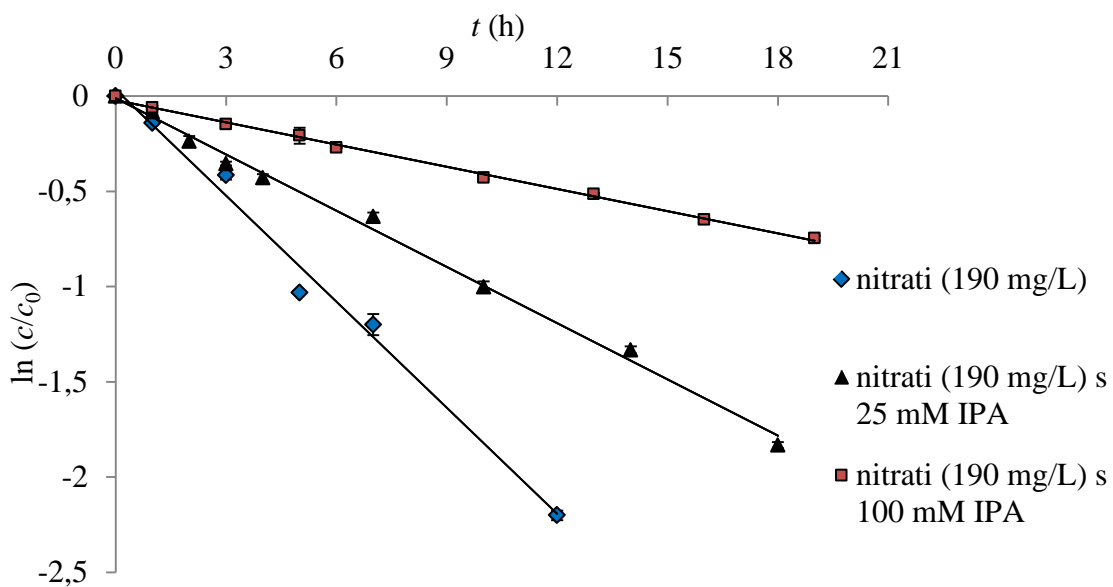
**Slika 3.P** Utjecaj izopropanola (IPA) ( $c = 25 \text{ mmol L}^{-1}$ ) na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina s huminskim kiselinama



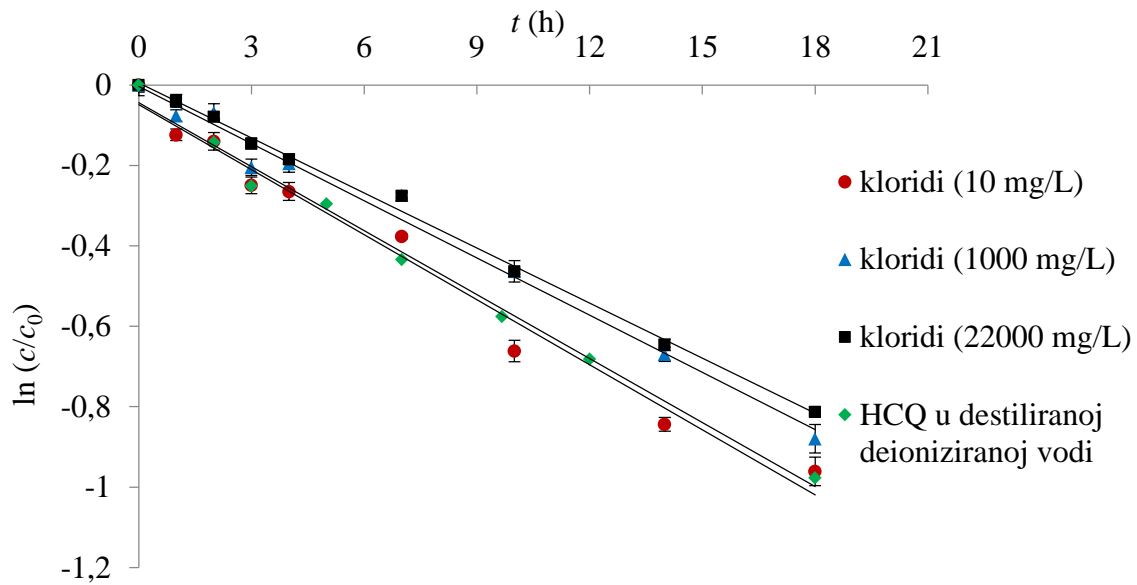
**Slika 4.P** Odnos između faktora zasjenjenja i koncentracije huminskih kiselina



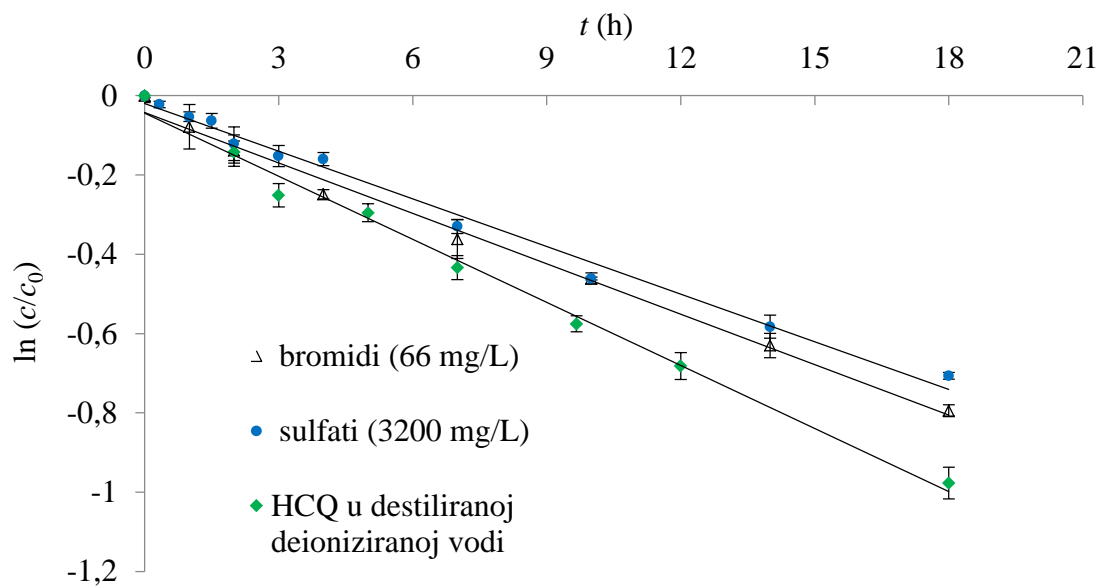
**Slika 5.P** Utjecaj koncentracije nitrata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina



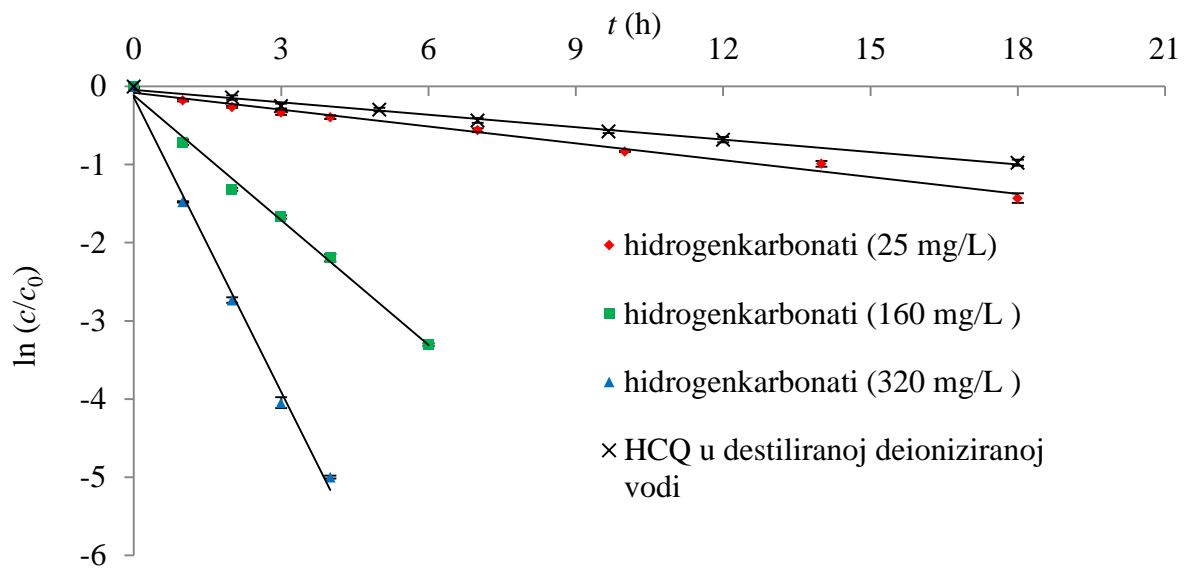
**Slika 6.P** Utjecaj dodatka izopropanola na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina s nitratima



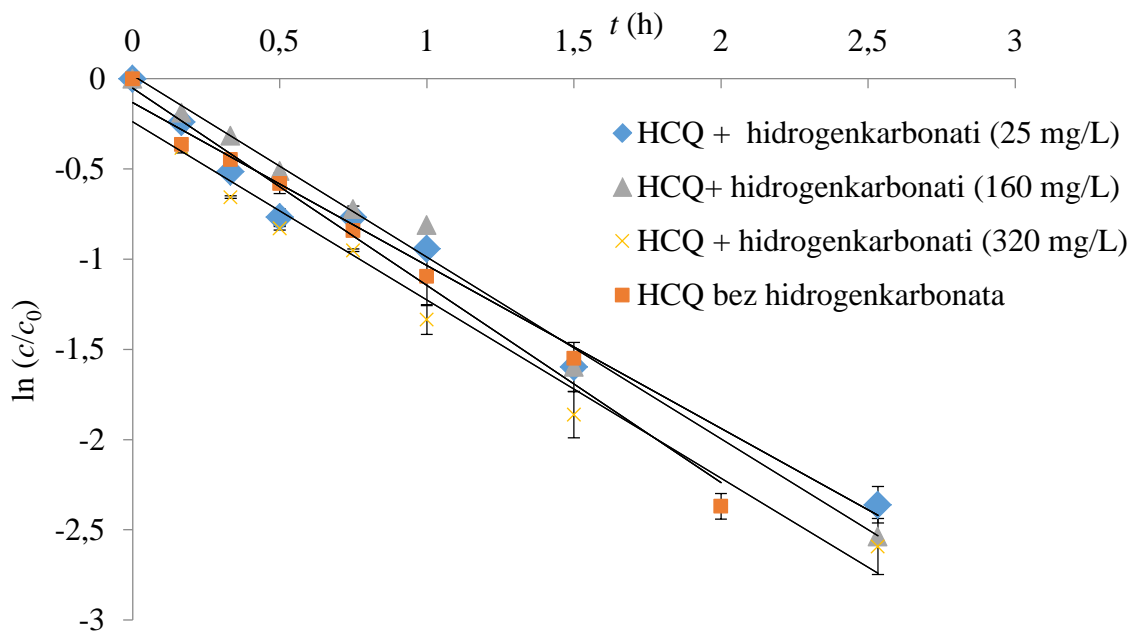
**Slika 7.P** Utjecaj klorida na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina



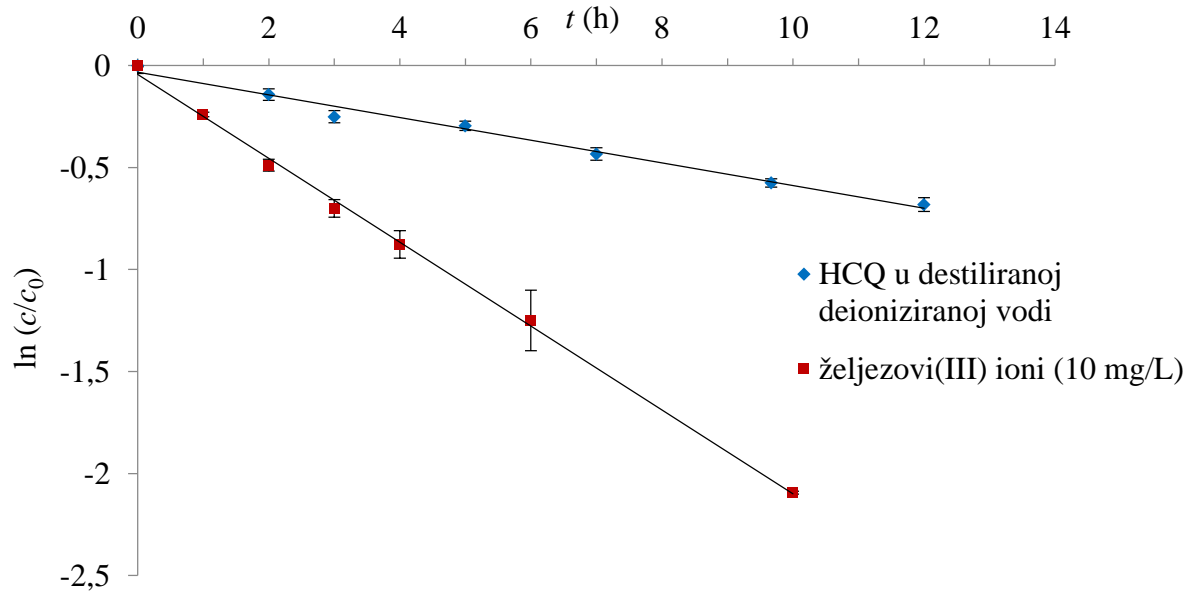
**Slika 8.P** Utjecaj bromida i sulfata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina



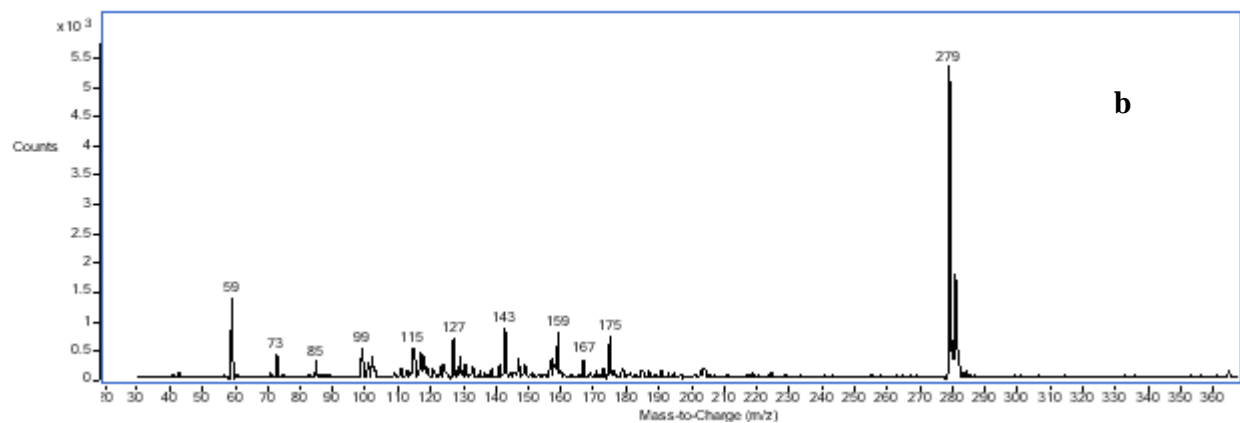
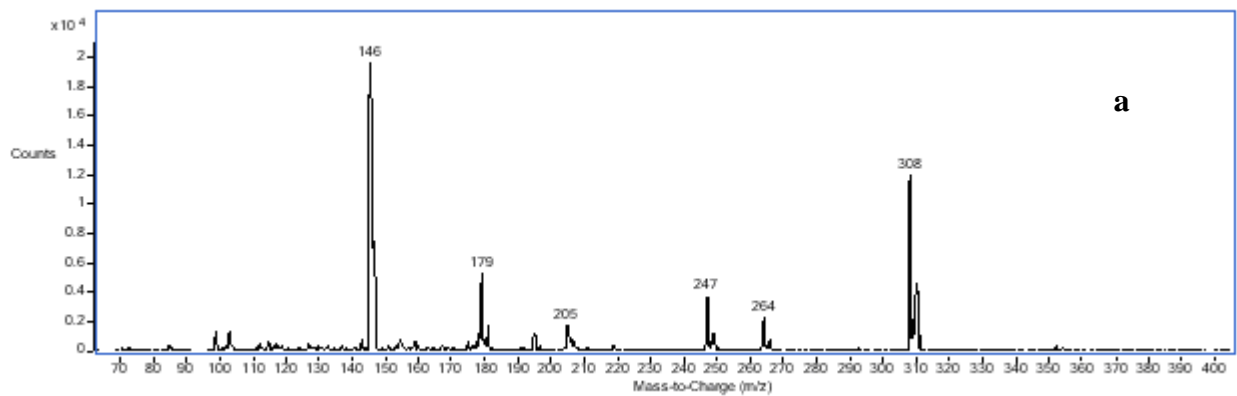
**Slika 9.P** Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

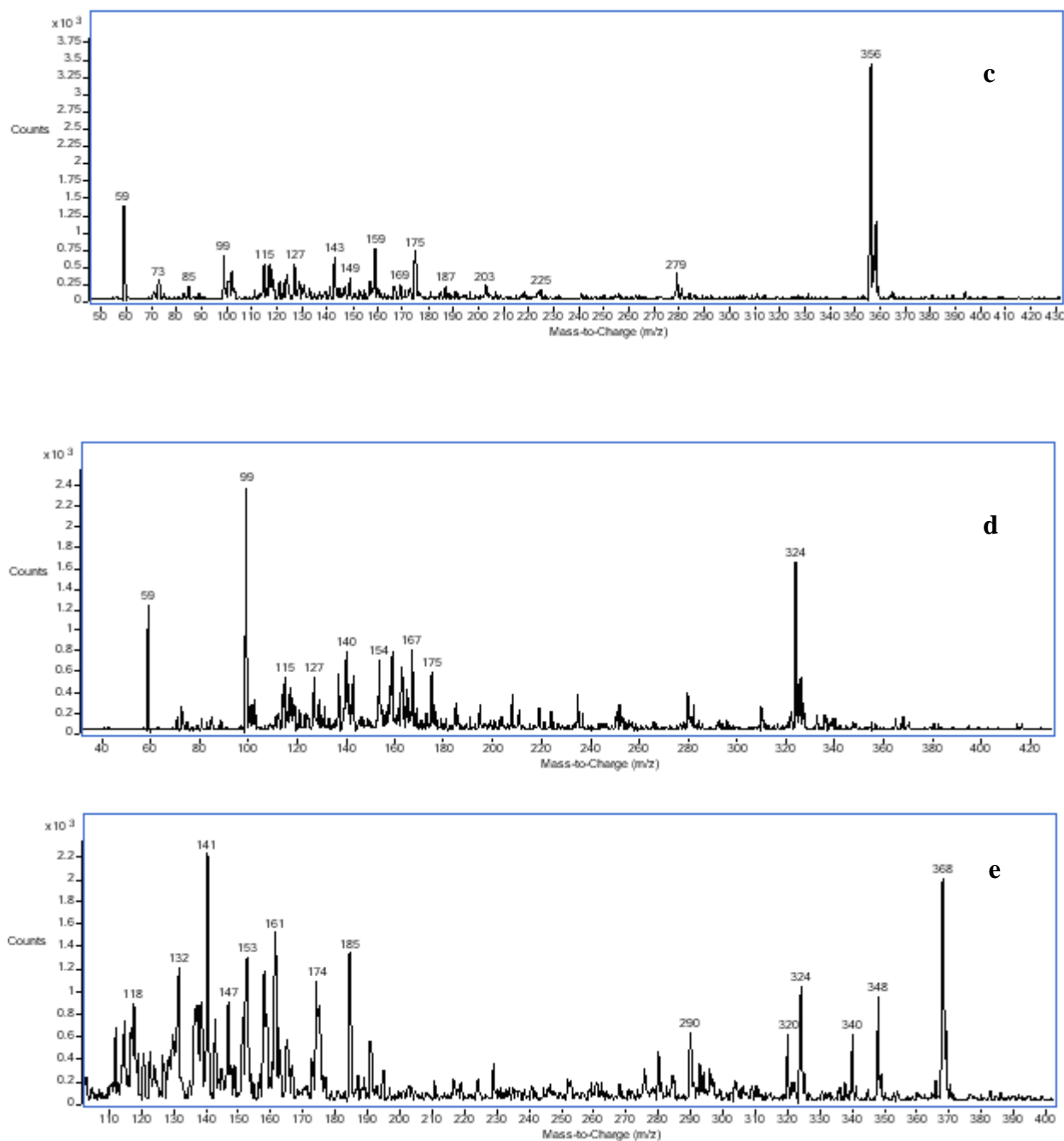


**Slika 10.P** Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina u puferiranim otopinama

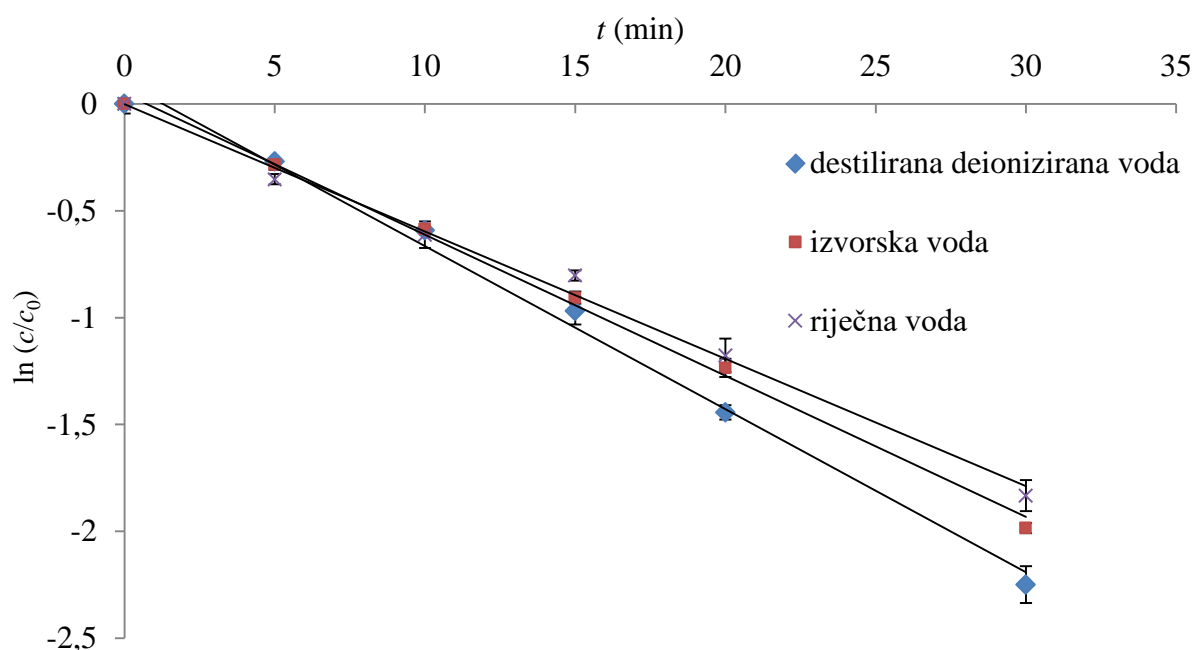


**Slika 11.P** Utjecaj željezovih(III) iona na kinetiku fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina

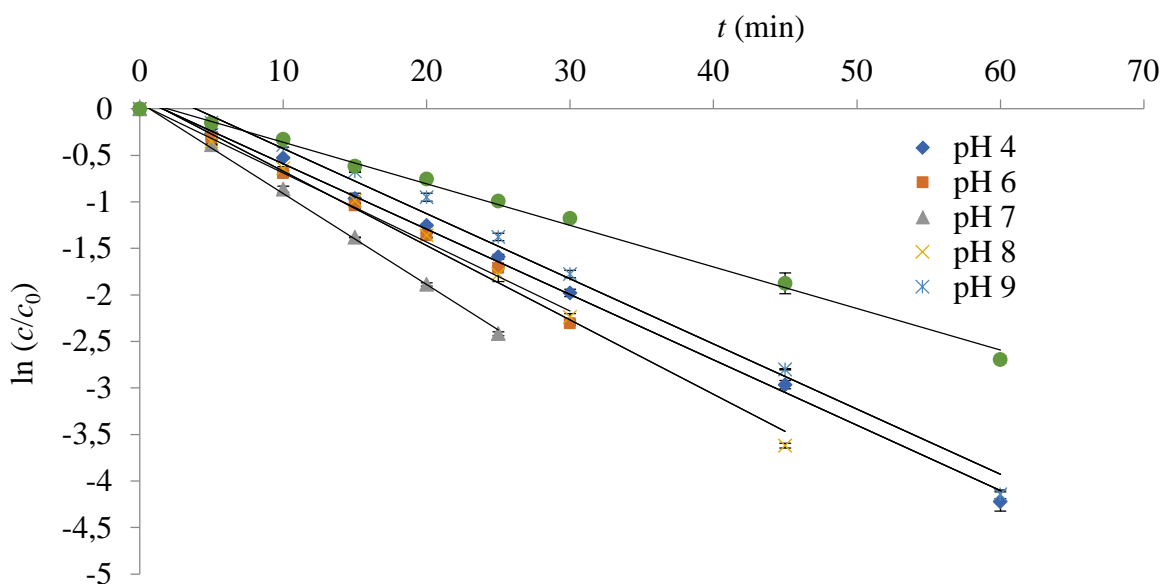




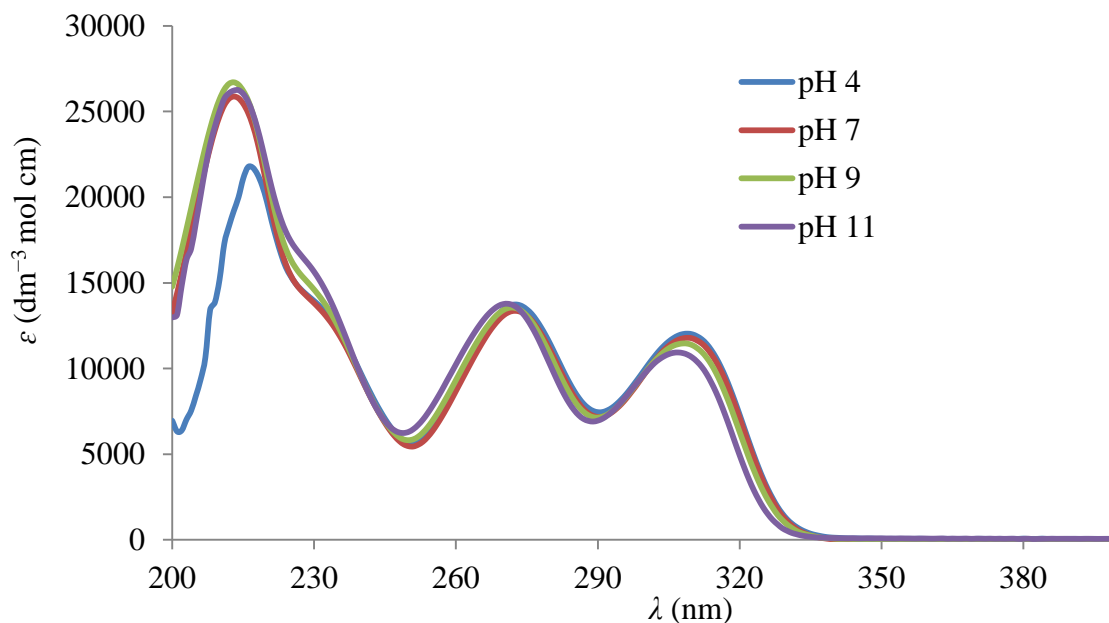
**Slika 12. P** Spektri masa za detektirane razgradne fotoproducte hidroksiklorokina u pozitivnom načinu rada (**a, b** pH = 4, 18 h osvjetljavanja; **c** za 36 h osvjetljavanja ; **d, e** za pH = 9 nakon 10 min osvjetljavanja; Xe svjetiljka, 500 W m<sup>-2</sup>)



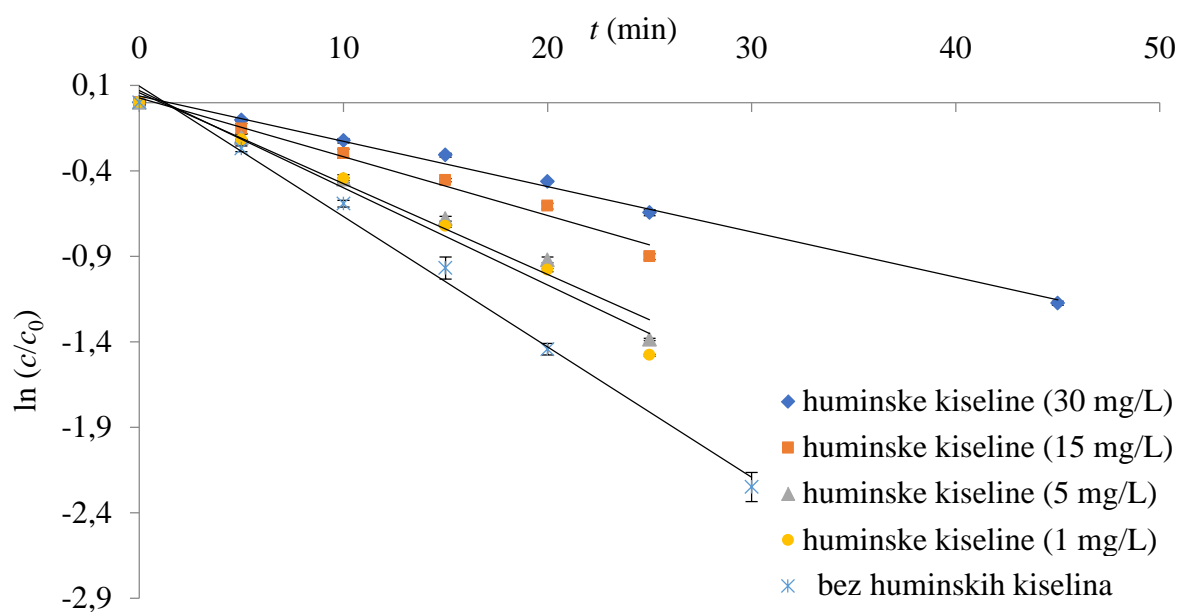
**Slika 13.P** Prikaz fotolitičke razgradnje metoklopramida u destiliranoj deioniziranoj, izvorskoj i riječnoj vodi



**Slika 14.P** Utjecaj vrijednosti pH na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida u puferiranim otopinama

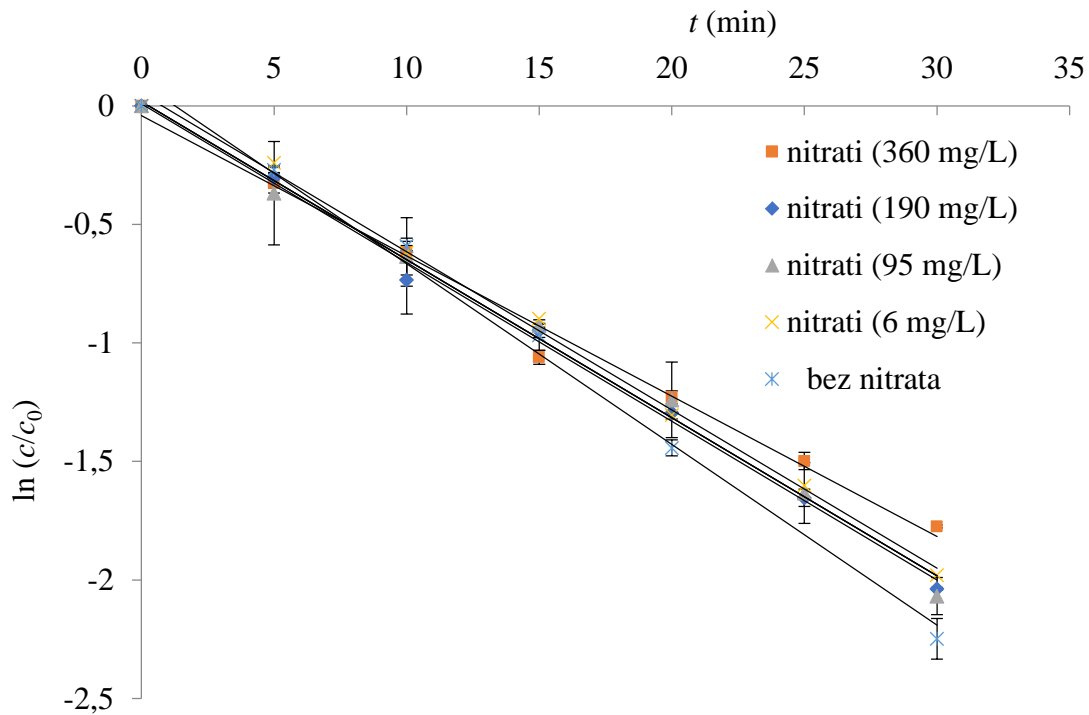


**Slika 15.P** Apsorpcijski spektri metoklopramida pri različitim vrijednostima pH  
( $c_0 = 3,3 \cdot 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ ,  $b = 1 \text{ cm}$ )

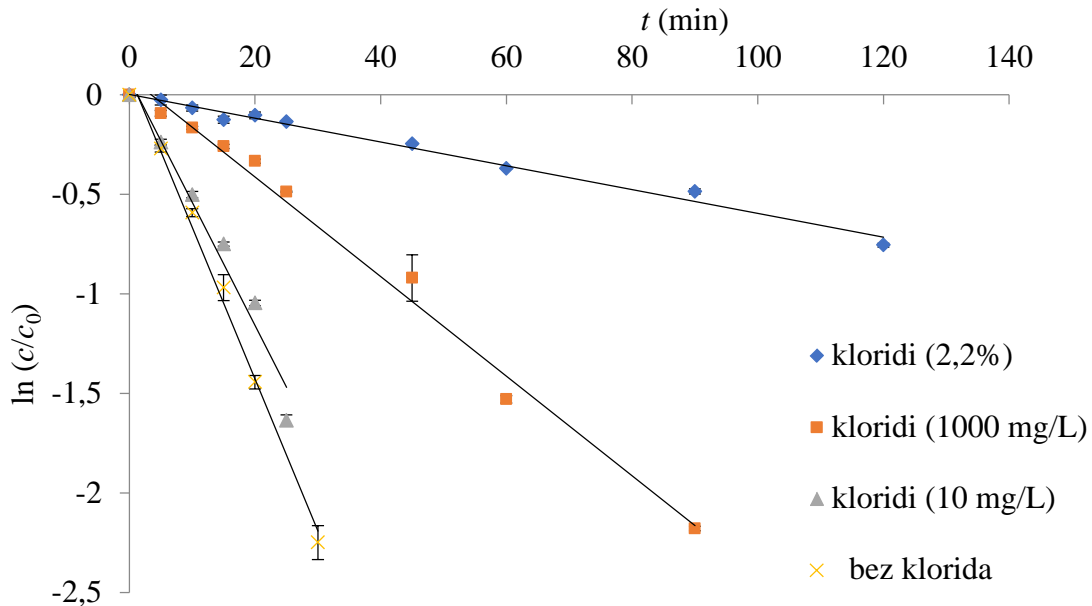


**Slika 16.P** Utjecaj huminskih kiselina na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

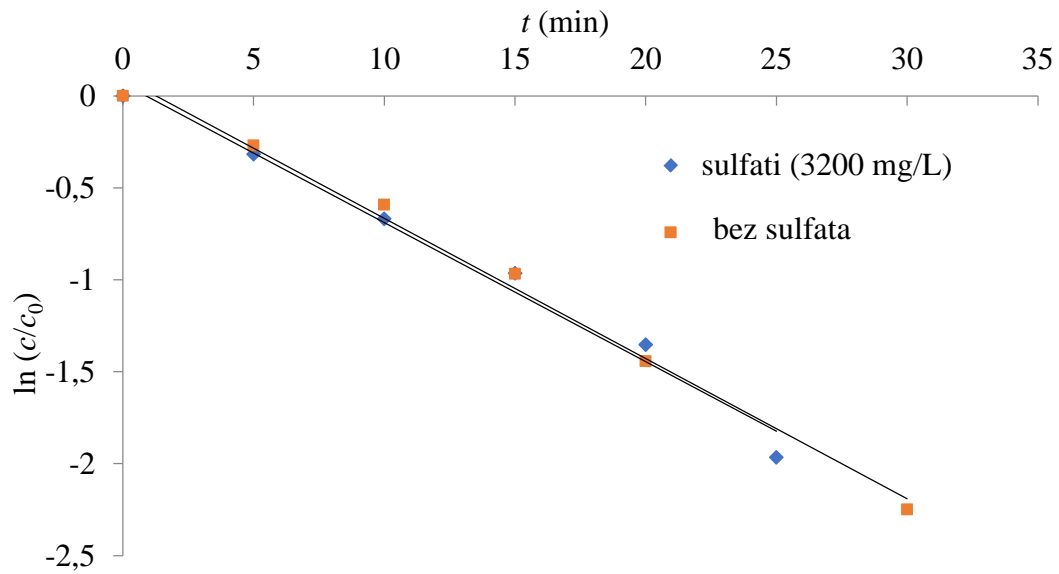




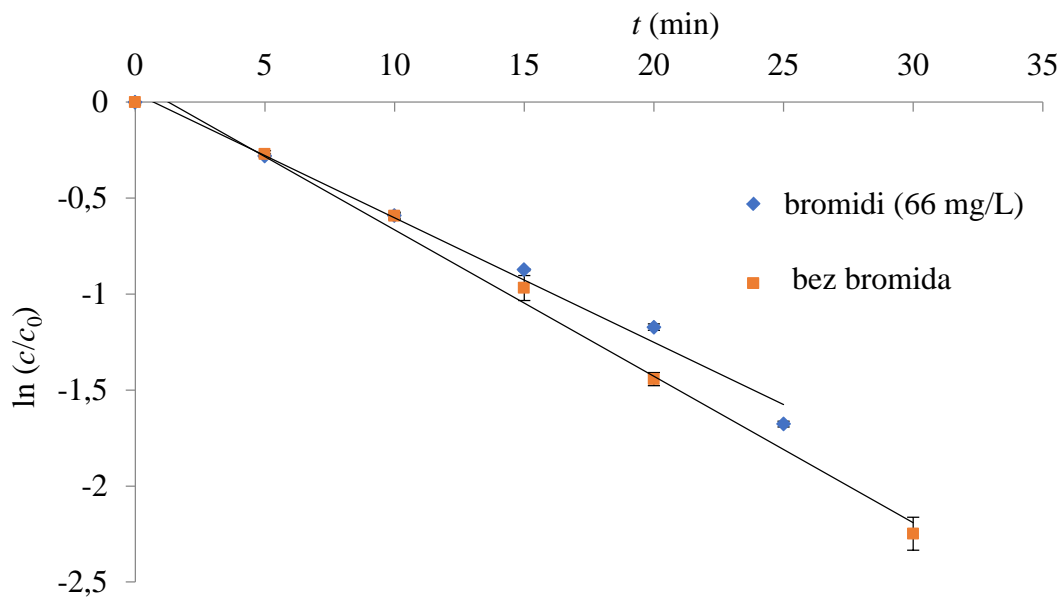
**Slika 17.P** Utjecaj nitrata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida



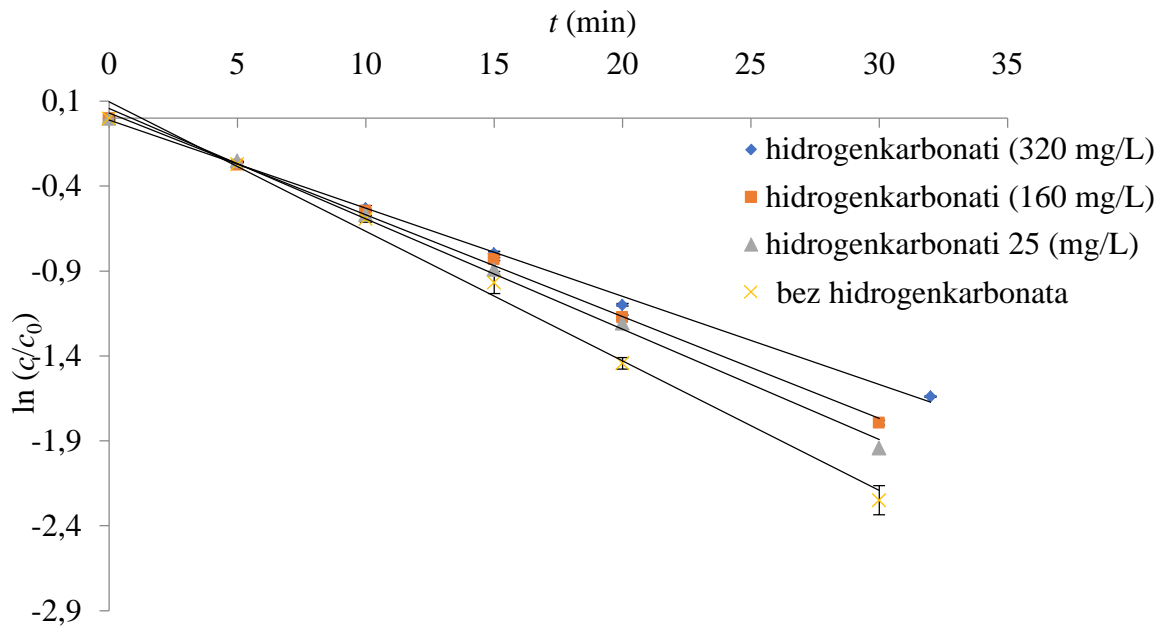
**Slika 18.P** Utjecaj klorida na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida



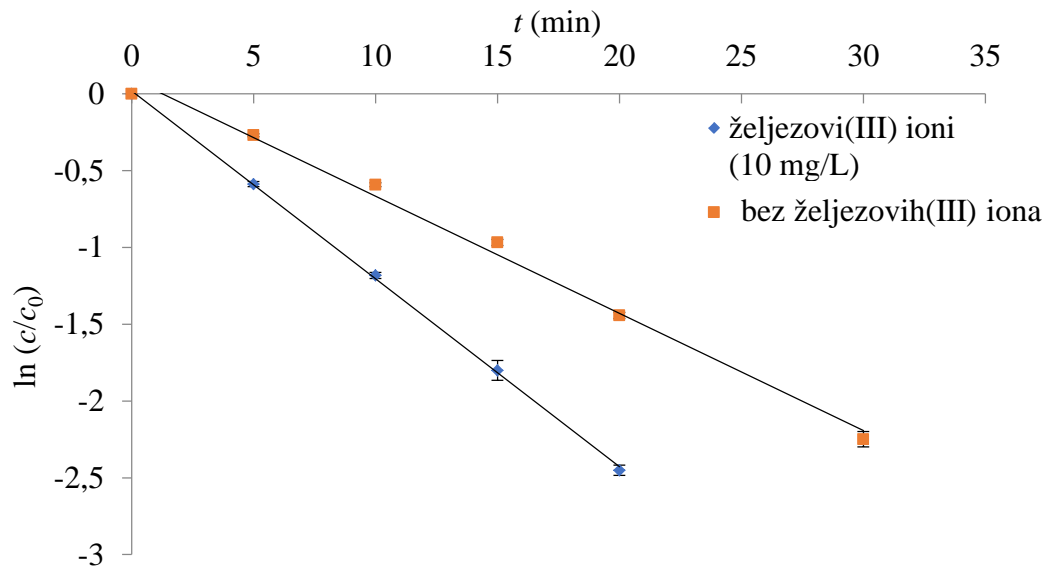
Slika 19.P Utjecaj sulfata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida



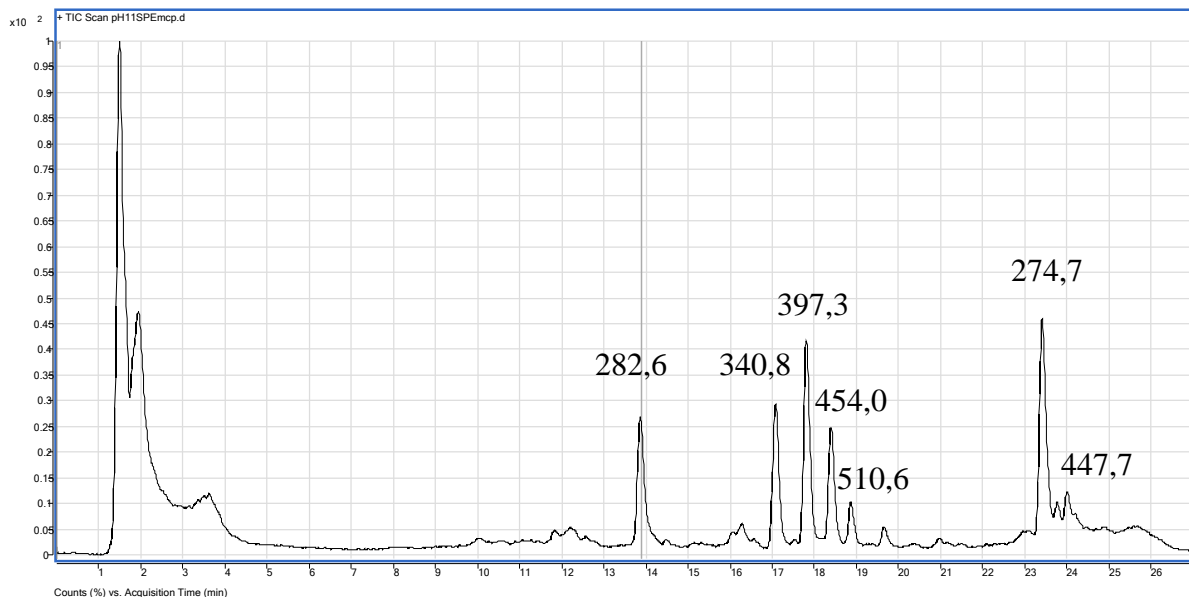
Slika 20.P Utjecaj bromida na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida



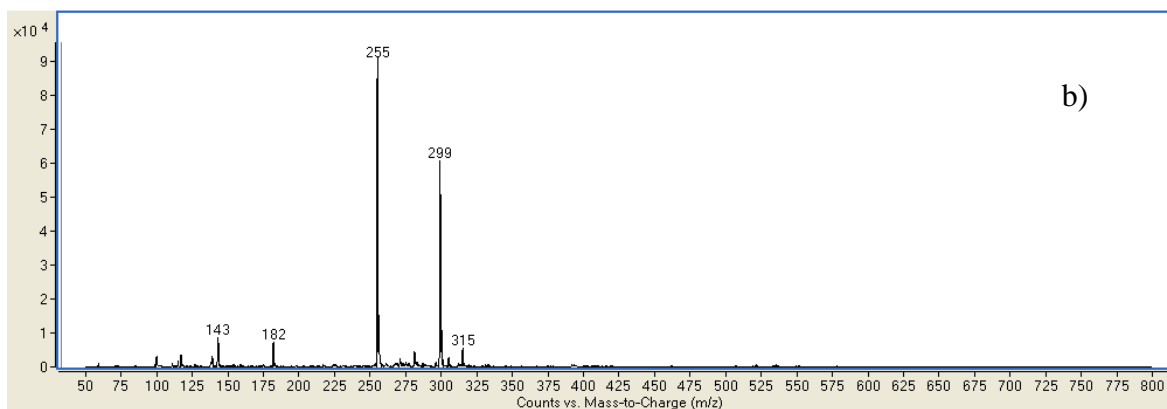
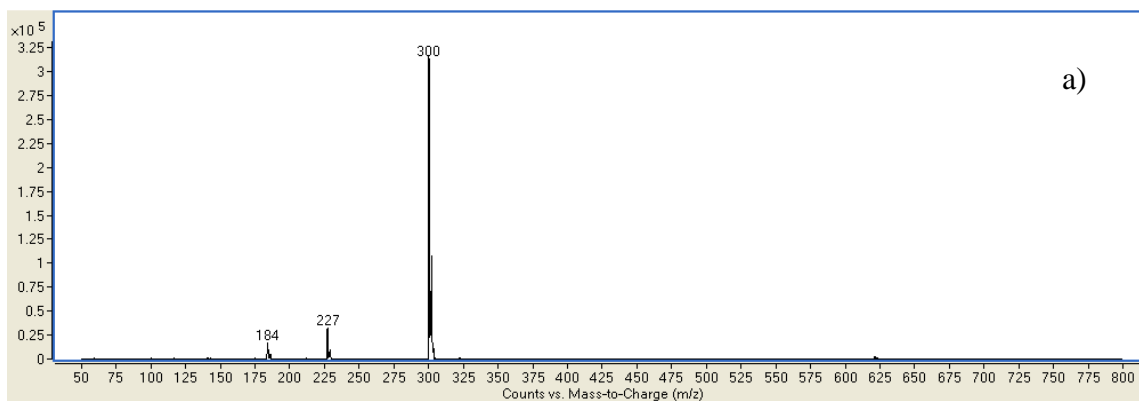
**Slika 21.P** Utjecaj hidrogenkarbonata na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

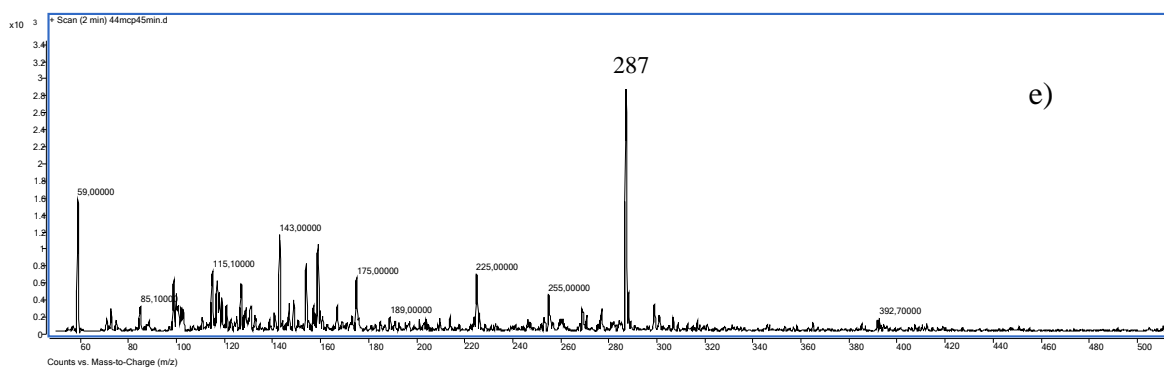
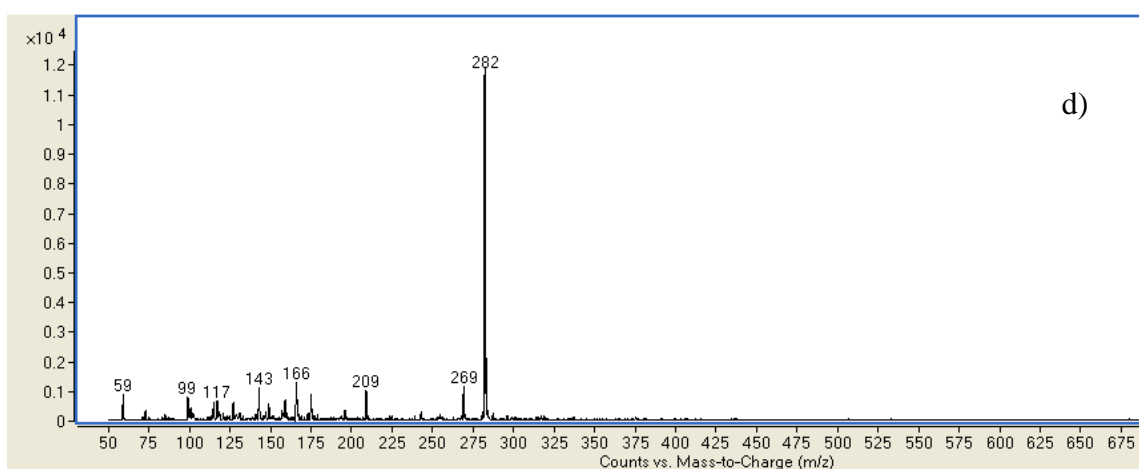
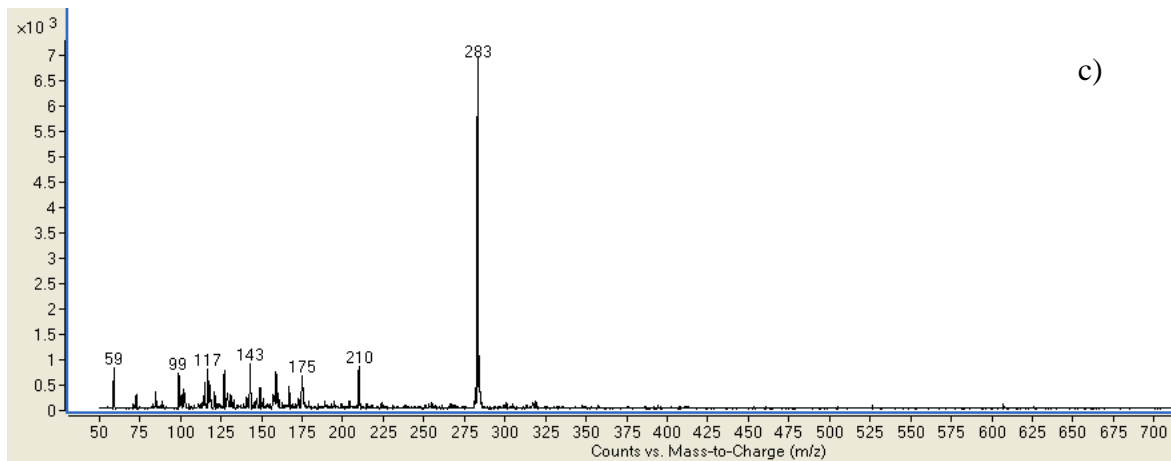


**Slika 22.P** Utjecaj željezovih(III) iona na kinetiku fotolitičke razgradnje metoklopramida

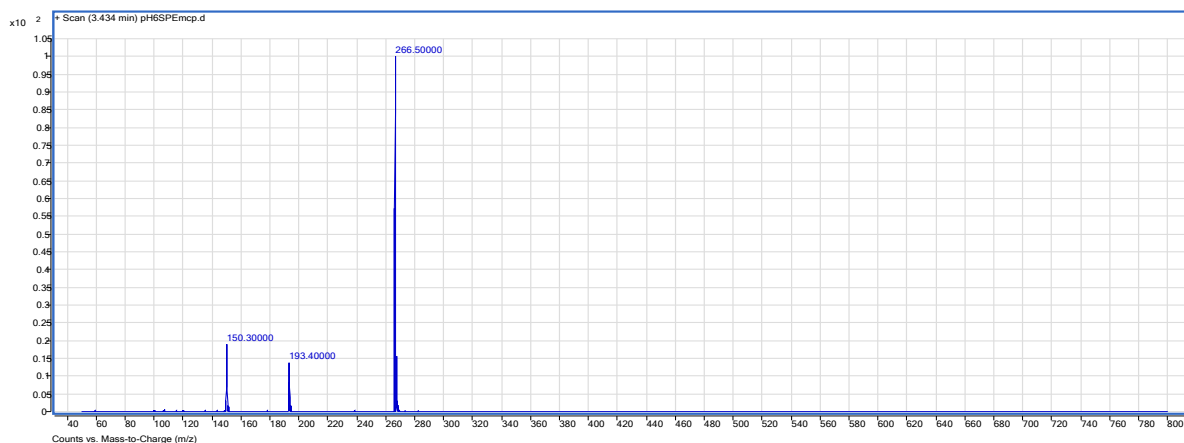


**Slika 23.P** Kromatogram fotolitičke razgradnje metoklopramida nakon 60 min osvjetljavanja s Xe svjetiljkom na  $250 \text{ W m}^{-2}$  pri  $\text{pH} = 11$  snimljen nakon provedene ekstrakcije čvrstom fazom zbog prekoncentriranja uzorka (50 mL uzorka propušteno je kroz sorbens C18 te je 20 mL metanola korišteno kao eluens). Nakon uparavanja na rotacijskom isparivaču pri  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , uzorak je otopljen u 1 mL metanola i snimljen na instrumentu HPLC-MS/MS

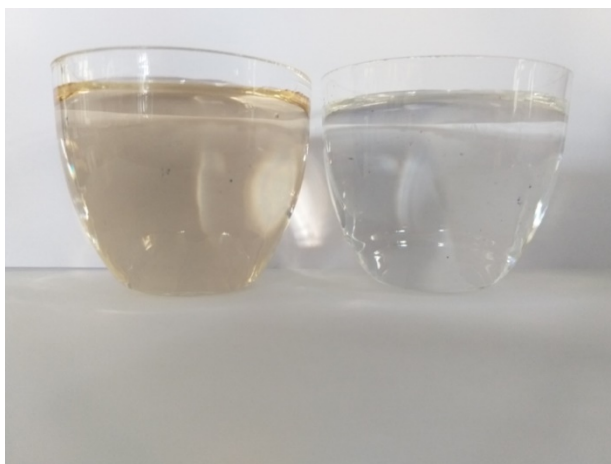




**Slika 24.P** Spektri masa snimljeni na instrumentu HPLC(ESI)-MS/MS u svrhu identifikacije razgradnih produkata metoklopramida (a-e)



**Slika 25.P** Spektar masa visoke razlučivosti (točnosti) razgradnog produkta metoklopramida snimljenog na instrumentu Q-ToF



**Slika 26.P** Primjer promjene boje otopine metoklopramida nakon fotolitičke razgradnje iz bezbojne (prije razgradnje) u žuto-smeđu (nakon 60 min razgradnje)



## a) ZNANSTVENI ČLANCI OBJAVLJENI U BAZI *Current Contents*

1. **D. Dabić**, S. Babić, I. Škorić, The role of photodegradation in the environmental fate of hydroxychloroquine, *Chemosphere* 230 (2019) 268-277.
2. A. Selmani, J. Lützenkirchen, K. Kučanda, **D. Dabić**, E. Redel, I. Delač Marion, D. Kralj, D. Domazet Jurašin, M. Dutour Sikirić, Tailoring the stability/aggregation of one-dimensional TiO<sub>2</sub>(B)/titanate nanowires using surfactants, *Beilstein J. Nanotechnol.* 10 (2019) 1024-1037.
3. **D. Dabić**, L. Brkljačić, T. Tandarić, M. Žinić, R. Vianello, L. Frkanec, R. Kobetić, The Metal Effect on Self-Assembling of Oxalamide Gelators Explored by Mass Spectrometry and DFT Calculations, *J. Am. Soc. Mass Spectr.* 28 (2018) 103-113.
4. M. Biošić, F. Varga, **D. Dabić**, I. Topalović, Z. Šatović, M. Grdiša, Matrix solid-phase dispersion optimization for determination of pyrethrin content in Dalmatian pyrethrum (*Tanacetum cinerariifolium* /Trevir./ Sch. Bip.) by liquid chromatograph, *Ind. Crops. Prod.* 145 (2019) 111999.

## b) STRUČNI RADOVI

- D. Dabić**, D. Petrin, Puferi u nastavi. I. Mjerenje vrijednosti pH i osnove teorije pufera, *Kem. Ind.* 69 (3-4) (2020) 183–194.
- D. Dabić**, D. Petrin, Puferi u nastavi. II. Priprema i upotreba, *Kem. Ind.* 69 (5-6) (2020) u tisku.