

Ispitivanje utjecaja različitih parametara na fotokatalitičku razgradnju prokaina

Javorić, Kristina

Master's thesis / Diplomski rad

2023

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:149:963627>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-12-20**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Javorić
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Javorić

**Ispitivanje utjecaja različitih parametara na fotokatalitičku
razgradnju prokaina**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

dr. sc. Kristina Tolić Čop

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, lipanj 2023.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu.

Prije svega se zahvaljujem svojoj mentorici, prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović, na strpljenju, susretljivosti, stručnim sugestijama i vodstvu prilikom izrade ovog rada.

Veliko hvala dr.sc. Kristini Tolić Čop na neposrednom vodstvu, prenesenom znanju, velikoj pomoći, uloženom vremenu, trudu i podršci tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada, kao i tijekom njegovog pisanja.

Zahvalu upućujem i Ivani Gabelici, mag. appl. chem. s Fakulteta strojarstva i brodogradnje u Zagrebu na pripremljenom fotokatalizatoru.

Također hvala svim kolegama i prijateljima na svim zajedničkim trenucima učenja, zabave i međusobne podrške.

Posebnu zahvalu upućujem mom bratu, šogorici i nećaku Janu koji su mi ovo razdoblje života učinili puno jednostavnijim i ljepšim.

Na kraju, najveće hvala mojim roditeljima na neizmjerljivoj podršci, razumijevanju, ljubavi i ogromnoj pomoći tijekom svih godina provedenih na FKIT-u.

Ispitivanje utjecaja različitih parametara na fotokatalitičku razgradnju prokaina

SAŽETAK

Farmaceutici su sveprisutni u našem svakodnevnom životu i time vrlo lako dospijevaju u okoliš. Primarni put njihovog ulaska u okoliš je kroz izvore otpadnih voda. Farmaceutici i njihovi metaboliti koji se prenose otpadnom vodom u rijeke i potoke uzrokuju velike probleme u cijelom ekosustavu i vrlo ju je važno prije ispuštanja u vodotokove adekvatno obraditi. Konvencionalni biološki i kemijski postupci obrade otpadnih voda su neučinkoviti zbog bio-nerazgradive prirode mnogih farmaceutika pa se stoga istražuju napredni oksidacijski procesi. Kao jedan od naprednih oksidacijskih procesa u ovom se radu provodi fotokataliza uz katalizator koji je napravljen nanošenjem TiO_2 filma na Al_2O_3 keramičku, pjenastu podlogu pri čemu je kao izvor zračenja korištena UV lampa.

U ovom radu ispitan je utjecaj različitih parametara na fotokatalitičku razgradnju prokaina. Prvo je provedena validacija metode za praćenje prokaina u vodi. Nakon toga provedli su se preliminarni eksperimenti kojima se potvrdilo da smanjenje koncentracije prokaina u otopini nije povezano s njegovom hidrolitičkom razgradnjom niti njegovom adsorpcijom na fotokatalizator. Također, određena je i kinetika fotokatalitičke razgradnje prokaina koja se može opisati reakcijom razgradnje prvog reda. Nadalje, provođenjem eksperimenata kojima se ispitaio utjecaj pH vrijednosti otopine i koncentracije prokaina određeni su optimalni uvjeti za provođenje fotokatalitičke razgradnje pri čemu koncentracija prokaina iznosi 10 mg/L, a pH vrijednost otopine 10. Ispitivanjem utjecaja slobodnih radikala na mehanizam razgradnje pokazalo se da šupljine imaju značajnu ulogu. Prilikom ispitivanja utjecaja matice vode utvrđeno je da nitrati i kloridi blago usporavaju fotokatalitičku reakciju razgradnje prokaina, a hidrogenkarbonati povećavaju brzinu razgradnje, ali sama promjena koncentracije navedenih tvari u otopini ne utječe na brzinu razgradnje. S druge strane, povećanjem koncentracije huminske kiseline smanjuje se brzina fotokatalitičke razgradnje. Razgradni produkti određeni nakon provođenja eksperimenta pri optimalnim uvjetima su RP-1 s m/z 120 i RP-2 s m/z 138. Na kraju se provela i procjena razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora prokaina i nastalih razgradnih produkata računalnim programom TEST.

Ključne riječi: fotokataliza, prokain, TiO_2 , optimalni uvjeti, utjecaj matice, razgradni produkti, toksičnost

Influence investigation of different parameters on photocatalytic degradation of procaine

ABSTRACT

Pharmaceuticals are ubiquitous in our daily lives and therefore easily enter the environment. They enter the environment primarily through wastewater. Pharmaceuticals and their metabolites that enter rivers and streams with wastewater are a major problem for the entire ecosystem, and it is very important to treat them properly before they enter waterways. Conventional biological and chemical wastewater treatment methods are ineffective due to the biodegradability of many pharmaceuticals, so advanced oxidation methods are being researched. As one of the advanced oxidation methods, photocatalysis is carried out in this work with a catalyst prepared by depositing a TiO₂ film on an Al₂O₃ ceramic foam substrate, using a UV lamp as a radiation source.

In this work, the influence of various parameters on the photocatalytic degradation of procaine was investigated. First, the validation of the method for monitoring procaine in water was carried out. Then, preliminary experiments were performed, which confirmed that the decrease of procaine concentration in solution was not related to its hydrolytic degradation or adsorption to the photocatalyst. Moreover, the kinetics of the photocatalytic decomposition of procaine was determined, which can be described by a first-order decomposition reaction. In addition, experiments that investigated the influence of solution pH value and the procaine concentration, the optimal conditions for carrying out photocatalytic decomposition, where the procaine concentration is 10 mg/L and the solution pH is 10. When studying the influence of free radicals on the decomposition mechanism, it was found that the holes played an important role. When the influence of water matrix was studied, it was found that nitrates and chlorides slightly slow down the photocatalytic reaction of procaine decomposition and hydrogen carbonates increase the rate of decomposition, but the mere change of the concentration of the mentioned substances in the solution does not affect the rate of decomposition. Increasing the concentration of humic acid, on the other hand, decreases the photocatalytic degradation rate. The degradation products determined after performing the experiment under optimal conditions are RP-1 with *m/z* 120 and RP-2 with *m/z* 138. Finally, an evaluation of the developmental toxicity, mutagenicity, and bioaccumulation factor of procaine and the resulting degradation products was performed using the computer program TEST.

Key words: photocatalysis, procaine, TiO₂, optimal conditions, influence of the matrix, degradation products, toxicity

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Farmaceutici.....	4
2.1.1. Lokalni anestetici	5
2.1.1.1. Prokain	6
2.1.2. Farmaceutici u okolišu	6
2.1.2.1. Fotolitička razgradnja farmaceutika u okolišu	9
2.2. Metode obrade otpadnih voda.....	10
2.2.1. Napredni oksidacijski procesi.....	12
2.2.1.1. Fotokataliza.....	13
2.2.1.1.1. Titanijev (IV) oksid.....	14
2.2.1.1.2. Mehanizam i kinetika heterogene fotokatalize.....	15
2.3. Kromatografija kao instrumentalna metoda analize	17
2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	17
2.4. Tekućinska kromatografija vezana na spektrometriju masa (LC-MS/MS).....	20
2.5. Validacija.....	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	23
3.1. Materijali.....	24
3.1.1. Kemikalije.....	24
3.1.2. Fotokatalizator	24
3.1.3. Farmaceutski aktivna tvar – prokain hidroklorid.....	25
3.2. Instrumenti.....	26
3.2.1. Analitička vaga.....	26
3.2.2. Ultrazvučna kupelj.....	26
3.2.3. pH – metar	27
3.2.4. Fotokatalitički reaktor.....	27
3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC-DAD).....	28
3.3. Opis rada	29
3.3.1. Priprema temeljne standardne otopine prokaina	29
3.3.2. Validacija metode za određivanje prokaina.....	29
3.3.2.1. Linearnost	29
3.3.2.2. Ponovljivost i međupreciznost.....	29
3.3.2.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije	30

3.3.3. Priprema radnih otopina.....	30
3.3.4. Preliminarni eksperimenti	32
3.3.5. Fotokatalitička razgradnja prokaina.....	32
3.3.6. Analiza uzoraka HPLC-DAD	32
3.3.7. Analiza uzoraka UPLC-MS/MS	33
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	35
4.1. Validacija.....	36
4.2. Preliminarni eksperimenti.....	37
4.3. Fotokatalitička razgradnja prokaina.....	40
4.3.1. Utjecaj pH i koncentracije prokaina.....	40
4.3.2. Mehanizam fotokatalitičke razgradnje.....	43
4.3.3. Utjecaj matice vode.....	45
4.3.4. Primjena realne otpadne vode	51
4.4. Razgradni produkti.....	53
4.5. Procjena toksičnosti.....	57
5. ZAKLJUČAK.....	59
6. LITERATURA	62
7. ŽIVOTOPIS.....	67

1. UVOD

Farmaceutici se koriste za dijagnosticiranje, liječenje i prevenciju bolesti u humanoj i veterinarskoj medicini. U svakodnevnom su životu neophodni i ulaze u okoliš kroz razne izvore pa je vrlo važno minimizirati njihove brojne negativne učinke na okoliš i fokusirati se na bolje tehnologije obrade otpadnih voda kako bi oni u što manjim količinama dospijevali u ekološke matrice. Heterogena fotokataliza, koja spada u napredne oksidacijske procese, jedna je od učinkovitih i obećavajućih tehnologija koja se temelji na fotoaktivaciji poluvodiča koji djeluju kao aktivne katalitičke površine za razgradnju i mineralizaciju postojećih organskih zagađivala, uključujući i farmaceutike.

U ovom je radu ispitivani farmaceutik prokain, derivat *p*-aminobenzojeve kiseline i jedan od najstarijih korištenih lokalnih anestetika esterskog tipa kojeg karakterizira visoka stabilnost u prirodnim uvjetima uz slabo uklanjanje u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda. U industrijskim farmaceutskim otpadnim vodama i otpadnim vodama iz postrojenja za pročišćavanja otpadnih voda otkriven je u koncentracijama blizu 1 µg/L.

Cilj ovog rada je ispitati utjecaj pH vrijednosti otopine i koncentracije prokaina na njegovu fotokatalitičku razgradnju, odrediti mehanizam fotokatalitičke razgradnje, ispitati utjecaj matrice vode te učinkovitost njegove fotokatalitičke razgradnje u uzorku realne otpadne vode. Razgradnjom farmaceutika dolazi do stvaranja njegovih razgradnih produkata koji mogu imati čak i veću toksičnost od izvorne tvari pa je vrlo važno identificirati i procijeniti njihovu toksičnost. Zbog toga je proveden i eksperiment pri optimalnim uvjetima u svrhu karakterizacije nastalih razgradnih produkata nakon čega je provedena i procjena razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora prokaina i nastalih razgradnih produkata pomoću softverskog alata TEST. Prije provedbe eksperimenata provedena je validacija analitičke metode za praćenje prokaina u vodi. Svi eksperimenti fotokatalize provedeni su korištenjem titanijeva dioksida, TiO₂, kao katalizatora imobiliziranog na Al₂O₃ pjenastu podlogu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Farmaceutici

Farmaceutici, tj. lijekovi koriste se za dijagnosticiranje, liječenje i prevenciju bolesti u humanoj i veterinarskoj medicini. Formulacija lijeka sastoji se od farmaceutski aktivne tvari (API¹-ja), pomoćnih tvari te ponekad sadrži i pigmente i bojila. API je glavna komponenta, kemijski i biološki aktivna, dok pomoćne tvari štite, podupiru ili poboljšavaju stabilnost, biološku raspoloživost ili podnošljivost lijeka. [1] Molekulske mase farmaceutika kreću se od 200 – 1000 Daltona. [2]

Za klasifikaciju farmaceutika služi nam sustav anatomsko-terapijsko-kemijske (ATK) klasifikacije kojeg propisuje Svjetska zdravstvena organizacija. Prema tom se sustavu klasifikacije, sve kategorije farmaceutika dijele na pet razina. ATK klasifikacija po razinama na primjeru prokaina prikazana je u **tablici 1**. [3]

Tablica 1. ATK klasifikacija prokaina [4]

1. Anatomska glavna grupa na koju lijek djeluje	Lijekovi s djelovanjem na živčani sustav
2. Glavna terapijska grupa kojoj pripada dati lijek	Anestetici
3. Farmakološko – terapijska podgrupa	Lokalni anestetici
4. Farmakološko – kemijska podgrupa	Esteri
5. Kemijski aktivna tvar	Prokain

¹ engl. *active pharmaceutical ingredient*

2.1.1. Lokalni anestetici

Lokalni anestetici su lijekovi koji se koriste u svrhu privremenog i reverzibilnog uklanjanja bolnih osjećaja u određenim dijelovima tijela blokiranjem prijenosa impulsa živčanih vlakana. [5] Bilo koji dio živčanog sustava može biti mjesto gdje lokalni anestetici djeluju kako bi proizveli željeni anestetički ili analgetski učinak. Oni reverzibilno blokiraju širenje akcijskog potencijala u aksonima sprječavajući ulazak natrija koji proizvodi potencijale. [6] Akcijski potencijal je pojava snažnih, brzih i povratnih promjena membranskog potencijala koji se javlja kao odgovor na dovoljnu razinu depolarizacije. [7] Na^+ kanal obično ima tri primarne konfiguracije tijekom akcijskog potencijala. U mirnom živcu je većina Na^+ kanala u stanju mirovanja, tj. zatvorenom stanju. Djelomična depolarizacija membrane uzrokovana električnim impulsima potiče otvaranje ovih kanala što dovodi do eksplozivne depolarizacije i širenja akcijskog potencijala. Međutim, gotovo odmah ti isti kanali postaju inaktivirani, sprječavajući kontinuirani dotok Na^+ bez obzira na daljnju stimulaciju. Ponovno pretvaranje iz otpornog inaktiviranog stanja u osjetljivo stanje mirovanja događa se tek nakon što se transmembranski potencijal vrati u normalu. [6] Lokalni anestetici vežu se za unutarstaničnu površinu natrijevih kanala i blokiraju ulaz natrijevih iona u stanicu. To dovodi do zaustavljanja procesa depolarizacije koji je neophodan za difuziju akcijskih potencijala. S obzirom da je proces vezanja anestetika na ionske kanale reverzibilan, lijek difundira u krvožilni sustav, metabolizira se, a funkcija živčanih stanica se potpuno obnavlja. [5]

Lokalni anestetici mogu se klasificirati prema glavnom načinu njihove kliničke upotrebe (anestezija za periferne živčane blokove te površinska, infiltracijska, spinalna i epiduralna anestezija) i prema određenoj klasi kemijskih spojeva. [5] Tipični lokalni anestetik je amfipatski i sadrži lipofilnu aromatsku strukturu na jednom kraju molekule i hidrofilnu amino skupinu na drugom kraju. Veza između krajeva može biti aminoesterska ili aminoamidna pri čemu se lokalni anestetici označavaju kao pripadnici jedne od dvije skupine: lokalni anestetici vezani na aminoester ili lokalni anestetici vezani na aminoamid. [8]

Naširoko se koriste u kirurgiji, ginekologiji i stomatologiji. Također, koriste se i za ublažavanje bolova, svrbeža i iritacija povezanih s narušavanjem cjelovitosti kože i sluznice (posjekotine, rane, osipi itd.), a u određenim se slučajevima lokalni anestetici (lidokain, prokainamid) mogu koristiti i kao antiaritmiци. [5] Metabolizam lokalnih anestetika iz skupine estera odvija se hidrolizom u plazmi (osim kokaina koji se hidrolizira u jetri) pomoću enzima

pseudokolinesteraze. Oni imaju kratko vrijeme poluraspada, a njihovi metaboliti se izlučuju putem bubrega. Lokalni anestetici iz skupine amida se podvrgavaju enzimskoj razgradnji mikrosomalnim enzimima koji se nalaze u jetri. Ovo je sporiji proces, stoga je poluživot amida duži i oni se mogu akumulirati ako se daju više puta. [9]

2.1.1.1. Prokain [10, 11]

Prokain je derivat *p*-aminobenzojeve kiseline i jedan je od najstarijih korištenih lokalnih anestetika esterskog tipa. Sam po sebi ima kratko vrijeme poluraspada, ali može stvarati soli s drugim spojevima što rezultira produljenjem trajanja njegova djelovanja. Komercijalno je dostupan kao prokain hidroklorid, tj. *Novocain*. Pokazuje jako male stupnjeve toksičnosti i iritacije, dobro se podnosi i odlikuje ga dobra stabilnost u fazi otopine. Neučinkovit je kada se primjenjuje površinskom primjenom i koristi se samo u obliku injekcije. Djelovanje lijeka počinje nakon otprilike pet minuta. Vazokonstriktori se obično primjenjuju zajedno s prokainom kao vazodilatatorom kako bi se odgodila apsorpcija i produljilo njegovo djelovanje. Lijek se koristi za infiltracijsku anesteziju, blokadu perifernih živaca i spinalnu anesteziju. Prokain se lako apsorbira i brzo hidrolizira u plazmi kolinesterazom u *p*-aminobenzojevu kiselinu i dietilaminoetanol. Dio lijeka se također metabolizira i u jetri, a oko 80 % *p*-aminobenzojeve kiseline izlučuje se nepromijenjeno.

Prokain je otkriven u koncentracijama blizu 1 µg/L u industrijskim farmaceutskim otpadnim vodama i otpadnim vodama iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda. Visoka stabilnost ovog lijeka u prirodnim uvjetima uz slabo uklanjanje u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda objašnjava njegovu prisutnost u vodenom okolišu, iako njegovi potencijalno toksični učinci na vodene organizme do sada nisu dokumentirani. Čini se da je učinkovito uklanjanje prokaina i njegovih produkata iz industrijskih farmaceutskih otpadnih voda snažnim tretmanima transformacije neophodno kako bi se izbjeglo njegovo ispuštanje u prirodnu vodu.

2.1.2. Farmaceutici u okolišu

Moderna medicina ne može se zamisliti bez lijekova. Više od 3000 aktivnih farmaceutskih tvari primjenjuje se diljem svijeta u lijekovima na recept, terapijskim lijekovima bez recepta i veterinarskim lijekovima. Rastuća svjetska populacija, ulaganja u zdravstveni sektor, napredak u istraživanju i razvoju, velika dostupnost globalnog tržišta i starenje društava u

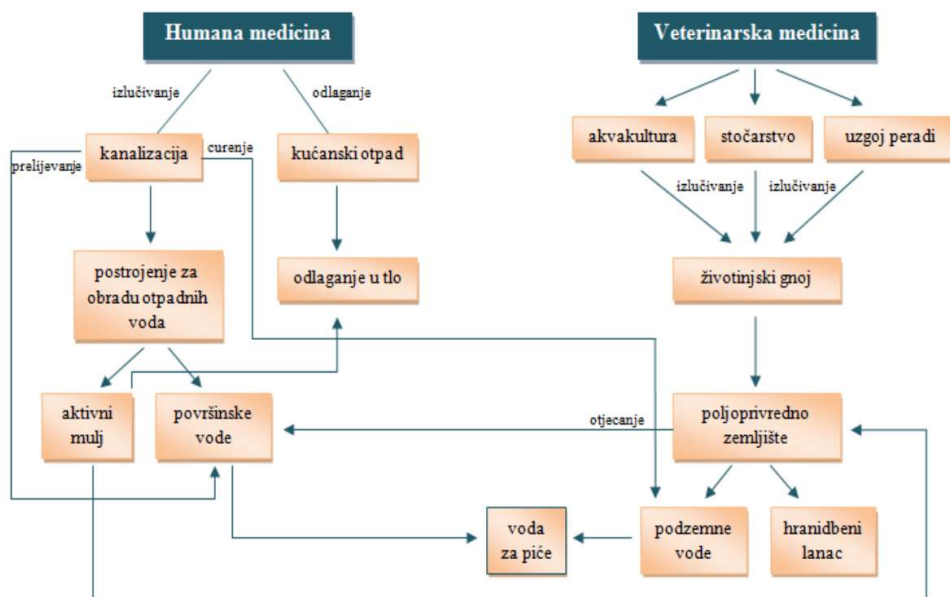
industrijaliziranim zemljama doveli su do snažnog porasta potrošnje lijekova posljednjih desetljeća. Razvitak novih, osjetljivijih analitičkih metoda omogućio je detektiranje farmaceutika u okolišu u rasponu od $\mu\text{g/L}$ do pg/L . Prema prikupljenoj literaturi, farmaceutici ili njihovi metaboliti otkriveni su u okolišu 71 zemlje u svih pet regija UN²-a, a ukupno je otkrivena 631 farmaceutski aktivna tvar iznad granica detekcije korištenih analitičkih metoda. Na primjer, lijek protiv bolova, diklofenak, detektiran je u okolišu 50 zemalja, na nekoliko lokacija u ekotoksikološki relevantnim koncentracijama. Nadalje, u najmanje 45 zemalja pronađeni su karbamazepin, ibuprofen, sulfametoksazol i naproksen. Uz ove antiepileptike, lijekove protiv bolova i antibiotike, u svim regijama UN-a otkriveni su i hormoni i antilipemici. [12]

Kako bi se ublažio budući ulazak lijekova u okoliš, potrebno je istražiti puteve njihove emisije. Prema dostupnim podacima, urbane otpadne vode su dominantan put emisije farmaceutika u okoliš na globalnoj razini što je i razumljivo s obzirom da se većina farmaceutika koristi kod kuće i da 54 % svjetske populacije živi u urbanim područjima. U kanalizacijskom ispustu iz bolnica može se pronaći mnoštvo različitih lijekova, često u visokim koncentracijama. Većina bolnica povezuje se na gradske kanalizacijske sustave čija postrojenja za pročišćavanje tih otpadnih voda nisu projektirana za uklanjanje lijekova. Međutim, lijekovi se i ne mogu smatrati homogenom skupinom kemikalija jer se njihovi sorpcijski koeficijenti, kinetika transformacije i vrijeme poluraspada uvelike razlikuju s obzirom na aktivnu farmaceutsku tvar. Treći najčešće navedeni izvor emisije farmaceutika u okoliš su farme gdje se veterinarski lijekovi koriste za liječenje ili prevenciju bolesti kod životinja. Ti lijekovi i njihovi metaboliti zatim putem izlučevina dospjevaju u tlo, odvodne kanale, podzemne vode i konačno u otvorene vodene površine poput rijeka i jezera. Daljnji važni izvori emisije, koji lokalno mogu uzrokovati povećanje koncentracije lijekova u okolišu, su farmaceutske proizvodnje, akvakultura i navodnjavanje otpadnom vodom. Proizvodnja lijekova posebno može uzrokovati visoke koncentracije u rasponu mg/L u rijekama u blizini proizvodnih pogona. [12]

Zbog visoke topljivosti većine lijekova, vodeni organizmi su osjetljiviji na njihovo djelovanje pa su stoga brojni eksperimenti usmjereni na ispitivanje učinaka na vodene organizme poput riba, algi i dagnji. Neke studije su otkrile da spojevi poput diklofenaka i etinilestradiola mogu izazvati strukturne poremećaje u bubrezima i crijevima riba te također promijeniti ekspresijske

² engl. *United Nations*

gene koji su povezani s ključnim procesima koji kontroliraju metabolizam. Dugoročni učinci na ribe mogu utjecati na njihov opstanak ili reprodukcijski sustav. Također, istraživanja su pokazala da prisutnost karbamazepina i diklofenaka dovode do štetnih učinaka na kloroplaste u algama što smanjuje brzinu fotosinteze i utječe na preživljavanje algi. Velika količina mrtvih algi dovodi do nuspojava za ekosustav kao što su eutrofikacija i poremećaj hranidbenog lanca. Nadalje, hormonski spojevi mogu uzrokovati ozbiljne ekološke učinke čak i pri vrlo niskim koncentracijama jer su vrlo aktivni biološki spojevi. Pojava hormonskog spoja u okolišu može dovesti do endokrinih poremećaja kod većine životinja, uključujući sisavce, ptice ili ribe. [13] Utvrđeno je da se štetni učinci mogu dogoditi i prijenosom spojeva unutar hranidbenog lanca. Na primjer, mrtvu stoku koja je bila liječena diklofenakom mogu konzumirati supovi koji su jako osjetljivi na diklofenak i već jako mala doza uzrokuje akutno zatajenje bubrega i njihovu smrt u roku od nekoliko dana. [14]



Slika 1. Putevi dospjeća farmaceutika u okoliš [15]

Nakon što završe u vodenim ekosustavima, farmaceutici i njihovi metaboliti prolaze kroz proces razgradnje, tj. podvrgnuti su abiotičkim i biotičkim procesima što rezultira smanjenjem koncentracije početne molekule i stvaranjem produkata razgradnje i transformacije koji mogu imati čak i veću toksičnost od izvorne tvari pa je stoga vrlo važno identificirati i utvrditi strukture razgradnih produkata. Abiotički procesi razgradnje uključuju hidrolizu i fotolizu, dok biotički procesi uključuju razgradnju farmaceutika pomoću bakterija i gljivica. Također,

smanjenje koncentracije farmaceutika može biti i rezultat njihove sklonosti sorpciji na čestice tla, sedimenta ili suspendirane čestice prisutne u vodenoj fazi. [16]

2.1.2.1. Fotolitička razgradnja farmaceutika u okolišu

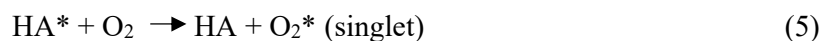
Abiotički procesi su od velike važnosti u određivanju sudbine farmaceutskih spojeva u vodi. Za farmaceutike koji su otporni na biološke i hidrolitičke procese razgradnje, fotoliza može biti jedini relevantni abiotički proces njihove razgradnje u vodenim sustavima izloženim Sunčevom zračenju. [17]

U vodenim sustavima javljaju se dvije vrste procesa fotolize: izravna fotoliza i neizravna fotoliza. Izravna fotoliza inicira se apsorpcijom fotona Sunčevog zračenja, a u mehanizmu neizravne fotolize, zagađivalo ne treba ili nije u stanju apsorbirati zračenje jer drugi kromofor u sustavu, kao što je otopljeni organska tvar, djeluje kao senzibilizirajuća vrsta. Svi spojevi, bez obzira apsorbiraju li fotone ili ne, potencijalno su podložni neizravnoj fotolizi. U neizravnom fotokemijskom mehanizmu, senzibilizator apsorbira zračenja i zatim reagira izravno sa supstratom ili proizvodi reaktivni međuprodukt (npr. hidroksilne radikale, singletni kisik, peroksi radikal i superoksid) koji reagira sa supstratom. Glavna vrsta koja apsorbira zračenje u neizravnoj fotolizi je otopljeni organska tvar prisutna u prirodnim vodama, ali treba spomenuti da pored njih i druge vrste koje apsorbiraju zračenje također mogu stvarati reaktivne međuprodukte poput nitrata i nitrita koji proizvode hidroksilne radikale (**jednadžbe 1-3**). [18, 16]



Huminske kiseline (HA³) su glavni predstavnici otopljenih organskih tvari koje apsorbiraju UV zračenje u širokom području valnih duljina. HA pod djelovanjem UV zračenja prelaze u pobuđeno stanje u kojem izravno reagiraju s molekulama farmaceutika ili reagiraju s kisikom stvarajući reaktivne vrste poput hidroksilnih radikala ($\bullet\text{OH}$), superoksida (O_2^-) i singletnog kisika kao što je prikazano u **jednadžbama 4-8** [16]:

³ engl. *humic acid*



Matrica koja se koristi za neizravna istraživanja fotolize može poprimiti bilo koji oblik. To može biti laboratorijska voda obogaćena prirodnim sastojcima (tj. sintetička prirodna voda) ili prirodna voda uzorkovana iz vodnog tijela (npr. površinska voda, otpadna voda, itd.). Sintetička prirodna voda često se koristi u kontroliranim eksperimentima s ciljem utvrđivanja specifičnih mehanizama neizravne fotolize (tj. koje fotosenzibilirajuće vrste su uključene). S druge strane, uzorkovana prirodna voda više nalikuje prirodnom sustavu, ali može biti vrlo specifična i nema široku primjenjivost. [19]

2.2. Metode obrade otpadnih voda

Voda je neophodna za život i pokriva približno 70 % Zemljine površine. [20] Kemijsko onečišćenje koje se prenosi otpadnom vodom u rijeke i potoke uzrokuje velike probleme u cijelom ekosustavu i vrlo ju je važno prije ispuštanja u vodotokove adekvatno obraditi. [21]

Proces pročišćavanja otpadnih voda općenito se sastoji od pet uzastopnih koraka: preliminarna obrada (fizička i mehanička), primarna obrada (fizikalno - kemijska i kemijska), sekundarna obrada (kemijska i biološka) i tercijarna ili konačna obrada (fizikalna i kemijska) te obrada nastalog mulja (recikliranje ili spaljivanje). [22]

Cilj preliminarne obrade je uklanjanje grubih krutih tvari i drugih velikih materijala koji se često nalaze u sirovoj otpadnoj vodi kao što su npr. tkanina, plastika i staklo. [21] Taj se proces odvija filtriranjem otpadne vode kroz rešetku ili sito, a prikupljeni otpad se odlaže kao čvrsti otpad te se njegovim uklanjanjem uvelike smanjuje volumen materijala koji treba daljnju obradu. [20]

Nadalje, primarna obrada namijenjena je uklanjanju organskih i anorganskih krutina procesima sedimentacije i flotacije. Tijekom primarne obrade uklanja se približno 20 – 50 % biokemijske

potrebe za kisikom (BPK), 50 – 70 % ukupnih suspendiranih čvrstih tvari i 65 % ulja i masti. [21] Smanjenje BPK pripisuje se uklanjanju mikrobnih čestica i pričvršćenih biofilmova koji su povezani s taloženim čvrstim tvarima. [20] Također, mali dio farmaceutika u otpadnoj vodi u tom stupnju obrade biološki razgrađuju postojeći mikroorganizmi, a dio spojeva ostaje apsorbiran na taložene i suspendirane krutine ostajući tako nedostupan za daljnju razgradnju. [21] Ako su prisutne velike oscilacije pH vrijednosti otpadne vode potrebno je prije sekundarne obrade provesti proces neutralizacije dodatkom kiseline ili lužine tako da pH vrijednost bude povoljna za odvijanje bioloških procesa. [23] Efluent iz primarnog pročišćavanja uglavnom sadrži koloidne i otopljene organske i anorganske tvari. [21]

Proces sekundarne obrade sastoji se od biološke obrade otpadnih voda korištenjem različitih vrsta mikroorganizama u kontroliranom okruženju. Tijekom sekundarne obrade postojeći mikrobi mogu razgraditi različite organske spojeve uključujući i farmaceutike. Procesi sekundarne obrade uključuju membranske bioreaktore, konvencionalni aktivni mulj i filtere s nasađenim mikroorganizmima. [21]

Tercijarna obrada koristi se za poboljšanje fizikalno – kemijske kakvoće izlazne vode. Taj stupanj obrade uključuje učinkovite procese kao što su ionska izmjena, ultrafiltracija, reverzna osmoza, kemijsko taloženje, elektrokemijske tehnologije, itd. [24]

Problemi tijekom pročišćavanja otpadnih voda vrlo su složeni s obzirom da one sadrže različite vrste zagađivala ovisno o podrijetlu te svaka sa svojim karakteristikama zahtijeva specifične postupke obrade. [22] Većina izvješća koja dokumentiraju uklanjanje farmaceutika tijekom obrade otpadnih voda temelje se na mjerenjima koncentracije u dotoku i efluentu. Na temelju takvih studija otkriveno je da prosječna eliminacija farmaceutika iz takvih ekoloških matrica može biti prilično varijabilna ne samo između različitih spojeva, nego i unutar istog spoja kada su prisutni u različitim matricama. Te razlike u uklanjanju nisu iznenađujuće jer su ti spojevi poprilično heterogeni u smislu strukture, reaktivnosti i kemijskih svojstava. Farmaceutici su neophodni i nastavit će ulaziti u okoliš kroz razne izvore, ali je vrlo važno minimizirati njihove učinke na okoliš te se fokusirati na bolje tehnologije obrade otpadnih voda kako bi ti spojevi u što manjim količinama dospijevali u ekološke matrice. [20]

2.2.1. Napredni oksidacijski procesi

Bio-nerazgradiva priroda mnogih API-ja čine konvencionalne biološke i kemijske postupke obrade otpadnih voda neučinkovitim, što posljedično dovodi do povećane prisutnosti matičnih farmaceutika i njihovih metabolita u vodenom i kopnenom okolišu. [25] Napredni oksidacijski procesi predstavljaju važne, učinkovite i ekološki prihvatljive metode razvijene za uklanjanje postojanih organskih zagađivala iz otpadnih voda. Općenito, ti se procesi odvijaju na sobnoj temperaturi i normalnom tlaku i temelje se na *in situ* stvaranju snažnog oksidacijskog sredstva, kao što su hidroksilni radikali ($\bullet\text{OH}$), pomoću različitih kemijskih, fotokemijskih, sonokemijskih ili elektrokemijskih reakcija. [26] Cilj kemijske oksidacije je mineralizacija zagađivala u ugljični dioksid, vodu i anorganske tvari ili barem njihovu transformaciju u bezopasne produkte. [27]

$\bullet\text{OH}$ radikali, koji se smatraju glavnom aktivnom odgovornom vrstom za uklanjanje otopljenih organskih tvari naprednim oksidacijskim procesima, su izvanredno reaktivne vrste koje karakterizira mala selektivnost što je vrlo dobro za oksidans koji se koristi u pročišćavanju otpadnih voda. [27] Imaju visok redoks potencijal od 2,8 eV te reagiraju s organskim zagađivalima s visokim konstantama brzine reakcije. Reakcije $\bullet\text{OH}$ s organskim tvarima odvijaju se na četiri glavna načina: adicijom $\bullet\text{OH}$ na dvostruke veze, apstrakcijom vodikovih atoma, prijenosom elektrona i kombinacijom radikala. Njihova reakcija s organskim tvarima stvara ugljikove radikale ($\text{R}\bullet$ ili $\text{R}\bullet\text{-HO}$), koji se u reakciji s kisikom mogu transformirati u organske peroksi-radikale ($\text{ROO}\bullet$). Svi radikali dalje reagiraju uz stvaranje drugih reaktivnih vrsta kao što su superoksid i vodikov peroksid, što dovodi do kemijske razgradnje i, u određenim slučajevima, mineralizacije ciljnih zagađivala vode. [28]

Najčešće korištena vrsta naprednog oksidacijskog procesa je Fentonova metoda u kojoj se primjenjuje smjesa topljive soli željeza (II) i H_2O_2 poznata kao Fentonov reagens. Međutim, moguće je uvelike poboljšati učinkovitost oksidacije i jednostavnost korištenja ove metode istodobnim zračenjem uzorka vode ultraljubičastim (UV) zračenjem pa tako postoji i foto-Fentonova metoda). Također, postoje i druge fotokemijske metode kao što je heterogena fotokataliza, korištenjem fotokatalizatora TiO_2 (TiO_2/UV), i ozonaliza (O_3/UV). Elektrokemijski napredni oksidacijski procesi predstavljaju nove i ekološki prihvatljive tehnike budući da koriste čisti reagens, elektron, izbjegavajući ili značajno smanjujući upotrebu kemijskih reagensa. Hidroksilni radikali pri tome se stvaraju izravno oksidacijom vode na anodi

ili neizravno u otopini pomoću elektrokemijski generiranog Fentonovog reagensa iz elektrodnih reakcija. [26] Sonoliza vode, kao jedan od mogućih naprednih oksidacijskih procesa, manje je proučavan u otpadnim vodama jer su početni operativni troškovi vrlo visoki, a pročišćeni volumeni vrlo mali su usporedbi s drugim metodama. Napredni oksidacijski proces ili kombinacija više njih mora biti odgovarajuće odabran uzimajući u obzir faktore kao što su karakteristike otpadne vode, tehnička primjenjivost, regulatorni zahtjevi, ekonomski aspekti i dugoročni utjecaji na okoliš. [28] Brzina oksidacije ovisi o koncentraciji radikala, kisika i polutanata. Drugi čimbenici koji utječu na stvaranje radikala su pH, temperatura, prisutnost iona te vrsta zagađivala. [29]

2.2.1.1. Fotokataliza [30]

Fotokataliza uključuje reakcije koje se odvijaju korištenjem zračenja i fotokatalizatora tj. poluvodiča. Kada se fotokatalizator izloži zračenju određene valne duljine, elektron u valentnoj vrpici apsorbira energiju fotona te se prenosi u vodljivu vrpcu. Energija potrebna za pomicanje elektrona iz valentne u vodljivu vrpcu smanjuje se povećanjem broja orbitala u HOMO⁴ (najviša popunjena molekulska orbitala) i LUMO⁵ (najniža nepopunjena molekulska orbitala). Energetska razlika između HOMO i LUMO orbitale naziva se zabranjena zona. Neki primjeri iznosa energetske razlike za pojedine poluvodiče navedeni su u **tablici 2**.

Tablica 2. Zabranjene zone različitih poluvodiča

Poluvodič	Zabranjena zona [eV pri 300K]
ZnS	3,54
SnO ₂	3,60
TiO₂	3,20
ZnO	3,03
Fe ₂ O ₃	2,20
Cu ₂ O	2,10
AlSb	1,58

⁴ engl. *Highest Occupied Molecular Orbital*

⁵ engl. *Lowest Unoccupied Molecular Orbital*

Postoje dvije vrste fotokatalitičkih reakcija, a to su homogena fotokataliza kod koje su poluvodič i reaktant u istoj fazi te heterogena fotokataliza kada su poluvodič i reaktant u različitim fazama. Važnost fotokatalize leži u činjenici da fotokatalizator osigurava i oksidacijsku i redukciju okolinu i to istovremeno.

2.2.1.1.1. Titanijev (IV) oksid

TiO₂ je najviše proučavan fotokatalizator sa širokom primjenom u raznim područjima. Glavne prednosti su mu kemijska i biološka inertnost, netoksičnost, relativno niska cijena te aktivnost sa stajališta fotokatalize. Visoka oksidacijska moć u prisutnosti zračenja čini ga pogodnim za razgradnju organskih i anorganskih spojeva čak i pri vrlo niskim koncentracijama. [31]

Titanijev (IV) oksid obično se u prirodi pojavljuje u tri mineralna oblika: anatas, rutil i brukit. Od ovih oblika, anatas pokazuje najveću fotokatalitičku aktivnost dok je rutil najstabilniji oblik. [31] Osim prirodnih oblika, dostupni su i komercijalno proizvedeni oblici kao što je P25, koji je mješavina anatasa i rutila (ovisno o dobavljaču, omjer anatasa i rutila kreće se između 80:20 i 70:30) i on se najčešće koristi u praksi. Brukit se često zanemaruje zbog niže fotoreaktivnosti od ostalih polimorfni oblika TiO₂. [32] Varijacije u fotokatalitičkoj učinkovitosti objašnjavaju se razlikama u morfologiji, kristalnoj fazi, specifičnoj površini, površinskom naboju, raspodjeli veličine čestica, poroznosti, itd. [25]

Modifikacije TiO₂ katalizatora imaju za cilj povećati njegovu aktivnost i time povećati njegovu reaktivnost na vidljivom svjetlu. TiO₂ zabranjena zona od 3,2 eV dopušta samo apsorpciju zračenja valne duljine ispod 387 nm. [32] Značajno poboljšanje fotokatalitičke učinkovitosti TiO₂ može se postići strategijama poput površinske modifikacije i dopiranja poluvodiča. [33] Proces dopiranja dovodi do stvaranja novih energetske razina što dovodi do smanjenja zabranjene zone, a time i smanjenja potrebne energije za prijelaz elektrona iz valentne u vodljivu vrpce. [31]

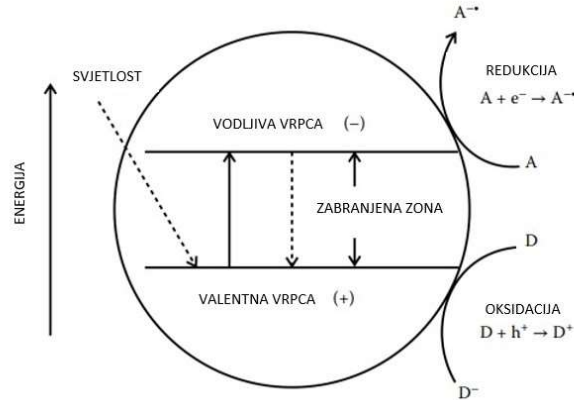
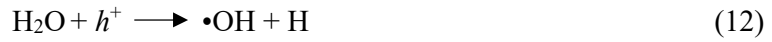
TiO₂ u suspenziji prilično je učinkovit u iskorištavanju zračenja jer suspendirane čestice imaju veliku specifičnu površinu u rasponu od 50 do 300 m²/g i stoga se postiže velika fotokatalitička aktivnost. Međutim, jedan od glavnih nedostataka je teško odvajanje čestica TiO₂ nakon tretmana. Kako bi se taj problem riješio, čestice TiO₂ mogu se imobilizirati na odgovarajuće nosače kao što su nehrđajući čelik, keramika, silikagel, zeoliti, polimeri, itd. [31]

Osim kao fotokatalizator, TiO_2 se uglavnom koristi kao bijeli pigment u proizvodnji keramike, kozmetike, boja, papira, lijekova i elektronike. Također, ova se molekula koristi u kremama za sunčanje kao UV-A i UV-B blokator za smanjenje prodiranja UV zračenja kroz kožu. Može se koristiti i kao antibakterijsko i antifungalno sredstvo pa se tako u dermatologiji koristi u novim metodama liječenja bolesti kao što su akne i atopijski dermatitis. Biokompatibilan je materijal pa se koristi i u mnogim znanostima, industrijama i granama medicine uključujući stomatologiju i tehnologiju implantacije. [32]

2.2.1.1.2. Mehanizam i kinetika heterogene fotokatalize

Heterogena fotokataliza je učinkovita i obećavajuća tehnologija koja se temelji na fotoaktivaciji poluvodiča koji djeluju kao aktivne katalitičke površine za razgradnju i mineralizaciju postojanih organskih zagađivala, uključujući farmaceutike i njihove moguće razgradne produkte u vodenom mediju. Zbog svih prednosti navedenih u odlomku 2.2.1.1.1. najčešće korišteni poluvodič je TiO_2 . [33]

Fotokatalitičke reakcije pokreću se apsorpcijom fotona s odgovarajućom energijom koja je jednaka ili veća od energije zabranjene zone fotokatalizatora. [31] Pri tome nastaju parovi elektron (e^-) - šupljina (h^+) (**jednadžba 9**) koji se mogu rekombinirati (**jednadžba 10**) ili migrirati na površinu poluvodiča i zatim reagirati s adsorbiranim kemijskim spojevima na površini. [26] Pobuđeni elektron može reducirati supstrat ili reagirati s akceptorima elektrona, kao što je O_2 prisutan na površini poluvodiča ili otopljen u vodi, reducirajući ga do superoksidnog radikala $\text{O}_2\cdot^-$ (**jednadžba 11**). S druge strane, šupljina može oksidirati organsku molekulu da stvori R^+ ili reagirati s molekulama H_2O oksidirajući ih u $\cdot\text{OH}$ radikale (**jednadžba 12**). Svi ti procesi utječu na konačnu brzinu i učinkovitost fotokatalitičke razgradnje farmaceutika u sustavu. [31] Povećanje ili smanjenje brzine reakcije često je povezano s potisnutom ili pojačanom rekombinacijom elektron (e^-) - šupljina (h^+). [34] Dakle, razgradnja zagađivala u otpadnoj vodi može se odvijati ili izravno na površini poluvodiča ili neizravno kroz interakcije s $\cdot\text{OH}$ radikalima, pri čemu je neizravna oksidacija pomoću radikala najpoželjniji put razgradnje. [26] Mehanizam fotokatalize prikazan je na **slici 2**.



Slika 2. Mehanizam fotokatalize [31]

Tijekom heterogenog fotokatalitičkog procesa, TiO_2 katalizator može se koristiti ili u disperznom obliku (prah, vodena suspenzija) ili u obliku tankog filma (fiksni TiO_2 katalitički sloj). Dispergirani TiO_2 katalizator ima nekoliko prednosti: jednostavan je za korištenje, ima veliku specifičnu površinu i može se prozračivati što sprječava rekombinaciju para elektrona - šupljina i povećava učinkovitost katalizatora. Međutim, nedostatak dispergiranog oblika je progresivno stvaranje tamnog katalitičkog mulja što smanjuje učinkovitost UV zračenja i smanjuje performanse fotoreaktora. S druge strane, prilikom korištenja TiO_2 u obliku tankog imobiliziranog filma nema potrebe za odvajanjem katalitičkih čestica na kraju procesa, ali katalitički sloj mora biti vrlo stabilan i aktivan. [26] Relativno visoki troškovi pripreme imobiliziranog fotokatalizatora zajedno s općenito nižom učinkovitošću glavne su prepreke za praktičnu primjenu fotokatalitičkih tankih filmova. [34]

Jedna od prednosti fotokatalize u usporedbi s drugim tehnologijama oksidacije je ta da se koriste kisik i voda iz okoline pa skupe metode oksidacije nisu potrebne. [31] Također, heterogenom fotokatalizom s TiO_2 moguće je i potpuno uništiti patogene, uključujući viruse, bakterije i plijesan. [26]

2.3. Kromatografija kao instrumentalna metoda analize [35, 36]

Kromatografija je važna tehnika koja omogućava odvajanje i identifikaciju komponenti smjese te njihovu kvantitativnu analizu. U tu se svrhu koriste različite metode kromatografije pri čemu se sastojci raspodjeljuju između nepokretne i pokretne faze. Prilikom kretanja pokretne faze, koja sa sobom nosi sastojke smjese, iznad nepokretne, molekule kemijskih sastojaka cijelo se vrijeme sorbiraju i desorbiraju. Nepokretna faza mora biti dobro odabrana tako da selektivno i s različitim vremenima zadržavanja odjeljuje sastojke smjese.

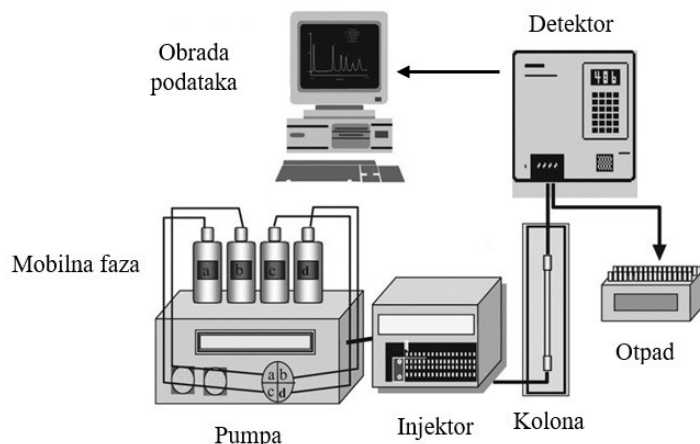
Kromatografske tehnike dijele se na nekoliko načina. Jedan od načina podjele je na temelju sastava pokretne faze pri čemu razlikujemo tekućinsku, plinsku te fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima. Plinska kromatografija primjenjuje se za analizu plinova, smjesa hlapljivih tekućina i krutih tvari dok se tekućinska kromatografija posebno koristi za termički nestabilne i nehlapljive uzorke. S druge strane, prema obliku nepokretne faze kromatografija se dijeli na plošnu i kolonsku. S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze razlikujemo adsorpcijsku, afinitetnu, razdjelnu, kromatografiju isključenjem te ionsku kromatografiju.

2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC⁶)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti definirana je kao razdvajanje smjese spojeva zbog razlika u ravnoteži njihove raspodjele između dviju faza, nepokretne faze pakirane unutar kolona i pokretne faze. Komponente čiji je afinitet za nepokretnu fazu veći, zadržavaju se dulje i odvajaju se od onih s manjim afinitetom. HPLC je najvažnija analitička tehnika koja se koristi tijekom različitih koraka razvoja i proizvodnje lijekova. Za uspješnu kromatografsku analizu ključno je poznavanje principa kromatografskog procesa te pravilan izbor kolone, pokretne faze i detektora. Shema HPLC sustava prikazana je na **slici 3**. On se sastoji od visokotlačne pumpe koja je potrebna da protjera pokretnu fazu kroz kolonu pri tipičnom protoku od 0,5 - 2 mL/min; većina pumpi omogućava kontrolirano miješanje različitih otapala iz različitih spremnika pokretnih faza. [37] Pumpe mogu raditi pri tlakovima do 400 bara, ali se većina analiza provodi na manje od 200 bara. [38] Uzorak koji se analizira uvodi se u pokretnu fazu pomoću injektora prije kolone koja omogućuje odvajanje analita iz smjese. Detektor obično sadrži ćeliju malog

⁶ engl. *High performance liquid chromatography*

volumena kroz koju prolazi pokretna faza noseći komponente uzorka koje eluiraju iz kolone. Mnoštvo osjetljivih i specifičnih detektora proširuje granice detekcije na razine nanograma, pikograma pa čak i femtograma. Na kraju je sustav za prikupljanje i kontrolu podataka koji prikuplja podatke s detektora i prati rad sustava. [37]



Slika 3. Shema HPLC uređaja [37]

Postoje različiti načini rada HPLC-a. Mehanizam interakcije otopljenih tvari s nepokretnim fazama određuje klasifikaciju načina tekućinske kromatografije. U **tablici 3.** prikazani su različiti načini provođenja tekućinske kromatografije od kojih se najčešće (u 70 % slučajeva) koristi kromatografija obrnutih faza. [37]

Tablica 3. Najčešće korištene vrste tekućinske kromatografije u HPLC analizama [37, 39, 40]

VRSTA KROMATOGRAFIJE	NORMALNIH FAZA	OBRNUTIH FAZA	IONSKO - IZMJENJIVAČKA	KROMATOGRAFIJA ISKLJUČENJEM
NEPOKRETNNA FAZA	polarna – hidrofilna (najčešće silikagel)	nepolarna – hidrofobna (alkilirani silikagel npr. C18)	negativno nabijene (sulfonat) ili pozitivno nabijene funkcionalne skupine (kvaterni amonij) vezane na polimerne materijale ili silikagel	umrežene polistirenske kuglice kontrolirane veličine pora
POKRETNNA FAZA	nepolarna – mješavina nepolarnog otapala poput heptana ili heksana s polarnijim otapalom	polarna – smjesa zakiseljenog metanola ili acetonitrila s vodom	pufer (često s povećanjem ionske jakosti npr. višom koncentracijom NaCl)	toluen, tetrahidrofur
UOBIČAJENI UZORCI	nepolarni spojevi, izomeri, frakcioniranje složenih uzoraka po funkcionalnim skupinama	gotovo sve organske tvari	ioni, biološke komponente poput aminokiselina, proteina/peptida i polunukleotida	biološki i sintetski polimeri

Eluiranje pokretne faze prilikom provođenja analize može biti izokratno ili gradijentno. Prilikom izokratnog eluiranja sastav pokretne faze je konstantan tijekom provođenja analize, a pri gradijentnom eluiranju sastav se mijenja s vremenom kako bi se odvojili analiti različite prirode. HPLC kolone se obično pakiraju u cijevi od nehrđajućeg čelika. Duljina im uglavnom iznosi od 100 do 250 mm, a unutarnji promjer od 2 - 4,6 mm. Duljina kolone je vrlo bitna za izbjegavanje pretjerano visokih tlakova pa su obično kratke, a mali promjer je zaslužan za veliku linearnu brzinu protoka. [38]

2.4. Tekućinska kromatografija vezana na spektrometriju masa (LC-MS/MS⁷) [41]

LC-MS kombinira snagu odvajanja tekućinske kromatografije (proizvodnja čistih ili gotovo čistih frakcija u kemijskoj smjesi) sa spektrometrijom masa (identifikacija spojeva s visokom molekularnom specifičnošću i osjetljivošću detekcije). Spektrometrija masa (MS) je analitička tehnika koja se koristi za identifikaciju nepoznatih spojeva, kvantificiranje poznatih tvari i razjašnjavanje strukturnih i fizičkih svojstava iona. Tehnika je povezana s vrlo visokim razinama specifičnosti i osjetljivosti, donekle kompenziranim visokim stupnjem tehničke složenosti. Analize se mogu izvršiti s malim količinama analita – ponekad manjim od pikogramskih. MS je vrlo prikladan za identifikaciju pojedinačnih komponenti u iznimno složenim smjesama.

Spektrometar masa je instrument koji razdvaja nabijene atome ili molekule prema njihovom omjeru mase i naboja (m/z). Stvaranje iona uzorka u plinovitoj fazi bitan je preduvjet za masovnu selekciju i detekciju. Za analizu se mogu odabrati ili pozitivni ili negativni ioni. Ionizacijske metode koje se mogu koristiti uključuju elektronsku ionizaciju (EI)⁸, kemijsku ionizaciju (CI)⁹, bombardiranje brzim atomima (FAB)¹⁰, termosprej (TSP)¹¹, elektrosprej (ESI)¹², kemijsku ionizaciju pod atmosferskim tlakom (APCI)¹³ i fotoionizaciju kod atmosferskog tlaka (APPI)¹⁴. Spregnuta spektrometrija masa (više povezanih analizatora masa) se koristi za pružanje više informacija nego što može dati jedan spektrometar masa i naširoko se koristi za probir složenih matrica kao što su krv i urin. Prvi spektrometar masa služi za prijenos ciljnih iona u područje gdje dolazi do fragmentacije. Fragmentacija se obično postiže u kolizijskoj ćeliji pod tlakom inertnog plina kao što je argon. Produkti ioni se zatim prenose u drugi analizator mase. Prijelaz iona iz ciljnih u produktne ione vrlo je specifičan za određivanje strukture željenog spoja i osigurava visok stupanj selektivnosti. Podatkovni sustav bilježi veličinu električnih signala kao funkciju m/z i pretvara tu informaciju u spektar masa, prikaz intenziteta iona kao funkciju omjera mase i naboja, koji se često prikazuje kao jednostavni histogram. Ljestvica masa se kalibrira uvođenjem referentnog spoja koji daje dobro

⁷ engl. *liquid chromatography – mass spectrometry*

⁸ engl. *Electron-impact*

⁹ engl. *Chemical ionization*

¹⁰ engl. *Fast Atom Bombardment*

¹¹ engl. *thermospray*

¹² engl. *Electrospray Ionization*

¹³ engl. *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

¹⁴ engl. *Atmospheric Pressure PhotoIonization*

karakteriziran spektar masa koji uključuje poznate mase u odgovarajućim intervalima. Velike baze podataka ili biblioteke spektara komercijalno su dostupne kao pomoć u identifikaciji spojeva u nizu primjena, iako su trenutno one uglavnom ograničene na spektre elektronske ionizacije (EI). Ova se tehnika često koristi za traženje spojeva slične strukture, poput metabolita poznatog lijeka. Spregnuta spektrometrija masa se može izvesti korištenjem sektorskih, kvadrupolnih i TOF¹⁵ instrumenata.

2.5. Validacija [42, 43]

Validacija novih metoda u analitici sastavni je dio osiguranja kvalitete, akreditacije i mogućnosti publikacije. U znanstvenom radu, nepouzdana analitički rezultati mogu dovesti do pretjeranog ili podcijenjenog učinka, lažnih tumačenja i neopravdanih zaključaka. Osnova za kvalitetne podatke su pouzdane analitičke metode. Stoga, nove analitičke metode zahtijevaju pažljiv razvoj nakon kojeg slijedi temeljita validacija konačne metode. Mora se istaknuti da kvaliteta analitičke metode uvelike ovisi o razvoju metode, a ne toliko o njezinoj validaciji. Međutim, samo validacija može objektivno pokazati kvalitetu analitičke metode ispunjavanjem minimalnih kriterija prihvatljivosti i time dokazati njezinu primjenjivost za određenu svrhu.

Validacija obuhvaća niz izvedbenih karakteristika kao što su selektivnost, stabilnost, linearnost, preciznost, granica detekcije, točnost, granica kvantifikacije, osjetljivost i robusnost. Parametri koje je potrebno validirati ovise o vrsti analize, stoga različite metode ispitivanja zahtijevaju različite sheme validacije. Neki od navedenih parametara opisani su u nastavku.

SELEKTIVNOST – sposobnost analitičke metode da nedvosmisleno mjeri i razlikuje analite u prisutnosti komponenti za koje se može očekivati da će biti prisutne (metaboliti, nečistoće, nusprodukte, komponente matrice, itd.).

STABILNOST – kemijska stabilnost analita u danj matrici pod određenim uvjetima za dane vremenske intervale. Stabilnost analita tijekom cijelog analitičkog postupka preduvjet je pouzdane kvantifikacije. Osim ako podaci o stabilnosti analita nisu dostupni u literaturi, potpuna validacija metode mora uključivati pokuse stabilnosti za različite faze analize.

LINEARNOST – za pouzdanu kvantifikaciju nužan je izbor odgovarajućeg kalibracijskog modela pa se mora ispitati odnos između koncentracije analita u uzorku i odgovarajućeg odziva.

¹⁵ engl. *time of flight*

PRECIZNOST – stupanj raspršenosti podataka između niza mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Obično se mjeri u smislu nepreciznosti, izražene kao apsolutno ili relativno standardno odstupanje (RSD)¹⁶. Može se razmatrati na tri razine: ponovljivost, međupreciznost i obnovljivost. Ponovljivost je preciznost pri čemu isti analitičar koristi istu aparaturu u istom laboratoriju i u kratkom vremenskom razdoblju. Međupreciznost izražava varijacije unutar istog laboratorija kao što su različita oprema, različiti analitičari, itd. Prilikom određivanja obnovljivosti, metoda i uzorak su isti, ali su promijenjeni uvjeti izvedbe kao što su laboratorij, instrument i analitičar.

GRANICA KVANTIFIKACIJE – najniža količina analita koja se može kvantitativno odrediti s odgovarajućom preciznošću i točnošću.

GRANICA DETEKCIJE – najniža koncentracija analita u uzorku koja se može otkriti, ali ne i kvantificirati.

ROBUSNOST – mjera za osjetljivost metode na male promjene koje se mogu dogoditi tijekom rutinske analize, npr. male promjene pH vrijednosti, sastava pokretne faze, temperature, itd.

¹⁶ engl. *Relative Standard Deviation*

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tablica 4. Popis kemikalija korištenih tijekom eksperimenta

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	C ₂ H ₃ N	HPLC	J.T. Baker
Amonijev hidroksid	NH ₄ OH	<i>p.a.</i>	Kemika
1,4-Benzokinon	C ₆ H ₄ O ₂	<i>p.a.</i>	n/a
Huminska kiselina	C ₉ H ₉ NO ₆	n/a	Sigma Aldrich, Švicarska
Izopropanol	C ₃ H ₈ O	HPLC	Fischer Chemical, SAD
Klorovodična kiselina	HCl	<i>p.a.</i>	Gram-mol, Hrvatska
Mravlja kiselina	CH ₂ O ₂	98%	Lach-Ner
Natrijev azid	NaN ₃	<i>p.a.</i>	Kemika
Natrijev hidroksid	NaOH	<i>p.a.</i>	VWR Chemicals, SAD
Natrijev hidrogenkarbonat	NaHCO ₃	<i>p.a.</i>	Kemika
Natrijev klorid	NaCl	<i>p.a.</i>	Lach-Ner d.o.o., Hrvatska
Natrijev nitrat	NaNO ₃	<i>p.a.</i>	Kemika

- ◆ Ultračista voda dobivena pomoću uređaja Milipore Simplicity

3.1.2. Fotokatalizator [44]

U ovom se diplomskom radu za sve eksperimente fotokatalize koristio fotokatalizator (**slika 4**) pripremljen na Fakultetu strojarstva i brodogradnje u Zagrebu. Fotoreaktori s imobiliziranim katalizatorom poželjni su za naprednu obradu otpadnih voda jer nema potrebe za odvajanjem nanočestica nakon procesa fotokatalitičke razgradnje. Napredak u području fotoreaktora s imobiliziranim katalizatorom usmjeren je na povećanje specifične površine te na povećanje afiniteta fotokatalizatora prema zagađivačima uz zadržavanje snažnog prijanjanja između katalizatora i supstrata. Keramičke pjene imaju brojne pore i veliku specifičnu površinu što ih čini prikladnima za širok raspon primjene, a jedna od njih je i kao nosači katalizatora. Fotokatalizator korišten u ovom radu napravljen je stvaranjem visoko porozne Al₂O₃ keramičke pjene jednostavnom i jeftinom metodom replike koja se temelji na impregnaciji poliuretanske

spužve visoko koncentriranom suspenzijom Al_2O_3 . Fotokatalitički TiO_2 film se na Al_2O_3 pjenastu podlogu taložio pomoću sol-gel premaza uranjanjem. TiO_2 film nano veličine identificiran je kao anatasna faza na pjenastom supstratu od korunda, korištenjem naprednih difrakcijskih postavki na skupnim i mljevenim uzorcima.



Slika 4. Fotokatalizator

3.1.3. Farmaceutski aktivna tvar – prokain hidroklorid

Tablica 5. Fizikalno – kemijske karakteristike prokaina [45]

PROIZVOĐAČ	Sigma Aldrich
CAS BROJ	51-05-8
IUPAC IME	2-(dietilamino)etil 4-aminobenzoat hidroklorid
STRUKTURNA FORMULA	
MOLEKULSKA FORMULA	$\text{C}_{13}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2\text{Cl}$
MOLEKULSKA MASA	272,771
KONSTANTE	$\log K_{ov} = 2,1$ $pK_k = 8,9$ (pri 20 °C)
TOPLJIVOST U VODI	6,81 mg/mL
TEMPERATURA TALIŠTA	153 - 156 °C

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga korištena je za vaganje točno određene mase ispitivanog farmaceutika, prokaina, u svrhu pripreme temeljne standardne otopine. Korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105 DualRange, čiji je maksimalan kapacitet 120 g, a mogućnost očitavanja 0,01 g (slika 5).



Slika 5. Analitička vaga Mettler Toledo XA105 DualRange

3.2.2. Ultrazvučna kupelj

Ultrazvučna kupelj korištena je u svrhu homogeniziranja temeljne standardne otopine te degaziranja pokretnih faza. Korištena je ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka (slika 6).



Slika 6. Ultrazvučna kupelj

3.2.3. pH – metar

Za mjerenje pH vrijednosti otopina korišten je pH metar Mettler Toledo, S20 SevenEasy, Švicarska čije je mjerno područje pH vrijednosti od 0 do 14, uz mogućnost očitavanja od 0,01 pH (slika 7).



Slika 7. pH metar Mettler Toledo S20 SevenEasy

3.2.4. Fotokatalitički reaktor

Svi su eksperimenti provedeni u protočnom reaktoru pravokutnog oblika čiji ukupni radni volumen iznosi 100 cm^3 (slika 8). U kutiju ispod reaktora stavljao se led u svrhu održavanja stalne temperature tijekom provedbe eksperimenta. Protok se pri svim eksperimentima namještao pomoću prikazane pumpe. Prilikom provođenja eksperimenata fotolize i fotokatalize se iznad reaktora namještala lampa koja je ozračivala otopinu UV zračenjem pri 365 nm, a cijeli se sustav prekrivao aluminijskom folijom kako bi se otopina ravnomjerno ozračivala. Za provođenje fotokatalitičkih eksperimenata korišten je fotokatalizator, opisan u odlomku 3.1.2., koji se namještao u reaktor tako da prekriva cijelo dno reaktora.



Slika 8. Protočni reaktor

3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC-DAD)¹⁷

Snimanje uzoraka provedeno je na Agilent 1100 Series HPLC uređaju koji je spojen na detektor s nizom dioda, DAD (**slika 9**). Korištena je Waters XBridge C18 kolona (150 mm × 4,6 mm, 3,5 μm).



Slika 9. HPLC – DAD uređaj

¹⁷ engl. *High-performance liquid chromatography with photodiode-array detection*

3.3. Opis rada

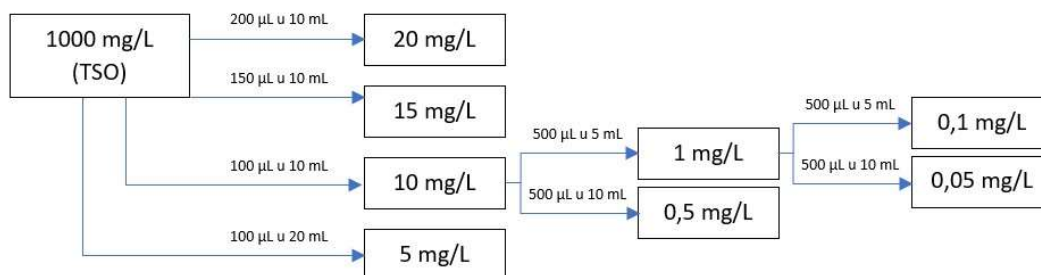
3.3.1. Priprema temeljne standardne otopine prokaina

Temeljna standardna otopina koncentracije 1000 mg/L pripravljena je otapanjem točno određene odvagane mase prokaina u određenom volumenu ultračiste vode. Tikvice s tako pripremljenim otopinama još su dodatno na pet minuta uronjene u ultrazvučnu kupelj s ciljem potpunog otapanja prokaina.

3.3.2. Validacija metode za određivanje prokaina

3.3.2.1. Linearnost

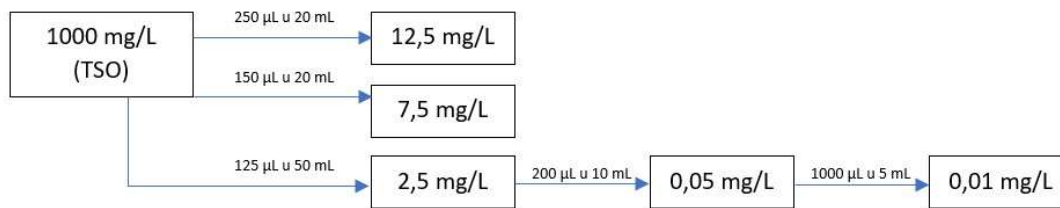
U svrhu provjere linearnosti pripremile su se standardne otopine prokaina koncentracije 0,05; 0,1; 0,5; 1; 5; 10; 15 i 20 mg/L prema shemi prikazanoj na **slici 10**. Sve su tikvice nadopunjene ultračistom vodom do oznake.



Slika 10. Postupak pripreme standardnih otopina za određivanje linearnosti

3.3.2.2. Ponovljivost i međupreciznost

Za provjeru ponovljivosti pripremile su se standardne otopine prokaina koncentracije 0,01; 0,05; 2,5; 7,5 i 12,5 mg/L prema shemi prikazanoj na **slici 11**. Sve su tikvice nadopunjene ultračistom vodom do oznake.



Slika 11. Postupak pripreme standardnih otopina za određivanje ponovljivosti

Za provjeru međupreciznosti proveden je F -test na temelju dva ponovljena mjerenja u dva dana. F -vrijednost računa se prema sljedećoj jednadžbi:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (13)$$

gdje je uvjet da je $s_1 > s_2$ (s_1 i s_2 – standardna odstupanja dvaju nizova mjerenja).

3.3.2.3. Granica detekcije i granica kvantifikacije

Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK) određene su pomoću otopina koje su korištene za određivanje linearnog područja. GD i GK eksperimentalno su procijenjene iz omjera signala i šuma (S/N) tako da se mjereni signal prokaina uspoređivao sa signalom slijepe probe pri čemu taj omjer za GD mora biti S/N=3/1, a za GK S/N=10/1.

3.3.3. Priprema radnih otopina

Sve su radne otopine za eksperimente navedene u ovom odlomku pripravane u odmjernoj tikvici od 100 mL u koju se dodao određeni volumen temeljne standardne otopine nakon čega su tikvice nadopunjene do oznake kako bi se pripravile otopine u kojima je koncentracija prokaina 5, 10 ili 15 mg/L.

U svrhu preliminarnih eksperimenata hidrolize, fotolize, adsorpcije i fotokatalize pripravane su radne standardne otopine koncentracije 10 mg/L pri čemu je otapalo ultračista voda.

Za eksperimente fotokatalize u svrhu određivanja utjecaja pH vrijednosti otopine i koncentracije prokaina pripravljene su radne standardne otopine koncentracija 5, 10 i 15 mg/L

uz ultračistu vodu kao otapalo. Tako se pripremljenim otopinama za svaku navedenu koncentraciju pH vrijednost podešavala na 4, 7 i 10 dodavanjem HCl ili NaOH koncentracija 0,01 - 0,1 mol/L.

Nakon navedenih eksperimenata određena je optimalna koncentracija prokaina za provođenje svih ostalih eksperimenata. Optimalna koncentracija prokaina bila je 10 mg/L.

Kako bi se ispitao dominantni mehanizam fotokatalitičke razgradnje u otopinu prokaina dodavali su se hvatači radikala, odnosno provodio se takozvani „scavenging“ test. Za taj su se eksperiment koristile sljedeće kemikalije: izopropanol, natrijev azid, 1,4-benzokinon i mravlja kiselina. Svaka radna otopina za četiri zasebna eksperimenta pripremala se dodavanjem određenog volumena jedne od četiri korištene kemikalije pri čemu se tikvica nadopunjavala ultračistom vodom do oznake.

Za eksperimente kojima se ispitivao utjecaj matice vode pripremale su se radne otopine s različitim koncentracijama hidrogenkarbonata, nitrata, klorida i huminske kiseline. Koncentracija temeljne otopine hidrogenkarbonata iznosila je 250 mg/L, nitrata 50 mg/L, klorida 1000 mg/L, a koncentracija temeljne otopine huminske kiseline iznosila je 50 mg/L. Koncentracija hidrogenkarbonata u radnoj otopini iznosila je 250, 100 i 40 mg/L, nitrata 50, 20 i 8 mg/L, klorida 1000, 100 i 10 mg/L, a huminske kiseline 20, 10 i 5 mg/L. Proveden je i eksperiment sa smjesom svih navedenih otopina pri čemu je koncentracija hidrogenkarbonata iznosila 100 mg/L, nitrata 8 mg/L, klorida 10 mg/L i huminske kiseline 10 mg/L. Za sve je navedene otopine ultračista voda korištena kao otapalo.

Također se proveo i eksperiment primjenom realne otpadne vode koja je u postrojenju za pročišćavanje otpadnih voda obrađena u membranskom bioreaktoru uz dodatak aktivnog ugljena pri čemu je influent smjesa gradske i bolničke otpadne vode. Za spomenuti eksperiment pripremljena je otopina prokaina koncentracije 10 mg/L u realnoj otpadnoj vodi.

Kako bi se identificirali i karakterizirali razgradni produkti pripremila se radna standardna otopina prokaina pri optimalnim uvjetima fotokatalitičke razgradnje koncentracije 10 mg/L i pH vrijednosti 10.

3.3.4. Preliminarni eksperimenti

Prvo je proveden preliminarni eksperiment hidrolize u svrhu ispitivanja hidrolitičke stabilnosti prokaina. Zatim je proveden eksperiment fotolitičke razgradnje pri čemu je otopina prokaina bila izložena zračenju UV lampe. Kako bi se provjerila adsorpcija prokaina na fotokatalizator proveden je eksperiment adsorpcije s nosačem na koji nije nanesen TiO_2 te eksperiment s nosačem na koji je nanesen TiO_2 .

Kako bi se pratila koncentracija preostalog prokaina i njegovih razgradnih produkata, na samom početku svakog eksperimenta, prije namještanja protoka pumpe, te u određenim vremenskim razmacima kroz šest sati uzimao se uzorak alikvota od 500 μL (automatskom pipetom) direktno iz reaktora koji se stavljao u vijalu za daljnju analizu. Eksperiment fotokatalize je prvih pola sata proveden u mraku u svrhu uspostavljanja sorpcijske/desorpcijske ravnoteže. Uzorak je uziman odmah nakon paljenja lampe kao početna točka reakcije, nakon čega su se uzorci nastavili uzimati kao i za preostale preliminarni eksperimente kroz idućih šest sati.

3.3.5. Fotokatalitička razgradnja prokaina

Eksperimenti za praćenje fotokatalitičke razgradnje prokaina provedeni su tako da se na dno reaktora prvo postavio fotokatalizator, nakon čega se reaktor ispunio sa 100 mL pripremljene radne otopine te se namjestio protok pumpe. UV lampa se uključila nakon trideset minuta, što odgovara vremenu potrebnom da se uspostavi sorpcijska/desorpcijska ravnoteža u sustavu. Unutar spomenutih trideset minuta eksperimenata u mraku uzorci su se uzimali u sljedećim vremenskim intervalima: prvi uzorak (aliquot od 500 μL radne otopine) se uzeo odmah na početku, zatim se uzeo nakon petnaest minuta odnosno trideset minuta reakcije u mraku, tj. prije paljenja UV lampe. Nakon paljenja UV lampe aliquot uzorka od 500 μL uzimao se kroz sedam sati u određenim vremenskim razmacima.

3.3.6. Analiza uzoraka HPLC-DAD

Uzorci svih eksperimenata, osim onog provedenog u svrhu identifikacije i karakterizacije razgradnih produkata, analizirani su pomoću HPLC-DAD kromatografa opisanog u odlomku 3.2.5. Prije početka analize treba kondicionirati kromatografsku kolonu i pričekati da se

stabilizira tlak. Prije svakog injektiranja uzorka kolona je uravnotežena na početnim uvjetima gradijentne metode (**tablica 6**). Tijekom analize injektira se 30 µL uzorka iz viala, protok pri kojem se analiza provodi iznosi 0,5 mL/min, a temperatura kolone iznosi 25 °C. Kao pokretna faza uz gradijentno eluiranje korištena je (A) 0,1 % mravlja kiselina u ultračistoj vodi i (B) 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu. Vrijeme trajanja analize po uzorku bilo je 15 minuta pri čemu se pratila pojava prokaina pri apsorpcijskom maksimumu valne duljine od 294,4 nm i vremenu zadržavanja od 8,1 minuta.

Tablica 6. Gradijent pokretne faze s vremenom

Vrijeme [min]	Udio otapala A u pokretnoj fazi [%]	Udio otapala B u pokretnoj fazi [%]
0,00	95,0	5,0
1,00	95,0	5,0
6,00	35,0	65,0
12,00	35,0	65,0
12,01	95,0	5,0
15,00	95,0	5,0

Nakon završene analize, integriranjem kromatograma provodi se kvantitativna analiza podataka dobivenih na računalu. Očitavaju se površine ispod odgovarajućih kromatografskih krivulja pri čemu se uspoređuju vrijednosti površina uzoraka prije i nakon razgradnje.

3.3.7. Analiza uzoraka UPLC-MS/MS

Uzorci dobiveni provođenjem eksperimenta fotokatalize u svrhu identificiranja i karakterizacije razgradnih produkata analizirani su pomoću UPLC uređaja vezanog na spektrometar masa kao detektor. Pritom je korišten UPLC¹⁸ Agilent 1290 Infinity 2 uređaj koji je spojen na detektor, spektrometar masa Agilent 6470 LC/TQ¹⁹. Korištena je Waters XBridge C18 kolona dimenzija 150×4,6 mm i promjera čestica unutar kolone 3,5 µm. Gradijentna metoda za analizu uzoraka jednaka je kao iz **tablice 6**. Nakon kondicioniranja kromatografske kolone i stabilizacije tlaka

¹⁸ engl. *Ultra performance liquid chromatography*

¹⁹ engl. *liquid chromatography-triple quadrupole*

u kolonu se injektiralo 20 μ L uzorka. Protok tijekom analize iznosio je 0,5 mL/min, a temperatura kolone 25 °C. Kao pokretna faza uz gradijentno eluiranje korištena je (A) 0,1 % mravlja kiselina u ultračistoj vodi i (B) 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu.

Ionizacija uzoraka je provedena elektroraspršenjem u pozitivnom modu te je kao metoda skeniranja analizatora masa korištena MRM²⁰ metoda. Uvjeti izvora iona spektrometra masa pri kojima su provedene analize prikazani su u **tablici 7**.

Tablica 7. Uvjeti izvora iona spektrometra masa

Temperatura plina	300 °C
Protok plina	13 L/min
Tlak raspršivača plina	35 psi
Napon kapilare	2500 V

²⁰ engl. *Multiple reaction monitoring*

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. Validacija

Kako bismo osigurali kvalitetne i pouzdane rezultate prvo je provedena validacija analitičke metode za praćenje prokaina u vodi. U ovom je radu validacija provedena ispitivanjem sljedećih izvedbenih karakteristika: linearnost, osjetljivost, ponovljivost, međupreciznost, granica kvantifikacije i granica detekcije. Rezultati su prikazani u **tablici 8**.

Tablica 8. Rezultati validacije

Izvedbena karakteristika	Rezultat	Koncentracija [mg/L]	Kriterij prihvatljivosti	Zadovoljava kriterij	
Linearnost	$R^2 = 0,9996$	za radno područje	$R^2 \geq 0,995$	DA	
Osjetljivost	212,35 [L/mg]	-	podatak	-	
Ponovljivost	RSD [%]		RSD \leq 10 %	DA	
	1. DAN	2. DAN			
	4,40	7,52			0,05
	3,16	1,91			2,50
	1,79	2,86			7,50
	1,32	1,35	12,50		
Međupreciznost	$F_{\text{rač.}}$		$F_{\text{tabl}} = 3,18$ $F_{\text{rač}} < F_{\text{tabl}}$	DA	
	2,67				2,50
	2,45				7,50
	1,05				12,50
Granica kvantifikacije	0,05 [mg/L]	-	podatak	-	
Granica detekcije	0,01 [mg/L]	-	podatak	-	

Za ispitivanje linearnosti svaka od pripremljenih otopina koncentracija u rasponu od 0,05 - 20 mg/L analizirana je tri puta. Na temelju tih rezultata za svaku pojedinu koncentraciju otopine izračunata je aritmetička vrijednost sve tri površine ispod dobivenih kromatografskih krivulja i RSD vrijednost. RSD vrijednost za najmanju ispitivanu koncentraciju od 0,05 mg/L iznosi 3 %, a za najveću ispitivanu koncentraciju od 20 mg/L iznosi 0,46 %. Male dobivene vrijednosti RSD-a ukazuju na prikladnost odabrane metode. Na temelju grafičkog prikaza ovisnosti izračunate površine o koncentraciji otopine dobivena je jednadžba umjernog pravca $y = 212,35x + 10,501$ i vrijednost koeficijenta determinacije od 0,9996 na temelju kojeg se može potvrditi

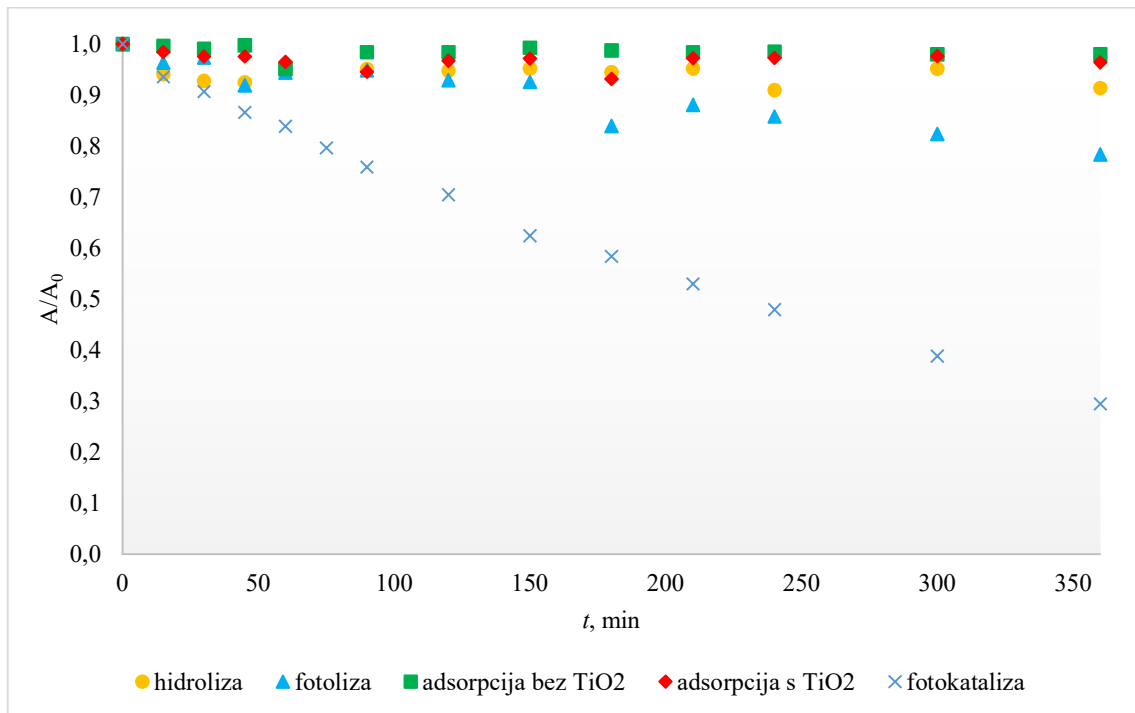
linearnost. Osjetljivost metode predstavlja nagib umjernog pravca te prema navedenoj jednadžbi pravca iznosi 212,35 L/mg.

Preciznost je, kao što je već navedeno u teorijskom dijelu, određena stupnjem raspršenosti podataka između niza mjerenja dobivenih višestrukim uzorkovanjem istog homogenog uzorka pod propisanim uvjetima. Preciznost je u ovom radu ispitana preko kriterija ponovljivosti i međupreciznosti. U svrhu ispitivanja ponovljivosti pripremljene su otopine prokaina koncentracija 0,05; 2,5; 7,5 i 12,5 mg/L i svaka je od njih prebačena u 10 vijala za analizu. Ista se analiza provodila kroz dva dana. Sve su izračunate RSD vrijednosti manje od 10 % i međusobno se za svaku pojedinu koncentraciju u oba provedena mjerenja ne razlikuju značajno. Na temelju tih dobivenih rezultata može se zaključiti da je ovaj kriterij preciznosti zadovoljen. Da bi se ispitala međupreciznost proveden je *F*-test na temelju dva ponovljena mjerenja u dva dana. Uvjet međupreciznosti je da dobivena *F*-vrijednost bude niža od kritične *F*-vrijednosti očitane iz tablice. Kritična *F*-vrijednost ovisi o broju stupnjeva slobode za oba niza mjerenja. U ovom slučaju stupanj slobode iznosi $(n - 1) = 9$ pa očitana kritična *F*-vrijednost iz tablice uz 95 %-tnu vjerojatnost iznosi 3,18. S obzirom da su za sve tri ispitane koncentracije izračunate *F*-vrijednosti dobivene eksperimentima manje od tabelirane kritične *F*-vrijednosti možemo zaključiti da ne postoje značajne razlike u preciznosti mjerenja provedena u dva različita dana pa je i time kriterij međupreciznosti zadovoljen.

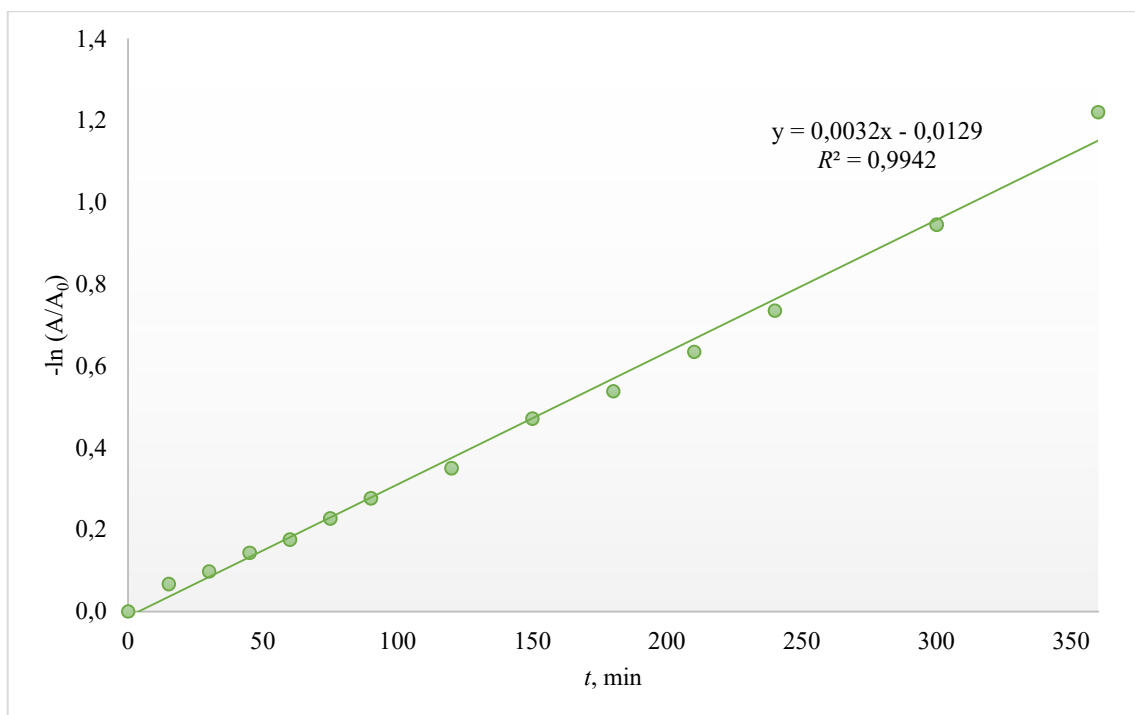
Eksperimentalno procijenjena granica kvantifikacije za prokain iznosi 0,05 mg/L, a granica detekcije 0,01 mg/L.

4.2. Preliminarni eksperimenti

Prije ispitivanja utjecaja različitih parametara na fotokatalitičku razgradnju prokaina provedena su preliminarna ispitivanja. Prvo je provedeno ispitivanje hidrolize prokaina te njegove adsorpcije na fotokatalizator kako bi se utvrdilo je li smanjenje koncentracije u daljnjim eksperimentima isključivo zbog razgradnje pod utjecajem UV zračenja. Nadalje, provedeni su eksperimenti fotolize i fotokatalize kako bi se ispitao utjecaj UV zračenja na smanjenje koncentracije prokaina i učinkovitost korištenja fotokatalizatora te kako bi se odredio kinetički model koji dobro opisuje eksperimentalne podatke. Grafički prikazi dobivenih rezultata preliminarnih eksperimenata nalaze se na **slikama 12 i 13**.



Slika 12. Hidrolitička, fotolitička i fotokatalitička razgradnja prokaina i njegova adsorpcija na nosač fotokatalizatora bez nanesenog sloja TiO₂ te na fotokatalizator s nanesenim slojem TiO₂



Slika 13. Kinetika fotokatalitičke razgradnje prokaina pod utjecajem UV zračenja

Na temelju grafičkog prikaza i rezultata za hidrolizu možemo vidjeti da vrijednost smanjenja koncentracije prokaina varira u vremenu, tj. naizmjenice se smanjuje i povećava kroz svih 360 minuta provođenja reakcije. Nakon petnaest minuta provođenja reakcije smanjenje koncentracije iznosi 5,91 %, nakon 360 minuta provođenja reakcije 8,61 %, a najveće smanjenje koncentracije iznosi 9,06 %. S obzirom da su sve vrijednosti manje od 10 % i s obzirom da bi se najvjerojatnije i dalje kroz vrijeme nastavio trend naizmjeničnog povećanja i smanjenja koncentracije u tom rasponu vrijednosti, može se zaključiti da je prokain hidrolitički stabilan. Prema tome, u svim sljedećim eksperimentima smanjenje koncentracije prokaina u otopini neće biti povezano s njegovom hidrolitičkom razgradnjom.

Vrijednosti smanjenja koncentracije prokaina za oba se provedena eksperimenta adsorpcije neznatno mijenjaju s vremenom te se isto kao i kod hidrolize naizmjenice smanjuju i povećavaju kroz svih 360 minuta provođenja reakcije. Sve su vrijednosti manje od 10 % za oba eksperimenta pa možemo zaključiti da niti sama adsorpcija na fotokatalizator neće utjecati na razgradnju prokaina u sljedećim provedenim eksperimentima.

Uspoređujući rezultate preliminarnih eksperimenata fotolize i fotokatalize vidi se da se razgradnja prokaina uvelike povećala korištenjem fotokatalizatora. Prilikom izlaganja otopine UV zračenju bez korištenja fotokatalizatora koncentracija prokaina se nakon 360 minuta smanjila za 21,63 %, dok se uz korištenje fotokatalizatora smanjila za 70,50 %. Prema tome, zaključujemo da je fotokatalizator prikladan i učinkovit za provođenje daljnjih eksperimenata fotokatalize.

Dobiveni rezultati fotokatalitičke razgradnje prokaina pod utjecajem UV zračenja su se integrirali kako bi se provela kinetička analiza te je dobiven grafički prikaz na **slici 13**. Dobivene integrirane vrijednosti mogu se opisati kinetičkim modelom razgradnje 1. reda. Koeficijent determinacije (R^2) iznosi 0,9942 pa prema tome odabrani kinetički model dobro opisuje eksperimentalne podatke. Iz jednadžbe pravca $y = 0,0032x - 0,0129$ može se odrediti vrijednost konstante brzine razgradnje od $0,0032 \text{ min}^{-1}$ i vrijeme poluraspada (vrijeme potrebno da se molekula razgradi 50 %) koje iznosi 216,61 min.

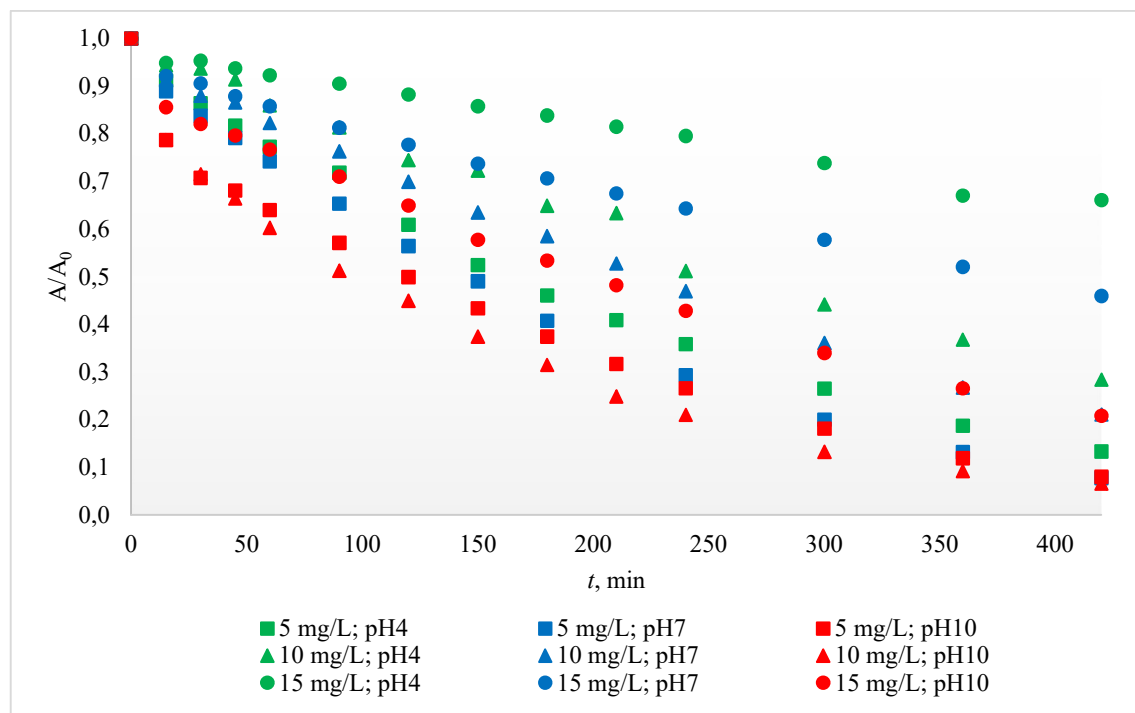
Početne pH vrijednosti otopina pripremljenih za provođenje prethodno navedenih preliminarnih eksperimenata bile su u rasponu od 5,39 do 6,05.

4.3. Fotokatalitička razgradnja prokaina

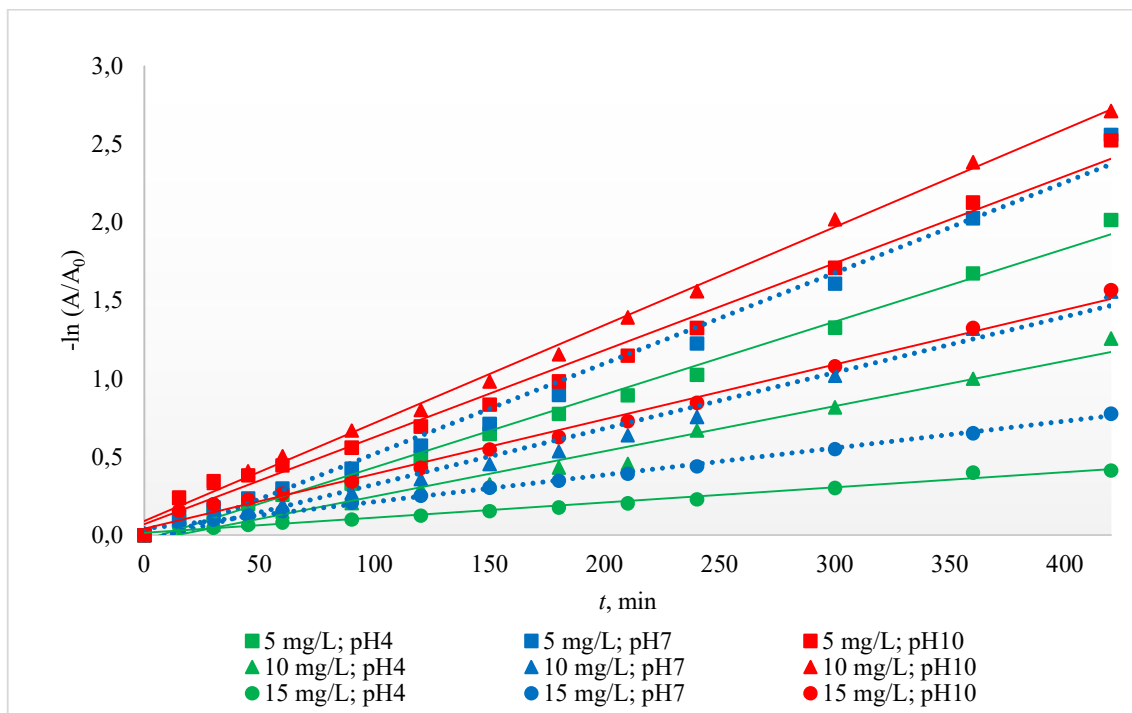
U svrhu ispitivanja utjecaja različitih parametara na fotokatalitičku razgradnju prokaina provedeno je niz eksperimenata čiji su rezultati navedeni i opisani u nastavku ovog rada.

4.3.1. Utjecaj pH i koncentracije prokaina

Da bi se utvrdili optimalni uvjeti fotokatalitičke razgradnje prokaina provelo se ukupno devet eksperimenata kombinacijom tri različite pH vrijednosti otopine od 4, 7 i 10 te tri različite početne koncentracije prokaina od 5, 10 i 15 mg/L. Grafički prikazi dobiveni obradom rezultata fotokatalitičke razgradnje prokaina za svih devet eksperimenata prikazani su na **slici 14**. Da bi se odredila kinetika fotokatalitičke razgradnje prokaina za svaki pojedini eksperiment dobiveni su se rezultati integrirali, a grafički prikaz toga prikazan je na **slici 15**. Također, podaci o smanjenju koncentracije prokaina nakon 420 minuta provođenja reakcije za svaki su eksperiment navedeni u **tablici 9**, a vrijednosti kinetičkih parametara navedeni su u **tablici 10**.



Slika 14. Fotokatalitička razgradnja prokaina pod utjecajem UV zračenja pri koncentracijama otopine prokaina od 5, 10 i 15 mg/L i pH vrijednostima od 4, 7 i 10



Slika 15. Kinetika fotokatalitičke razgradnje prokaina pod utjecajem UV zračenja pri koncentracijama otopine prokaina od 5, 10 i 15 mg/L i pH vrijednostima od 4, 7 i 10

Tablica 9. Izračunate vrijednosti smanjenja koncentracije prokaina tijekom provođenja ispitivanja njegove fotokatalitičke razgradnje pri koncentracijama otopine prokaina od 5, 10 i 15 mg/L i pH vrijednostima od 4, 7 i 10

Vrijeme [min]	5 mg/L	5 mg/L	5 mg/L	10 mg/L	10 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	15 mg/L	15 mg/L
	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10	pH4	pH7	pH10
	Smanjenje koncentracije [%]								
420	86,70	92,27	92,00	71,59	78,96	93,37	33,91	54,06	79,17

Tablica 10. Izračunate vrijednosti kinetičkih parametara za ispitivanje fotokatalitičke razgradnje prokaina pri svim kombiniranim uvjetima koncentracije i pH dobivene prema modelu kinetike razgradnje 1. reda

k [min^{-1}]	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L	$t_{1/2}$ [min]	5 mg/L	10 mg/L	15 mg/L
pH 4	0,0047	0,0029	0,0010	pH 4	147,48	239,02	693,15
pH 7	0,0058	0,0036	0,0017	pH 7	119,51	192,54	407,73
pH 10	0,0056	0,0063	0,0035	pH 10	123,78	110,02	198,04

Prema rezultatima iz **tablica 9 i 10** vidimo da se tijekom 420 minuta, koliko se reakcija provodila, najviše prokaina razgradilo pri koncentraciji otopine od 10 mg/L i pH vrijednosti 10. Pri navedenim se uvjetima koncentracija prokaina smanjila za 93,37 %. Također, pri tim je uvjetima dobivena i najveća konstanta brzine reakcije od $0,0063 \text{ min}^{-1}$ i najmanje vrijeme poluraspada od 110,02 min. S obzirom na sve navedeno, može se zaključiti da su koncentracija prokaina od 10 mg/L i pH vrijednost otopine 10 optimalni uvjeti za provođenje fotokatalitičke razgradnje prokaina.

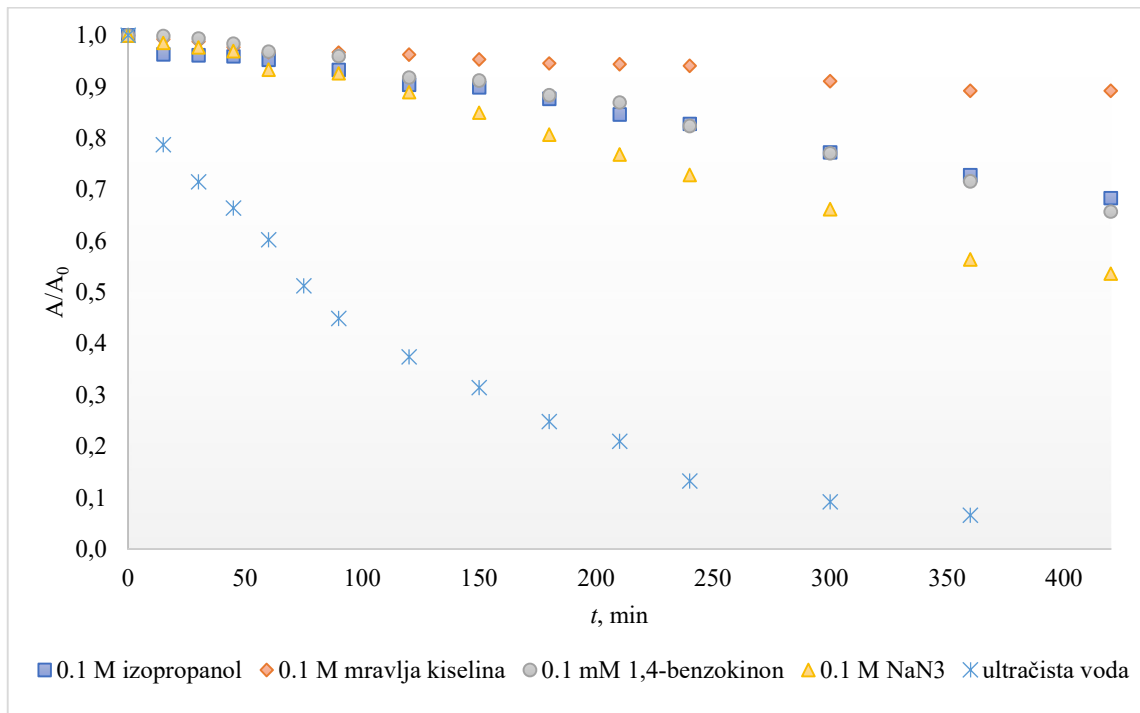
Na temelju ostalih rezultata iz tablice može se vidjeti da se za svaku ispitivanu koncentraciju otopine povećanjem pH povećava i postotak razgrađenog prokaina kao i konstanta brzine reakcije, dok se smanjuje vrijeme poluraspada. Na temelju toga može se zaključiti da pH vrijednost otopine ima vrlo važnu ulogu u brzini razgradnje prokaina. Poznato je da pH vrijednost otopine određuje površinska svojstva fotokatalizatora i protoniranje/deprotoniranje komponente koja se razgrađuje. Izoelektrična točka za TiO_2 , $\text{pH}_{\text{pzc}}^{21}$, iznosi otprilike 6,5. Pri pH vrijednosti manjoj od vrijednosti izoelektrične točke, površina fotokatalizatora postaje protonirana i pozitivno nabijena, dok pri većoj vrijednosti postaje deprotonirana i negativno nabijena. [46] Prema navedenim činjenicama znači da će površina fotokatalizatora pri ispitivanoj pH vrijednosti 4 biti pozitivno nabijena, a pri vrijednostima 7 i 10 negativno nabijena. Lokalni anestetici općenito u otopini mogu postojati u neioniziranom obliku i u ioniziranom obliku kao anion, a relativni udio tih dvaju oblika ovisi o njihovoj konstanti disocijacije tj. $\text{p}K_{\text{k}}$ i o pH otopine. Prokain je slaba baza s konstantom disocijacije 8,9 i pri tom je pH otopine ionizirani (hidrofilan) i neionizirani (lipofilan) oblik molekule u ravnoteži. [45, 47] Pri pH vrijednosti otopine 4 i 7 prokain se nalazi u neioniziranom obliku, dok se pri pH vrijednosti 10 nalazi u ioniziranom obliku kao anion. Stoga, pri pH vrijednosti otopine 10 dolazi do elektrostatskog odbijanja između anionskog oblika prokaina i negativno nabijene površine fotokatalizatora. Međutim, neutralne molekule se vežu na fotokatalizator putem relativno slabih van der Waalsovih i elektron donor-akceptor interakcija dok nabijene vrste mogu međudjelovati putem jačih elektrostatskih mehanizama kao što su kationska izmjena, kationsko premošćivanje i kompleksiranje. [48] Ti su jači elektrostatski mehanizmi između nabijenih vrsta vjerojatno razlog najvećeg smanjenja koncentracije prokaina pri pH vrijednosti otopine 10 za sve tri ispitivane koncentracije.

²¹ engl. *Point of Zero Charge*, pH_{pzc}

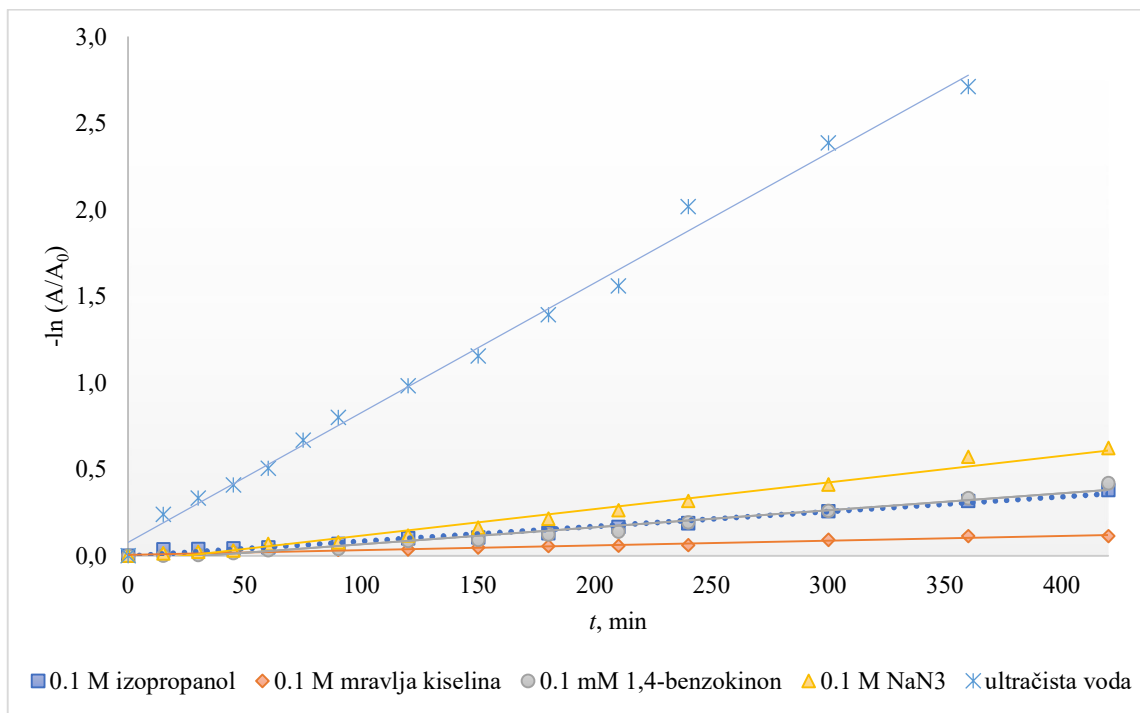
Može se primijetiti kako se pri pH vrijednostima otopine 4 i 7 dobilo najveće smanjenje koncentracije, najveća konstanta brzine reakcije i najmanje vrijeme poluraspada za najmanju početnu koncentraciju prokaina od 5 mg/L. Takav se rezultat može opravdati time što na površini fotokatalizatora postoji ograničen broj aktivnih mjesta pa su pri velikim koncentracijama polaznog reaktanta sva slobodna mjesta na površini katalizatora popunjena i daljnje povećanje ulazne koncentracije reaktanta ne utječe na konverziju. [49] Kao što je već spomenuto, pri pH vrijednosti otopine 10 najveće smanjenje koncentracije, najveća konstanta brzine reakcije i najmanje vrijeme poluraspada dobiveno je za koncentraciju prokaina od 10 mg/L, a ne od 5 mg/L kao za druge dvije ispitivane pH vrijednosti jer su vjerojatno slobodna aktivna mjesta na površini fotokatalizatora maksimalno iskorištena.

4.3.2. Mehanizam fotokatalitičke razgradnje

„Scavenging“ test proveden je u svrhu ispitivanja uloge pojedinih reaktivnih vrsta na fotokatalitičku razgradnju prokaina pri optimalnim uvjetima. U otopinu su se dodali tzv. hvatači radikala kako bi se deaktivirale određene aktivne vrste. Na taj se način može procijeniti uloga tih aktivnih vrsta u razgradnji prokaina te sam mehanizam fotokatalize. Rezultati fotokatalitičke razgradnje prokaina uz dodatak hvatača radikala u otopinu prikazani su na **slikama 16 i 17**, a izračunati podaci o kinetičkim parametrima navedeni su u **tablici 11**.



Slika 16. Fotokatalitička razgradnja prokaina pod utjecajem UV zračenja s i bez izopropanola, mravlje kiseline, 1,4-benzokinina i natrijeva azida



Slika 17. Kinetika fotokatalitičke razgradnje prokaina pod utjecajem UV zračenja s i bez izopropanola, mravlje kiseline, 1,4-benzokinona i natrijeva azida

Tablica 11. Izračunate vrijednosti kinetičkih parametara za ispitivanje fotokatalitičke razgradnje prokaina pri svim poveljenim „scavenging“ testovima prema modelu kinetike razgradnje 1. reda

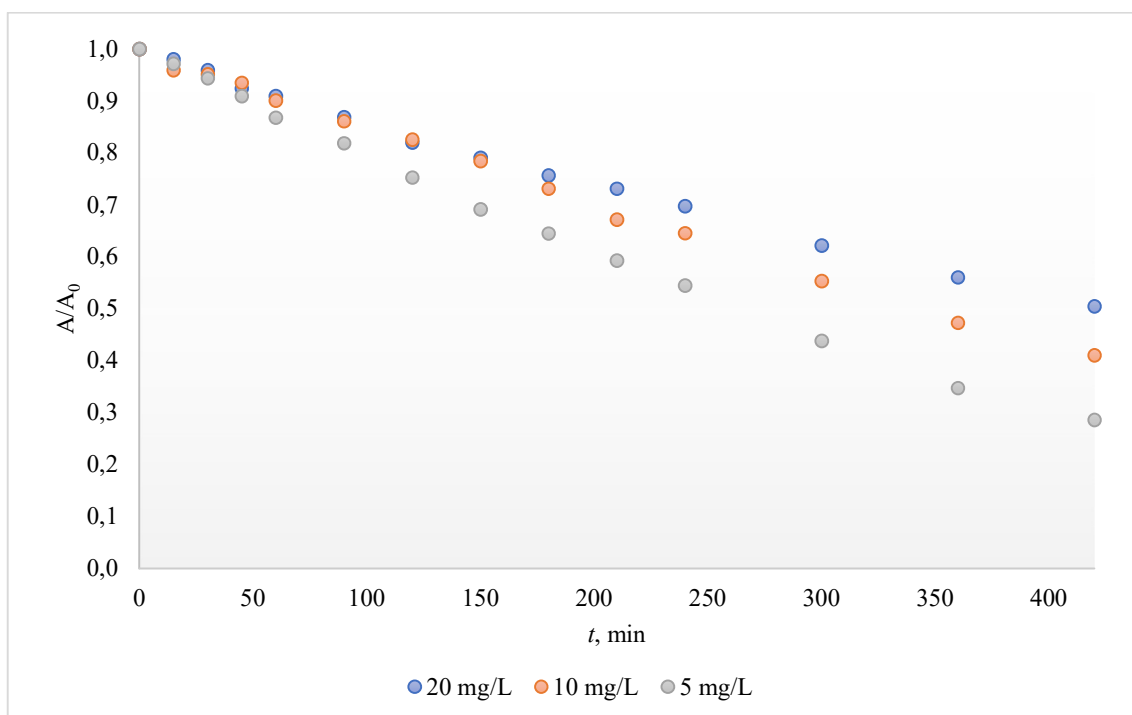
	k [min^{-1}]	$t_{1/2}$ [min]	R^2
0,1 M izopropanol	0,0009	770,16	0,9835
0,1 M mravlja kiselina	0,0003	2310,49	0,9708
0,1 mM 1,4-benzokinon	0,0010	693,15	0,9755
0,1 M NaN₃	0,0015	462,10	0,9822
ultračista voda	0,0063	110,02	0,9966

Izopropanol je hvatač hidroksilnih radikala, mravlja kiselina je hvatač šupljina, 1,4-benzokinon superoksidnih radikala, a natrijev azid singletnog kisika. [50] Na temelju grafičkog prikaza na **slici 16** vidi se da se koncentracija prokaina u prisutnosti svih hvatača radikala smanjila znatno manje u odnosu na otopinu prokaina u kojoj nisu bili prisutni hvatači radikala. Sve vrijednosti konstanti brzina reakcija su puno manje, a vremena poluraspada prokaina su puno veća u usporedbi s njihovim vrijednostima za otopinu bez prisutnosti hvatača radikala koje iznose $0,0063 \text{ min}^{-1}$ i 110,02 min. Prema tome se može zaključiti da sve prethodno navedene aktivne vrste sudjeluju u procesu razgradnje prokaina. Međutim, u usporedbi s drugim hvatačima, za prokain u prisutnosti mravlje kiseline dobivena je najmanja konstanta brzine razgradnje od $0,0003 \text{ min}^{-1}$ te najveće vrijeme poluraspada od 2310,49 min. Po tome se može zaključiti da šupljine znatno više doprinose razgradnji prokaina od hidroksilnih radikala, superoksidnih radikala i singletnog kisika. Treba razmotriti i selektivnost korištenih hvatača radikala jer ako uzmemo u obzir da se u literaturi spominje uloga mravlje kiseline i alkohola kao mogućih hvatača i šupljina i hidroksilnih radikala, može se reći da obje navedene specije imaju dominantnu ulogu u razgradnji prokaina koji je zasigurno, opisanim eksperimentima, pokazao podložnost ka reakcijama s kisikovim reaktivnim vrstama. [50, 51]

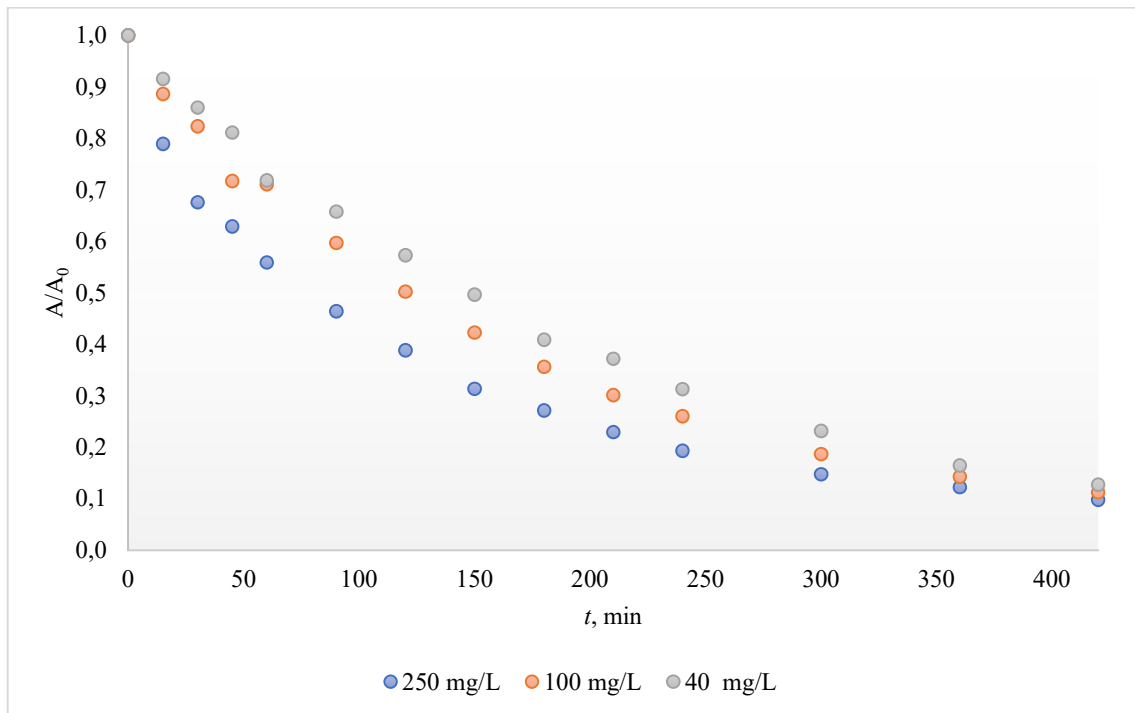
4.3.3. Utjecaj matice vode

Kao što je već spomenuto u odlomku 2.1.2.1., na fotokatalitičku razgradnju mogu utjecati i razni organski i anorganski spojevi, uobičajene sastavnice vode koje mogu apsorbirati zračenje i zatim reagirati izravno s farmaceutikom ili stvoriti reaktivne kisikove vrste koje mogu oksidirati farmaceutik i tako usporiti ili ubrzati njegovu razgradnju. U ovom je radu zasebno

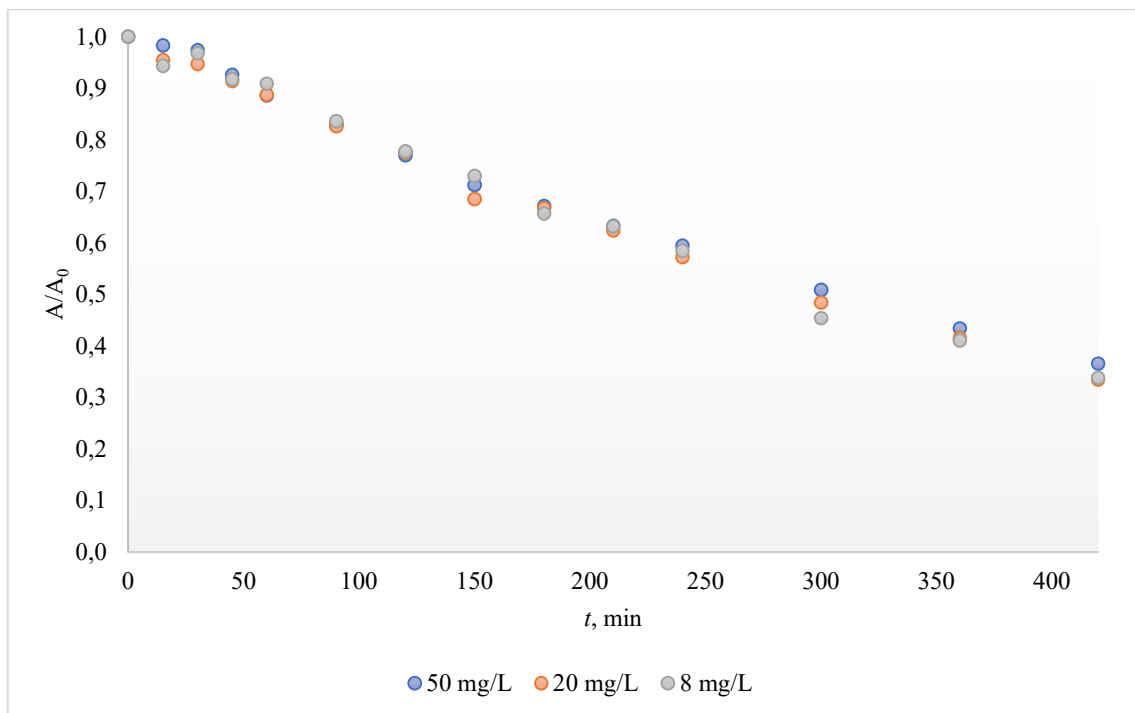
ispitan utjecaj prisutnosti sljedećih spojeva u otopini: huminske kiseline, hidrogenkarbonata, nitrata i klorida. Budući da se u stvarnim uzorcima otpadne vode mogu razlikovati i sastav i koncentracija prisutnih tvari važno je ispitati i utjecaj koncentracije navedenih sastojaka na fotokatalitičku razgradnju prokaina. Također, ispitan je i utjecaj smjese navedenih spojeva u otopini. Na **slikama 18-22** prikazani su rezultati pojedinih eksperimenata utjecaja matice na fotokatalitičku razgradnju prokaina, a u **tablici 12** navedene su izračunate vrijednosti kinetičkih parametara i početne pH vrijednosti pojedinih otopina.



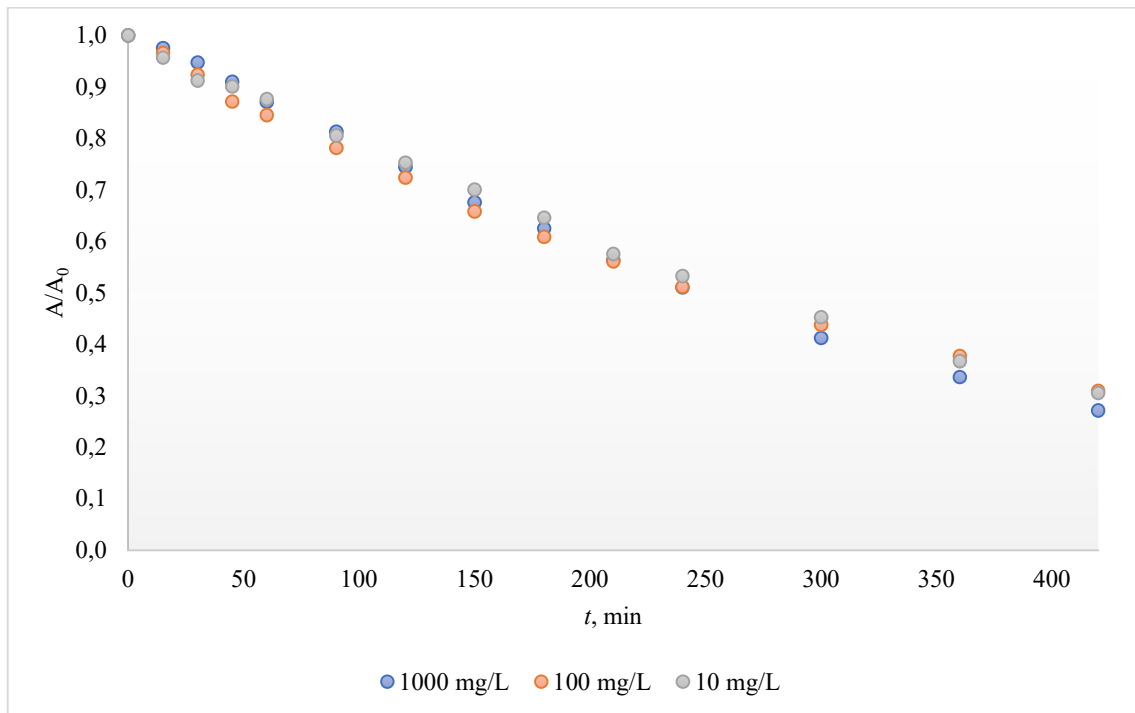
Slika 18. Utjecaj huminske kiseline različitih koncentracija na fotokatalitičku razgradnju prokaina pod utjecajem UV zračenja



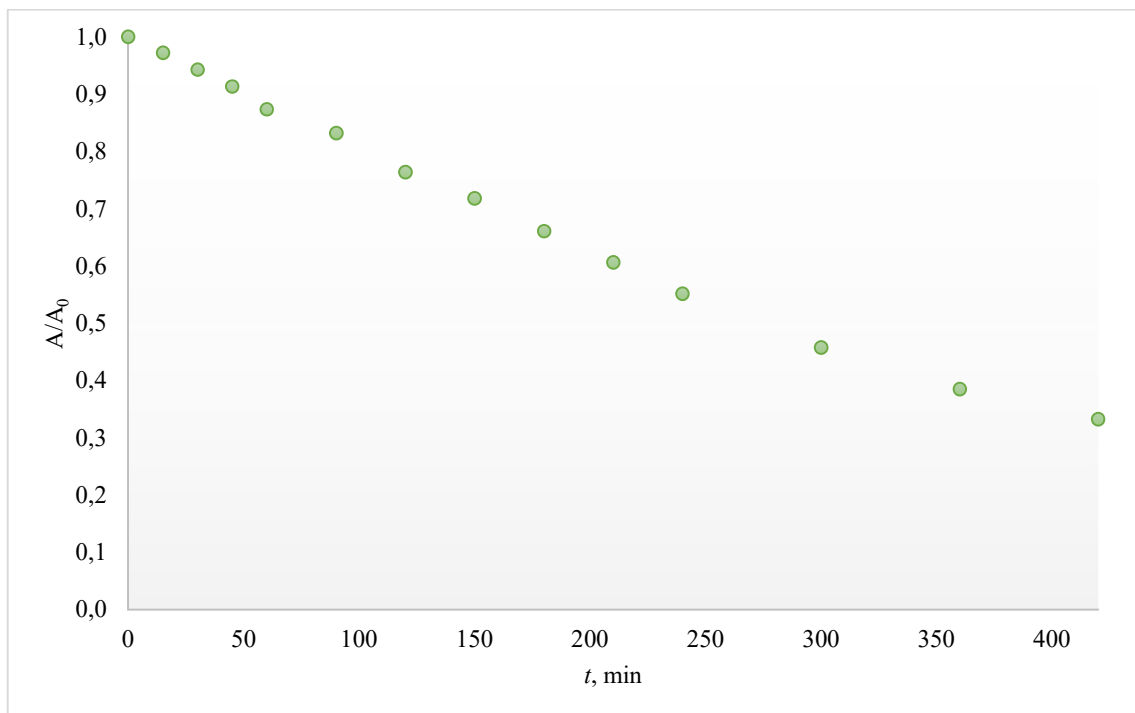
Slika 19. Utjecaj hidrogenkarbonata različitih koncentracija na fotokatalitičku razgradnju prokaina pod utjecajem UV zračenja



Slika 20. Utjecaj nitrata različitih koncentracija na fotokatalitičku razgradnju prokaina pod utjecajem UV zračenja



Slika 21. Utjecaj klorida različitih koncentracija na fotokatalitičku razgradnju prokaina pod utjecajem UV zračenja



Slika 22. Utjecaj smjese svih ispitanih tvari (huminska kiselina, hidrogenkarbonati, nitrati, kloridi) određenih koncentracija na fotokatalitičku razgradnju prokaina pod utjecajem UV zračenja

Tablica 12. Izračunate vrijednosti kinetičkih parametara za ispitivanje utjecaja matice na fotokatalitičku razgradnju prokaina prema modelu kinetike razgradnje 1. reda te početne pH vrijednosti pojedinih otopina

	Koncentracija [mg/L]	k [min ⁻¹]	$t_{1/2}$ [min]	R^2	Početni pH otopine
HA	20	0,0016	433,22	0,9978	5,10
	10	0,0021	330,07	0,9897	5,13
	5	0,0030	231,05	0,9910	5,15
HCO₃⁻	250	0,0054	128,36	0,9772	8,58
	100	0,0053	130,78	0,9971	8,36
	40	0,0049	141,46	0,9986	8,01
NO₃⁻	50	0,0024	288,81	0,9975	5,62
	20	0,0025	277,26	0,9939	5,49
	8	0,0026	266,60	0,9900	5,40
Cl⁻	1000	0,0031	223,60	0,9951	5,32
	100	0,0028	247,55	0,9995	5,14
	10	0,0028	247,55	0,9949	5,54
smjesa iona	-	0,0027	256,72	0,9957	7,70
ultračista voda	-	0,0032	216,61	0,9996	5,69

Bez prisutnosti navedenih tvari u otopini nakon 360 minuta provođenja reakcije konstanta brzine razgradnje iznosi 0,0032 min⁻¹, vrijeme poluraspada 216,61 min, a koncentracija prokaina se smanjila za 70,50 %.

Povećanjem koncentracije huminske kiseline u otopini smanjuje se konstanta brzine reakcije i povećava se vrijeme poluraspada. Pri najmanjoj ispitivanoj koncentraciji konstanta brzine reakcije iznosi 0,0030 min⁻¹, vrijeme poluraspada 231,05 min, a koncentracija prokaina se nakon 360 minuta provođenja reakcije smanjila za 65,28 %.

Povećanjem koncentracije hidrogenkarbonata u otopini neznačajno se povećava konstanta brzine reakcije i smanjuje vrijeme poluraspada. Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji konstanta brzine reakcije iznosi 0,0054 min⁻¹, vrijeme poluraspada 128,36 min, a koncentracija prokaina se nakon 360 minuta provođenja reakcije smanjila za 87,69 %.

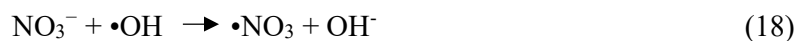
Povećanjem koncentracije nitrata u otopini neznačajno se smanjila konstanta brzine reakcije i povećalo vrijeme poluraspada. Pri najmanjoj ispitivanoj koncentraciji konstanta brzine reakcije

iznosi $0,0026 \text{ min}^{-1}$, vrijeme poluraspada $266,60 \text{ min}$, a smanjenje koncentracije nakon 360 minuta provođenja reakcije iznosi $58,99 \%$.

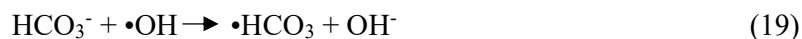
Povećanjem koncentracije klorida u otopini neznajno se povećala konstanta brzine reakcije i smanjilo vrijeme poluraspada. Pri najvećoj ispitivanoj koncentraciji konstanta brzine reakcije iznosi $0,0031 \text{ min}^{-1}$, vrijeme poluraspada iznosi $223,60 \text{ min}$, a smanjenje koncentracije nakon 360 minuta provođenja reakcije iznosi $66,34 \%$.

S obzirom na sve prethodno spomenuto, različita koncentracija hidrogenkarbonata, nitrata i klorida u otopini skoro pa uopće nema utjecaja na fotokatalitičku razgradnju prokaina. Uspoređujući utjecaj nitrata i klorida s rezultatima bez njihove prisutnosti u otopini može se primijetiti blago usporavanje reakcije razgradnje pri čemu nitrati reakciju usporavaju malo više od klorida. S druge strane, uspoređujući utjecaj hidrogenkarbonata s rezultatima eksperimenata kada hidrogenkarbonat nije bio prisutan u otopini može se primijetiti povećanje brzine razgradnje. Od utjecaja tvari ispitivanih u ovom radu jedino je huminska kiselina ta čija različita koncentracija u otopini utječe na brzinu fotokatalitičke razgradnje prokaina pa se tako povećanjem njene koncentracije smanjuje brzina fotokatalitičke razgradnje prokaina.

Blago smanjenje brzine razgradnje prilikom prisutnosti kloridnih i nitratnih iona u otopini može se pripisati smanjenju dostupnih adsorpcijskih mjesta na fotokatalizatoru, potrošnji hidroksilnih radikala ili hvatanju šupljina adsorbiranim anionima. Iako tim reakcijama nastaju novi radikali, njihova je aktivnost manja od h^+ i $\bullet\text{OH}$. Spomenute reakcije prikazane su **jednadžbama 14-18** [52]:



Nadalje, hidrogenkarbonat djeluje kao čistač hidroksilnih radikala pri čemu se stvaraju karbonatni radikali, koji su selektivniji i manje reaktivni od $\bullet\text{OH}$ radikala, prema sljedećim **jednadžbama 19-20** [52]:



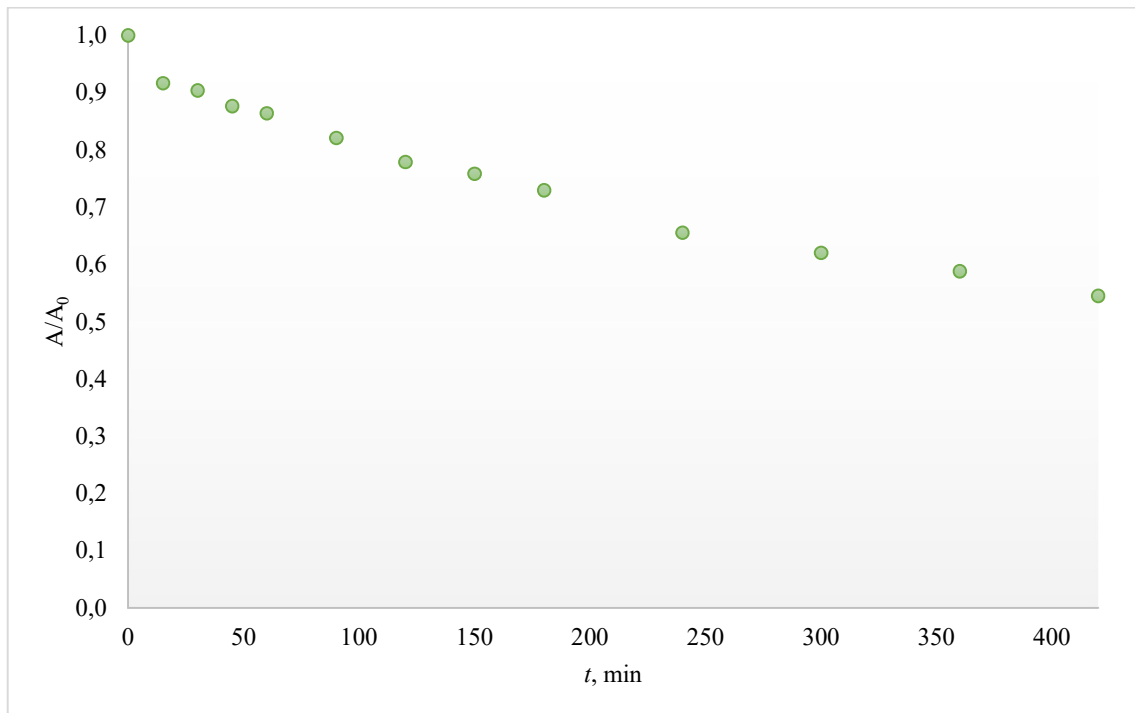
Prilikom povećanja brzine razgradnje prokaina u prisutnosti hidrogenkarbonata u otopini nastali karbonatni radikali bi mogli igrati vodeću ulogu. S druge strane, jedan od mogućih razloga za tu pojavu je možda i viši početni pH otopine, a već je u radu zaključeno da se povećanjem pH otopine povećava i konstanta brzine fotolitičke razgradnje prokaina.

Što je veća koncentracija huminske kiseline u otopini to je konstanta brzine reakcije manja. Poznato je da se huminske kiseline lako adsorbiraju na površinu TiO_2 i da su bogate elektronima pa bi mogle imati ulogu hvatača hidroksilnih radikala. S obzirom da su i druge ispitivane tvari mogući hvatači hidroksilnih radikala, najvjerojatnije se brzina reakcije povećanjem koncentracije huminske kiseline smanjuje zbog smanjenja slobodnih aktivnih mjesta na fotokatalizatoru i kompeticije s prokainom pa se time inhibira njegova razgradnja.

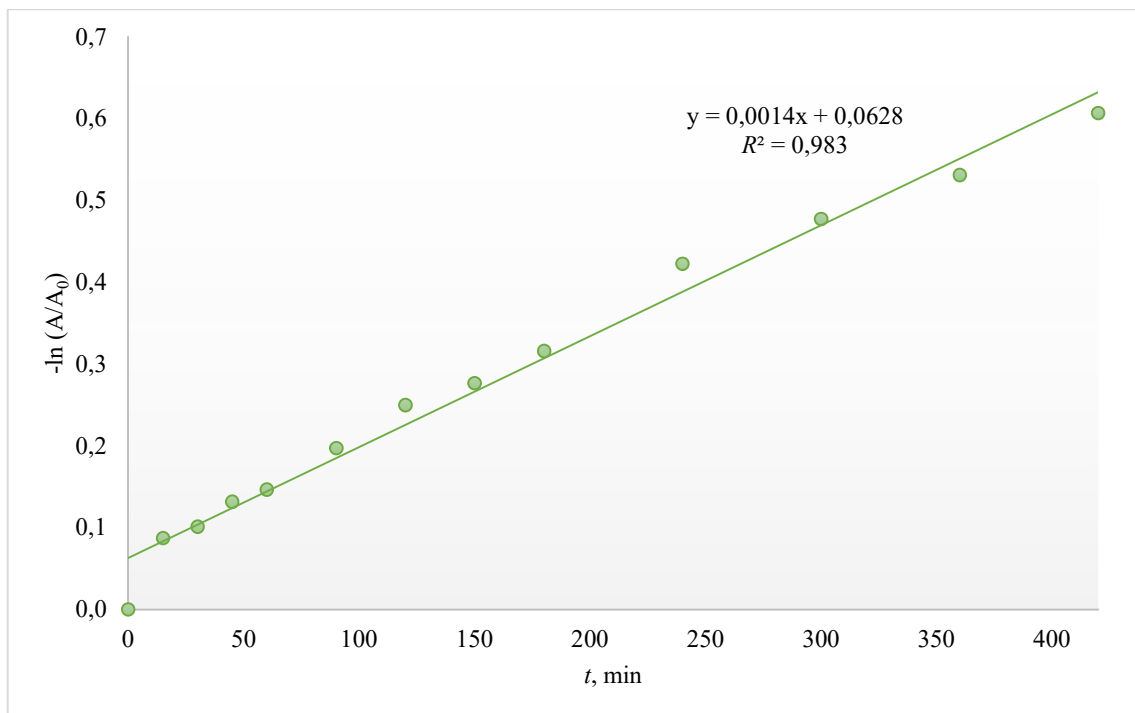
Provođenjem reakcije u smjesi svih iona u otopini dobivena je konstanta brzine razgradnje od $0,0027 \text{ min}^{-1}$, vrijeme poluraspada od 256,72 min, a koncentracija prokaina se nakon 360 minuta provođenja reakcije smanjila za 61,49 %. Time se primjećuje smanjenje brzine fotokatalitičke razgradnje prokaina u odnosu na ispitivanje s otopinom bez prisutnih iona. Takav je rezultat i očekivan s obzirom da sve tvari osim hidrogenkarbonata smanjuju brzinu razgradnje.

4.3.4. Primjena realne otpadne vode

U ovom se radu također ispitala učinkovitost fotokatalitičke razgradnje prokaina u realnoj otpadnoj vodi. Rezultati su prikazani na **slikama 23 i 24**.



Slika 23. Fotokatalitička razgradnja prokaina u uzorku realne otpadne vode pod utjecajem UV zračenja



Slika 24. Kinetika fotokatalitičke razgradnje prokaina u uzorku realne otpadne vode pod utjecajem UV zračenja

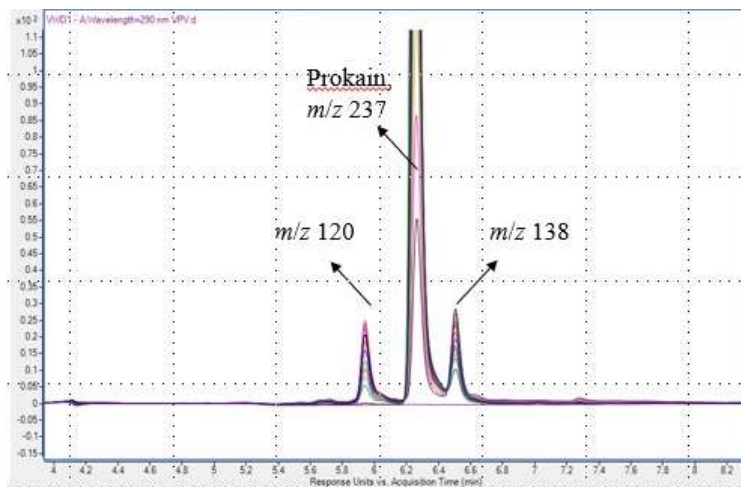
Za eksperiment fotokatalitičke razgradnje prokaina u uzorku realne otpadne vode s početnom pH vrijednosti otopine od 7,7 dobivena konstanta brzine reakcije iznosi $0,0014 \text{ min}^{-1}$, vrijeme poluraspada 495,11 min, a smanjenje koncentracije nakon 420 minuta provođenja reakcije iznosi 45,49 %. S obzirom da se radi o realnoj otpadnoj vodi u kojoj je prisutno i puno drugih zagađivala, poput huminskih kiselina čiji je utjecaj ispitan i u ovom radu, manji stupanj razgradnje prokaina je sasvim očekivan. S druge strane pH vrijednost realne otpadne vode je blago lužnata, a budući je dokazano da fotokatalitičkoj razgradnji prokaina pogoduje viša pH vrijednost može se očekivat da bi pri višoj početnoj pH vrijednosti i razgradnja prokaina u realnoj otpadnoj vodi bila veća.

4.4. Razgradni produkti

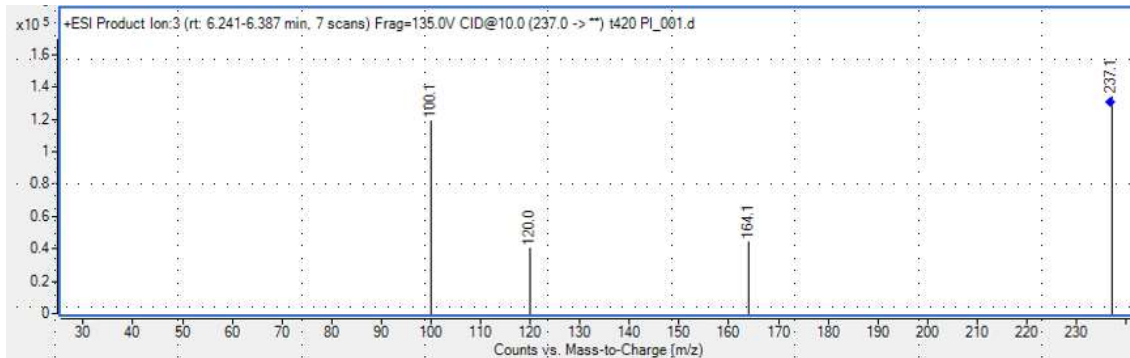
Razgradni produkti prokaina određeni su nakon provođenja reakcije fotokatalitičke razgradnje prokaina tijekom 420 minuta pri optimalnim uvjetima. U **tablici 13** navedena su vremena zadržavanja i uvjeti MS/MS analize prokaina i potencijalnih razgradnih produkata. Kromatogram prokaina i razgradnih produkata prikazan je na **slici 25**. MS/MS spektri prokaina i razgradnih produkata prikazani su na **slikama 26, 28 i 30**, a na **slikama 27, 29 i 31** prikazani su putevi fragmentacije dobivenih razgradnih produkata (RP-1 i RP-2).

Tablica 13. Vremena zadržavanja prokaina i potencijalnih produkata razgradnje te optimalni uvjeti na MS/MS-u

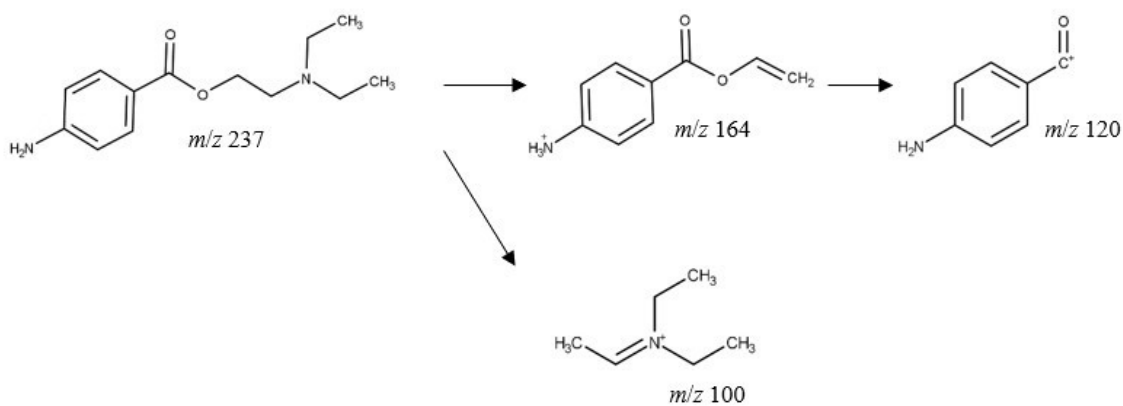
	Vrijeme zadržavanja [min]	[M+H] ⁺	Napon fragmentora [V]	Energija sudara [eV]	Fragmentni ioni [m/z]
RP-1	5,9	120	135	10	92, 65
Prokain	6,3	237	135	10	164, 120, 100
RP-2	6,5	138	135	20	94, 77, 65



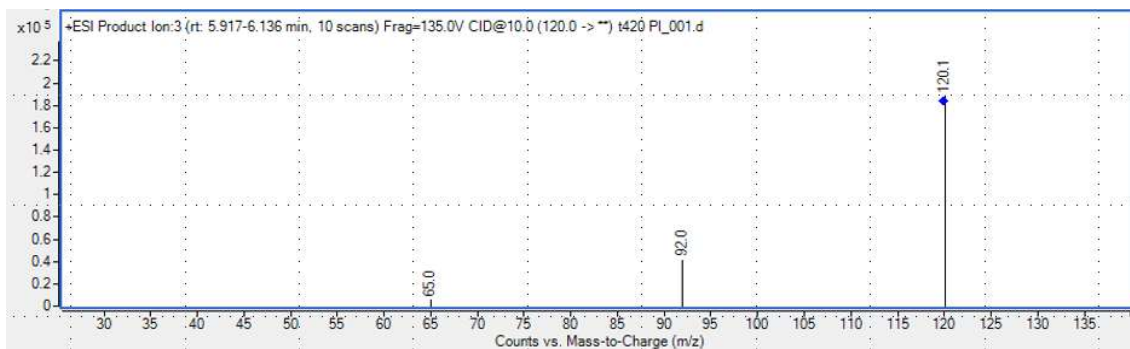
Slika 25. Kromatogram prokaina i dva nastala razgradna produkta RP-1 i RP-2



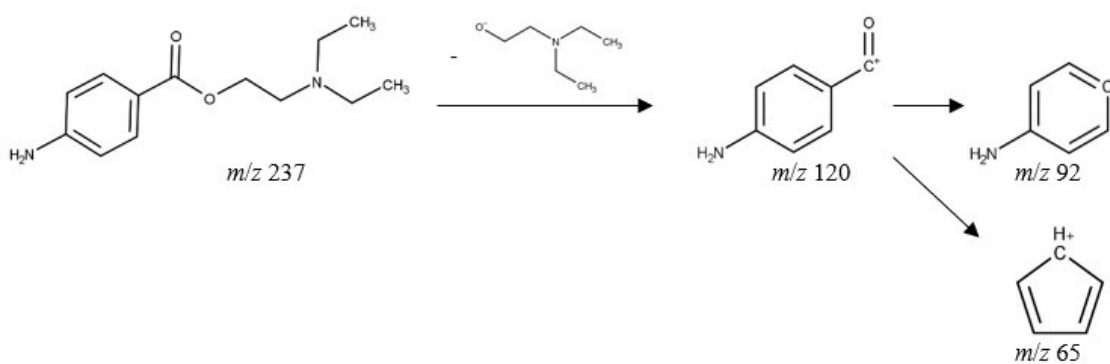
Slika 26. MS/MS spektar prokaina



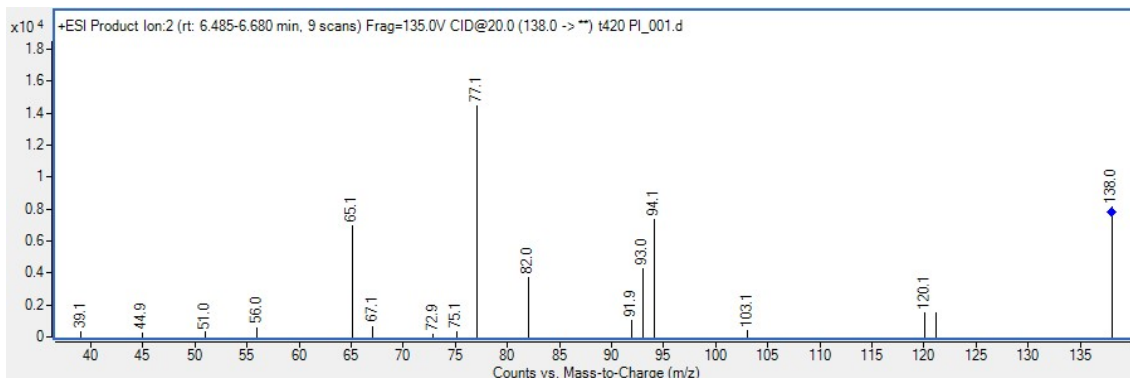
Slika 27. Predložena fragmentacija prokaina



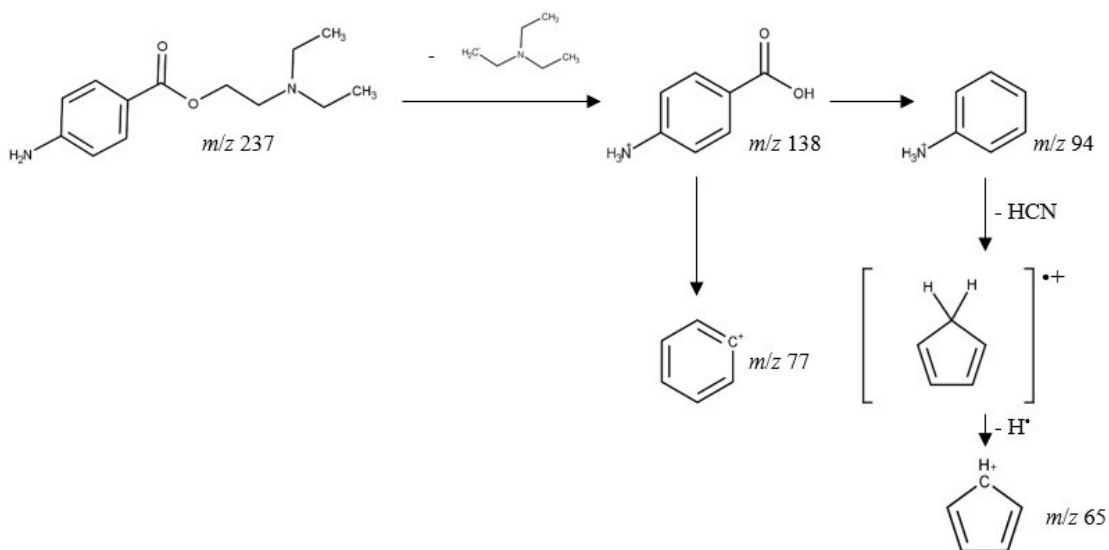
Slika 28. MS/MS spektar RP-1



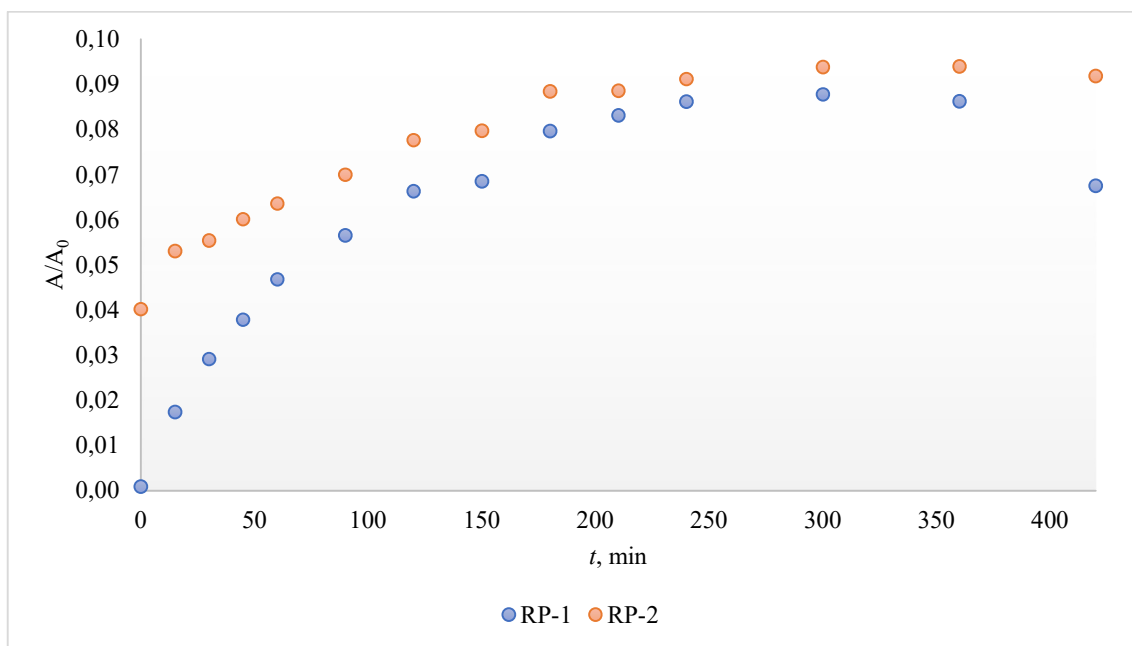
Slika 29. Predložena fragmentacija RP-1



Slika 30. MS/MS spektar RP-2



Slika 31. Predložena fragmentacija RP-2



Slika 32. Prikaz vremenskog profila nastajanja i razgradnje razgradnih produkata RP-1 i RP-2

Tijekom fotokatalitičke razgradnje prokaina (m/z 237) nastaju RP-1 s m/z 120 i RP-2 s m/z 138. RP-1 nastaje odcjepljivanjem molekule 4-karbonil anilina ($\text{C}_7\text{H}_6\text{NO}^+$), a RP-2 nastaje odcjepljivanjem molekule 4-karboksi anilinijskog kationa ($\text{C}_7\text{H}_8\text{NO}_2^+$). Na slikama 28 i 30 prikazani su MS/MS spektri za RP-1 odnosno RP-2 na temelju čega su i predložene njihove strukture. Na spektru za RP-1 mogu se vidjeti pikovi nižeg intenziteta s m/z 92 i 65, a na spektru za RP-2

mogu se izdvojiti pikovi s m/z 94, 77 i 65. Prijedlozi struktura razgradnih produkata i njihovih fragmenata prikazani su na **slikama 29 i 31**.

Vremenski profili nastajanja razgradnih produkata prikazani su na **slici 32** kao omjer relativne površine ispod kromatografske krivulje razgradnog produkta i prokaina na početku eksperimenta kao funkcija vremena razgradnje. Prema **slici 32** vidimo da odziv za oba razgradna produkta kontinuirano raste i za RP-1 postiže svoj maksimum nakon 300 minuta, a RP-2 nakon 360 minuta provođenja reakcije. Također možemo vidjeti da je na početku prisutno više RP-2 nego RP-1 te se s vremenom ta razlika smanjuje, ali je i dalje cijelo vrijeme u otopini prisutno više RP-2 nego RP-1.

4.5. Procjena toksičnosti

U svrhu procjene razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora prokaina, RP-1 i RP-2 koristio se softverski alat TEST²². Softver TEST procjenjuje vrijednosti toksičnosti i fizikalna svojstva kemikalija na temelju njihove molekularne strukture korištenjem metodologije kvantitativnih odnosa strukture i aktivnosti (QSAR²³). Razvijeno je nekoliko QSAR metodologija, a u ovom radu korištene su metoda konsenzusa i metoda najbližeg susjeda. Kod metode konsenzusa predviđena toksičnost procjenjuje se uzimanjem prosjeka predviđenih toksičnosti pomoću hijerarhijske metode, metode jednog modela, metode grupnog doprinosa i metode najbližeg susjeda ako su vrijednosti unutar domene primjenjivosti. Metodom najbližeg susjeda predviđena toksičnost procjenjuje se uzimanjem prosjeka triju molekula koje su najbližnje ispitivanoj molekuli. [53]

Razvojna toksičnost se odnosi na štetne utjecaje tvari na organizam u razvoju, a mutagenost na induciranje trajno prenosive promjene u genetski materijal stanice ili organizma. Ako je dobivena bezdimenzijska vrijednost za razvojnu toksičnost ili mutagenost manja od 0,5 spoj se smatra netoksičnim/nemutagenim. Bioakumulacijski faktor definira se kao omjer koncentracije kemikalije u organizmu i kemikalije u vodi. Njegova vrijednost predviđa sklonost kemijske tvari ulasku u prehrambeni lanac, tj. njenoj bioakumulaciji pa je tako <30 niska sklonost, 30-

²² engl. *Toxicity Estimation Software Tool*, TEST

²³ engl. *Quantitative Structure-Activity Relationship*, QSAR

100 umjerena, 100-1000 visoka i >1000 jako visoka sklonost bioakumulaciji. [54] U **tablici 14** navedene su vrijednosti spomenutih parametara.

Tablica 14. Vrijednosti razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora za prokain, RP-1 i RP-2 dobivene TEST programom

Molekula	Razvojna toksičnost	Mutagenost	Bioakumulacijski faktor	Metoda
Prokain	0,57	-0,16	6,46	konsenzus metoda
RP-1	0,33	/	7,94	najbliži susjed
RP-2	0,33	0,00	/	najbliži susjed

Prema konsenzus metodi vrijednost razvojne toksičnosti za prokain iznosi 0,57 čime se on može okarakterizirati kao toksičan. S druge strane, vrijednosti razvojne toksičnosti za RP-1 i RP-2 su manje od 0,5 što znači da ti spojevi nisu toksični. Vrijednosti mutagenosti ukazuju da prokain i RP-2 nisu mutageni, dok za RP-1 nisu dobiveni nikakvi rezultati pomoću metode najbližih susjeda. Nadalje, bioakumulacijski faktori prokaina i RP-1 su dosta manji od 30 (6,46 i 7,94) što ukazuje na njihovu malu sklonost bioakumulaciji dok za RP-2 istom metodom (metodom najbližih susjeda) nije dobivena nikakva vrijednost.

5. ZAKLJUČAK

U ovom su diplomskom radu ispitani utjecaji različitih parametara na fotokatalitičku razgradnju prokaina. Prije početka eksperimenata provela se validacija metode za praćenje prokaina u vodi. Na kraju se još jednom ponovio eksperiment pri optimalnim uvjetima kako bismo okarakterizirali nastale razgradne produkte. Također, provela se i procjena razvojne toksičnosti, mutagenosti i bioakumulacijskog faktora prokaina i nastalih razgradnih produkata pomoću softverskog alata TEST. Na temelju provedenih eksperimenata doneseni su sljedeći zaključci:

- Dobiveni koeficijent determinacije tijekom ispitivanja linearnosti metode iznosi 0,9996 čime se linearnost može i potvrditi. Osjetljivost metode iznosi 212,35 [L/mg]. Prilikom ispitivanja ponovljivosti metode sve su izračunate RSD vrijednosti manje od 10 % i međusobno se za svaku koncentraciju u oba provedena mjerenja ne razlikuju značajno što zadovoljava kriterij za tu izvedbenu karakteristiku. Međupreciznost je ispitana na temelju *F*-testa i sve su izračunate vrijednosti manje od očitane kritične *F*-vrijednosti iz tablice. Eksperimentalno procijenjena granica kvantifikacije za prokain iznosi 0,05 mg/L, a granica detekcije 0,01 mg/L.
- Vrijednosti hidrolize prokaina su ispod 10 % što ukazuje da je spoj hidrolitički stabilan pa smanjenje koncentracije prokaina u otopini nije povezano s njegovom hidrolitičkom razgradnjom.
- Adsorpcija prokaina na fotokatalizator također ne utječe na razgradnju prokaina jer su vrijednosti smanjenja koncentracije manje od 10 %.
- Prokain se razgrađuje pod utjecajem UV zračenja te je njegova razgradnja veća prilikom korištenja fotokatalizatora.
- Fotokatalitička razgradnja prokaina može se opisati kinetikom 1. reda.
- Optimalni uvjeti za provođenje fotokatalitičke razgradnje prokaina su koncentracija od 10 mg/L i pH vrijednosti otopine 10. Pri tim se uvjetima koncentracija prokaina tijekom 420 minuta provođenja reakcije smanjila za 93,37 %, a konstanta brzine reakcije i vrijeme poluraspada iznose $0,0063 \text{ min}^{-1}$, tj. 110,02 min.
- Povećanjem pH otopine povećava se i postotak razgrađenog prokaina kao i konstanta brzine reakcije, dok se vrijeme poluraspada smanjuje.
- Pri pH vrijednostima otopine 4 i 7 najveće smanjenje koncentracije, najveća konstanta brzine reakcije i najmanje vrijeme poluraspada dobiveni su za najmanju početnu koncentraciju prokaina od 5 mg/L zbog ograničenog broja aktivnih mjesta na površini fotokatalizatora. Pri pH vrijednosti 10 su takvi rezultati dobiveni za koncentraciju od 10

mg/L jer su vjerojatno slobodna aktivna mjesta na površini fotokatalizatora maksimalno iskorištena.

- Sve ispitane aktivne vrste (hidroksilni radikali, šupljine, superoksidni radikali i singletni kisik) sudjeluju u procesu razgradnje prokaina. Međutim, u usporedbi s drugim hvatačima, za mravlju kiselinu dobivena je najmanja konstanta brzine razgradnje od $0,0003 \text{ min}^{-1}$ te najveće vrijeme poluraspada od 2310,49 min. Prema tome se zaključuje da šupljine najviše doprinose razgradnji prokaina.
- Različita koncentracija hidrogenkarbonata, nitrata i klorida u otopini skoro pa uopće nema utjecaja na fotokatalitičku razgradnju prokaina. S druge strane, povećanjem koncentracije huminske kiseline smanjuje se brzina fotokatalitičke razgradnje.
- Nitrati i kloridi blago usporavaju reakciju razgradnje pri čemu nitrati usporavaju reakciju malo više od klorida.
- Hidrogenkarbonati povećavaju brzinu fotokatalitičke razgradnje prokaina.
- Smjesa svih ispitivanih tvari (nitrati, kloridi, huminske kiseline i hidrogenkarbonati) u otopini smanjuje brzinu fotokatalitičke razgradnje prokaina u odnosu na ispitivanje s otopinom bez prisutnih tih tvari.
- Fotokatalitička razgradnja prokaina je sporija u uzorku realne otpadne vode u usporedbi s ultračistom vodom.
- Određena su dva razgradna produkta s m/z 120 i m/z 138 tijekom fotokatalitičke razgradnje prokaina tijekom 420 minuta pri optimalnim uvjetima.
- Prokain se može okarakterizirati kao razvojno toksičan, dok RP-1 i RP-2 nisu toksični. Vrijednosti mutagenosti ukazuju da prokain i RP-2 nisu mutageni, dok za RP-1 nisu dobiveni rezultati pomoću metode najbližih susjeda. Bioakumulacijski faktori prokaina i RP-1 od 6,46 i 7,94 ukazuju na njihovu malu sklonost bioakumulaciji dok za RP-2 metodom najbližih susjeda nije dobivena nikakva vrijednost na osnovu koje bismo mogli nešto zaključiti o njegovoj sklonosti bioakumulaciji.

6. LITERATURA

- [1] V. Kumar, V. Bansal, A. Madhavan, M. Kumar, R. Sindhu, M. Kumar Awasthi, P. Binod, S. Saran, Active pharmaceutical ingredient (API) chemicals: a critical review of current biotechnological approaches, *Bioengineered*, 13 (2) (2022) 4309-4327.
- [2] K. Kümmerer, *Pharmaceuticals in the Environment: Sources, Fate, Effects and Risks*, Second edition, Springer - Verlag Berlin Heidelberg, 2004, str. 3-4.
- [3] URL: https://hr.wikipedia.org/wiki/ATK_klasifikacija (pristup 10.5.2023.)
- [4] URL: https://www.whocc.no/atc_ddd_index/?code=N01BA02 (pristup 10.5.2023.)
- [5] R.S. Vardanyan, V.J. Hruby, *Synthesis of Essential Drugs*, Elsevier, 2006, str. 9-18.
- [6] J. A. Yagiela, Local anesthetics, *Anesth Prog*, 38 (4-5) (1991) 128-141.
- [7] URL: https://bs.wikipedia.org/wiki/Akcijski_potencijal (pristup 10.5.2023.)
- [8] J. E Heavner, Local anesthetics, *Curr Opin Anaesthesiol*, 20 (4) (2007) 336-342.
- [9] F. Liu, C. Wang, T. A. Patterson, *Anesthetics*, *Encyclopedia of Toxicology (Third Edition)*, Academic Press, 2014, str. 234-237.
- [10] A. A. Al-Badr, M. M. Tayel, *Analytical Profiles of Drug Substances and Excipients*, Academic Press, Vol 26, 1999, str. 395-458.
- [11] I. Badea, D. Moja, L. Vladescu, Determination of para-aminobenzoic acid, a degradation product of procaine hydrochloride, by zero-crossing first-derivative spectrometry, *Anal Bioanal Chem* 374 (2002) 51–53.
- [12] Tim aus der Beek, F. A. Weber, A. Bergmann, G. Grüttner, A. Carius, *Pharmaceuticals in the environment: Global occurrence and potential cooperative action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)*, Umweltbundesamt, 2016, str. 1-95.
- [13] W. C. Li, Occurrence, sources, and fate of pharmaceuticals in aquatic environment and soil, *Environ Pollut* 187 (2014) 193-201.
- [14] K. Kümmerer, *Pharmaceuticals in the Environment*, *Annu. Rev. Environ. Resour* 35 (1) (2010) 57-75.
- [15] K. Perović, *Određivanje toksičnosti azitromicina nakon naprednih oksidacijskih procesa*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2018, str. 10.
- [16] M. Periša, S. Babić, *Farmaceutici u okolišu*, *Kem. Ind.* 65 (9-10) (2016) 471-482.
- [17] M. Petrovic, D. Barceló, LC-MS for identifying photodegradation products of pharmaceuticals in the environment, *TrAC Trends Anal. Chem.* 26 (6) (2007) 486-493.
- [18] W. A. Arnold, K. McNeill, *Comprehensive Analytical Chemistry*, Elsevier, Vol 50, 2007, str. 361-385.

- [19] 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.: Processes Impacts* 16 (4) (2014) 672-696.
- [20] P. K. Jjemba, *Pharma-Ecology; The Occurrence and Fate of Pharmaceuticals and Personal Care Products in the Environment*, Wiley, 2008, str. 77-79, 214-237.
- [21] A. Sonune, R. Ghate, Developments in wastewater treatment methods, *Desalination* 167 (2004) 55-63.
- [22] G. Crini, E. Lichtfouse, Advantages and disadvantages of techniques used for wastewater treatment, *Environ Chem Lett* 17 (2019) 145-155.
- [23] H. Tomić, *Obrada otpadnih voda*, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Rudarsko-geološko-naftni fakultet, Zagreb, 2019, str. 27-28.
- [24] A. E. Segneanu, C. Orbeci, C. Lazau, P. Sfirloaga, P. Vlazan, C. Bandas, I. Grozescu, *Waste Water Treatment Methods*, Ch. 4, IntechOpen, 2013, str. 53-54.
- [25] D. Kanakaraju, B. D. Glass, M. Oelgemöller, Advanced oxidation process-mediated removal of pharmaceuticals from water: A review, *Journal of Environmental Management*, 219 (2018) 189-207.
- [26] M. A. Oturan, J.-J. Aaron, *Advanced Oxidation Processes in Water/Wastewater Treatment: Principles and Applications, A Review*, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 44 (23) (2014) 2577-2641.
- [27] R. Andreozzi, V. Caprio, A. Insola, R. Marotta, Advanced oxidation processes (AOP) for water purification and recovery, *Catalysis Today* 53 (1999) 51–59.
- [28] J. A. Garrido-Cardenas, B. Esteban-García, A. Agüera, J. A. Sánchez-Pérez, F. Manzano-Agugliaro, *Wastewater Treatment by Advanced Oxidation Process and Their Worldwide Research Trends*, *Int. J. Environ. Res. Public Health* 17 (1) (2019) 170.
- [29] A. Gil, L. A. Galeano, M. A. Vicente, *Applications of Advanced Oxidation Processes (AOPs) in Drinking Water Treatment*, Springer, 2019, str. 73-75.
- [30] R. Ameta, M. S. Solanki, S. Benjamin, S. C. Ameta, Chapter 6 - Photocatalysis, *Advanced Oxidation Processes for Waste Water Treatment*, Academic Press, 2018, str. 135-175.
- [31] R. Ameta, S.C. Ameta, *Photocatalysis – Principles and Applications*, CRC Press, New York, 2017, str. 1-20.
- [32] R. Krakowiak, J. Musial, P. Bakun, M. Sychała, B. Czarczynska-Goslinska, D. T. Mlynarczyk, T. Koczorowski, L. Sobotta, B. Stanisiz, T. Goslinski, *Titanium Dioxide-Based*

Photocatalysts for Degradation of Emerging Contaminants including Pharmaceutical Pollutants, *Appl. Sci.* 11 (18) (2021) 8674.

[33] B. A. Marinho, L. Suhadolnik, B. Likozar, M. Huš, Ž. Marinko, M. Čeh, Photocatalytic, electrocatalytic and photoelectrocatalytic degradation of pharmaceuticals in aqueous media: Analytical methods, mechanisms, simulations, catalysts and reactors, *J. Clean. Prod.* 343 (2022) 131061.

[34] J. J. Rueda-Marquez, I. Levchuk, P. Fernandez Ibanez, M. Sillanpaa, A critical review on application of photocatalysis for toxicity reduction of real wastewaters, *J. Clean. Prod.* 258 (2020) 120694.

[35] O. Coskun, Separation techniques: Chromatography, *North Clin Istanbul* 3 (2) (2016) 156-160.

[36] B. G. Belenkii, L.Z. Vilenchik, Chapter 1 General theory of chromatography, *Journal of Chromatography Library*, Elsevier, Vol. 25 (1983) 1-67.

[37] S. Levin, High Performance Liquid Chromatography (HPLC) in the pharmaceutical analysis, *Pharmaceutical Sciences Encyclopedia: Drug Discovery, Development, and Manufacturing*, John Wiley & Sons Inc., 2010, 1-34.

[38] R. F. Venn, Principles and practice of bioanalysis, Second edition, Taylor & Francis Group, LLC, 2008, str. 1-99, 177-237.

[39] Y. Kazakevich, R. Lobrutto, HPLC for Pharmaceutical Scientists, John Wiley & Sons, Inc., 2007, str. 1-674.

[40] M. W. Dong, HPLC and UHPLC for Practicing Scientists, Second edition, John Wiley & Sons, Inc., 2019, str. 15-23, 45-55, 147-174.

[41] R. Sleeman, J. F. Carter, Mass spectrometry:overview, *Encyclopedia of Analytical Science*, Elsevier, 2005, str. 337-344.

[42] F. T. Peters, O. H. Drummer, F. Musshoff, Validation of new methods, *Forensic Science International*, 165 (2-3) (2007) 216-224.

[43] M. Yuwono, G. Indrayanto, Validation of chromatographic methods of analysis, *Profiles Drug Subst Excip Relat Methodol* 32 (2005) 243-259.

[44] Z. Švagelj, V. Mandić, L. Čurković, M. Biošić, I. Žmak, M. Gaborardi, Titania-Coated Alumina Foam Photocatalyst for Memantine Degradation Derived by Replica Method and Sol-Gel Reaction, *Materials*, 13 (1) (2020) 227.

[45] URL: <https://go.drugbank.com/salts/DBSALT000551> (pristup 27.5.2023.)

- [46] Y. Mokhbi, M. Korichi, M. Sidrouhou Hadj, K. Chaouche, Treatment Heterogeneous Photocatalysis; Factors Influencing the Photocatalytic Degradation by TiO₂, Energy Procedia 50 (2014) 559-566.
- [47] D. Čavlina, Karakteristike i učinci lokalnih anestetika u kliničkoj praksi, Diplomski rad, Sveučilište u Rijeci, Medicinski fakultet, Rijeka, 2020, str. 8-9.
- [48] D. Mutavdžić Pavlović, L. Čurković, D. Blažek, J. Župan, The sorption of sulfamethazine on soil samples: Isotherms and error analysis, Sci. Total Environ. 497–498 (2014) 543–552.
- [49] F. Jović, V. Tomašić, Heterogena fotokataliza: osnove i primjena za obradu onečišćenog zraka, Kem. Ind. 60 (7-8) (2011) 392.
- [50] K. Majnarić, Fotokatalitička razgradnja trimetoprima, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020, str. 22-23.
- [51] J. T. Schneider, D. S. Firak, R. R. Ribeiro, P. G. Peralta-Zamora, Use of scavenger agents in heterogeneous photocatalysis: truths, half-truths, and misinterpretations, Phys. Chem. Chem. Phys. 22 (27) (2020) 1-6.
- [52] X. Gao, Q. Guo, G. Tang, W. Peng, Y. Luo, D. He, Effects of inorganic ions on the photocatalytic degradation of carbamazepine, Journal of Water Reuse and Desalination 9 (1) (2019) 1-9.
- [53] URL: <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (pristup 8.6.2023.)
- [54] E. Pavić, Određivanje razgradnih produkata amino i amidino supstituiranih 2-benzotiazola, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2021, str. 52, 53, 58.

7. ŽIVOTOPIS

