

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Minea Pranjić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Minea Pranjić**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 18. rujna 2023.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Kristina Tolić Čop, asistent, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Dr. sc. Lidija Furač, v. pred., Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
Prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 21. rujna 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Minea Pranjić

FOTOKATALITIČKA RAZGRADNJA TORASEMIDA S
IMOBILIZIRANIM TiO₂

Diplomski rad

Mentorica: prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović

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

dr. sc. Kristina Tolić Čop

dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, rujan 2023.

Željela bih se iskreno zahvaliti dragoj mentorici prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na stručnom vođenju i savjetovanju tijekom pisanja diplomskog rada. Vaše vodstvo i mentorstvo su mi bili neizmjereno dragocjeni te sam ponosna što sam imala priliku učiti od Vas.

Također, želim izraziti veliku zahvalnost asistentici dr. sc. Kristini Tolić Čop na pomoći, smjernicama i strpljenju, a ponajviše na prijateljskoj atmosferi tijekom eksperimentalnog procesa.

Mojoj dragoj obitelji i prijateljima, hvala vam što ste bili uz mene tijekom ovog napornog, ali i izuzetno zadovoljavajućeg razdoblja. Vaša podrška, ohrabrenje i ljubav su me nadahnuli da se suočim sa svim izazovima i da ustrajem u postizanju ovog cilja.

Dragi Tomislave, hvala ti što si uvijek bio tu da me ohrabriš, saslušаш moje brige i pomogneš mi da prevladam sve izazove. Tvoja podrška i motivacija bili su mi od neizmjerne važnosti.

I na kraju, hvala Ti Bože na svemu. Tvoja prisutnost i vodstvo su me nadahnuli, hrabрили i davali mi snagu da idem naprijed.

Ovaj diplomski rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu akademske godine 2022./2023. pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović.

SAŽETAK

Posljednjih nekoliko desetljeća farmaceutski aktivni spojevi smatrani su zagađivalima u nastajanju zbog njihovog kontinuiranog otpuštanja i postojanosti u vodenom okolišu čak i pri niskim koncentracijama. No sve veći broj istraživačkih članaka potvrđuje njihovu prisutnost analiziranjem različitih dotoka iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, bolničkih otpadnih voda i površinskih voda diljem svijeta. Rastuća zabrinutost u vezi s farmaceuticima, koji pokazuju veliki otpor prema konvencionalnim metodama uklanjanja, potaknula je opsežna istraživanja na području njihove učinkovite sanacije.

Ovaj istraživački rad pruža procjenu heterogenog fotokatalitičkog procesa za uklanjanje farmaceutika torasemida kao potencijalne metode za primjenu prilikom pročišćavanja zagađenih vodenih sustava, uz primjenu fotokatalizatora na bazi TiO_2 . Kako bi potvrdili prikladnost analitičke metode za određivanje torasemida u vodi provedena je njena validacija koja se sveukupno pokazala zadovoljavajućom. Provedeni su i preliminarni eksperimenti hidrolize, adsorpcije i fotolize koji nemaju značajan utjecaj na razgradnju te se oslanjamo isključivo na fotokatalizu.

Nakon toga ispitani su utjecaji pH vrijednosti i početne koncentracije farmaceutika pri čemu su određeni i optimalni uvjeti za razgradnju, a to su pH 4 i 5 mg/L. Provedeno je ispitivanje utjecaja „hvatača“ reaktivnih čestica pri čemu se pokazalo kako $\bullet\text{OH}$ radikali imaju najveću ulogu u razgradnji. Prilikom promatranja razgradnje smjese farmaceutika, imatiniba i torasemida, zaključilo se kako se povećanjem koncentracije smjese smanjuje brzina razgradnje što je posljedica zasićenosti površine fotokatalizatora. Razni ioni prisutni u matici vode također pokazuju velik utjecaj na fotokatalizu farmaceutika od kojih kompleksne huminske kiseline najviše usporavaju razgradnju. U konačnici primjenom realne otpadne vode fotokatalitički proces se najviše usporio zbog prisutnosti raznih onečišćenja.

Analizom otopine torasemida nakon fotokatalitičke razgradnje pri optimalnim uvjetima utvrđeno je 7 različitih transformacijskih produkata koji su potencijalno štetniji od primarnog farmaceutika i tijekom eksperimenta moguće usporili razgradnju torasemida natjecanjem za vezno mjesto na fotokatalizatoru.

Ključne riječi: zagađivala, vodeni okoliš, napredni oksidacijski procesi, heterogena fotokataliza, TiO_2 , torasemid, radikali

SUMMARY

Photocatalytic decomposition of torasemide with immobilised TiO₂

In recent decades, pharmaceutical agents have been considered as emerging pollutants due to their continuous release and persistence in the aquatic environment, even at low concentrations. However, a growing number of research articles confirm their presence through the analysis of various influents from wastewater treatment plants, hospital effluents, and surface waters worldwide. Increasing concern about pharmaceuticals that exhibit significant resistance to conventional removal methods has led to extensive research in the area of their effective remediation.

This research provides an evaluation of the heterogeneous photocatalytic process for the removal of the pharmaceutical torasemide as a potential method for application in the cleanup of polluted water systems using a TiO₂-based photocatalyst. To verify the suitability of the method, its validation was carried out, which proved to be satisfactory overall. Preliminary experiments on hydrolysis, adsorption and photolysis were performed, which showed no significant effect on degradation, thus relying solely on photocatalysis.

Subsequently, the influences of pH and initial pharmaceutical concentration were investigated, and optimal degradation conditions were determined to be pH 4 and 5 mg/L. An investigation of the effects of scavengers of reactive particles revealed that •OH radicals played the most important role in degradation. Observing the degradation of a pharmaceutical mixture, imatinib and torasemide, it was found that increasing the mixture concentration decreased the degradation rate due to saturation of the catalyst surface. Various ions present in the water matrix also exert a significant influence on pharmaceutical photocatalysis, with complex humic acids inhibiting degradation the most.

Finally, when real wastewater was used, the photocatalytic process was significantly slowed down by the presence of various impurities. Analysis of the torasemide solution after photocatalytic degradation under optimal conditions revealed seven different transformation products that are potentially more harmful than the primary pharmaceutical compound and further hinder torasemide degradation as they compete for binding sites on the photocatalyst.

Key words: pollutants, aquatic environment, advanced oxidation processes, heterogeneous photocatalysis, TiO₂, torasemide, radicals

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	4
2.1. Farmaceutski spojevi – primarna zagađivala	5
2.1.1. Izvori zagađenja farmaceuticima.....	7
2.1.2. Razine zagađenja.....	10
2.1.2.1. Geografska rasprostranjenost.....	11
2.1.2.2. Utjecaj pandemije	12
2.1.3. Ekotoksikološki rizici.....	13
2.2. Uklanjanje farmaceutika iz vodenog okoliša	15
2.2.1. Napredni oksidacijski procesi	16
2.2.1.1. Fotokatalitički procesi.....	20
2.2.1.1.1. TiO ₂ /UV.....	22
2.2.1.1.2. Kinetika heterogene fotokatalize (Langmuir–Hinshelwood)	23
2.3. Analitički pristup za određivanje farmaceutika.....	26
2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	26
2.3.2. Spektrometrija masa	28
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	30
3.1. Materijali	31
3.1.1. Korištene kemikalije	31
3.1.2. Torasemid.....	31
3.1.3. Staklena mrežica s imobiliziranim TiO ₂	32
3.2. Instrumenti	33
3.2.1. Analitička vaga.....	33
3.2.2. Ultrazvučna kupelj	34
3.2.3. pH metar.....	34

3.2.4.	Fotokatalitički reaktor	35
3.2.5.	Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC).....	36
3.2.6.	Vakuum filtracija.....	37
3.3.	Opis rada	39
3.3.1.	Priprema radnih otopina torasemida	39
3.3.2.	Ispitivanje fotokatalitičke razgradnje	41
3.3.3.	Analiza uzoraka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti	42
3.3.4.	Određivanje razgradnih produkata UPLC-MS ² metodom	43
4.	REZULTATI I RASPRAVA	44
4.1.	Razvoj metode (validacija).....	45
4.2.	Preliminarni eksperimenti	47
4.3.	Fotokataliza	49
4.3.1.	Utjecaj pH i koncentracije otopine farmaceutika	50
4.3.2.	Mehanizam fotokatalize („scavenger study“)	54
4.3.3.	Utjecaj imatiniba (smjesa farmaceutika)	57
4.3.4.	Utjecaj matice vode	59
4.3.4.1.	Utjecaj smjese iona i primjena realne vode	67
4.3.5.	Transformacijski produkti	69
5.	ZAKLJUČAK	80
6.	POPIS SIMBOLA	83
7.	LITERATURA.....	85
8.	ŽIVOTOPIS	93

1. *UVOD*

Posljednjih desetljeća pročišćavanje otpadnih voda postalo je važno pitanje za međunarodnu zajednicu zbog svojih implikacija na gospodarstvo, okoliš i zdravlje ljudi. Različite vlade usvojile su različite propise za pročišćavanje otpadnih voda. Većina ovih propisa usredotočena je na tradicionalna ograničenja otpadnih voda kao što su biokemijska potrošnja kisika (BPK5), ukupne suspendirane krute tvari (TSS), kemijska potrošnja kisika (COD), hranjive tvari (fosfor i dušik), itd. Međutim, drugi potencijalno toksični spojevi sve više su prisutni u otpadnim vodama. Posljednjih godina otkriven je velik broj različitih farmaceutskih proizvoda u različitim koncentracijskim razinama u vodenom okolišu, od podzemnih i površinskih voda do izvora pitke vode. Ovo pitanje izaziva zabrinutost zbog potencijalnih rizika za život u vodi i ljudsko društvo budući da farmaceutski aktivne komponente izazivaju biološki učinak već pri niskim koncentracijama. Osim toga, farmaceutici u vodenom mediju izloženi su mogućim biotičkim i abiotičkim transformacijama stvarajući transformacijske produkte, koji su možda postojaniji i toksičniji od matičnog spoja, a do sada je potvrđeno da i oni mogu imati znatan utjecaj na okoliš. Stoga kontinuirano ispuštanje farmaceutika u vodeni okoliš iz gradskih postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda može ozbiljno utjecati na vodeni ekosustav.

S druge strane, prisutnost takvih zagađivala u vodnom mediju, zajedno s mnogim objavljenim istraživačkim radovima o načinima njihova tretiranja i uklanjanja jasno pokazuju slabu učinkovitost konvencionalnih procesa pročišćavanja otpadnih voda i procesa proizvodnje pitke vode u uklanjanju širokog spektra farmaceutski aktivnih spojeva. Stoga je potrebna dodatna obrada kako bi se kontroliralo ispuštanje farmaceutika i drugih zagađivala u vodeni okoliš. Štoviše, postoji sve veća potražnja za ponovnom uporabom vode za različite svrhe, kao što su poljoprivredno navodnjavanje, industrijski procesi, urbane usluge, itd. Ponovna uporaba biološki pročišćenih otpadnih voda zahtijeva tercijarno pročišćavanje, što uvelike ovisi o namjeni korištenja. Državne regulative prvenstveno su uvedene s ciljem izbjegavanja prisutnosti patogena, opasnih tvari i osiguravanja biološke i kemijske sigurnosti za korisnika. Međutim, rijetko postoje regulative vezane za ograničavanje prisutnosti farmaceutskih spojeva i rješavanja ovog specifičnog problema.

Od spomenutih tercijarnih metoda pročišćavanja, napredni oksidacijski procesi (AOP)¹ prihvaćeni su kao valjana alternativa za transformaciju i dekontaminaciju ovih topljivih zagađivala. AOP se oslanja na stvaranje visoko reaktivnog •OH radikala kao glavne oksidativne

¹ eng. *Advanced Oxidation Process*, AOP

vrste za potencijalno uklanjanje i pretvaranje organskih zagađivala u bezopasne tvari. Heterogena fotokataliza, koja primjenjuje TiO_2 kao katalizator, pojavila se kao obećavajući proces među različitim AOP-ima za uklanjanje farmaceutika iz vode.

U ovom radu ispitat će se utjecaj različitih parametara, konkretno utjecaj pH i koncentracije farmaceutika, mehanizam fotokatalize pri optimalnim uvjetima (utjecaj tzv. „hvatača radikala“²), utjecaj drugog farmaceutika imatiniba i utjecaj matice vode na fotokatalitičku razgradnju farmaceutika torasemida u vodenom mediju, uz TiO_2 imobiliziran na mrežicu kao fotokatalizator.

² eng. *Scavenger*

2. *TEORIJSKI DIO*

2.1. Farmaceutski spojevi – primarna zagađivala

Farmaceutski spojevi su kemijske tvari koje se koriste za liječenje, prevenciju ili dijagnozu bolesti te iz tih razloga imaju značajnu ulogu u osiguranju zdravlja i kvalitete života stanovništva. [1, 2] Ovi spojevi sadrže aktivne sastojke prirodnog ili sintetskog podrijetla s različitim terapijskim potencijalima, kao što su antibiotici, analgetici, antidijabetici, antihipertenzivi, antitumorski lijekovi, imunosupresivi i mnogi drugi. Predviđa se da će svjetsko farmaceutsko tržište dosegnuti približno 2135 milijardi dolara u 2026. godini od proizvodnje farmaceutika. Zajedno s povećanjem stanovništva istodobno se povećala i upotreba farmaceutskih spojeva. Njihovo značenje u suvremenom životu ne može se podcijeniti, ali moramo biti svjesni da njihovo korištenje i odlaganje uzrokuje enormno zagađenje okoliša. [2]

Moderna medicina neodrživa je bez lijekova te su upravo farmaceutici ključni elementi moderne medicine koji daju značajnu korist društvu. Više od 3000 aktivnih farmaceutskih supstanci primjenjuje se svakodnevno diljem svijeta u lijekovima na recept, terapijskim lijekovima bez recepta i veterinarskim lijekovima. [3, 4] Njihove aktivne komponente sastoje se od raznih sintetičkih kemikalija koje proizvode farmaceutske tvrtke u industrijaliziranim zemljama te zemljama u razvoju i to u količini od 100 000 tona godišnje (WHO 2014). [5] Iako su farmaceutski proizvodi strogo regulirani u pogledu učinkovitosti i sigurnosti pacijenata, štetne nuspojave koje mogu imati u prirodnom okruženju još nisu dovoljno proučene i nisu obuhvaćene međunarodnim sporazumom ili regulativom. Rastuća svjetska populacija, ulaganja u zdravstveni sektor, napredak u istraživanju i razvoju, velika dostupnost globalnog tržišta i starenje društva u industrijaliziranim zemljama doveli su do snažnog porasta farmaceutske potrošnje u posljednjim desetljećima. [3, 6] U isto vrijeme, laboratorijski instrumenti i analitičke metode dodatno su napredovali, omogućujući detekciju određenih farmaceutskih tvari u vodenom i kopnenom okolišu u rasponu od pg/L do µg/L. Rezultat toga je i porast znanstvenih publikacija od kasnih 1990-ih. Usporedno s pratećim istraživanjima, ekotoksikološki učinci farmaceutskih tvari u okolišu na neciljane organizme dokazani su u sve većem broju laboratorija. [3]

Prvo izvješće o pojavi lijekova u riječnim vodama objavljeno je 1970. godine. Od tada se provode rigorozna istraživanja posvećena praćenju lijekova u vodenom okolišu. Glavni fokus „monitoringa“ okoliša bio je usmjeren na praćenje farmaceutskih proizvoda (glavnih lijekova) u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda i riječnih voda. Pojava farmaceutskih proizvoda

kao organskih zagađivala u morskoj vodi otkrivena je tek početkom 2000-ih. Znanstvena istraživanja o pojavi lijekova u oceanima, koji su poznati kao jedan od glavnih izvora zagađivala, postala su sve češća, stoga ne čudi velika dostupnost istraživačkih članaka koji izvješćuju o zagađenju morske vode. Fokus objavljenih znanstvenih članaka bio je usmjeren na specifične lijekove kao što su pojava farmaceutika diklofenaka u morskom okolišu i kontaminacija odabranih područja morske vode kao što su Sredozemno more i Arktičko okruženje. [7]

Tijekom proteklog desetljeća Europska komisija financirala je oko 15 projekata na temu prisutnosti lijekova u okolišu. Rezultati ovih projekata stvorili su sve veću količinu otvorene znanstvene literature i povećali svijest javnosti, a Europska agencija za okoliš (EEA)³ konačno je priznala da su lijekovi sve veći ekološki problem. Jedno od njihovih ključnih otkrića bilo je da "definitivno postoji potreba za promatranjem utjecaja kroz cijeli životni ciklus lijeka". Naknadno je Europska komisija prepoznala da je zagađenje okoliša farmaceuticima novi problem te je prema direktivi 2008/105/EC dala smjernice za dopuštene i prihvatljive koncentracije 33 kemijska spoja, uključujući ibuprofen, ciprofloksacin, kofein, bisfenol A, mekoprop, kao i mnoge druge, u vodenom okolišu. [8]

Danas mnoge visokorazvijene zemlje, uključujući EU, daju strožu politiku u vezi kemijskih zagađivala, a većina tih politika temelji se na riziku koji predstavljaju za živi svijet (*Science for Environment Policy*, 2015.). Sukladno tome, velik broj farmaceutika dodano je na „Popis praćenja“⁴ površinskih voda koje treba pratiti i potencijalno uključiti u prioritetni popis zagađivala Okvirne direktive o vodama⁵ Europske unije. Zbog kontinuiranog razvoja novih kemijskih proizvoda, razine kontrole i opsega kemijskih propisa za zaštitu zdravlja ljudi i okoliša globalno se jačaju i proširuju. Međutim, čak i pod tako strogim propisima, trenutna procjena rizika još uvijek je više usmjerena na pojedinačne tvari nego na kemijske smjese. Razlog je lako otkriti iz činjenice da se, primjerice, u EU godišnje testira do 300 novih kemikalija. Stoga je praktički nemoguće ispitati štetne učinke za sve moguće mješavine/kombinacije tako velikog broja novih potencijalnih zagađivala. Nažalost, organizmi u zagađenim vodenim sustavima obično su izloženi mješavinama kemijskih spojeva, a ne pojedinačnim spojevima. Takve mješavine mogu proizvesti čak veću toksičnost od pojedinačnih spojeva (sinergijsko djelovanje). [6]

³ eng. *European Environment Agency*, EEA

⁴ eng. *Watch List*

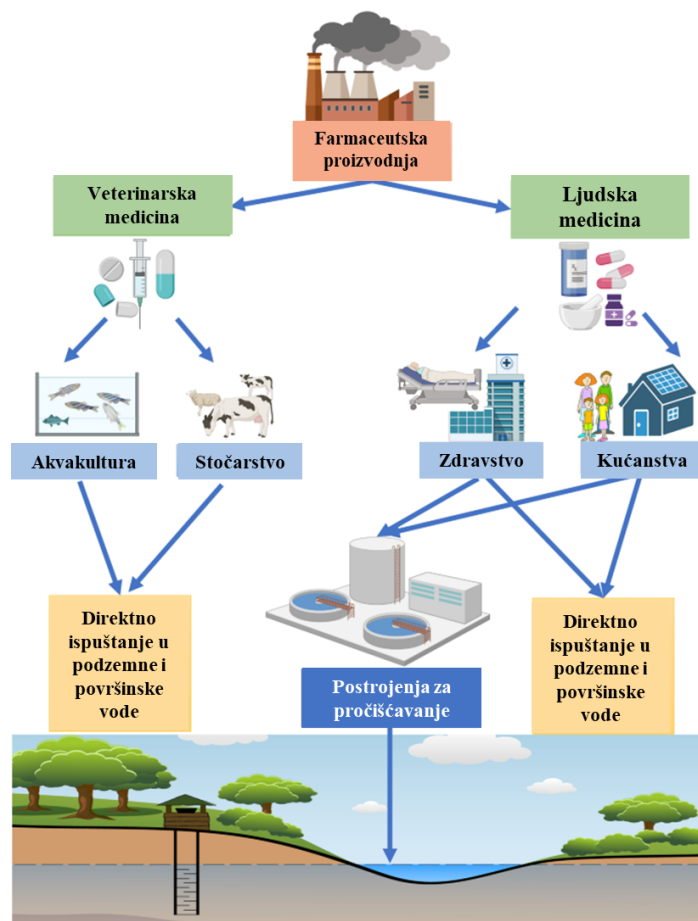
⁵ eng. *Water Framework Directive*, WFD

Poseban problem koji proizlazi iz prisutnosti lijekova u okolišu povezan je s produktima razgradnje ili metabolitima tih tvari. Mnogi farmaceutici transformiraju se u nove produkte, pod utjecajem Sunčevog svjetla ili prilikom kemijske obrade otpadnih voda, o kojima znanost vrlo malo zna, a nastali metaboliti mogu biti toksičniji od primarnih spojeva. Na primjer, analgetik paracetamol prilikom kloriranja vode transformira se u benzokinon za koji se smatra da je stotinjak puta štetniji za ekosustav. Također je zabrinjavajuća njihova otpornost prema biorazgradnji, čime se dulje zadržavaju u okolišu. Nažalost, nastali metaboliti često se ne uzimaju u obzir prilikom procjene ekološkog rizika od farmaceutskih proizvoda. Regulatornim agencijama odgovornim za odobravanje farmaceutskih proizvoda, poput Hrvatske agencije za lijekove i medicinske proizvode (HALMED), nedostaju kako znanje tako i informacije o štetnim učincima razgradnih produkata lijekova. Čak ni Europskom direktivom 2004/27/EC, koja regulira lijekove na tržištu, nisu obuhvaćeni ekotoksični učinci metabolita.[9]

U većini slučajeva razine koncentracije lijekova u okolišu ne smatraju se pogubnima za ljude i, sukladno tome, njihovo se određivanje vrlo često provodi samo zbog regulatornih zahtjeva. Unatoč tome, mnogi od tih spojeva, iako prisutni u vrlo niskim koncentracijama, potencijalno mogu proizvesti kumulativne štetne učinke (kronične učinke), što znači da se stvarni rizik krije u dugotrajnoj izloženosti. Provedbom pravila i propisa te pravilnim postupcima zbrinjavanja farmaceutskog otpada možemo utjecati na smanjenje zagađenja uzrokovanog farmaceutskim spojevima. [2, 5]

2.1.1. Izvori zagađenja farmaceuticima

Kako bi se ispuštanje lijekova u okoliš svelo na najmanju moguću razinu, potrebno je analizirati izvore iz kojih potječu (Slika 1.). Lijekovi u okoliš dospijevaju prije svega kroz njihovu uporabu - putevi su različiti ovisno o tome koriste li se u ljudskoj ili veterinarskoj medicini. Metode obrade otpadnih voda međusobno se razlikuju u pogledu njihove sposobnosti za uklanjanje farmaceutskih ostataka, što ovisi o vrsti tvari koja se želi eliminirati i stupnju pročišćavanja. U nekim situacijama značajne količine mogu biti uklonjene, dok u drugima može biti uklonjen samo mali postotak. Međutim, čak ni najbolje, najskuplje i najmodernije metode pročišćavanja nisu potpuno djelotvorne. [10]



Slika 1. Najveći izvori onečišćenja vodenog okoliša farmaceuticima [11]

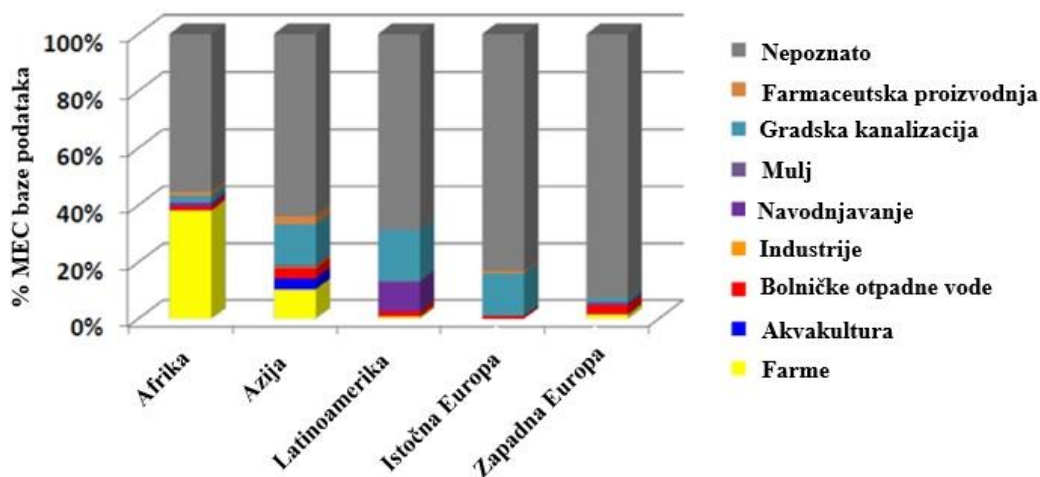
Izvori farmaceutskih proizvoda općenito se mogu kategorizirati u dvije skupine [12]:

1. točkasti koji uključuju izvore kanalizacije, kućni kruti otpad, otpadne vode industrijskog sektora povezane s farmaceutskom proizvodnjom te biomedicinski otpad,
2. difuzni koji uključuju poljoprivredno otjecanje, gradsko otjecanje i curenje iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (WWTP)⁶.

Prema istraživanju [3] iz 2016. na temelju 150 prikupljenih i analiziranih znanstvenih osvrta iz različitih dijelova svijeta utvrđeno je da su gradske otpadne vode dominantan izvor ove vrste zagađivala (Slika 2.). Obzirom da se većina farmaceutskih proizvoda koristi kod kuće te da 54% svjetske populacije živi u urbanim područjima, rezultati se mogu smatrati vjerodostojnima. Drugi najčešće izvori ispuštanja su bolnice. Ovdje se u kanalizacijskom ispustu može naći mnoštvo različitih lijekova, koji su često prisutni u visokim koncentracijama. Većina bolnica ne pročišćava otpadne vode već su te vode povezane na gradske kanalizacijske sustave.

⁶ eng. *Wastewater Treatment Plants*, WWTP

Međutim, gradska postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda nisu projektirana za uklanjanje lijekova, što je posljedica toga što se lijekovi ne smatraju homogenom skupinom kemikalija, budući da njihovi koeficijenti sorpcije, kinetika transformacije i vrijeme poluraspada uvelike variraju između različitih farmaceutskih tvari. Stoga lijekovi iz bolničke kanalizacije lako dopijevaju u rijeke i jezera, ponekad i u visokim koncentracijama (primjer su kontrastna sredstva za rendgensko zračenje koja su dizajnirana kao stabilni kemijski spojevi). Treći najčešće izvori farmaceutika u okolišu su životinjske farme. Ovdje se veterinarski lijekovi koriste za liječenje ili prevenciju bolesti kod životinja. Putem urina i fekalija sve preostale farmaceutske tvari i produkti transformacije dopijevaju u tlo, odvodne kanale, podzemne vode i konačno u otvorene vodene površine, poput rijeka i jezera. Daljnji važni izvori emisije farmaceutika u okoliš, koji se ne smiju zanemariti jer mogu uzrokovati lokalno povećanje koncentracije lijekova u okolišu, su proizvodnja farmaceutika, akvakultura te navodnjavanje obradivih površina otpadnom vodom. Proizvodnja lijekova posebno može uzrokovati visoke koncentracije na razini mg/L u rijekama u blizini proizvodnih pogona. [3] Izvori zagađenja lijekovima pojedinih svjetskih područja na temelju istraživanja [3] u postocima prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Izvori onečišćenja farmaceuticima na globalnoj razini prema MEC⁷ bazi podataka [3]

Iz istog istraživanja na temelju proučavanja znanstvenih publikacija objavljenih na području Istočne Europe, među zemljama poput Slovačke, Slovenije, Mađarske, Srbije, Bugarske, Rumunjske, Ukrajine i Rusije, utvrđeno je da su upravo u hrvatskim otpadnim vodama u blizini

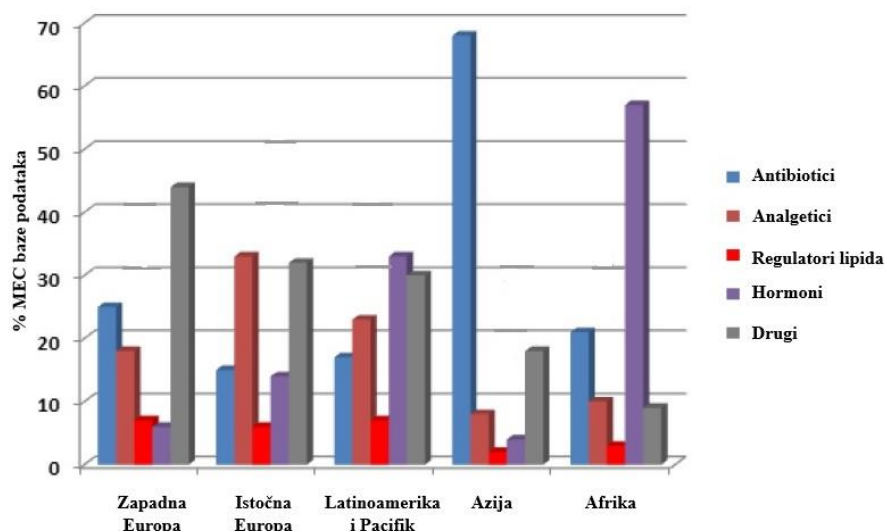
⁷ eng. *Measured Environmental Concentration*, MEC

lokaliteta za proizvodnju lijekova, detektirane najviše koncentracije farmaceutika, konkretno 28,5 mg/L febantela, 27,7 mg/L trimetoprima, 17,5 mg/L ciprofloksacina, 13,6 mg/L deksametazona i 9 mg/L sulfametoksazola. [3, 13] Naravno, zbog različite količine unosa u MEC bazu podataka za svaku regiju Istočne Europe ne preporuča se izravno uspoređivanje.

2.1.2. Razine zagađenja

Koncentracija farmaceutski aktivnih spojeva (PhAC)⁸, u vodenom okolišu ovisi o obrascima potrošnje lijekova, stupnju društveno-ekonomskog razvoja, načinu života stanovništva, klimatskim uvjetima i tehnologijama uklanjanja. Terapijske skupine koje su prema literaturi najviše otkrivene u vodenom okolišu su antibiotici, zatim analgetici, hormoni, regulatori lipida, protuupalni lijekovi, psihotici i dr. (Slika 3.). Karbamazepin, ibuprofen, naproksen, diklofenak, sulfametoksazol, tetraciklin, trimetoprim bile su najčešće zabilježene aktivne komponente u vodenim matricama među istraženim studijama. [1, 3] Antibiotici i protuupalni lijekovi zabrinjavaju zbog visoke i rastuće potrošnje u svijetu. Poznato je da postoji odnos između stope potrošnje i prisutnosti PhAC u okolišu. Ti su spojevi otkriveni u pročišćenoj otpadnoj vodi, pa čak i u pitkoj vodi na raznim lokacijama diljem svijeta, što ukazuje da nisu potpuno uklonjeni u vodi i prilikom pročišćavanja otpadnih voda. Nadalje, postoji zabrinutost oko prisutnosti antibiotika u okolišu čak i u niskim koncentracijama budući da ti spojevi mogu povećati otpornost među prirodnim populacijama bakterija, što može imati negativan učinak na javno zdravlje. Otpornost bakterija može se postići horizontalnim prijenosom gena ili mutacijom. Ova sposobnost bakterija da razviju toleranciju na određene antibiotike čini liječenje zaraznih bolesti težim i često skupljim. [1, 6]

⁸ eng. *Pharmaceutically Active Compounds, PhAC*



Slika 3. Distribucija terapijskih skupina unutar MEC baze podataka prema svjetskim regijama [3]

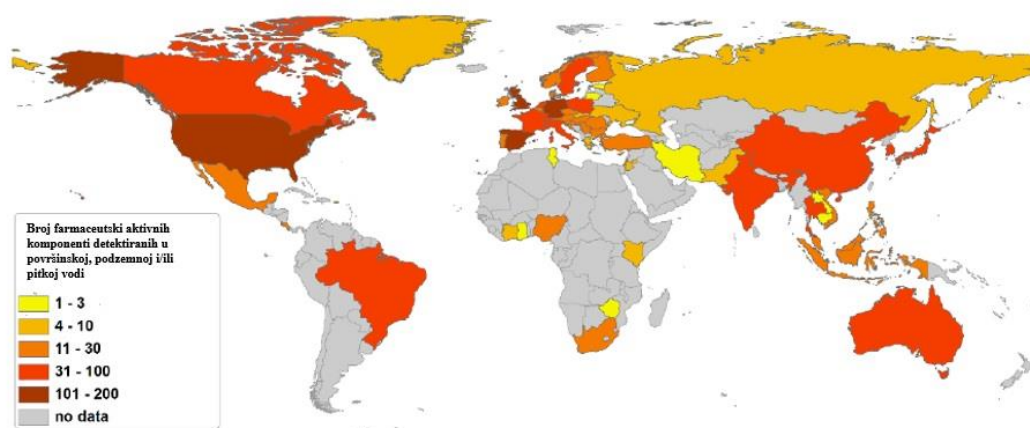
Sezonska pojava PhAC u vodenom okolišu ukazuje na to da u nekim slučajevima njihove koncentracije variraju tijekom godišnjih doba. Zbog obrazaca potrošnje, učinka razrjeđivanja i temperature vode uočeno je da su u otpadnoj vodi analgetici i protuupalni lijekovi predstavljali veće koncentracije ljeti i u jesen, dok su antibioticima bile veće koncentracije zimi. Čini se da se veće koncentracije farmaceutika u površinskim vodama mogu pojaviti u hladnijim godišnjim dobima, kako zbog veće potrošnje nekih lijekova, tako i zbog manjeg uklanjanja u postrojenjima za pročišćavanje u tim razdobljima godine. To ukazuje da utjecaj godišnjeg doba na koncentraciju PhAC ovisi o nekoliko čimbenika i varijabli, što još nije u potpunosti proučeno. Temperatura je važan parametar koji utječe na procese biorazgradnje i sorpcije, stoga može utjecati i na koncentraciju PhAC u okolišu. Pri nižim temperaturama može se povećati sorpcija nekih spojeva, dok se biorazgradnja smanjuje što može utjecati i na postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda i na prirodne procese koji se odvijaju u površinskim vodama. [1]

2.1.2.1. Geografska rasprostranjenost

PhAC se pojavljuju u različitim geografskim regijama diljem svijeta (Slika 4.). Na primjer, antibiotici, nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID)⁹, i antidepresivi često su kvantificirani u vodenom okolišu Afrike i Europske unije (EU). U Latinskoj Americi najveći broj otkrivenih

⁹ eng. *Non-steroidal Anti-inflammatory Drugs*, NSAID

lijekova u površinskim vodama, otpadnim vodama i pročišćenim otpadnim vodama bili su NSAID, sintetski hormoni, psihijatrijski lijekovi, β -blokatori i antibiotici. U zemljopisnim regijama Azije, EU i Sjeverne Amerike, lijekovi kao što su antibiotici, NSAID, regulatori lipida, β -blokatori, antiepileptici, hormoni i stimulansi identificirani su s najvećim udjelom u dotoku, pročišćenom efluentu i mulju iz WWTP. U površinskim vodama Kine, glavni kvantificirani spojevi bili su antibiotici, antipsihotici, kardiovaskularni agensi, NSAID, lijekovi za hipertenziju, regulatori lipida i antifungici. Iz navedenog se može zaključiti kako su antibiotici i NSAID najzastupljenije terapijske skupine u otpadnim vodama postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda te u vodenom okolišu diljem svijeta. [14]



Slika 4. Broj farmaceutika otkrivenih u površinskim, podzemnim vodama, vodi iz slavine i/ili vodi za piće na svjetskoj razini prema objavljenim znanstvenim radovima [3]

2.1.2.2. Utjecaj pandemije

Intenziviranje medicinske skrbi, posebno u razdoblju pandemije, također je dovelo do drastičnog porasta prisutnosti PhAC u okolišu. Najčešće zabilježene skupine su antivirusni lijekovi, antibiotici, antiparazitici, antiprotozoe, β -blokatori, anestetici, nesteroidni protuupalni i antitumorski lijekovi, kontrastna sredstava za X-zrake i glukokortikoidi, među mnogim drugim. [2, 15] Glavni izvor ulaska ovih spojeva u okoliš je kroz vodeni ciklus budući da se u ljudskom tijelu ne troše u potpunosti već se izlučuju iz njega što rezultira njihovim pojavljivanjem u vodi. Općenito, literatura izvještava da se nekoliko farmaceutskih spojeva može otkriti u slatkim i otpadnim vodama koje potječu iz bolnica, urbanih područja, otpadnih

voda postrojenja za obradu i farmaceutske industrije. Istraživanje iz 2012. [16] izvještava o pojavi 22 farmaceutskih spojeva u otpadnim vodama postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda u Italiji, uključujući antibiotike sulfametoksazol, klaritromicin i azitromicin, itd. Među njima, diklofenak (533 - 800 ng/L) i hidroklorotiazid (520 ng/L) pokazali su prisutnost u visokim koncentracijama nakon čega slijede atenolol (264 ng/L) i sotalol (262 ng/L). Istraživanjem je istaknulo da su β -blokatori, protuupalni lijekovi, antibiotici, analgetici i antihipertenzivi bili među prvih pet skupina farmaceutskih spojeva otkrivenih u otpadnim vodama koje su pokazale visok kvocijent rizika za okoliš ($RQ > 1$).

Nekoliko istraživanja također je pokazalo vrlo visoke koncentracije antivirusnih lijekova, posebno tijekom razdoblja pandemije, u vodnom mediju. Lopinavir (730 ng/L), favipiravir (4231 ng/L), ribavirin (7402 ng/L) i remdesivir (319 ng/L), farmaceutici koji su se koristili tijekom pandemije COVID-19 infiltrirali su se u domaćinstva i otpadne vode te je objavljeno da pokazuju visoku ekotoksičnost. [2]

Uzimajući u obzir gore navedene studije i činjenicu da je pandemija ostavila trag u cijelom ekosustavu, obavezno je nastaviti praćenje i unaprijediti znanje o učincima primijenjenih ograničenja na društveni život i okoliš. Kontinuirano istraživanje karakteristika otpadne vode u dotoku i efluentu postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda, može predstavljati valjan alat za proučavanje. Točnije, praćenje kvalitete dotoka omogućuje procjenu opterećenja onečišćujućim tvarima koje stanovništvo ispušta u kanalizacijsku mrežu, što zauzvrat daje neizravne informacije o navikama, načinu života i zdravstvenom stanju ljudi. Sukladno tome, učinkovitost uređaja za pročišćavanje otpadnih voda, a time i kvaliteta otpadnih voda, osim o radnim parametrima postrojenja, ovisi o opterećenju dotoka. Stoga se također mogu procijeniti utjecaji promjena u navikama i načinu života ljudi na rezidualne koncentracije specifičnih zagađivala prisutnih u izlaznoj otpadnoj vodi, koja se može izliti u okoliš ili ponovno upotrijebiti za razne primjene. [15]

2.1.3. Ekotoksikološki rizici

Većina lijekova napravljena je kako bi djelovala pri nižim koncentracijama i dala biološki odgovor kod specifičnih organizama te da traju dovoljno dugo da se ostvari željeni učinak. Izloženost takvim lijekovima u razmjernim koncentracijama može predstavljati rizik ostalim nespecifičnim organizmima zbog njihove toksičnosti ili drugih štetnih karakteristika. [10, 13]

Istraživanja su dokumentirala direktni utjecaj određenih lijekova na divlje životinje čak i pri koncentracijama nižim od onih prisutnih u vodi i tlu. Na primjer, mužjaci riba koji su izloženi koncentracijama etinilestradiola (EE2) mogu razviti ženske karakteristike zbog utjecaja na endokrini sustav, što narušava njihovu reproduktivnu sposobnost i populaciju u cjelini. [8, 10] Druga istraživanja ukazuju da ribe izložene niskim koncentracijama određenih antidepresiva mijenjaju svoje ponašanje, što utječe na njihovu sposobnost preživljavanja. Diklofenak, lijek protiv bolova, pronađen je u ribama i vidrama. Prije nekoliko godina izazvao je zabrinutost zbog neočekivanog smrtonosnog utjecaja na supove u Aziji koji su bili izloženi lijeku hraneći se strvinama goveda, liječena ovim lijekom. Smatra se da je pad populacije kotrljana djelomično posljedica korištenja antiparazitskih lijekova, uključujući ivermektin, za stoku. Objavljene znanstvene literature koje dokumentiraju pad ribljih populacija u Sjevernoj Americi uslijed djelovanja sintetskih estrogena, nestanak ptica na indijskom potkontinentu zbog veterinarske upotrebe "Voltarena", te psihoaktivni poremećaji u jatima riba zbog tragova oksazepamata u vodi, potvrđuju da prisutnost lijekova u okolišu može izazvati ekološke katastrofe, budući da takvi učinci izravno utječu na cikluse hranjivih tvari. [9, 10] Primjeri nekih ekotoksikoloških učinaka na živa bića prikazani su u Tablici 1.

Tablica 1. Primjeri štetnih učinaka lijekova na neciljane organizme u laboratorijskim, terenskim i okolišnim promatranjima [3]

			
Lijek	Diklofenak	17 α -etinilestradiol	Ciprofloksacin
Skupina	Analgetik	Sintetski estrogen	Antibiotik
Nespecifični organizam	Sup (<i>Gyps bengalensis</i>)	Gavčica (<i>Pimephales promelas</i>)	Cijanobakterije (<i>Anabaena flos aquae</i>)
Efekt	Kolaps populacije zbog zatajenja bubrega	Kolaps populacije zbog feminizacije mužjaka riba	Inhibicija rasta
Vrsta istraživanja	Eksperiment na divljoj životinji	Eksperiment na cijelom jezeru	Laboratorij

Za potpuno razumijevanje i procjenu koncentracije određenih lijekova u okolišu i razinama rizika koje iz toga proizlaze, još uvijek su potrebna dodatna istraživanja i informacije. Lijekovi i njihovi metaboliti već utječu na žive organizme, i samo je pitanje vremena kada će slični učinci postati primjetni i u ljudskoj populaciji. [10]

2.2. Uklanjanje farmaceutika iz vodenog okoliša

Praćenje farmaceutskih tvari u vodnom okolišu omogućilo je njihovu detekciju u koncentracijskim razinama od ng/L do µg/L. Njihova prisutnost u podzemnim i površinskim vodama pripisuje se izravnom ispuštanju otpadnih voda iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda (WWTP) i raznih industrija (kao što su kemijska, rudarska, petrokemijska i farmaceutska) u vodeni okoliš. Općenito, komunalna postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda dizajnirana su za uklanjanje mnogih spojeva poput ugljika, fosfora, dušika i patogena. Takve konvencionalne metode uključuju fizikalno-kemijske i biološke metode. Fizikalne metode kao što su koagulacija, filtracija i sedimentacija odvajaju otpadni materijal od vode, ali ne razgrađuju zagađivala prisutna u vodi, budući da potpuna mineralizacija zagađivala nije moguća; također proces primarne obrade (npr. sedimentacija) pokazuje niske postotke uklanjanja jer je adsorpcija jedan od glavnih mehanizama uklanjanja farmaceutskih proizvoda u tim procesima. [14] Ostale fizikalne metode uključuju konvencionalnu obradu aktivnim muljem, CAS¹⁰, tretman aktivnim ugljenom i membransku filtraciju. Posljednja dva procesa pokazala su veću učinkovitost u uklanjanju lijekova nego CAS proces. Uklanjanje toksičnih nusproizvoda smatra se glavnom prednošću postupaka fizičkog tretmana, no s procesima je povezano nekoliko nedostataka kao što su odlaganje otpada, potrošnja energije, neugodan miris i problem adsorpcije. [17] Sekundarna obrada uključuje biološke procese koji imaju nisku do umjerenu učinkovitost uklanjanja, a organski otpad razgrađuje se pomoću bakterija. Uključuju i membranski bioreaktor, biofiltraciju, mikrobne i enzimske procese, ali zahtijevaju optimalne uvjete pH i prozračivanje kako bi mikrobi djelovali na zagađivalo. Biološki procesi manje su energetske zahtjevni i stvaraju manje ili nimalo nusprodukata, no nedostatak je što su ti procesi selektivni i proizvode toksične nusprodukte. Ove tradicionalne metode koje se koriste za tretiranje zagađivala imaju ograničenu učinkovitost, iako se do sada koriste za uklanjanje većine prisutnih zagađivala, no njihovo potpuno iskorjenjivanje nije se moglo postići zbog niske

¹⁰ eng. *Conventional Activated Sludge*, CAS

koncentracije i kemijske stabilnosti farmaceutskih tvari. [14, 18] Negativni učinci uklanjanja ove vrste zagađivala zabilježene su u nekoliko istraživačkih radova [19-21] gdje su koncentracije ili masena opterećenja veća u efluentu postrojenja za pročišćavanje nego u dotoku što pokazuje da pročišćavanje otpadnih voda može povećati dostupnost PhAC u okolišu. Uzrok navedenog su nesigurnost mjerenja, interferencije prisutne u uzorku, farmaceutski spojevi koji se oslobađaju iz adsorbirane faze ili stvaranje metabolita i transformacijskih produkata tijekom postupka pročišćavanja. Dakle, prilikom procjene PhAC u vodenim ekosustavima potrebno je uzeti u obzir ne samo matične lijekove, već i njihove metabolite i nusprodukte koji mogu nastati tijekom obrade otpadnih voda. [1] Potrebno je stoga pronaći ekološki prihvatljivu metodu koja učinkovito upravlja problemima koje predstavljaju ta zagađivala, a istraživanja upućuju na napredni proces oksidacije, kao jednu od potencijalnih kemijskih metoda koja pomaže u ozračivanju/oksidaciji ovih zagađivala. Dakle, napredna obrada se provodi kao prethodna obrada ili nakon sekundarne obrade kako bi se uklonila organska i toksična zagađivala prisutna u malim koncentracijama. [18]

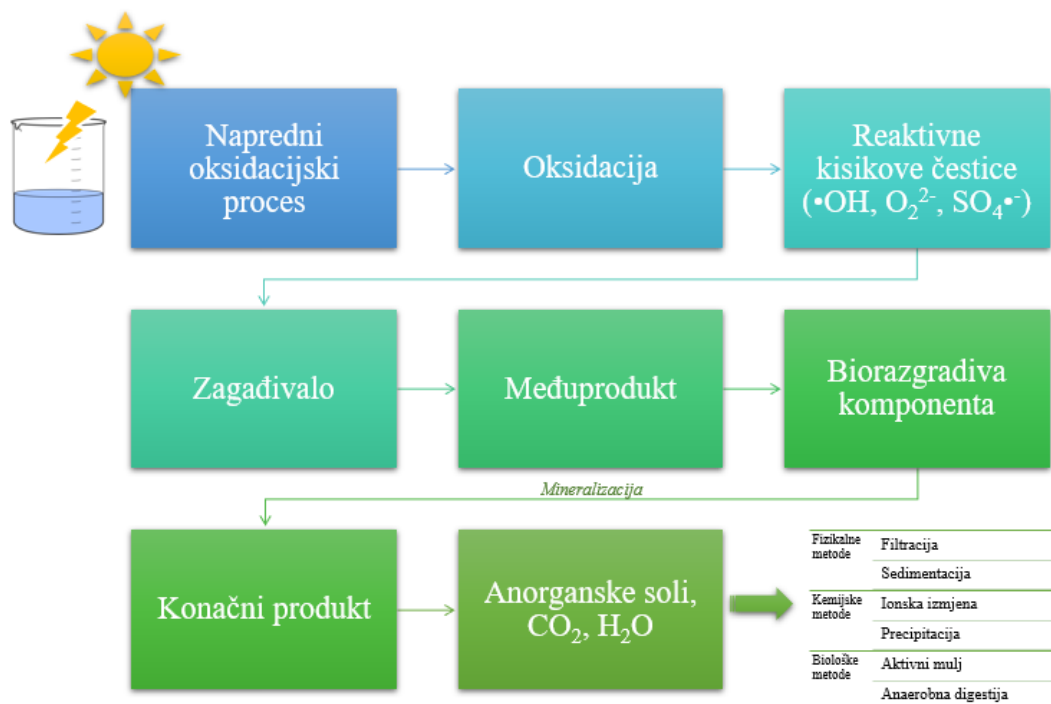
2.2.1. Napredni oksidacijski procesi

Napredni oksidacijski procesi, AOP¹¹ predloženi su kao tercijarni korak pročišćavanja otpadnih voda zbog njihove svestranosti i sposobnosti uklanjanja zagađivala za koje se zna da nisu biorazgrađiva ili imaju nisku biorazgrađivost, visoku postojanost i kemijsku stabilnost. AOP-i se smatraju ekološki prihvatljivim metodama i temelje se na fizikalno-kemijskim procesima koji potiču razgradnju, pojednostavljenje kemijske strukture organskih molekula i konačno mineralizaciju do konačnih bezopasnih produkata. [18, 22]

AOP djeluje u raznim koracima (Slika 5. prikazuje osnovni mehanizam AOP metode); u preliminarnom koraku reaktivne vrste kisika s visokim redukcijskim potencijalom nastaju u dovoljnim količinama putem reakcije oksidacije. Stvaranje oksidansa može biti ili kroz kemijske reakcije, ili korištenjem katalizatora ili primjenom energije (kao što je UV zračenje, električna energija i ultrazvuk). Tada nastali oksidans (kao što je •OH) reagira sa zagađivalima i stvara intermedijere. Reakcijska kemija za svaki radikal je drugačija, kao što reakcije hidroksilnog radikala (•OH) s organskim spojevima mogu nastati:

¹¹ eng. *Advanced Oxidation Process*, AOP

- (i) odvajanjem vodika iz C-H, N-H ili OH skupina
- (ii) kroz interakcije radikal-radikal, npr. dodavanjem molekularnog kisika (O_2) što dovodi do stvaranja peroksid radikala
- (iii) izravnim prijenosom elektrona koji daje oksidirane međuprodukte, dok u slučaju sulfatnog radikala dolazi do elektrofilnog prijenosa elektrona.



Slika 5. Mehanizam AOP [18]

Dakle, oksidansi se aktiviraju tijekom naprednog procesa oksidacije putem različitih izvora i korištenjem različitih oblika energije; ti oksidansi s visokim redukcijским potencijalom reduciraju i oksidiraju zagađivalo. To dovodi do razgradnje zagađivala u organske kiseline niske molekularne težine, koje oksidacijom stvaraju biorazgradive spojeve. Ti se biorazgradivi spojevi daljnjom oksidacijom potpuno mineraliziraju u CO_2 i H_2O te anorganske spojeve (uključujući reducirane reaktivne vrste kisika). Ovi se anorganski spojevi tretiraju konvencionalnim metodama obrade (kao što je navedeno na Slici 5.) i uklanjaju se iz medija te na kraju ostaju CO_2 i H_2O , što dovodi do potpune mineralizacije onečišćenog medija. [18]

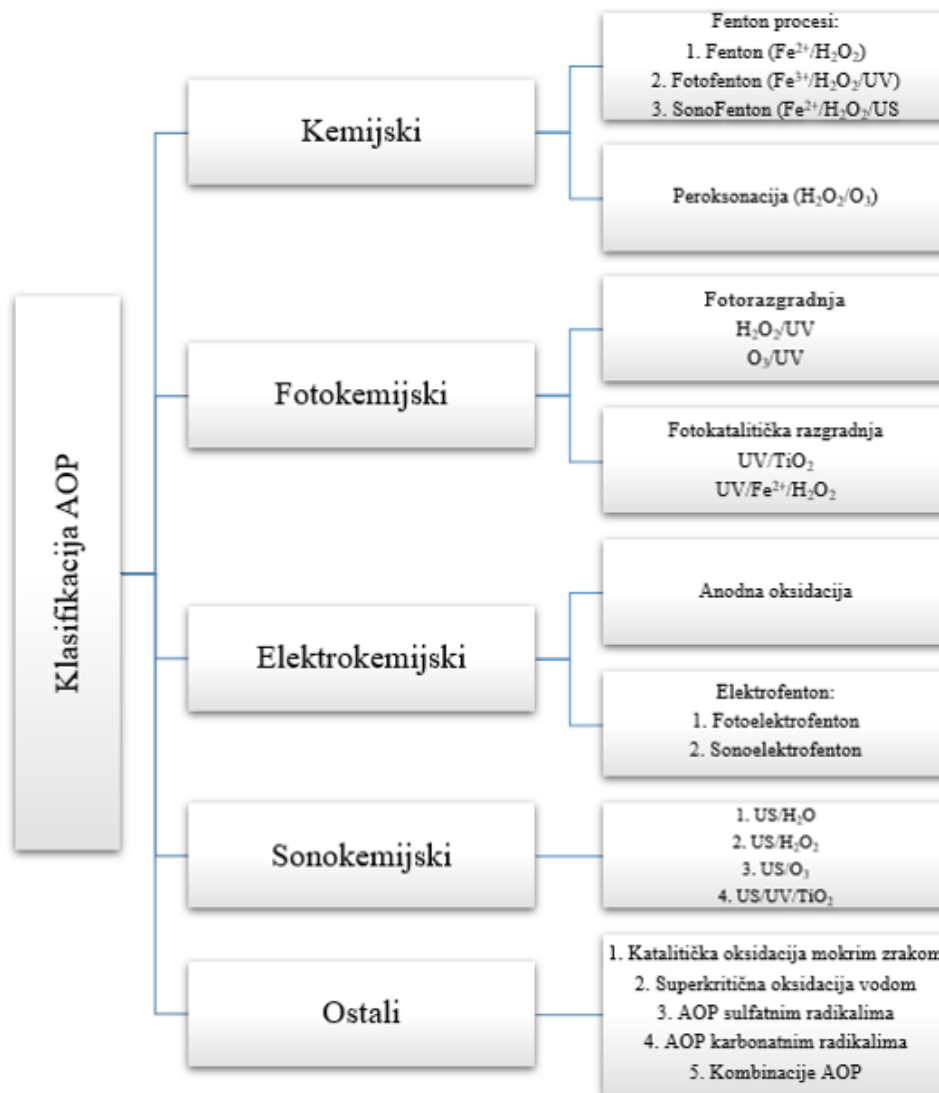
AOP-i se mogu klasificirati na temelju načina oksidacije, odnosno izvora stvaranja ROS čestica (Slika 6.). Oksidacija se može odvijati [18]:

- (a) Kemijskim procesom (upotrebom kemijskog reagensa i katalizatora)

(b) Fotokemijskim (upotrebom Sunčeve energije/UV izvora)

(c) Elektrokemijskim (upotrebom električnog izvora)

(d) Sonokemijskim (upotrebom ultrazvuka).



Slika 6. Klasifikacija AOP [18], [23]

Ozonizacija, Fenton i foto-Fenton oksidacija, fotoliza i H_2O_2 /fotoliza, heterogena fotokataliza i elektrokemijska oksidacija su najučestaliji AOP-i. [24] Među navedenim, čini se da je heterogena fotokataliza jedna od najatraktivnijih tehnologija zbog niza prednosti kao što su [25]:

1. razgradnja ostataka farmaceutika iz složenih spojeva u jednostavne i bezopasne tvari; ne proizvodi sekundarni mulj,
2. fotokatalizatori se mogu ponovno koristiti jer njihova fotokatalitička aktivnost ostaje gotovo nepromijenjena tijekom procesa obrade,
3. koncentracija fotokatalizatora koji se koriste za razgradnju ostataka farmaceutika u vodi izuzetno je niska zbog velike površine primijenjenog katalizatora na nano razini te snažne adsorpcije lijekova na njihovu površinu, i
4. heterogena fotokataliza je jeftina i učinkovita alternativna metoda za uklanjanje ostataka farmaceutika i pročišćavanje okoliša.

AOP, kako je prethodno navedeno, uključuju stvaranje reaktivnih kisikovih čestica (ROS)¹², tj. radikala koji imaju barem jedan nespareni elektron zaduženih za proces oksidacije. Primjer takvih čestica su hidroksilni ($\bullet\text{OH}$), superoksidni ($\text{O}_2\bullet^-$), peroksidni (O_2^{2-}), hidroperoksidni ($\text{HO}_2\bullet$) radikal, singletni kisik ($^1\text{O}_2$), alkoksilni ($\text{RO}\bullet$), sulfatni ($\text{SO}_4\bullet^-$), karbonatni (CO_3^-) i kloridni ($\text{Cl}\bullet$) radikali (ovisno o korištenom katalizatoru ili oksidansu), pri čemu je $\bullet\text{OH}$ privukao najviše pažnje. [18, 22] Ove vrste imaju visok redukcijski potencijal s neselektivnom prirodom i visokom brzinom reakcije, postižući potpunu mineralizaciju zagađivala u CO_2 , vodu i mineralne soli ili, pod odabranim uvjetima, pretvarajući ih u biorazgradive molekule. Tablica 2. daje redukcijske potencijale različitih oksidansa; redukcijski potencijal mjeri tendenciju određene kemijske vrste da se reducira i oksidira druge vrste.

Tablica 2. Redukcijski potencijali najčešćih oksidansa [18]

Oksidativne vrste	Redukcijski potencijal (E°/V)
Fluor	3,03
Hidroksilni radikal	2,80
Singletni kisik	2,42
Ozon	2,07
Vodikov peroksid	1,78
Hidroperoksidni radikal	1,70

¹² eng. *Reactive Oxygen Species*, ROS

Iz Tablice 2. možemo zaključiti da nakon fluora hidroksilni radikal ima najveći redukcijski potencijal u usporedbi s drugim ROS česticama, pa se najviše koristi u AOP-ima. [18, 24]

Osim visokog redukcijskog potencijala, hidroksilni radikal ($\bullet\text{OH}$) ima mnoge prednosti što ga čini jednim od najboljih reagensa koji sudjeluje u AOP-ima [18, 22]:

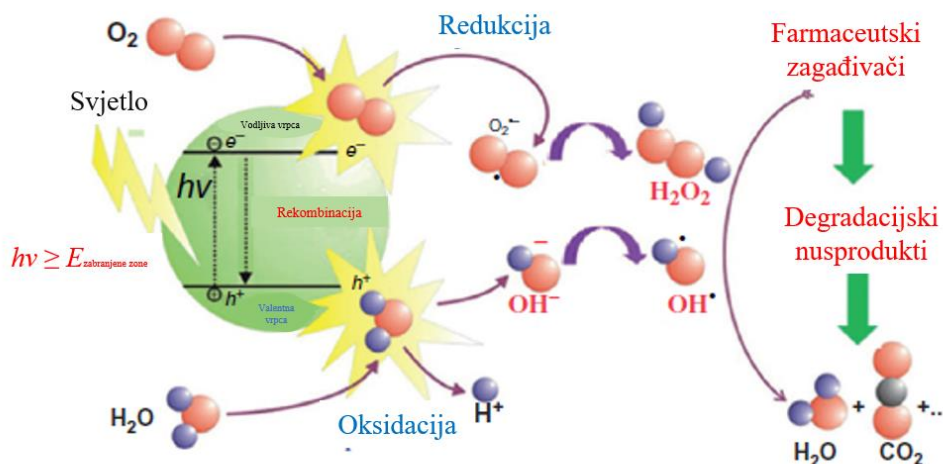
- ❖ Neselektivan je i može reagirati s gotovo svim organskim zagađivalima,
- ❖ Vrlo je reaktivan i ima konstante brzine reakcije reda $10^8 - 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, što ga čini bržim u usporedbi s konvencionalnim tehnikama,
- ❖ Može se lako generirati različitim metodama koje uključuju oksidanse kao što su vodikov peroksid, ozon ili katalizatori uključujući metalne ione i poluvodiče pod UV/Vis zračenjem ili drugim izvorima energije, što AOP čini svestranom tehnikom za različita zagađivala, i
- ❖ Bezopasan je i zeleni oksidans; u nekim slučajevima može potpuno oksidirati zagađivalo i rezultirati netoksičnim nusproduktima (što u konačnici ovisi o samom zagađivalu).

Ovisno o vrsti zagađivala, dostupnosti resursa i cijeni ukupnog procesa, određuje se vrsta AOP-a koja će se koristiti. [18] Predmet razmatranja u ovom eksperimentalnom radu je fotokatalitička razgradnja pomoću TiO_2 , stoga će ti procesi biti detaljnije opisani u nastavku.

2.2.1.1. Fotokatalitički procesi

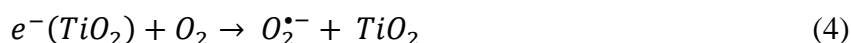
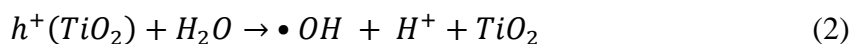
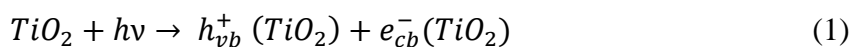
Fotokatalizom se Sunčeva energija može iskoristiti za oksidaciju ili smanjenje koncentracije zagađivala stimuliranjem ekscitacije, tj. prijenosa elektrona (e^-) u poluvodičkom fotokatalizatoru. Najvažniji čimbenik u ovom procesu je sam fotokatalizator koji Sunčevu energiju pretvara u kemijsku energiju i na taj način uništava zagađivala. Energija fotona koja je potrebna da bi došlo do ekscitacije elektrona u katalizatoru mora biti jednaka ili veća od energije zabranjene zone poluvodiča. Time energija postaje dovoljna da elektron promijeni elektronsku razinu, iz valentne u vodljivu vrpću, dok iza njega ostaje pozitivno nabijena elektronska šupljina (h^+) u valentnoj vrpći¹³. [18, 25] Mehanizam fotokatalize prikazan je na Slici 7.

¹³ eng. *valence band*, vb



Slika 7. Mogući mehanizam razgradnje farmaceutskih zagađivala fotokatalitičkim procesom [25]

Površina poluvodiča (npr. TiO_2) ozračena je UV svjetlom s energijom jednakom ili većom od energije zabranjene zone, dolazi do pobuđivanja elektrona iz valentne u vodljivu vrpcu¹⁴, što rezultira stvaranjem para *elektron-šupljina*, kako je vidljivo u jednadžbi (1). Pozitivno nabijena šupljina djeluje kao oksidans, koji ili izravno oksidira zagađivalo ili oksidira vodu da bi se stvorio hidroksilni radikal ($\text{HO}\cdot$) koji razgrađuje organska zagađivala (2, 3). S druge strane, elektron reducira kisik adsorbiran na fotokatalizatoru, nastaje superoksid ($\text{O}_2^{\cdot-}$) radikal koji se može disproporcionirati u vodikov peroksid kao odličan oksidans (4-6). Međutim, ova oksido-redukcijska reakcija ne odvija se istovremeno i stoga, zbog prisutnosti elektrona u vodljivoj vrpci, dolazi do rekombinacije elektrona i pozitivnih šupljina. [18, 25, 26]



¹⁴ eng. *conduction band*, cb

2.2.1.1.1. TiO_2/UV

Postoji veliki izbor fotokatalizatora koji su razvijeni i proučavani tijekom posljednjeg desetljeća, poput ZnO , ZrO_2 , SiO_2 , SnO_2 , CdS , ali najkorišteniji katalizator je još uvijek titanijev dioksid (TiO_2), te poznati *Degussa P25* (mješavina kristalnih faza anatasa/rutila = 70/30) kao jedan od najučinkovitijih komercijalno dostupnih fotokatalitičkih materijala. [22, 25, 27] TiO_2 ima vrlo jaku oksidacijsku moć, 3,2 eV za anatasni oblik TiO_2 i 3,02 eV za rutilni TiO_2 , čime se ispunjava oksidacijski potencijal vode ($\approx 1,2$ eV). Osim toga, TiO_2 je industrijski masovno proizveden materijal koji je lako dostupan, jeftin i može se lako sintetizirati u laboratoriju kao bijeli prah TiO_2 , koloidna disperzija u tekućoj fazi, ili kao tanki film nanesen na odgovarajuću podlogu. Nadalje, vrlo je stabilan, kemijski i fotokemijski siguran. TiO_2 također ima jaku otpornost na kiseline i lužine. [22, 26] Sam postupak fotokatalize s primjenom TiO_2 kao fotokatalizatora omogućava obradu organskih zagađivala u mg/L i $\mu\text{g/L}$ koncentracijskim razinama, jednostavna je metoda i ima laganu postavku aparature. [18] Međutim, velika energija zabranjene zone TiO_2 (3,2 eV) ograničava njegov fotokatalitički učinak na UV područje svjetlosnog spektra, koje predstavlja oko 3 do 5% Sunčevog spektra. Stoga se pojavila potreba za proučavanjem fotokatalizatora koji, osim što su učinkoviti pod UV svjetlom ($100 < \lambda < 400$ nm), pokazuju dobru fotokatalitičku aktivnost pod vidljivim svjetlom ($\lambda > 400$ nm). [28, 27]

Osim prednosti, TiO_2 još uvijek ima ograničenja kao što su navedeno apsorpiranje svjetlosti u UV rasponu, brza stopa rekombinacije para elektron-šupljina i nečistoće na površini kristala. [25] Nadalje, postoje ograničavajući čimbenici za primjenu heterogene TiO_2 fotokatalize, kao što su odvajanje koloidnog katalizatora od vodene suspenzije nakon obrade, ograničenja prijenosa mase za imobilizirane katalitičke sustave i nizak kvantni prinos za proizvodnju $\bullet OH$ radikala. [22] Korištenje TiO_2 u obliku praha u fotokatalitičkim procesima stvara poteškoće s odvajanjem praha od vode, agregacija suspendiranog praha TiO_2 posebno pri visokim koncentracijama. Čak i najfiniji prašci TiO_2 imaju tendenciju taloženja nakon nekog vremena što rezultira smanjenjem količine apsorpirane svjetlosti i gubitkom učinkovitosti.

Kako bi se prevladao ovaj nedostatak, praškasti TiO_2 može se imobilizirati na različitim površinama kao što su staklene podloge ili kuglice silikagela za daljnju upotrebu u cjevastim fotoreaktorima. [24, 29] Neke metode za povećanje fotokatalitičke aktivnosti i prevladavanje ograničenja uključuju kombiniranje s poluvodičima, dopiranje nemetalima ili metalima, ugradnju nanostrukturiranih ugljikovih materijala itd. [25] Katalizatori nanoveličine za

razgradnju različitih zagađivala imaju dobra optička i fotokatalitička svojstva zbog svoje male veličine. Imobilizacija nanočestica katalizatora na inertnim površinama poput staklenih mrežica preferirana je zbog toksičnosti TiO_2 u obliku suspenzije, kao i niske specifične površine u tom stanju. Imobilizacija nanočestica na anorganskom mediju može produžiti životni vijek katalizatora u reaktoru i njegov potencijal ponovne upotrebe. [29] Aktivni ugljen nema fotokatalitičku aktivnost, ali povećava uklanjanje zagađivala zbog svoje jake sposobnosti adsorpcije te omogućuje poboljšanje brzine prijenosa međupovršinskog naboja i smanjenje rekombinacije pozitivnih šupljina i elektrona, stoga je jedna od mogućih alternativnih pristupa nanošenja TiO_2 na podlogu s velikom površinom. [26]

Učinkovitost razgradnje fotokatalitičke reakcije ovisi o različitim čimbenicima, kao što su početna koncentracija zagađivala, vrsta i intenzitet zračenja, karakteristike katalizatora (struktura, oblik, veličina masa i površina), pH, temperatura, reakcijsko vrijeme, prisutnost elektron-akceptora, itd., stoga je potrebno istražiti najoptimalnije moguće uvjete i oblike reaktora i fotokatalizatora kako bi se postiglo maksimalno uklanjanje opasnih zagađivala iz vodenog ekosustava. [25, 28]

2.2.1.1.2. Kinetika heterogene fotokatalize (Langmuir-Hinshelwood)

Što se tiče klasične heterogene katalize, cjelokupni proces može se rastaviti na pet neovisnih koraka:

1. Prijenos reaktanata u tekućoj fazi do površine fotokatalizatora
2. Adsorpcija reaktanata
3. Reakcija u adsorbiranoj fazi
4. Desorpcija produkta
5. Uklanjanje produkta iz područja međufaze

Fotokatalitička reakcija odvija se u adsorbiranoj fazi (korak br. 3). Jedina razlika u odnosu na konvencionalnu katalizu je način aktivacije katalizatora u kojem je toplinska aktivacija zamijenjena fotonskom aktivacijom kao što je opisano u prethodnom poglavlju. Način aktivacije ne odnosi se na korake 1, 2, 4 i 5, iako fotoadsorpcija i fotodesorpcija reaktanata, uglavnom kisika, postoje. [30]

Razmatranja koja vrijede za uobičajene reakcijske sustave s čvrstim katalizatorima primjenjuju se i za kinetiku heterogenih fotokatalitičkih sustava, uz određene fotokatalitičke specifičnosti. Dakle, polazi se od činjenice da se fotokatalizator praktički ne mijenja za vrijeme reakcije, dok je pojava adsorpcije, tj. kemisorpcije nužan korak na putu fotokatalitičke reakcije. Iz toga proizlazi da eksperimentalno istraživanje kinetike takvih reakcija uključuje određivanje reakcijske površine, brzine reakcije na površini fotokatalizatora te ukupne brzine kao rezultante svih uključenih procesa, što obuhvaća reakciju na površini fotokatalizatora i odgovarajuće fizičke procese prijenosa. Prijenos tvari, neovisno je li riječ o međufaznom prijenosu (prijenosu iz mase fluida na površinu fotokatalizatora) ili unutarfaznom prijenosu tvari (prijenosu kroz pore fotokatalizatora), u osnovi može odrediti ukupnu brzinu razgradnje onečišćujućih tvari. Stoga je važno poznavati čimbenike koji utječu na prijenos tvari, a to su:

- ❖ priroda reaktanta i medija (fluida) kroz koji se reaktant prenosi (uglavnom sadržani u koeficijentu molekulske difuzije),
 - ❖ temperatura, i
 - ❖ hidrodinamika (odnosno debljina graničnog sloja i način prijenosa kroz taj sloj).
- [28]

Langmuir-Hinshelwood-ova (LH) kinetika je kinetički izraz koji se najčešće koristi za objašnjenje kinetike heterogenih katalitičkih procesa. Langmuir-Hinshelwood-ov izraz dan je sljedećom jednadžbom:

$$r = -\frac{dC}{dt} = \frac{k_r KC}{1+KC} \quad (7)$$

gdje je r predstavlja brzinu reakcije koja se mijenja s vremenom t , C koncentraciju u bilo kojem trenutku t tijekom razgradnje u mg/L, K konstantu ravnoteže za adsorpciju supstrata na katalizator te k_r graničnu konstantu brzine reakcije pri maksimalnoj pokrivenosti u danim eksperimentalnim uvjetima. U slučaju jednadžbe (7), konstante k_r i K mogu se izračunati iz odgovarajućeg integriranog izraza. Ova se jednadžba može integrirati između granica: $C = C_0$ pri $t = 0$ i $C = C$ pri $t = t$. Integrirani izraz je dan sa:

$$\ln\left(\frac{C_0}{C}\right) + K(C_0 - C) = k_r Kt \quad (8)$$

Ako je $KC \ll 1$ tada se jednadžba (7) svodi na:

$$r = k_r KC \quad (9)$$

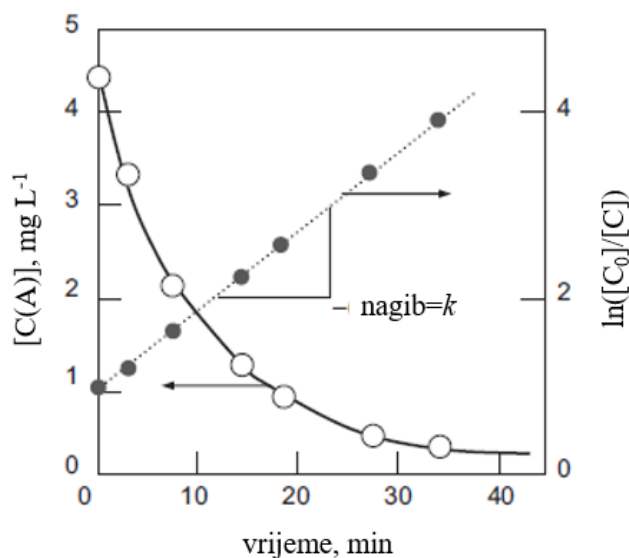
Integriranje jednadžbe (9) s obzirom na ograničenja: $C = C_0$ pri $t = 0$ i $C = C$ pri $t = t$, LH izraz se svodi na kinetiku prvog reda i daje se izrazom:

$$-\ln\left(\frac{C}{C_0}\right) = k_1 t \quad (10)$$

gdje je $k_1 = k_r K$ konstanta brzine reakcije prvog reda, min^{-1} . Iz toga slijedi da je vrijeme poluraspada supstrata, $t_{1/2}$, jednaka [30, 31]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln(2)}{k_1} \quad (11)$$

Poznato je da se kinetika prvog reda obično promatra za reakcije koje se odvijaju u homogenim fazama, tj. reakcije u homogenim otopinama ili u plinovitoj fazi, no primjenjiva je i za heterogene sustave. U idealnom slučaju, brzina monomolekularne reakcije odgovara izrazu brzine prvog reda koji se objašnjava tim udjelom (brojem) molekula koje imaju kinetičku energiju veću od energije aktivacije određenu samo temperaturom reakcije, te da je stvarni broj molekula s energijom za aktivaciju proporcionalan koncentraciji (ili tlaku) molekula. Za ove reakcije, kinetički podaci se analiziraju iscrtavanjem logaritma koncentracije supstrata ili produkta (A) u odnosu na vrijeme reakcije kako bi se dobila linearna linija, a apsolutna vrijednost nagiba linije je konstanta brzine, k (Slika 8). [33]



Slika 8. Graf kinetike prvog reda za fotokatalitičku razgradnju supstrata A [33]

2.3. Analitički pristup za određivanje farmaceutika

Ne postoji jedinstvena analitička metoda za detekciju svih lijekova. Kako bi se otkrila prisutnost farmaceutika u vodenom mediju pri vrlo niskim koncentracijama, potrebne su sofisticirane analitičke metode istraživanja s vrlo niskim granicama detekcije koje su ujedno vrlo osjetljive i selektivne. Posebna analitička oprema potrebna za ispitivanje uzoraka vode za lijekove nalazi se samo u određenim analitičkim istraživačkim laboratorijima ili određenim komercijalnim laboratorijima koji su također specijalizirani za istraživanje metoda.

Iako je detekcija najšireg mogućeg raspona onečišćujućih tvari u vodnom okolišu izuzetno izazovna, istodobno je i bitna kako bi se osigurala ispravnost vodnih resursa radi očuvanja zdravlja živih organizama. Analitički kemičari susreću se s velikim izazovom jer moraju kvantificirati koncentracije u tragovima i ultra-tragovima različitih farmaceutskih produkata u uzorcima s kompleksnim matricama.

Pravilno pripremljeni uzorci za analizu mogu biti izvor pouzdanih podataka (kvalitativnih i kvantitativnih). Reprezentativni uzorak, ispravno prevezen u laboratorij, podvrgava se ekstrakciji; najčešće se primjenjuje ekstrakcija tekućina-krutina. Zahvaljujući postupku ekstrakcije, moguće je dobiti dovoljno visoke vrijednosti koncentriranja analita. Suvremene metode za mjerenje tragova farmaceutika u okolišu uglavnom se temelje na primjeni plinske kromatografije (GC¹⁵) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti (HPLC¹⁶), koje odvajaju analite prisutne u vrlo složenim matricama. Za ovu vrstu analize sve se češće koristi HPLC, posebice u kombinaciji sa spektrometrijom masa (MS¹⁷). [34, 35]

2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

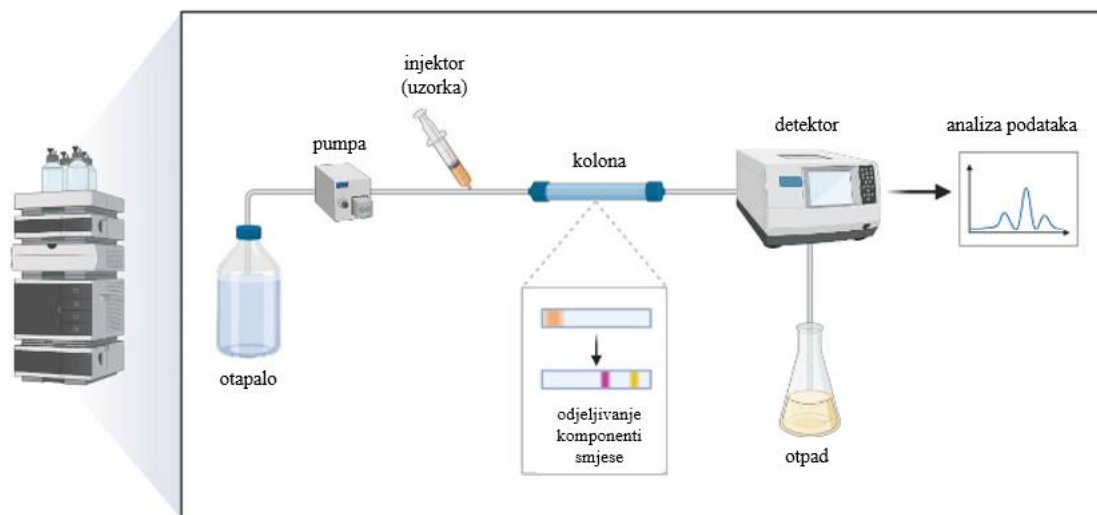
HPLC je jedna od najpopularnijih i najosjetljivijih metoda koja može separirati širok spektar farmaceutika, od kojih neki nisu podložni plinskoj kromatografiji. Metoda se zasniva na separaciji sastojaka smjese temeljem njihove raspodjele između dvije faze, pri čemu je jedna faza čvrsta (nepokretna) koja ne mijenja položaj, dok je druga faza tekuća (pokretna) u protoku.

¹⁵ eng. *Gas Chromatography*, GC

¹⁶ eng. *High-Liquid Performance Chromatography*, HPLC

¹⁷ eng. *Mass Spectrometry*, MS

Kemijske interakcije između analizirane tvari i nepokretne faze dovode do zadržavanja tvari na nepokretnoj fazi, što rezultira zadržavanjem jedne komponente u odnosu na druge komponente. Ovaj proces omogućuje efikasnu separaciju pojedinačnih komponenata smjese, a odjeljivanje je poboljšano korištenjem kolona s visokim razlučivanjem i kraćim vremenom kromatografije. Shematski prikaz metode nalazi se na Slici 9.



Slika 9. Shematski prikaz analize HPLC metodom [36]

Tijekom pregleda literature uočeno je da je među kromatografskim tehnikama HPLC najprimjenjiviji sustav, budući da je GC ograničen samo na nekoliko nepolarnih i hlapljivih lijekova, stoga analiza polarnih lijekova zahtijeva korak derivatizacije koji je uvijek dugotrajan i neponovljiv. [7, 37] Prednosti HPLC metode uključuju ponovnu uporabu kolona, automatsko ubacivanje uzorka, skraćeno trajanje analize te detekciju i kvantifikaciju koje se mogu postići vezanjem detektora. Zbog primjene visoko osjetljivih detektora, potrebne su izuzetno male količine uzorka u nanogramskim količinama, što omogućuje jasno razdvajanje komponenata smjese. Ove prednosti doprinose preciznosti i pouzdanosti rezultata analize. No, nedostaci HPLC-a obuhvaćaju trošak kolona, otapala te nedostatak dugotrajne ponovljivosti zbog zaštićenog načina pakiranja kolone. [35, 38]

U tekućinskoj kromatografiji izbor detekcijskog pristupa je ključan kako bi se zajamčilo da su sve komponente detektirane. Korištenje detektora s nizom dioda, DAD¹⁸, za HPLC pokazalo se kao moćan alat u određivanju i identifikaciji spojeva budući da omogućuje *on-line*

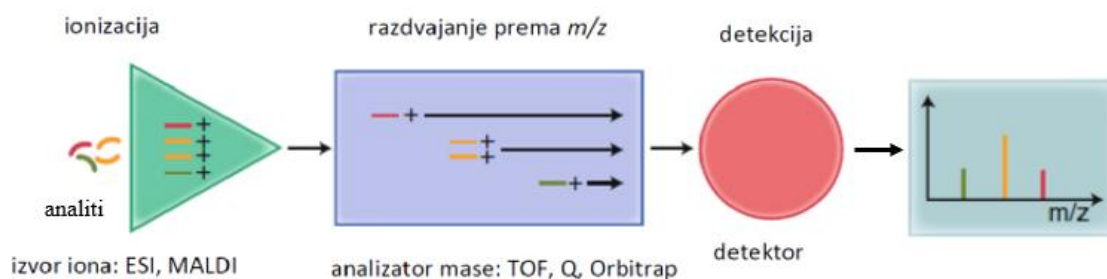
¹⁸ eng. *Diode Array Detector*, DAD

prikupljanje njihovih UV spektara. DAD je obloženi niz diskretnih fotodioda na čipu integriranog kruga za spektroskopiju. Postavlja se u ravninu slike spektrometra kako bi se omogućilo istovremeno opažanje niza valnih duljina. Kada se koristi detektor promjenjive valne duljine, uzorak se mora injektirati više puta, s promjenom valne duljine, kako bi se osiguralo da su detektirane sve kromatografske krivulje. U slučaju DAD može se programirati raspon valnih duljina i svi spojevi koji apsorbiraju unutar tog raspona mogu se identificirati u jednoj analizi. DAD detektor također može analizirati čistoću kromatografske krivulje podudaranjem spektra unutar vrijednosti te kromatografske krivulje na kromatogramu. [37, 38]

HPLC je važna metoda za analitičku podršku u mnogim fazama kontrole i osiguranja kvalitete unutar farmaceutske industrije, a primjenjuje se i za analizu nečistoća farmaceutskih proizvoda i produkata razgradnje. Moguće ju je spregnuti (vezati) s raznim sustavima, a jedna od njih je spektrometrija masa. [38, 39]

2.3.2. Spektrometrija masa

Spektrometrija masa se temelji na procesu ionizacije uzorka, nakon čega slijedi njegova fragmentacija i razdvajanje ioniziranih fragmenata prema omjeru mase i naboja (m/z), te konačno detekcija tih fragmenata (Slika 10.).



Slika 10. Shematski prikaz tijeka analize spektrometrijom masa [40]

U usporedbi s nespecifičnim detektorima (npr. elektronski, UV ili fluorescencijski), MS ima inherentne prednosti poput visoke selektivnosti, specifičnosti i osjetljivosti i jedna je od preferiranih tehnika za analizu farmaceutika i proizvoda za osobnu njegu. Spektrometriju masa,

kako je u prethodnom poglavlju spomenuto, moguće je spregnuti s drugim analitičkim tehnikama poput tekućinske i plinske kromatografije. GC-MS, GC-MS², LC-MS i LC-MS² postali su nezamjenjivi alati za istraživanje farmaceutskih spojeva u matricama okoliša. LC-MS smatra se jednom od najvažnijih tehnika novijeg vremena u analizi i identifikaciji lijekova, razgradnih produkata, međuprodukata i onečišćenja lijekova.

LC-MS ima posebno širok raspon primjena u farmaceutskoj industriji, gdje su kvantitativna i strukturna karakterizacija/identifikacija toplinski labilnih i hidrofilnih spojeva rutinski potrebni; na primjer, strukturni dokaz i karakterizacija glavnih spojeva u lijekovima, kinetička istraživanja i profiliranje nečistoća u različitim koracima i razmjerima kemijske sinteze, ispitivanja stabilnosti i nečistoća farmaceutskih formulacija i komponenti pakiranja, toksikološkog ispitivanja kandidata za lijekove na različitim nosačima za doziranje i farmakokinetičkih/metaboličkih istraživanja za prekliničke i kliničke studije. [41–43]

3. *EKSPERIMENTALNI DIO*

3.1. Materijali

3.1.1. Korištene kemikalije

Za provođenje eksperimentalnog istraživanja fotokatalitičke razgradnje farmaceutika torasemida na staklenoj mrežici s imobiliziranim TiO_2 , odnosno za pripravu radnih otopina korištene su navedene kemikalije:

- ❖ Acetonitril, CH_3CN ; proizvođač: Fischer Chemical, SAD; HPLC čistoća
- ❖ Deionizirana voda; dobivena pomoću Millipore Simplicity uređaja
- ❖ Natrijev hidroksid, NaOH ; proizvođač: VWR Chemicals; SAD; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Klorovodična kiselina, HCl ; proizvođač: Gram-mol; Hrvatska; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Izopropanol, $\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$; proizvođač: Fischer Chemical, SAD; HPLC čistoća
- ❖ Natrijev azid, NaN_3 (krutina); proizvođač: Kemika, Hrvatska; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ para-benzokinon, (p-BQ), $\text{C}_6\text{H}_4\text{O}_2$ (krutina); stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Metanska (mravlja) kiselina, HCOOH ; proizvođač: Lach-Ner d.o.o., Hrvatska; 98-100%; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Imatinib, $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_7\text{O}$ (krutina); proizvođač: Pliva, d.o.o., Hrvatska
- ❖ Natrijev hidrogenkarbonat, NaHCO_3 ; proizvođač: Kemika, Hrvatska; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Natrijev nitrat, NaNO_3 ; proizvođač: Kemika, Hrvatska; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Natrijev klorid, NaCl ; proizvođač: Lach-Ner d.o.o., Hrvatska; stupanj čistoće *p.a.*
- ❖ Huminska kiselina, HA (krutina); proizvođač: Sigma Aldrich, Švicarska
- ❖ Amonijak, NH_3 ; proizvođač: Kemika, Hrvatska; stupanj čistoće *p.a.*

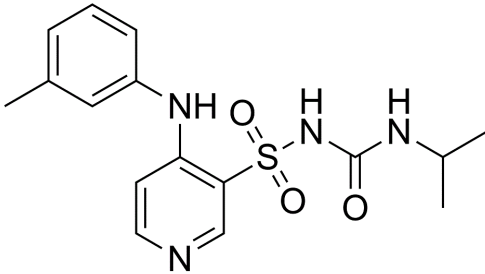
3.1.2. Torasemid

Torasemid (*torsemid*) je lipofilni derivat anilinopiridin sulfoniluree s farmakološkim svojstvima diuretika Henlove petlje. Torasemid je prvi put odobren za kliničku upotrebu od strane FDA¹⁹ 1993. godine. Njegova gotovo potpuna bioraspodivnost u širokom rasponu doza

¹⁹ eng. *Food and Drug Administration*, FDA

od 2,5 do 200 mg odgovara zahtjevima za liječenje akutnog i kroničnog kongestivnog zatajenja srca i hipertenzije. Koristi se kao ljekovita tvar u komercijalno dostupnim lijekovima Demadex[®], Toradiurw[®], Toremw[®] i Unatw[®]. [44–46] Opći podaci i fizikalno- kemijska svojstva torasemida prikazan su u Tablici 3.

Tablica 3. Svojstva torasemida [34, 47, 48]

2D struktura	
IUPAC ime	1-({4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il} sulfonil)-3-(propan-2-il)urea
Molekulska formula	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S
Molekulska masa [g/mol]	348,42
CAS broj	56211-40-6
Agregatno stanje, 25°C	Krutina
Talište [°C]	164
Topljivost u vodi [mg/mL]	0,0596
log <i>P</i>	3,356
p <i>K</i> _k	7,1
Vrijeme poluraspada, <i>t</i> _{1/2} [h]	3,5

3.1.3. Staklena mrežica s imobiliziranim TiO₂

Na Slici 11. prikazane su staklene mrežice s imobiliziranim titanijevim dioksidom, mase sloja fotokatalizatora od 0,1518 g i površinom od 60,48 cm², korištene u ovom radu. Mrežice su dobivene sol-gel metodom pripreve na Metalurškom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Slika 11. Staklena mrežica s imobiliziranim TiO_2

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Prilikom provedbe eksperimenta korištena je vaga tvrtke Mettler Toledo, model XA105DU Dual-Range (Slika 12.), s preciznošću mjerenja od 0,01 g. Maksimalna moguća vrijednost odvage za navedeni model iznosi 120 g. Vaga je korištena za mjerenje precizne odvage krutina pri provođenju eksperimenta.



Slika 12. Analitička vaga Mettler Toledo XA105DU Dual-Range

3.2.2. Ultrazvučna kupelj

U svrhu homogenizacije temeljne standardne otopine torasemida te za degaziranje pokretnih faza za HPLC sustav korištena je ultrazvučna kupelj modela SONOREX DIGITAL 10 P, proizvedena u Njemačkoj, Berlin, Bandelin. Ultrazvučna kupelj prikazana je na Slici 13.



Slika 13. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P

3.2.3. pH metar

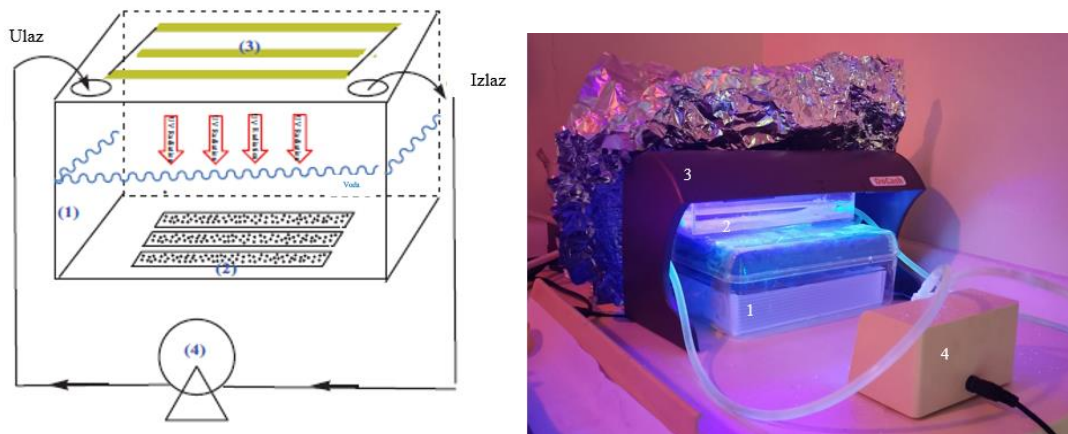
Za optimiranje i provjeru pH vrijednosti standardnih radnih otopina na dnevnoj bazi korišten je pH metar Mettler Toledo, SevenEasy, proizveden u Švicarskoj. Izgled pH metra prikazan je na Slici 14.



Slika 14. pH metar Mettler Toledo, SevenEasy

3.2.4. Fotokatalitički reaktor

Za provedbu utjecaja UV zračenja na razgradnju torasemida pomoću fotokatalizatora TiO_2 imobiliziranog na staklenoj mrežici korišten je reaktor od pleksiglasa priključenog na peristaltičku pumpu za konstantno miješanje otopine s protokom od ≈ 30 mL/min uz UV lampu koja proizvodi zračenje maksimuma valne duljine pri 365 nm. U slučaju ispitivanja utjecaja hidrolize UV lampu nije korištena jer se reakcija provodi u potpunom mraku. Reaktor je smješten u mračnoj sobi i dodatno prekriven aluminijskom folijom kako ne bi došlo do utjecaja drugog (Sunčevog) zračenja i jednolike raspodjele zračenja kroz cijeli reakcijski volumen otopine. Na vrhu reaktora postavljena je staklena mrežica pravokutnog oblika (oblika posude) s imobiliziranim TiO_2 te je prilikom ispitivanja raznih utjecaja pripremljena radna otopina volumena 100 mL izlivena u posudu. Osigurana je minimalna udaljenost između površine katalizatora i izvora zračenja kako bi se ekscitacijom katalizatora stvorilo više hidroksilnih radikala. Za održavanje sobne temperature korišten je led smješten na dnu reaktora, budući da prilikom UV zračenja dolazi do zagrijavanja otopine. Shematski i stvarni prikaz reaktora vidljiv je na Slici 15.



Slika 15. Shematski prikaz (lijevo) [26] i reaktor (desno) za fotokatalitičku razgradnju farmaceutika (1-reaktor od pleksiglasa, 2- mrežica s imobiliziranim fotokatalizatorom, 3- UV lampa, 4- pumpa)

3.2.5. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)

Za snimanje uzoraka nakon fotokatalitičke razgradnje korišten je tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti modela HPLC Agilent 1100, u kombinaciji s detektorom s nizom dioda (DAD) prikazan na Slici 16. Kolona (nepokretna faza) je modela XBridge™ C18, s dimenzijama 4,6×150 mm (Slika 17.). Promjer čestica koje ispunjavaju kolonu je 3,5 μm.



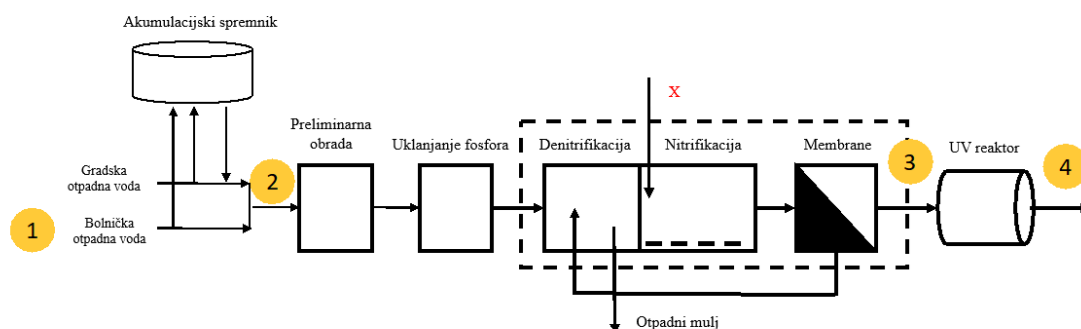
Slika 16. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti s DAD detektorom



Slika 17. HPLC kolona XBridge™ C18

3.2.6. Vakuum filtracija

Za određivanje utjecaja realne vode korištena je otpadna voda uzorkovana 19.10.2021. u talijanskoj regiji Emilia-Romagna. Voda je uzorkovana u realnom WWTP (Slika 18.) na mjestu 2 koje odgovara mješavini komunalne i bolničke otpadne vode prije preliminarne obrade. Nakon uzorkovanja, voda je zaleđena te dopremljena u Zagreb.



Slika 18. Shematski prikaz postrojenja za obradnu mješavine gradske i bolničke otpadne vode u regiji Emilia-Romagna, Italija [49]

Neposredno prije analize utjecaja otpadne vode, uzorak vode se odledio nakon čega su makro čestice uklonjene vakuum filtracijom preko Bühnerovog lijevka primjenom filtra „plava vrpca“ koji ima najsitnije pore. Nakon grube filtracije, otpadna voda se ponovno filtrira vakuuomskom filtracijom primjenom PTFE membranskih filtera (47 mm, 0,45 μm). Aparatura za vakuum filtraciju prikazana je na Slici 19.



Slika 19. Vakuum filtracija za pročišćavanje realnog uzorka otpadne vode

U nastavku će biti opisan postupak eksperimentalnog rada, od pripreme radnih otopina do same analize razgradnje torasemida uz imobilizirani TiO_2 na HPLC uređaju te analize njegovih transformacijskih produkata na UPLC-MS² uređaju.

3.3. Opis rada

3.3.1. Priprema radnih otopina torasemida

Na početku pripremljena je temeljna standardna otopina (TSO) torasemida koncentracije 1000 mg/L iz koje će biti pripravljene radne standardne otopine. Za pripremu TSO otopljeno je 10 mg torasemida (odvagano na analitičkoj vagi) u 10 mL 50% otopine acetonitrila (ACN) (ACN:deionizirana voda= 1:1). Za potpuno otapanje farmaceutika korištena je ultrazvučna kupelj (5 min na sobnoj temperaturi). Reakcijski volumen daljnjih radnih otopina iznosi 100 mL.

Za validaciju metode, odnosno određivanje linearnosti, iz TSO pripremljene su radne otopine sljedećih koncentracija: 30 mg/L, 20 mg/L, 15 mg/L, 10 mg/L, 5 mg/L, 1 mg/L, 0,5 mg/L, 0,1 mg/L i 0,05 mg/L, nadopunjavanjem s deioniziranom vodom. Određivanje ponovljivosti provedeno je ispitivanjem 25 mg/L, 15 mg/L i 5 mg/L otopina torasemida, a za određivanje granice detekcije (GD) i granice kvantifikacije (GK) korištena je koncentracija od 0,05 mg/L. Tako pripremljene radne otopine mjerene su na HPLC uređaju.

Preliminarni eksperimenti provodili su se s koncentracijom torasemida od 10 mg/L bez prethodnog namještanja pH vrijednosti.

Utjecaj pH vrijednosti i koncentracije farmaceutika određivan je prema vrijednostima prikazanim u Tablici 4. pH vrijednosti radnih otopina namještene su otopinama klorovodične kiseline i natrijevog hidroksida.

Tablica 4. Ispitivane vrijednosti koncentracija torasemida i pH vrijednosti

Koncentracija [mg/L]	pH
5	4
5	7
5	10
10	4
10	7
10	10
15	4
15	7
15	10

Mehanizam fotokatalize pri optimalnim uvjetima ispitan je dodatkom sljedećih koncentracija otopina u 100 mL reakcijske otopine farmaceutika:

- ❖ 0,1 mol/L izopropanola (IPA) („hvatač“ $\bullet\text{OH}$ radikala)
- ❖ 0,1 mol/L natrijeva azida (NaN_3) („hvatač“ $^1\text{O}_2$ radikala)
- ❖ 0,1 mol/L para-benzokinona (p-BQ) („hvatač“ $\text{O}_2\bullet^-$ radikala)
- ❖ 0,1 mol/L mravlje kiseline (HCOOH) („hvatač“ pozitivnih šupljina, h^+).

Za određivanje fotokatalitičke razgradnje smjese farmaceutika otopini torasemida koncentracije 5 mg/L dodana je otopina imatiniba koncentracije 5 mg/L i 10 mg/L. Radne otopine namještene su na optimalnu pH vrijednost.

Utjecaj matice vode ispitan je pomoću sljedećih koncentracija otopina kojima pH vrijednost nije namještena:

- ❖ 50 mg/L, 20 mg/L i 8 mg/L natrijeva nitrata (NaNO_3)
- ❖ 1000 mg/L, 100 mg/L i 10 mg/L natrijeva klorida (NaCl)
- ❖ 250 mg/L, 100 mg/L i 25 mg/L natrijeva hidrogenkarbonata (NaHCO_3)
- ❖ 20 mg/L, 10 mg/L i 5 mg/L huminske kiseline (HA)
- ❖ Smjese iona: 8 mg/L NO_3^- , 10 mg/L Cl^- , 100 mg/L HCO_3^- i 10 mg/L HA.

Otopine su dodane radnoj otopini torasemida koncentracije 5 mg/L.

Za određivanje utjecaja realne vode pripremljena je radna otopina torasemida koncentracije 15 mg/L te je reakcijski volumen nadopunjen otpadnom vodom nakon vakuum filtracije.

3.3.2. Ispitivanje fotokatalitičke razgradnje

Nakon pripreme radnih otopina za sve eksperimente, ukoliko je potrebno, namještene su odgovarajuće pH vrijednosti otopine. Zatim slijedi ostvarivanje kontakta između TiO_2 mrežica i otopine farmaceutika. Bolji kontakt ostvaruje se konstantnim miješanjem radne otopine kako bi njena koncentracija s vremenom bila izjednačena u reaktoru. Mrežica s imobiliziranim TiO_2 smještena je na vrh reaktora u otvorenu posudu te se u nju dodaje 100 mL pripremljene radne otopine. U trenutku kontakta otopine i mrežice uključi se štoperica za mjerenje vremena. U svim eksperimentima, osim u preliminarnim, najprije je određivan utjecaj sorpcije farmaceutika na mrežice kroz 30 min. Nakon proteklog vremena, odnosno uspostavljanja sorpcijske/desorpcijske ravnoteže, slijedi fotokatalitička razgradnja paljenjem UV lampe i pokrivanjem reaktora aluminijskom folijom kako bi se cijeli volumen radne otopine jednako ozračivao tijekom razgradnje. Alikvot uzoraka od 500 μL uziman je automatskom pipetom u sljedećim vremenima: 0 min, 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 75 min, 90 min, 120 min, 150 min, 180 min, 210 min, 240 min, 300 min i 360 min od postizanja sorpcijske ravnoteže. Alikvot se ispušta u vijale koje se čuvaju u hladnjaku do analize na HPLC-u.

Preliminarni eksperimenti uključivali su reakciju hidrolize, fotolize i adsorpcije. U reakciji hidrolize radna otopina torasemida postavljena je u reaktor uz uključivanje pumpe za miješanje i prekrivena aluminijskom folijom (bez utjecaja zračenja i katalizatora). U reakciji fotolize radna otopina farmaceutika ozračena je UV lampom valne duljine 365 nm (bez prisutnosti katalizatora), a u reakciji adsorpcije postavljen je fotokatalizator na dno posude reaktora te je promatrana sorpcija farmaceutika bez zračenja.

3.3.3. Analiza uzoraka na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti

Prikupljeni uzorci analiziraju se na HPLC instrumentu u kombinaciji s detektorom s nizom dioda (DAD). Eluiranje pokretne faze je gradijentno, odnosno udio jedne faze s vremenom se smanjuje, dok se udio druge faze povećava. Kromatografski proces je proces obratnih faza (u kojem je pokretna faza polarnija od nepokretne faze). Sastav pokretne faze koju čine vodena i organska faza je sljedeći:

- ❖ Vodena faza (A): 0,1 % HCOOH u deioniziranoj vodi
- ❖ Organska faza (B): 0,1 % HCOOH u ACN.

Gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 5.

Tablica 5. Gradijent pokretne faze

Vrijeme [min]	Udio otapala A [%]	Udio otapala B [%]
0,00	80	20
6,00	20	80
7,00	20	80
7,01	80	20
12,00	80	20

Analiza uzoraka može započeti nakon što je kolona kromatografa kondicionirana, odnosno nepokretna faza pripremljena za organski uzorak. Kondicioniranje se postiže podizanjem protoka za 0,1 mL/min od početne vrijednosti 0,1 mL/min do konačne, 0,5 mL/min. Postupno dolazi do uravnoteženja tlaka koji za korišteni sustav iznosi ≈ 28 bara. Nakon toga slijedi ekvilibriranje, odnosno uravnoteženje kolone s početnim uvjetima metode (u trajanju od 30 min). U konačnici pokrećemo analizu. Volumen uzorka koji se injektira u kolonu je 25 μ L. Protok pokretne faze tijekom analize je 0,5 mL/min, a vrijeme zadržavanja torasemida (t_R) iznosi 6,647 minuta. Radni tlak tijekom analize kreće se oko 70 bara. Nakon završetka analize slijedi obrada rezultata. Kvantifikacija torasemida provodi se integriranjem kromatografske krivulje na valnoj duljini na kojoj torasemid apsorbira maksimalnim intenzitetom, što je 288 nm, te se uspoređuju površine kromatografskih krivulja prije i nakon razgradnje.

3.3.4. Određivanje razgradnih produkata UPLC-MS² metodom

Detekcija razgradnih produkata torasemida nakon fotokatalitičke razgradnje odrađena je primjenom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti, UPLC²⁰, i vezanom sustavu MS/MS (CID 10-30V) kao detektorom u farmaceutskoj firmi *Pliva d.o.o.* Pritom je korišten UPLC Agilent 1290 Infinity 2 uređaj spojen na detektor, tj. spektrometar masa Agilent 6470 LC-TQ²¹. Korištena je Waters XBridge C18 kolona kao i za HPLC sustav prethodno prikazana na Slici 17. Injektirani volumen uzorka nakon kondicioniranja kolone i stabilizacije tlaka iznosio je 20 µL. Uvjeti analize ostali su jednaki, tj. protok tijekom analize iznosio je 0,5 mL/min, a temperatura kolone 25 °C. Gradijent pokretne faze za analizu uzoraka jednak je kao iz Tablice 5., a pokretna faza jednakog je sastava kao i za analizu HPLC metodom, opisana u prethodnom odjeljku.

Ionizacija uzoraka izvedena je elektrosprej ionizacijom u pozitivnom modu, a kao metoda skeniranja analizatora masa korištena je metoda praćenja višestrukih reakcija, MRM²². U Tablici 6. prikazani su uvjeti izvora iona spektrometra mase koji su korišteni za provedbu analize.

Tablica 6. Uvjeti ionizirajućeg izvora MS uređaja

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

²⁰ eng. *Ultra Performance Liquid Chromatography*, UPLC

²¹ eng. *Liquid Chromatography-Triple Quadrupole*, LC-TQ

²² eng. *Multiple Reaction Monitoring*, MRM

4. *REZULTATI I RASPRAVA*

4.1. Razvoj metode (validacija)

Kako bi utvrdili prikladnost metode za određivanje fotokatalitičke razgradnje farmaceutika torasemida u vodi i potvrdili sigurnost dobivenih rezultata, provedena je validacija metode, odnosno određene su karakteristike linearnosti, ponovljivosti i međupreciznosti (preciznost), granice detekcije, *GD*, i granice kvantifikacije, *GK*. Dobivene vrijednosti izvedbenih karakteristika prikazane su u Tablici 7.

Tablica 7. Izvedbene karakteristike validacije fotokatalitičke metode razgradnje torasemida

Izvedbena karakteristika	Rezultat		Koncentracija, mg/L	Kriterij prihvatljivosti	Kriterij zadovoljen
<i>Linearnost</i>	$R^2=0,993$		Za radno područje (0,05-30)	$R^2>0,990$	DA
<i>Ponovljivost</i>	<i>RSD, %</i>			$RSD \leq 10\%$	DA
	3.11.2022.	4.11.2022.			
	4,0988	4,7832	0,05		
	0,4559	0,1648	5		
	0,3103	0,1825	15		
	0,2896	0,1967	25		
<i>Međupreciznost</i>	$F_{\text{rač.}}$			$F_{\text{tabl.}}=3,18$ $F_{\text{rač.}} < F_{\text{tabl.}}$	
	7,2017		5		NE
	2,9151		15		DA
	2,0563		25		DA
<i>Granica detekcije</i>	0,003 mg/L		/	<i>podatak</i>	/
<i>Granica kvantifikacije</i>	0,009 mg/L		/	<i>podatak</i>	/

Za određivanje linearnosti pripravljene koncentracije standarada u rasponu od 0,05 mg/L do 30 mg/L analizirane su u tri ponavljanja. Iz dobivenih vrijednosti rezultata, odnosno površina ispod kromatografskih krivulja, izračunata je aritmetička sredina za svaku koncentraciju te se na temelju dobivenih vrijednosti prikazala grafička ovisnost odziva instrumenta o koncentraciji

analita i prikazao kalibracijski pravac. Jednadžba pravca glasi: $y=84,861x+28,961$, a vrijednosti regresijskog koeficijenta, R^2 , iznosi 0,993. Prema regresijskom koeficijentu, čija je vrijednost veća od vrijednosti zadane kriterijem prihvatljivosti, može se potvrditi linearnost metode, tj. odziv instrumenta i koncentracija analita međusobno su linearno ovisni. Iz jednadžbe kalibracijskog pravca može se istaknuti i nagib pravca s vrijednošću 84,861 L/mg koji ukazuje na osjetljivost metode. Relativno standardno odstupanje, RSD^{23} , izračunato je za niz odziva instrumenta pri svakoj koncentraciji te je najviša vrijednost od 5,28% dobivena za najnižu koncentraciju od 0,05 mg/L. Ostale vrijednosti RSD-a kreću se uglavnom ispod 1%, što ukazuje na prikladnost metode za mjerenje fotokatalitičke razgradnje promatranog farmaceutika u vodi.

Preciznost, koja predstavlja stupanj podudarnosti između rezultata nezavisnih ispitivanja dobivenih višestrukim mjerenjem istog homogenog uzorka, promatrana je kroz ponovljivost i međupreciznost. Ispitivanje ponovljivosti provodilo se u dva uzastopna dana mjerenjem odziva 10 uzoraka standardnih otopina torasemida koncentracija 0,05 mg/L, 5 mg/L, 15 mg/L i 25 mg/L. Iz dobivenih vrijednosti izračunata je aritmetička sredina odziva za svaku koncentraciju te RSD vrijednosti na temelju koje zaključujemo o ponovljivosti. Budući da je odstupanje u svakom slučaju manje od 10% kriterij ponovljivosti je zadovoljen. Međupreciznost ispitana je provedbom F -testa, odnosno usporedbom procjena standardnih odstupanja dvaju nizova podataka, s_1 i s_2 (dobivenih mjerenjem ponovljivosti). Kriterij međupreciznosti nalaže kako izračunata F vrijednosti, $F_{rač.}$, mora biti manja od kritične F vrijednosti očitane iz tablice, $F_{tabl.}$, koja ovisi o broju stupnjeva slobode (broj mjerenja(n) -1). F vrijednosti dvaju nizova računa se jednadžbom:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (12)$$

pri čemu je $s_1 > s_2$. Dobiveni rezultati prikazani u Tablici 7. ukazuju na to kako kriterij međupreciznosti za najmanju koncentraciju od 5 mg/L nije zadovoljen budući da je $F_{rač.} > F_{tabl.}$, što znači da postoji greška analitičara ili instrumenta u mjerenju. Za ostale koncentracije kriterij međupreciznosti je zadovoljen, odnosno ne postoje značajne razlike u preciznosti mjerenja.

Granica detekcije, GD koja predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koju je moguće detektirati (ne i kvantitativno odrediti) i granica kvantifikacije, GK – najmanja količina analita u uzorku koja se može kvantificirati uz zadovoljavajuću točnost i preciznost procijenjene su na temelju standardnog odstupanja slijepog uzorka prema formulama:

²³ eng. *Residual Standard Deviation*, RSD

$$GD = 3,3 \cdot s_0 \quad (13)$$

$$GK = 10 \cdot s_0 \quad (14)$$

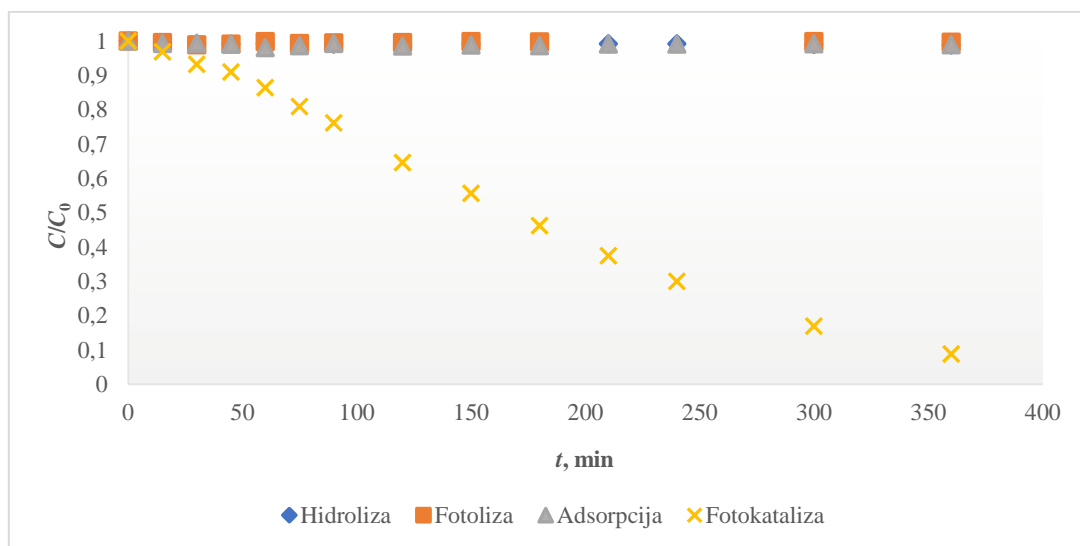
gdje s_0 predstavlja procjenu standardnog odstupanja n mjerenja. Odnosno, uzorak koji se očekuje blizu granice detekcije injektiran je deset puta (0,05 mg/L) i na temelju ponovljenih mjerenja (n) izračunat je s_0 prema formuli:

$$s_0 = s/\sqrt{n} \quad (15)$$

Procijenjena vrijednost GD za torasemid iznosi 0,003 mg/L, odnosno 0,009 mg/L za GK.

4.2. Preliminarni eksperimenti

Ispitivanju fotokatalitičke razgradnje farmaceutika torasemida prethodili su preliminarni eksperimenti koji uključuju hidrolizu, adsorpciju i fotolizu kako bi se utvrdilo koliko navedeni procesi utječu na razgradnju farmaceutika pored procesa fotokatalize. Eksperimenti su provedeni kako je opisano u odjeljku 3.3.2., a rezultati su prikazani na Slici 20.



Slika 20. Preliminarni eksperimenti i fotokatalitička razgradnja torasemida

Iz grafičkog prikaza vidljivo je kako na razgradnju promatranog farmaceutika ne postoji značajan utjecaj niti jednog od preliminarnih eksperimenata unutar promatranih 360 minuta eksperimenta.

Hidrolitička razgradnja torasemida, odnosno utjecaj vode je neznatan što zaključujemo na temelju činjenice da se nakon provedenih 7 sati eksperimenta razgradilo tek 1,5 % torasemida. Stoga možemo zaključiti kako je torasemid hidrolitički stabilan.

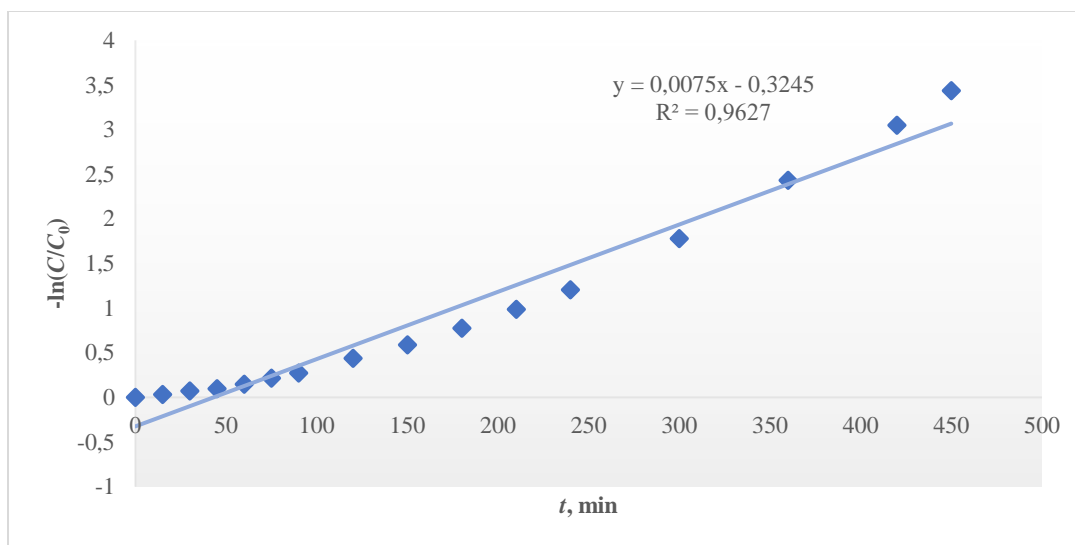
Adsorpcija torasemida na mrežice također se nije pokazala kao favorizirani proces. Smanjenje koncentracije farmaceutika nakon cijelog eksperimenta u prisutnosti mrežica iznosilo je 1,07% u odnosu na početnu koncentraciju.

Također, fotolitička razgradnja torasemida nakon promatranog vremena iznosi 0,31% što je izrazito malo u odnosu na promatranu fotokatalitičku razgradnju. Zaključujemo kako UV zračenje nema značajan utjecaj na razgradnju torasemida. No, vidljivo je kako se dodatkom fotokatalizatora u kombinaciji s UV zračenjem rezultati uvelike mijenjaju. Protekom vremena smanjenje koncentracije torasemida doseže 95,32% u odnosu na njegovu početnu koncentraciju te bi se postotak u daljnjem tijeku eksperimenta vjerojatno povećao i čak dostigao 100%-tnu vrijednost. Dakle, rezultati pokazuju kako bi se promatrani farmaceutik ovom metodom mogao u potpunosti razgraditi.

Prema istraživanju iz 2020. [50] srodni farmaceutici iz iste skupine lijekova (diuretika) prate drugačije ponašanje. Visoka učinkovitost uklanjanja zabilježena je kod furosemida nakon fotokatalize (97%) i fotolize (100%), dok je hidroklorotiazid pokazao slabo uklanjanje nakon fotokatalitičkog tretmana (29,4%) i fotolitičkog tretmana (11,3%). Adsorpcija, prema istraživanju, dovodi do zanemarive ili nulte eliminacije diuretika iz otpadnih voda.

Prije i nakon samih eksperimenata izmjerene su pH vrijednosti otopina kako bi se pratila promjena. Značajna promjena evidentirana je jedino u slučaju fotokatalitičke razgradnje gdje se pH vrijednost smanjila na 4,04 u odnosu na početnu vrijednost od 5,52 što se može objasniti prisutnošću potencijalnih razgradnih produkata torasemida prisutnih u otopini nakon razgradnje. Obzirom na dobivene rezultate u daljnjem tijeku eksperimenta razgradnju torasemida ne povezujemo s hidrolizom, fotolizom ili adsorpcijom na mrežice, već promatramo isključivo kao rezultat fotokatalize.

Rezultati fotokatalitičke razgradnje torasemida integrirani su kako bi se dobila linearna ovisnost između parametara i odredio kinetički model. Dobivena linearna ovisnost prikazana je na Slici 21.



Slika 21. Kinetički model I. reda fotokatalitičke razgradnje torasemida

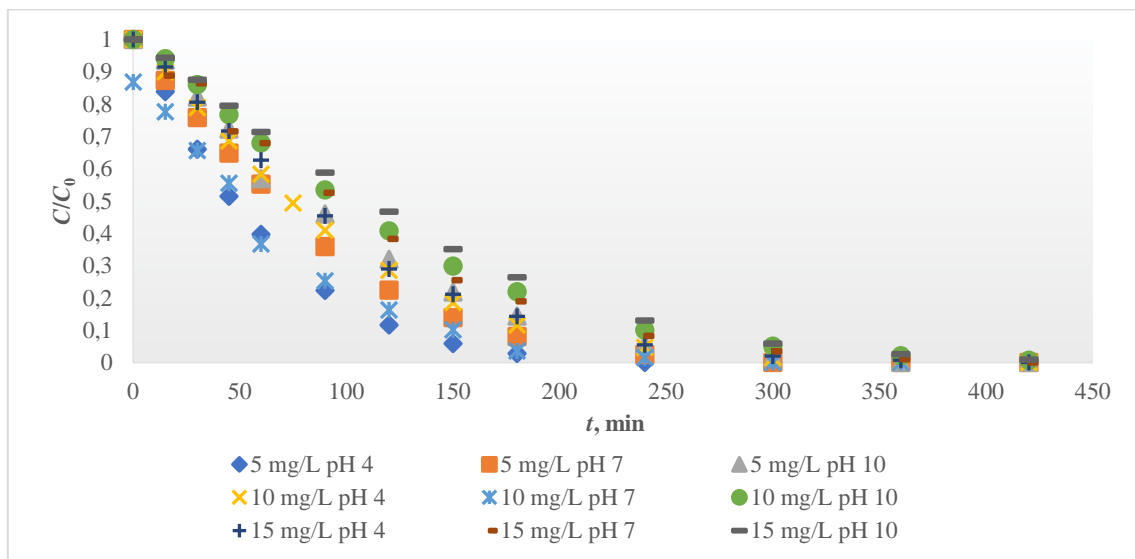
Prema vrijednosti $R^2=0,9627$ može se potvrditi dobro slaganje kinetičkog modela I. reda i eksperimentalnih podataka. Iz dobivene jednadžbe pravca može se očitati vrijednost konstante brzine razgradnje, k , kako je opisano u odjeljku 2.2.1.1.2., koja je jednaka nagibu pravca te iznosi $0,0075 \text{ min}^{-1}$. Vrijeme poluraspada torasemida prema danom modelu izračunava se prema jednadžbi (11) i jednako je 92,42 min, tj. 1,54 h.

4.3. Fotokataliza

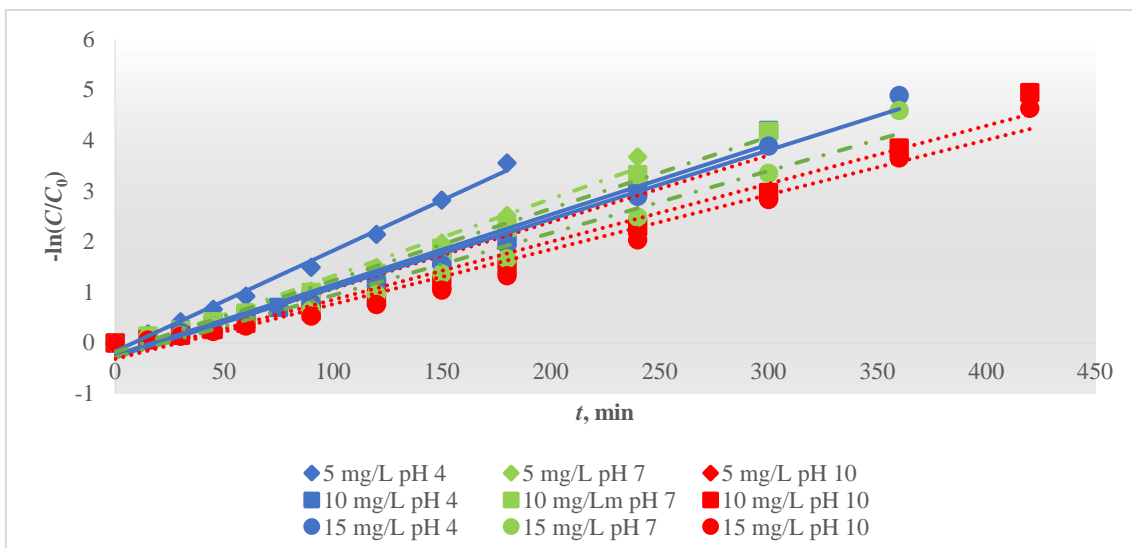
U nastavku će biti razmotreni rezultati fotokatalitičke razgradnje torasemida s imobiliziranim TiO_2 kao fotokatalizatorom pod utjecajem raznih parametara. Konkretno su ispitani utjecaji koncentracije i pH vrijednosti otopine farmaceutika, mehanizam fotokatalize pri optimalnim uvjetima (tzv. „scavenger study“), utjecaj imatiniba za ispitivanje razgradnje smjese farmaceutika, utjecaj matice vode i primjene realne vode.

4.3.1. Utjecaj pH i koncentracije otopine farmaceutika

Ispitivani su utjecaji pH vrijednosti i koncentracije farmaceutika kako je prikazano u Tablici 4. Na temelju dobivenih rezultata moglo se zaključiti i o optimalnim uvjetima razgradnje torasemida koji će biti primijenjeni u daljnjem tijeku eksperimenta. Grafički prikaz rezultata fotokatalitičke razgradnje torasemida pri pojedinim vrijednostima pH i koncentracije otopina prikazan je na Slici 22., a pripadajući kinetički modeli na Slici 23.



Slika 22. Rezultati ispitivanja utjecaja pH i koncentracije otopine na fotokatalitičku razgradnju torasemida



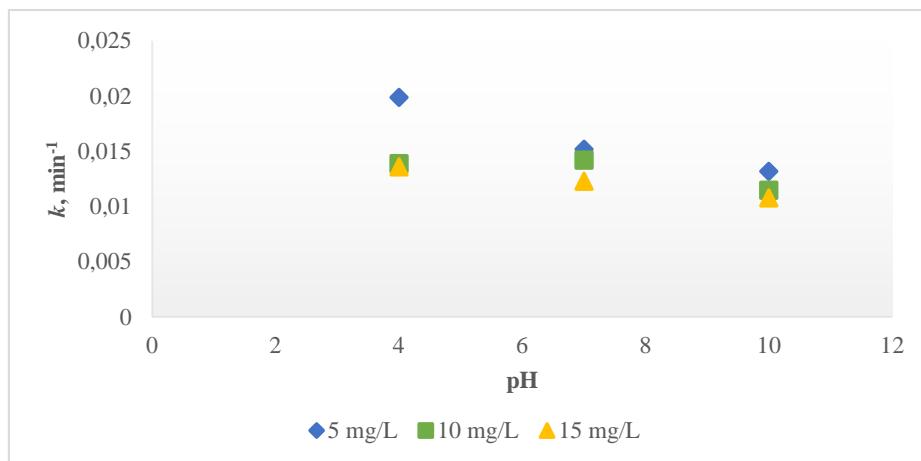
Slika 23. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju pH i temperature

U Tablici 8. prikazane su vrijednosti konstante brzine razgradnje i vrijeme poluraspada farmaceutika prateći kinetički model I. reda za svaku ispitivanu koncentraciju i pH vrijednosti.

Tablica 8. Rezultati kinetičkog modela I. reda za ispitivanje utjecaja pH i koncentracije na fotokatalitičku razgradnju torasemida

γ , mg L ⁻¹	5			10			15		
	k , min ⁻¹	$t_{1/2}$, min.	R^2	k , min ⁻¹	$t_{1/2}$, min.	R^2	k , min ⁻¹	$t_{1/2}$, min.	R^2
4	0,0199	34,8315	0,9930	0,0139	49,8667	0,9865	0,0136	50,9667	0,9879
7	0,0152	45,6018	0,9868	0,0142	48,8132	0,9932	0,0123	56,3534	0,9756
10	0,0132	52,5112	0,9797	0,0115	60,2737	0,9826	0,0108	64,1803	0,9768

Na Slici 24. prikazana je ovisnost konstante brzine razgradnje o pH vrijednosti pri ispitivanim koncentracijama torasemida.



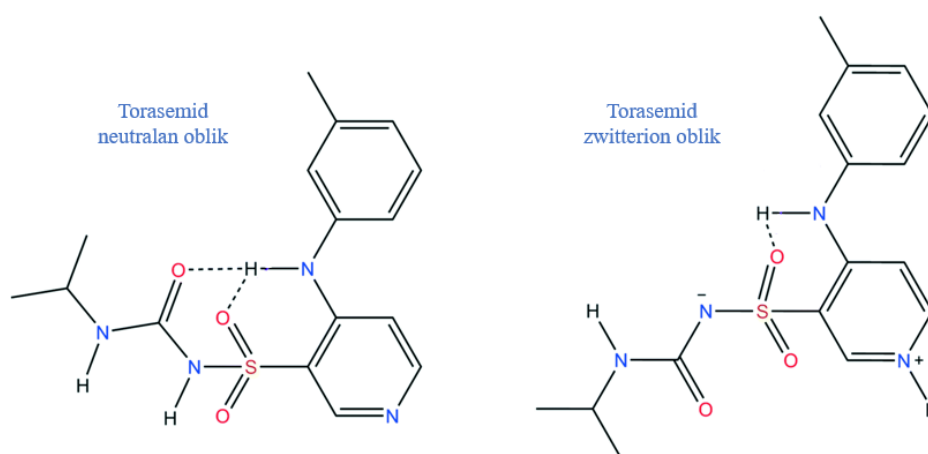
Slika 24. Prikaz ovisnosti konstante brzine razgradnje torasemida o pH pri ispitivanim koncentracijama

Prema grafičkom prikazu na Slici 22. vidljivo je kako najveći pad krivulje ovisnosti C/C_0 o vremenu t pripada otopini torasemida najniže koncentracije, 5 mg/L, i najniže ispitivane pH vrijednosti, 4. Pri navedenim uvjetima potpuna razgradnja farmaceutika postiže se već nakon 180 min, odnosno 3 h. Također je ostvarena najveća konstanta brzine razgradnje koja iznosi $0,199 \text{ min}^{-1}$ i najkraće vrijeme poluraspada torasemida od 34,83 min. Stoga možemo zaključiti kako su upravo ove vrijednosti koncentracije i pH vrijednosti otopine optimalne za razgradnju torasemida među ispitanim vrijednostima.

Ostali podaci na temelju Slike 22. i Tablice 8. ukazuju na to kako je potpuna razgradnja torasemida ostvaruje i pri drugim uvjetima koncentracije i pH vrijednosti, no nešto sporijom brzinom razgradnje. Jedino se u slučaju 10 mg/L i 15 mg/L otopine pH vrijednosti 10 potpuna razgradnja ostvaruje nakon 8h. Pri tim koncentracijama i pH vrijednosti 10 zabilježene su i najmanje konstante brzine razgradnje $0,0115 \text{ min}^{-1}$ i $0,0108 \text{ min}^{-1}$ i najduže vrijeme poluraspada 60,27 min i 64,18 min. No treba napomenuti kako su i te vrijednosti prihvatljive s obzirom da se i pri tim uvjetima može ostvariti potpuna fotokatalitička razgradnja torasemida.

Promatrajući kinetički model I. reda za opisivanje fotokatalitičke razgradnje pri različitim vrijednostima pH i koncentracije, regresijski koeficijenti u prosjeku su bili $R^2 > 0,98$, što ukazuje na odlično slaganje modela s eksperimentalnim podacima. Uspoređujući konstante brzine razgradnje i vrijeme poluraspada pri određenim pH vrijednostima i koncentracijama, uočljivo je kako k vrijednost unutar iste koncentracije povećanjem pH vrijednosti opada (Slika 24.), a $t_{1/2}$ raste. Iznimka je pri koncentraciji torasemida od 10 mg/L i pH vrijednosti 7 gdje kinetički parametri ne slijede prethodno opisan trend, no odstupanje je vrlo malo.

pH se smatra jednim od važnih parametara u fotokatalitičkim procesima budući da utječe ne samo na površinski naboj katalizatora već i na disocijaciju farmaceutskih spojeva u otopinama. Pri nižim pH vrijednostima, ispod $\text{pH}_{\text{pzc}}^{24}$, površina katalizatora je pozitivno nabijena i povećana je adsorpcija iona H^+ . Nasuprot tome, pri pH vrijednostima iznad pH_{pzc} površina katalizatora je negativno nabijena i ispunjena OH^- ionima. Osim navedenog, promjena pH vrijednosti utječe i na međudjelovanje elektrostatskih učinaka između površine katalizatora i odvajanja funkcionalnih skupina na aktivnim mjestima katalizatora te na kemiju otopine. [25, 26] Izoelektrična točka TiO_2 kao fotokatalizatora kreće se između 5 i 6,6. [51] Dakle, pri pH vrijednostima medija iznad navedenih vrijednosti mrežice će biti negativno nabijene, i suprotno, pri pH vrijednostima medija ispod navedenih vrijednosti mrežice će biti pozitivno nabijene. Za torasemid kao promatrani farmaceutik utvrđeno je da postoji u obliku tzv. *zwitterion- α* ²⁵ u krutom stanju (Slika 25.), no još uvijek se razmatra njegovo postojanje i stabilnost u otopljenom obliku. [52] Kako njegova izoelektrična točka nije poznata, teško je tvrditi u kakvom se obliku nalazi pri određenim pH uvjetima.



Slika 25. Prikaz *zwitteriona* torasemida u usporedbi s neutralnim oblikom [53]

Obzirom na njegovu $\text{p}K_{\text{k}}$ vrijednost možemo zasigurno tvrditi kako se iznad pH vrijednosti 7,1 nalazi u deprotoniranom obliku gdje nosi negativni naboj. Ispod te vrijednosti se nalazi kao neutralna molekula, ili moguće, u protoniranom obliku ukoliko je u vodenom mediju *zwitterion* stabilan. Iz navedenog ne čudi kako se upravo pri povišenim pH

²⁴ Izoelektrična točka (pH_{pzc})- točka, tj. pH vrijednost pri kojem je broj pozitivnih i negativnih naboja na površini adsorbensa nula [26]

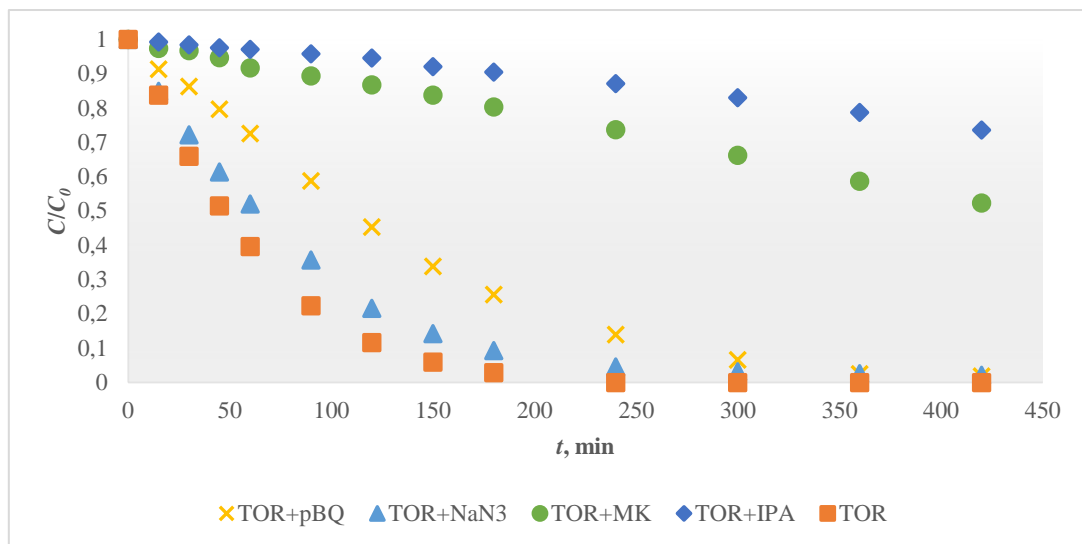
²⁵ *Zwitterion*- oblik molekule s dvojnim nabojem i formalnim nabojem nula. Molekule koje sadrže i kisele i bazične funkcionalne skupine teže stvaranju *zwitteriona*.

vrijednostima konstanta brzine razgradnje smanjuje, a vrijeme poluraspada povećava budući da dolazi do odbijanja negativne površine TiO_2 mrežica i torasemida u negativnoj formi. Pri nižim pH vrijednostima mrežice postaju pozitivno nabijene i može se pretpostaviti da se pri najnižoj ispitanoj pH vrijednosti 4 torasemid nalazi u neutralnom obliku. U tom slučaju ne postoje Coulombove sile privlačenja ili odbijanja između mrežica i farmaceutika, no adsorpcijski afinitet molekula farmaceutika je prisutan te dolazi do vezanja molekula na mrežice gdje se odvija brža fotokatalitička razgradnja nego u slučaju viših pH vrijednosti medija. [24, 26, 54]

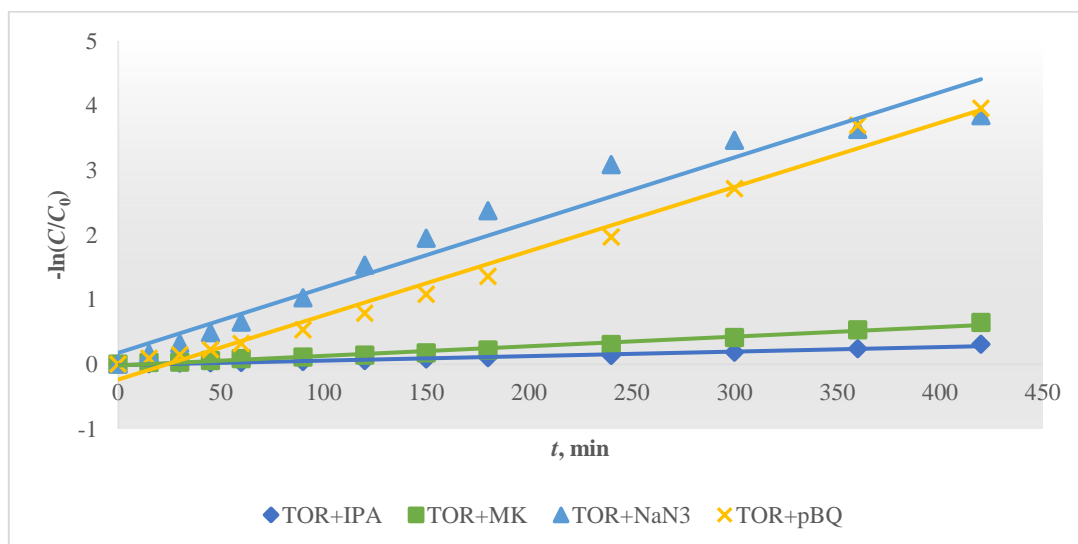
Početna koncentracija farmaceutika također utječe na doseg razgradnje torasemida. S porastom koncentracije farmaceutika, povećava se broj molova u reakcijskoj okolini i aktivna mjesta na površini TiO_2 postaju zasićena, sprječavajući učinkovito pobuđivanje površine katalizatora svjetlosnim fotonima i smanjujući učinkovitost uklanjanja. Povišenje koncentracije zagađenja također mogu uzrokovati smanjenje prodiranja svjetlosti i smanjenoj duljini puta fotona koji ulaze u otopinu, smanjujući učinkovitost fotokatalitičkog procesa. Drugi mogući razlog za ovu pojavu je stvaranje reaktivnijih međuprodukata. U tom stanju dolazi do „natjecanja“ za adsorpciju na mrežice i reakciju s dostupnim radikalima, budući da se značajan dio formiranih radikala koristi za razgradnju međuprodukata u jednostavnije produkte. [26, 28] Stoga su smanjena konstanta brzine razgradnje torasemida i dulje vrijeme poluraspada pri većim koncentracijama logični.

4.3.2. Mehanizam fotokatalize („scavenger study“)

Mehanizam djelovanja reaktivnih radikala na fotokatalitičku razgradnju torasemida (TOR) ispitan je dodatkom spojeva koji djeluju kao „hvatači radikala“, konkretno dodane su otopine izopropanola (IPA), natrijeva azida (NaN_3), para-benzokinona (p-BQ) i mravlje kiseline (MK). Ispitivanje se provodilo pri optimalnim uvjetima, kako je u prethodnom odjeljku određeno, pri koncentraciji 5 mg/L i pH vrijednosti 4. Grafički prikaz rezultata fotokatalitičke razgradnje torasemida prilikom dodatka pojedinih otopina prikazan je na Slici 26., a pripadajući kinetički modeli na Slici 27.



Slika 26. Rezultati ispitivanja utjecaja „hvatača radikala“ na fotokatalitičku razgradnju torasemida



Slika 27. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju „hvatača“ radikala

U Tablici 9. prikazane su vrijednosti konstante brzine razgradnje i vrijeme poluraspada farmaceutika prateći kinetički model I. reda za ispitivane otopine.

Tablica 9. Rezultati kinetičkog modela I. reda za ispitivanje utjecaja „hvatača“ radikala na fotokatalitičku razgradnju torasemida

	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{h}$	R^2
TOR+IPA	0,0007	16,50	0,9822
TOR+MK	0,0015	7,70	0,9873
TOR+NaN₃	0,0101	1,14	0,9577
TOR+p-BQ	0,0099	1,17	0,9838

Obzirom da se dodatkom svih navedenih otopina „hvatača“ fotokatalitička razgradnja torasemida usporila u odnosu na čistu otopinu farmaceutika pri optimalnim uvjetima, te da nije postignuta potpuna razgradnja torasemida nakon 8 h eksperimenta, zaključujemo kako sve reaktivne vrste, $\bullet\text{OH}$, $^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$ i h^+ , sudjeluju u razgradnji torasemida. Iz Tablice 9. vidljivo je kako su konstante brzine razgradnje puno manje, a vrijeme poluraspada puno duže u odnosu na čistu otopinu torasemida. Prema Slici 26. može se zaključiti kako se najbrža razgradnja torasemida odvija dodatkom NaN_3 kao „hvatača“ singletnog kisika, $^1\text{O}_2$, a najsporija dodatkom otopine IPA koji veže $\bullet\text{OH}$ radikale. To znači da su hidroksilni radikali glavne reaktivne čestice zadužene za fotokatalitičku razgradnju torasemida, a singletni kisik u tome najmanje sudjeluje od promatranih reaktivnih vrsta. Rezultat toga je najmanja vrijednost konstante brzine razgradnje, koja iznosi $0,0007 \text{ min}^{-1}$, i najduže vrijeme poluraspada torasemida, 16,5 h upravo pri dodatku IPA. Svi regresijski koeficijenti kinetičkog modela su u vrijednostima $R^2 > 0,95$ što znači da model zadovoljava opis razgradnje torasemida pri danim uvjetima.

Prethodna istraživanja fotokatalitičkih sustava temeljenih na TiO_2 zabilježila su da su hidroksilni radikali važne reaktivne vrste u razgradnji ciljanih zagađivala. [24, 26, 55] Međutim, neki su istraživači jasno istaknuli da druge vrste, uključujući elektrone, šupljine, superoksidne anionske radikale, singletni kisik, također mogu pridonijeti razgradnji ciljanih zagađivala ovisno o karakteristikama specifičnog katalizatora. Prema istom istraživanju [55] iz 2018. proučavanjem razgradnje farmaceutika metropolola, MTP (β -blokatora), na bazi TiO_2 pomoću mravlje kiseline i *tert*-butanola („hvatača“ $\bullet\text{OH}$) rezultati su pokazali da je razgradnja MTP bila uvelike smanjena: ukupno uklanjanje nakon 120 min eksperimenta smanjeno je na 2,42% i 10,48%, s dodatkom mravlje kiseline i *tert*-butanola u odnosu na početnu razgradnju (bez dodataka) od 87%. Istraživanje iz 2018. [56] u kojem se proučavala razgradnja farmaceutika imatiniba, IMA (antitumorski lijek), pomoću TiO_2 dodatkom izopropanola također ukazuje da je 84% stope razgradnje IMA rezultat reakcije $\bullet\text{OH}$ radikala. Dodatak metanola („hvatača“

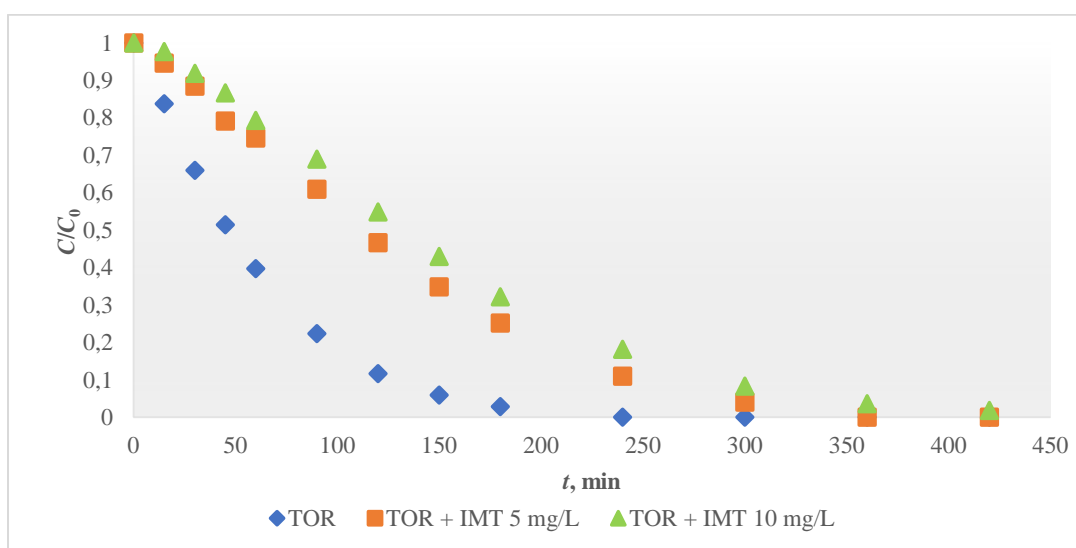
šupljina i OH•) umjesto izopropanola rezultirao je dodatnim smanjenjem konstante brzine razgradnje pokazujući da je 90% od ukupne razgradnje rezultat djelovanja h^+ i •OH radikala. Dakle, vidi se da su •OH radikali jedni od najvažnijih reaktivnih vrsta ključnih za razgradnju zagađivala, što je potvrđeno i ovim eksperimentom.

4.3.3. Utjecaj imatiniba (smjesa farmaceutika)

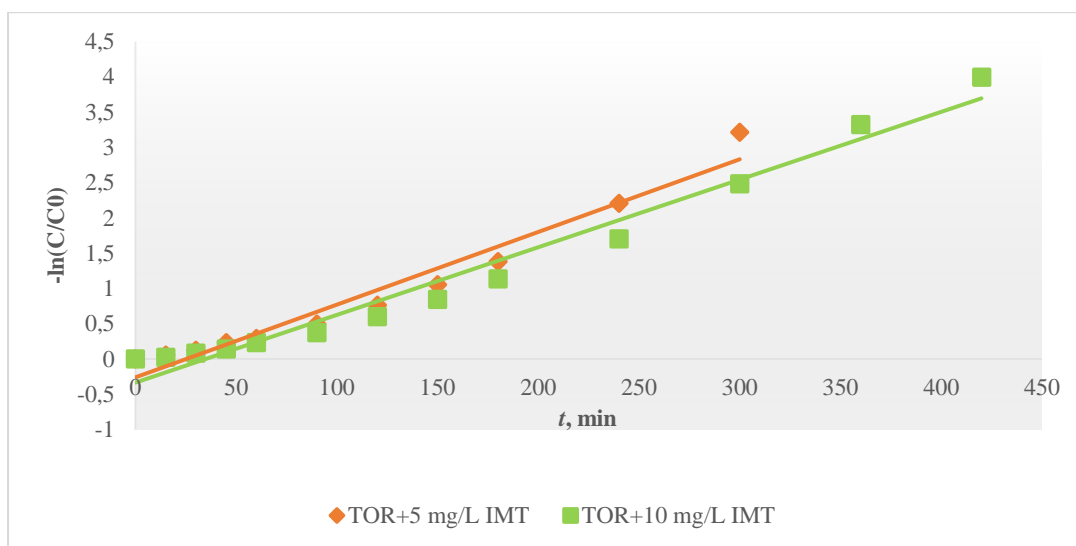
U narednom eksperimentu promatrana je fotokatalitička razgradnja smjese farmaceutika, konkretno imatiniba u koncentraciji 5 mg/L i 10 mg/L pri optimalnim uvjetima razgradnje torasemida koncentracije 5 mg/L i pH vrijednosti 4.

Imatinib, IMA, glavni antitumorski lijek koji se koristi u liječenju kronične mijeloične leukemije, može izazvati štetne učinke pri koncentracijama ispod 1 ng/mL. Unatoč tome što je IMA lijek koji može izazvati učinke na okoliš, provedeno je tek nekoliko istraživanja za procjenu sudbine IMA i utjecaja njegovih transformacijskih produkata u vodi. Danas su istraživanja sve više usmjerena na otkrivanje razgradnje IMA pod hidrolitičkim, oksidativnim i fotolitičkim uvjetima. [56]

Grafički prikaz rezultata razgradnje torasemida pod utjecajem farmaceutika imatiniba prikazan je na Slici 28., a pripadajući kinetički modeli na Slici 29.



Slika 28. Rezultati ispitivanja utjecaja imatiniba na fotokatalitičku razgradnju torasemida



Slika 29. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju imatiniba

U Tablici 10. prikazane su vrijednosti konstante brzine razgradnje i vrijeme poluraspada farmaceutika torasemida prateći kinetički model I. reda pri utjecaju imatiniba.

Tablica 10. Rezultati kinetičkog modela I. reda za ispitivanje utjecaja imatiniba na fotokatalitičku razgradnju torasemida

	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{h}$	R^2
IMT 5 mg/L	0,0103	1,1216	0,9592
IMT 10 mg/L	0,0096	1,2034	0,9726

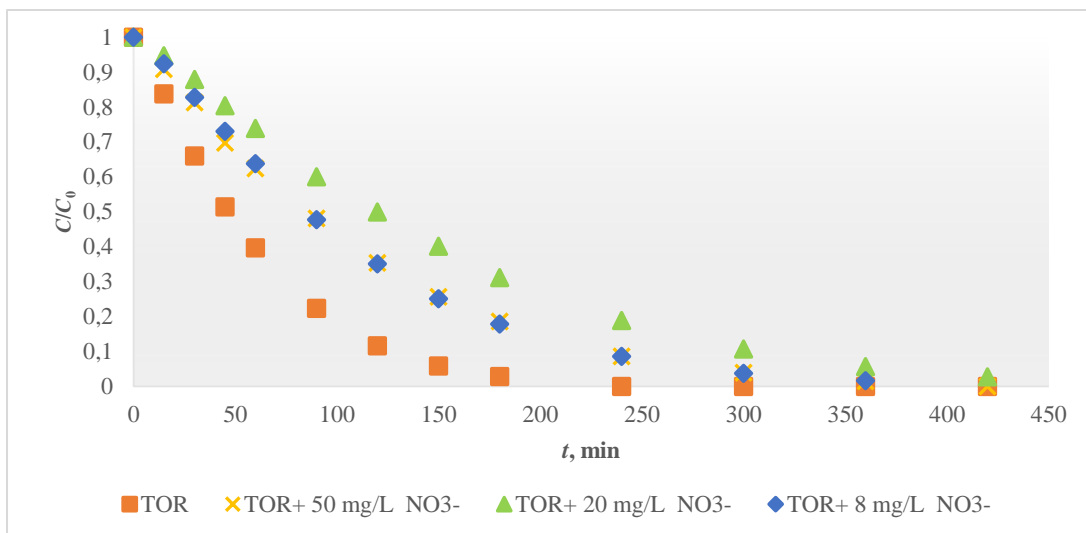
Prema Slici 28. može se uočiti kako dodatak farmaceutika imatiniba utječe na razgradnju torasemida tako što ju dodatno usporava. Iz Tablice 11. vidljivo je kako su konstante brzine reakcije manje u odnosu na njenu vrijednost za torasemid pri optimalnim uvjetima koja iznosi $0,0119 \text{ min}^{-1}$, te je vrijeme poluraspada duže od optimalnih 0,58 h. Vrijednosti regresijskog koeficijenta veće su od 0,95 čime potvrđujemo dobro praćenje modela. Pri koncentraciji imatiniba od 5 mg/L potpuna razgradnja torasemida zabilježena je već nakon 7 h, dok pri koncentraciji od 10 mg/L nije postignuta ni nakon 8 h. Razlog smanjenoj brzini razgradnje torasemida dakako može biti kompeticija između IMT i TOR molekula za aktivna mjesta na površini TiO_2 fotokatalizatora, što je u skladu s teorijom fotokatalitičkog procesa, koja pretpostavlja da do razgradnje organskih spojeva dolazi kada se ti spojevi adsorbiraju na površinu katalizatora ili u blizini. [57] Poznato je prema prethodnim istraživanjima da imatinib

posjeduje veliki adsorpcijski afinitet [56, 58, 59], time zauzima aktivna mjesta na površini fotokatalizatora čime se smanjuje proizvodnja hidroksilnih radikala koji bi sudjelovali u razgradnji torasemida. Imatinib kao „zwitterion“ posjeduje tri konstante disocijacije, pK_{k1} od 2,5, pK_{k2} od 4,0 i pK_{k3} od 8,3. [60, 61] Dakle, njegova druga konstanta disocijacije, pK_{k2} , iznosi 4, upravo kolika je i namještena pH vrijednost ispitivanih otopina. Pri toj vrijednosti imatinib gubi još jedan proton i postaje manje pozitivno nabijena molekula pa je privlačenje s pozitivno nabijenom mrežicom ($pH < pH_{pcz}$) veće (nego što bi bilo pri nižim pH vrijednostima otopine). Osim navedenog, važno je spomenuti i potencijalne transformacijske produkte pojedinog farmaceutika koji se formiraju tokom fotokatalitičke reakcije te se mogu vezati na površinu fotokatalizatora, čime se zauzimaju aktivni centri koji su bitni za vezivanje reaktanata. [28]

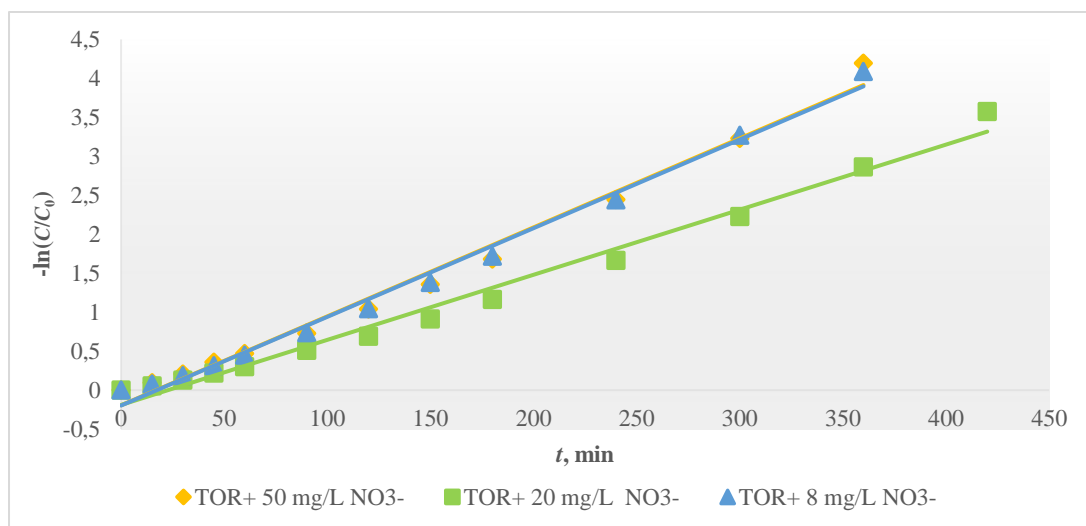
4.3.4. Utjecaj matice vode

U svrhu ispitivanja utjecaja matice vode, odnosno raznih iona koji se mogu pronaći u prirodnim vodama okoliša, pripravljene su otopine NaHCO_3 , NaNO_3 , NaCl i huminske kiseline (HA). Njima se tikvica nadopunjavala do maksimalnog reakcijskog volumena od 100 mL (bez prethodnog namještanja pH kako bi rezultati bili istovjetni s mogućim učincima iz okoliša) uz dodani alikvot otopine torasemida optimalne koncentracija od 5 mg/L. Ispitan je utjecaj tri različite koncentracije pojedinih otopina iona, kako je opisano u odjeljku 3.3.1 budući da su u realnim sustavima sastavi vodenog medija raznoliki.

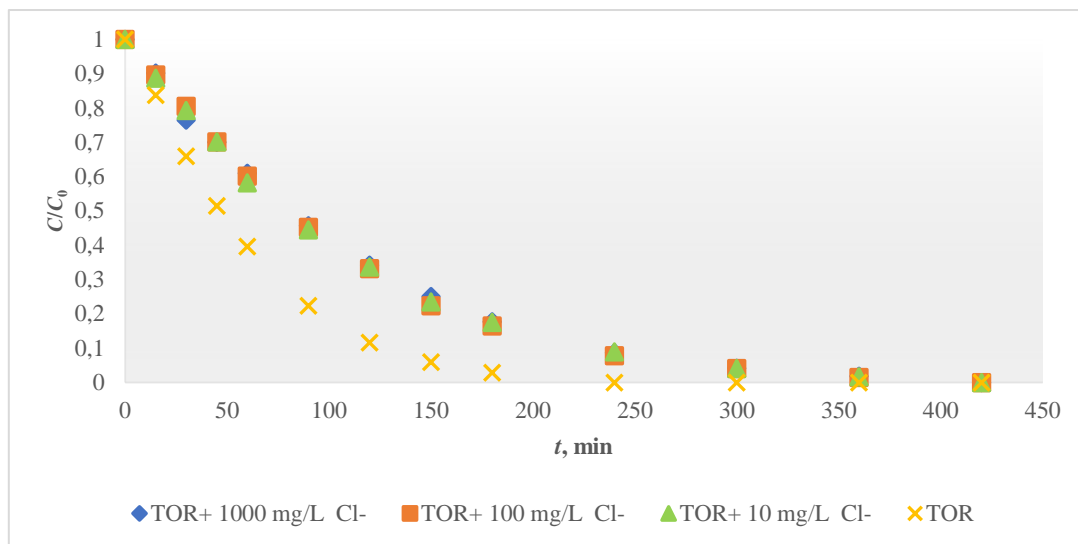
Grafički prikazi rezultata ispitivanja utjecaja hidrogenkarbonata, nitrata, klorida i huminske kiseline na fotokatalitičku razgradnju torasemida prikazani su na Slikama 30., 32., 34. i 36., a pripadajući kinetički modeli na Slikama 31., 33., 35. i 37.



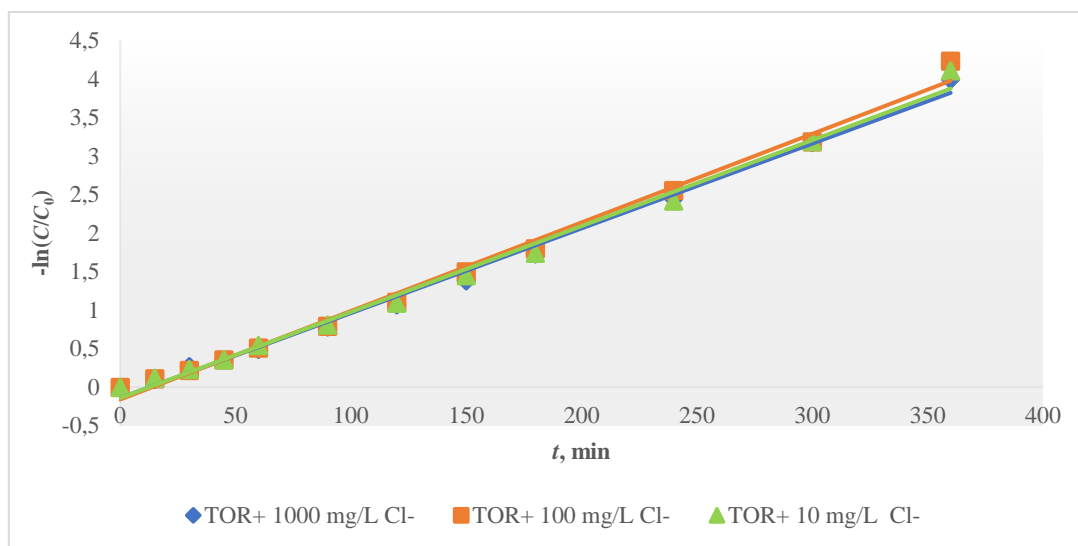
Slika 30. Rezultati ispitivanja utjecaja nitratnih iona na fotokatalitičku razgradnju torasemida



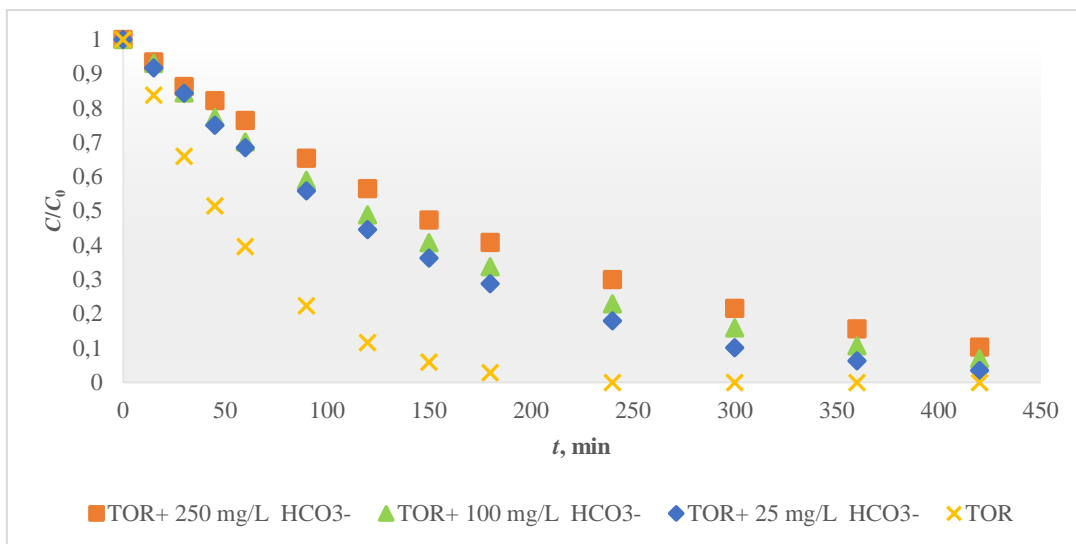
Slika 31. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju nitratnih iona



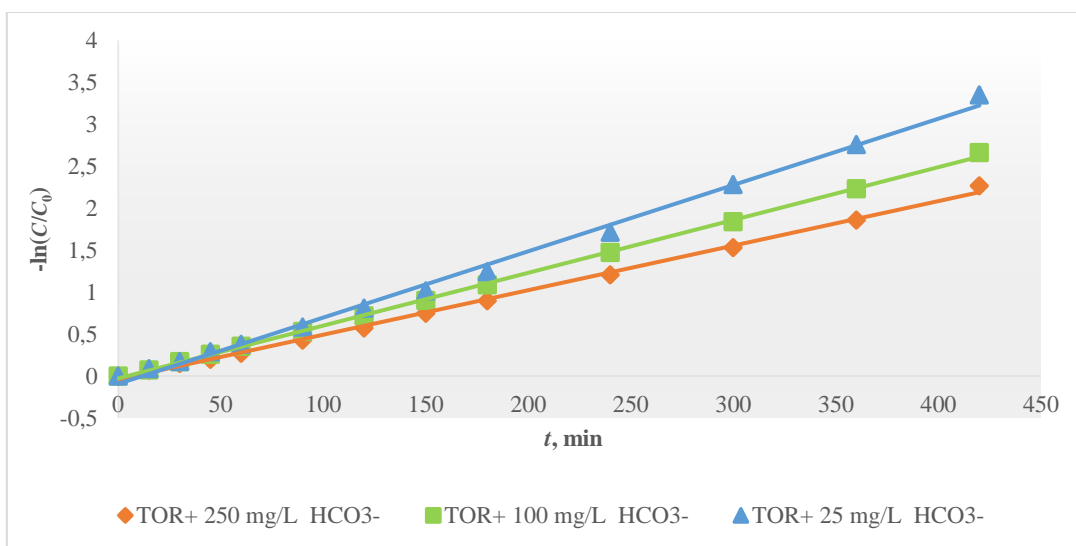
Slika 32. Rezultati ispitivanja utjecaja kloridnih iona na fotokatalitičku razgradnju torasemida



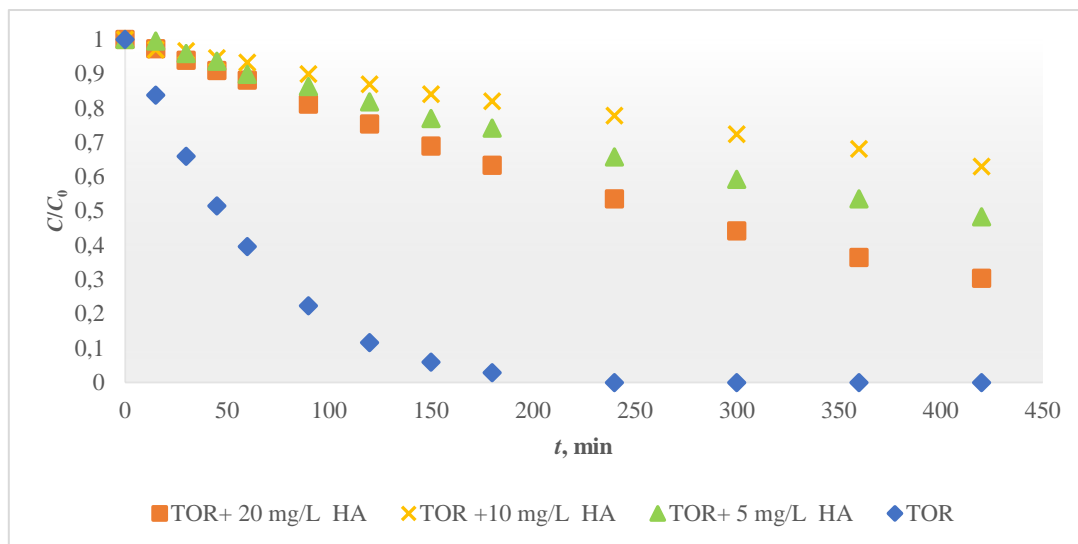
Slika 33. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju kloridnih iona



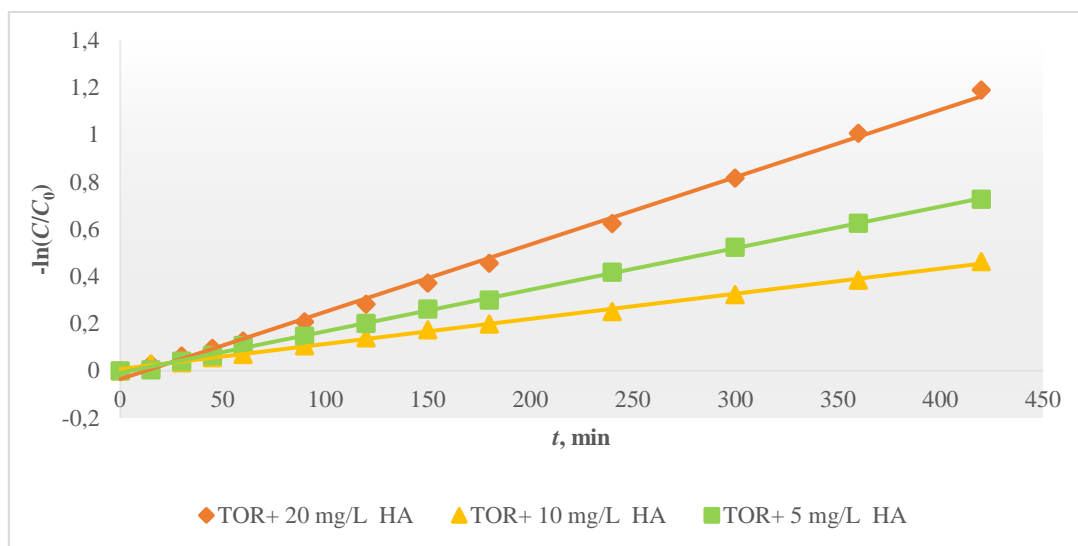
Slika 34. Rezultati ispitivanja utjecaja hidrogenkarbonatnih iona na fotokatalitičku razgradnju torasemida



Slika 35. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju hidrogenkarbonatnih iona



Slika 36. Rezultati ispitivanja utjecaja huminske kiseline na fotokatalitičku razgradnju torasemida



Slika 37. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju huminskih kiselina

U Tablici 11. prikazane su vrijednosti konstante brzine razgradnje i vrijeme poluraspada farmaceutika torasemida prateći kinetički model I. reda pri utjecaju raznih iona.

Tablica 11. Rezultati kinetičkog modela I. reda za ispitivanje utjecaja matice vode na fotokatalitičku razgradnju torasemida

	γ , mg/L	k , min ⁻¹	$t_{1/2}$, h	R^2
NO₃⁻	50	0,0114	1,01	0,9882
	20	0,0083	1,39	0,9865
	8	0,0114	1,01	0,9920
Cl⁻	1000	0,0110	1,05	0,9940
	100	0,0115	1,00	0,9925
	10	0,0112	1,03	0,9928
HCO₃⁻	250	0,0053	2,18	0,9981
	100	0,0063	1,83	0,9995
	25	0,0079	1,46	0,9962
HA	20	0,0029	6,42	0,9972
	10	0,0011	10,50	0,9981
	5	0,0018	3,98	0,9992

Priloženi rezultati iz Tablice 12. ukazuju na to kako prisutnost ispitivanih iona znatno utječe na smanjenje razgradnje torasemida. Kako je prethodno analizirano, konstanta brzine razgradnje farmaceutika pri optimalnim uvjetima iznosila je 0,0199 min⁻¹, a vrijeme poluraspada je iznosilo 0,58 h. Sva količina torasemida pri optimalnim uvjetima razgradila se već nakon 180 min reakcije. Prema priloženim grafičkim prikazima vidljivo je kako je za potpunu razgradnju torasemida u prisutnosti iona bilo potrebno gotovo 8 h koliko se eksperiment provodio. U slučaju dodatka HCO₃⁻ i HA potrebno je i više od ispitivanog vremena. Dodavanje otopina iona otopini torasemida uzrokovalo je produljenje vremena poluraspada farmaceutika za minimalno 50% i drastično smanjilo konstantu brzine reakcije. Najmanja konstanta brzine reakcije razgradnje torasemida zabilježena je dodatkom huminske kiseline koncentracije 10 mg/L pri čemu je $k=0,0011$ min⁻¹, a vrijeme poluraspada iznosi čak 10,5 h. Na razgradnju torasemida prema rezultatima najmanje je utjecao dodatak kloridnih iona pri koncentraciji od 100 mg/L, no k vrijednost je unatoč tomu dosta niska u usporedbi s vrijednosti pri optimalnim uvjetima torasemida bez dodataka. Vrijednosti R^2 sve su redom veće od 0,98 što ukazuje na izvrsno poklapanje dobivenih eksperimentalnih rezultata s praćenim modelom kinetike.

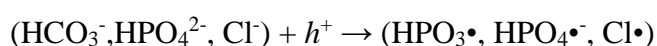
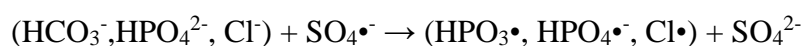
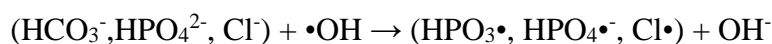
Među ispitanim koncentracijama NO₃⁻ iona, koncentracija od 20 mg/L izazvala je najveće usporenje fotokatalitičke razgradnje torasemida koje je nakon 8 h iznosilo 97%. U

slučaju Cl^- iona najveći utjecaj na razgradnju imala je i najviša koncentracija od 1000 mg/L, no i s tom koncentracijom se nakon 8 h eksperimenta torasemid potpuno razgradio. Dodatak HCO_3^- iona u najvećoj ispitanoj koncentraciji od 250 mg/L izazvao je najveće smanjenje konstante brzine reakcije u odnosu na druge koncentracije hidrogenkarbonata, a razgradnja torasemida nakon 8 h dostigla je 89,6 % od svoje početne koncentracije. I konačno HA u koncentraciji od 10 mg/L najviše utječe na smanjenje razgradnje torasemida koje je nakon cijelog eksperimenta iznosilo tek 37,8 %. Djelovanje iona na fotokatalitičku razgradnju torasemida slijedi niz: $\text{HA} > \text{HCO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Cl}^-$.

Dakle, može se zaključiti kako sve ionske vrste utječu na usporavanje fotokatalitičke razgradnje torasemida, ističući posebice huminsku kiselinu. U svim eksperimentima vidljiv je pad krivulja razgradnje torasemida u vremenu, što znači da, iako nije pri svim uvjetima postignuta 100%-tna razgradnja torasemida, vjerojatno bi se to dogodilo nakon 8 h. U slučaju prisutnosti huminske kiseline proces bi se više odužio.

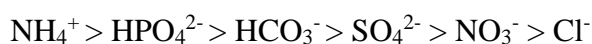
Pretpostavlja se da anorganski ioni smanjuju učinkovitost fotokatalize iz sljedećih razloga:

- a) „hvatanjem“ reaktivnih vrsta kao što su $\bullet\text{OH}$, $\text{SO}_4\bullet^-$ i h^+ iz valentne vrpce TiO_2 kako bi se formirale manje reaktivne vrste prema sljedećim reakcijama:



- b) natječući se s organskim molekulama za adsorpciju na površini TiO_2 . Prema istraživanju iz 2005. [62] pretpostavljeno je da je smanjenje fotokatalitičke učinkovitosti razgradnje metilenskog modrila u prisutnosti anorganskih iona (PO_4^{3-} , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , NO_3^- , Cl^-) uzrokovano stvaranjem sloja anorganske soli na površini TiO_2 koji inhibira pristup molekule metilen modrila, a zatim smanjuje njegovu adsorpciju na površini TiO_2 .

Prema raznim istraživanjima, dobro je poznato da su anorganski ioni više ili manje adsorbirani na površini TiO_2 i mogu se rangirati prema njihovom učinku na kompetitivnu adsorpciju na sljedeći način [18, 25, 63]:



Huminske kiseline definiraju se kao frakcije organske tvari iz tla, a sadrže ugljik, dušik, vodik, kisik i druge tvari u tragovima. [64] Huminske tvari također su posvuda prisutne u vodenim sustavima i mogu utjecati na fotokatalitički proces natječući se s ciljnim spojem za adsorpciju na površini TiO_2 i uklanjanjem $\bullet\text{OH}$ budući da su same bogate elektronima. Osim toga, huminske tvari mogu apsorbirati UV, ali u ovom slučaju mogu nastati reaktivne vrste kao što su hidroksilni radikal i singletni kisik. [63] No u ovom slučaju možemo pretpostaviti kako HA ima veći adsorpcijski afinitet budući da znatno usporava fotokatalitičku razgradnju torasemida.

Prethodno je spomenuto da pH ima učinak na elektrostatski naboj površine TiO_2 koji određuje TiOH^{2+} gustoću skupina, a pri $\text{pH} > \text{pH}_{\text{pzc}}$, TiO_2 je negativno nabijen i očekuje se smanjena adsorpcija aniona; unatoč tome, pretpostavljamo da su HA i HCO_3^{2-} adsorbirane na površini TiO_2 te zbog toga uzrokuju smanjenje razgradnje torasemida, za razliku od NO_3^- i Cl^- koji manje ometaju razgradnju. [63] Zabilježene pH vrijednosti pri početku (pH_1) i na kraju (pH_2) eksperimenata dane su u Tablici 12.

Tablica 12. Izmjerene pH vrijednosti prije i nakon eksperimenta utjecaja iona i otpadne vode na fotokatalitičku razgradnju torasemida

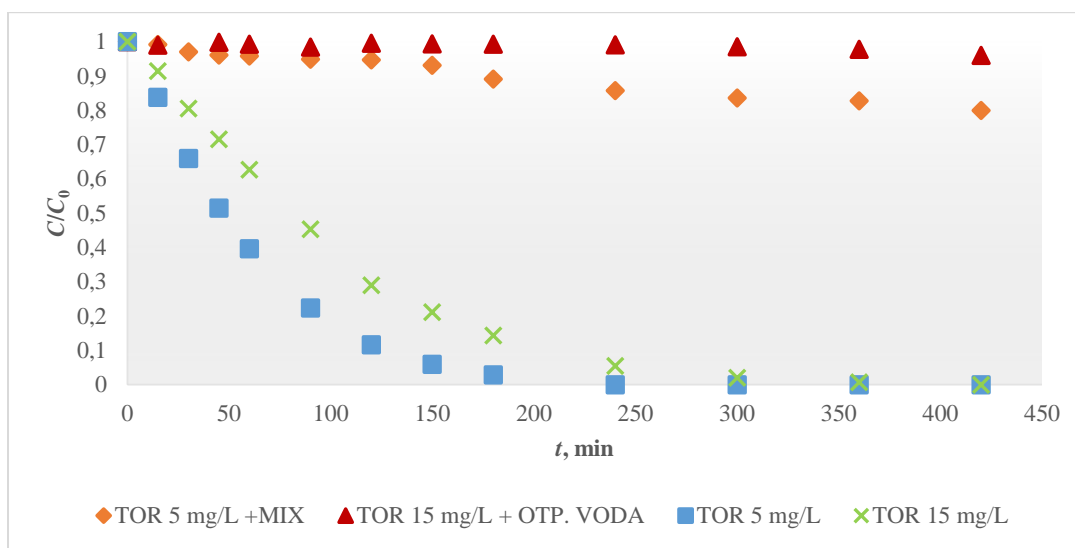
	γ , mg/L	pH_1	pH_2
NO_3^-	50	5,99	4,17
	20	5,88	4,23
	8	5,67	4,29
Cl^-	1000	5,84	4,41
	100	5,59	4,37
	10	5,56	4,32
HCO_3^-	250	8,64	8,24
	100	8,35	7,83
	25	8,2	7,07
HA	5	5,59	7,60
	10	5,48	7,57
	20	8,66	8,04

Ova istraživanja potvrđuju da kataliza na bazi TiO_2 ne samo da izravno reagira s lijekovima, već i adsorbira onečišćujuće tvari kako bi pokrenula proces fotorazgradnje. [25]

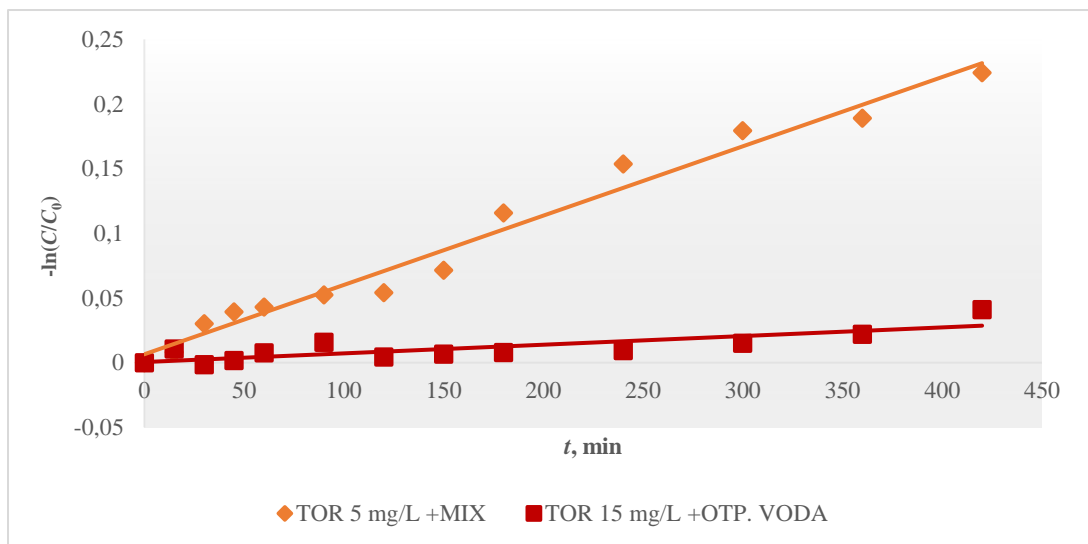
4.3.4.1. Utjecaj smjese iona i primjena realne vode

U nastavku eksperimenta promatran je utjecaj smjese prethodno analiziranih iona u sljedećim koncentracijama: 8 mg/L NO_3^- , 10 mg/L Cl^- , 100 mg/L HCO_3^- i 10 mg/L HA pri optimalnoj koncentraciji torasemida od 5 mg/L. Takva smjesa iona predstavljala bi okolišni uzorak vode, no s poznatim sastavom i bez dodatnih onečišćenja. Uz to, analiziran je i realan uzorak otpadne vode (mješavina bolničke i komunalne kako je opisano u odjeljku 3.3.6.) pri dodanoj koncentraciji torasemida od 15 mg/L. U navedenim eksperimentima pH vrijednost otopina nije bila namještavana.

Grafički prikazi rezultata ispitivanja utjecaja smjese iona hidrogenkarbonata, nitrata, klorida i huminske kiseline te realne otpadne vode na fotokatalitičku razgradnju torasemida prikazani su na Slici 38., a pripadajući kinetički modeli na Slici 39.



Slika 38. Rezultati ispitivanja utjecaja smjese iona i realne otpadne vode na fotokatalitičku razgradnju torasemida



Slika 39. Grafički prikazi kinetičkih modela razgradnje torasemida pri utjecaju smjese iona i realne otpadne vode

U Tablici 13. prikazane su vrijednosti konstante brzine razgradnje i vrijeme poluraspada farmaceutika torasemida prateći kinetički model I. reda pri utjecaju smjese iona i realne otpadne vode.

Tablica 13. Rezultati kinetičkog modela I. reda za ispitivanje utjecaja smjese iona i realnog uzorka vode na fotokatalitičku razgradnju torasemida

	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{h}$	R^2
TOR 5 mg/L+MIX	0,0005	23,10	0,9766
TOR 15 mg/L +OTPADNA VODA	0,00007	165,04	0,6739

Prema Tablici 13. regresijski koeficijent kinetičkog modela za opis utjecaja smjese iona na razgradnju torasemida iznosi 0,98 što ukazuje na zadovoljavajuće slaganje rezultata eksperimenta s modelom. No u slučaju primjene realnog uzorka otpadne vode regresijski koeficijent je puno niži i iznosi 0,6739 što je rezultat vrlo usporene razgradnje torasemida zbog utjecaja kompleksne matrice.

Prema Slici 38. i izračunatim kinetičkim parametrima iz Tablice 13. zaključujemo kako smjesa iona i realni uzorak vode imaju značajan učinak na smanjenje fotokatalitičke razgradnje torasemida. Nakon 8 h eksperimenta razgradnja torasemida pri utjecaju smjese iona dosegla je

17,2% u odnosu na početnu koncentraciju, dok je u prisutnosti otpadne vode tek 4,4%. Konstante brzine razgradnje neusporedivo su male naspram onih pri optimalnim uvjetima, $0,0199 \text{ min}^{-1}$ pri koncentraciji torasemida od 5 mg/L i $0,0136 \text{ min}^{-1}$ pri koncentraciji torasemida od 15 mg/L. Vrijeme poluraspada pri utjecaju smjese iona produljilo se s početnih 0,58 h, odnosno 35 minuta, do jednog dana. U slučaju ispitivanja utjecaja realne otpadne vode pri koncentraciji torasemida od 15 mg/L vrijeme poluraspada se produljilo od 0,85 h (51 minuta) do gotovo 5 dana. Dakle, kompleksne matrice u kojima su prisutne smjese raznih iona i drugih onečišćenja, poput metala u slučaju realne otpadne vode, onemogućavaju fotokatalitičku razgradnju torasemida. U industrijskom smislu ovakvi procesi fotokatalitičkog uklanjanja torasemida u realnim sustavima vjerojatno bi bili neisplativi te je zato nužno optimiranje uvjeta eksperimenta.

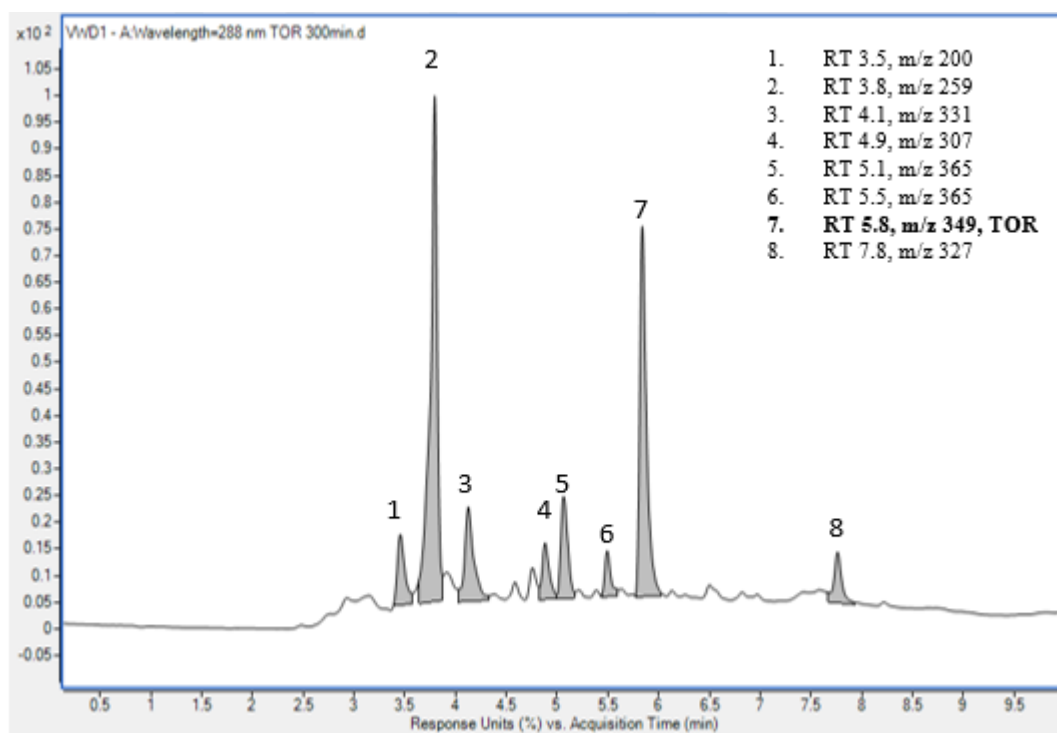
4.3.5. Transformacijski produkti

Iz dosadašnjih analiza možemo zaključiti kako je otkrivanje transformacijskih produkata od velike važnosti budući da uvelike mogu utjecati na tijek razgradnje organskih zagađivala na način da se mogu adsorbirati na aktivno mjesto supstrata i na taj način blokirati adsorpciju analita od važnosti. Također ih je važno poznavati zbog toksičnih rizika koje mogu predstavljati za okoliš, pa u nekim slučajevima mogu biti toksičnijih od primarnih spojeva od kojih potječu.

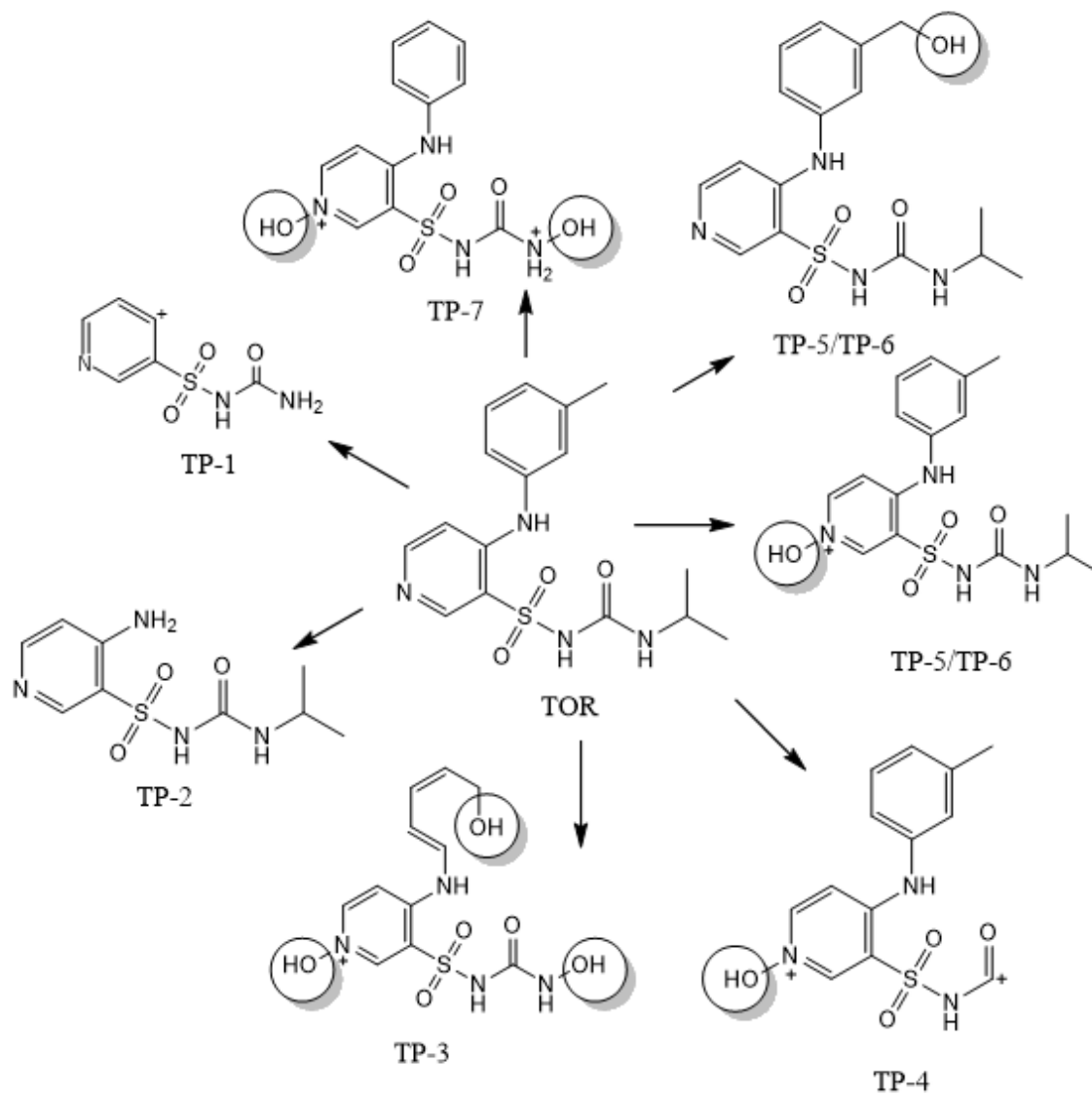
U svrhu otkrivanja transformacijskih produkata torasemida, nakon fotokatalitičke razgradnje pri optimalnim uvjetima (koncentracije 5 mg/L i pH vrijednosti 4) prikupljeni su uzorci kroz 8 h, a zatim analizirani na UPLC uređaju vezanom s MS/MS kao detektorom. U Tablici 14. navedeni su transformacijski produkti torasemida (TP-1–TP-7), njihova vremena zadržavanja i fragmentacije, odnosno produkt ioni prema omjeru mase i naboja [m/z]. Kromatogram torasemida i njegovih transformacijskih produkata prikazan je na Slici 40, a predložene strukture razgradnje na Slici 41. Na Slikama 42., 44., 46., 48., 50., 52., 53. i 55. prikazani su MS/MS spektri torasemida i razgradnih produkata, a na Slikama 43., 45., 47., 49., 51., 54. i 56. mogući načini fragmentacije nastalih transformacijskih produkata.

Tablica 14. Produkti transformacije torasemida

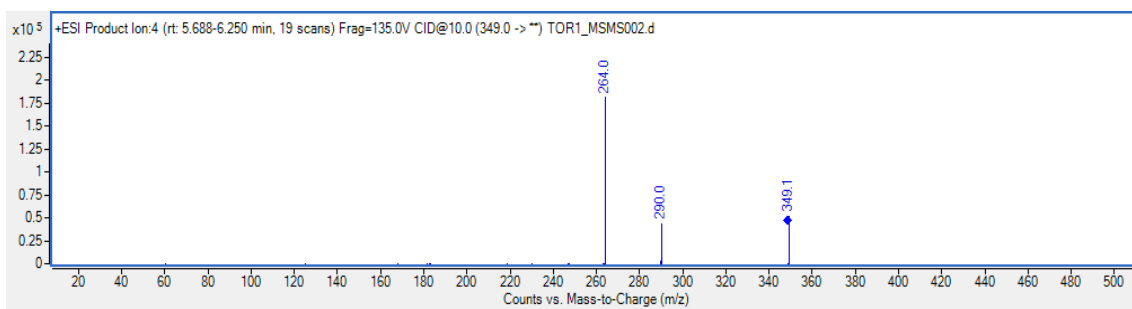
	Vrijeme zadržavanja, t_R , min	Molekulski ion [m/z]	Produkt ioni [m/z]	Kolizijska energija [eV]
TP-1	3,5	200	157, 109, 81	10
TP-2	3,8	259	200, 174, 157	10
TP-3	4,1	331	246, 200, 174	20
TP-4	4,9	307	290, 264, 183	20
TP-5	5,1	365	306, 280	20
TP-6	5,5	365	306, 280	20
TOR	5,8	349	290, 264	10
TP-7	7,8	327	251, 233, 215	30



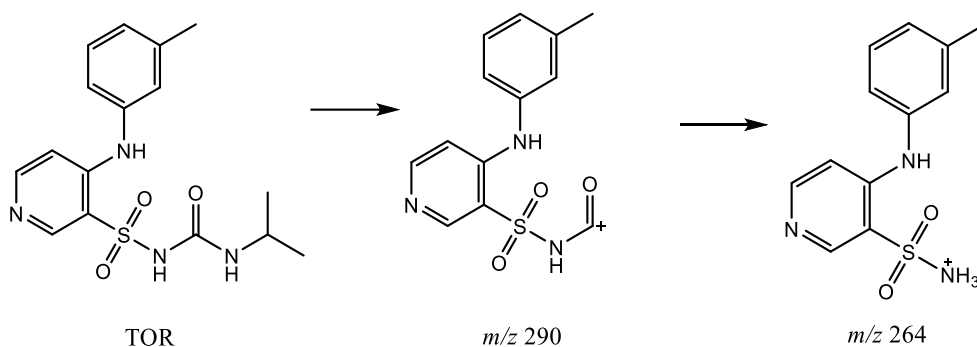
Slika 40. Kromatogram torasemida i njegovih produkata transformacije



Slika 41. Predložene strukture transformacijskih produkata nastalih fotokatalitičkom razgradnjom torasemida

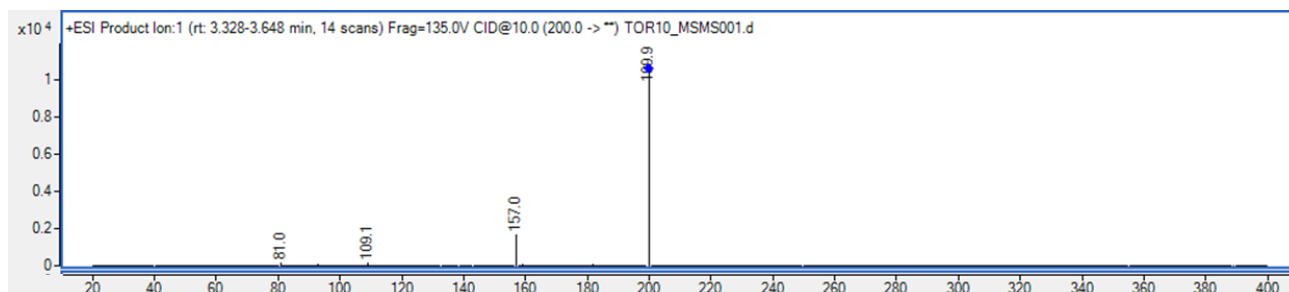


Slika 42. MS/MS spektar torasemida

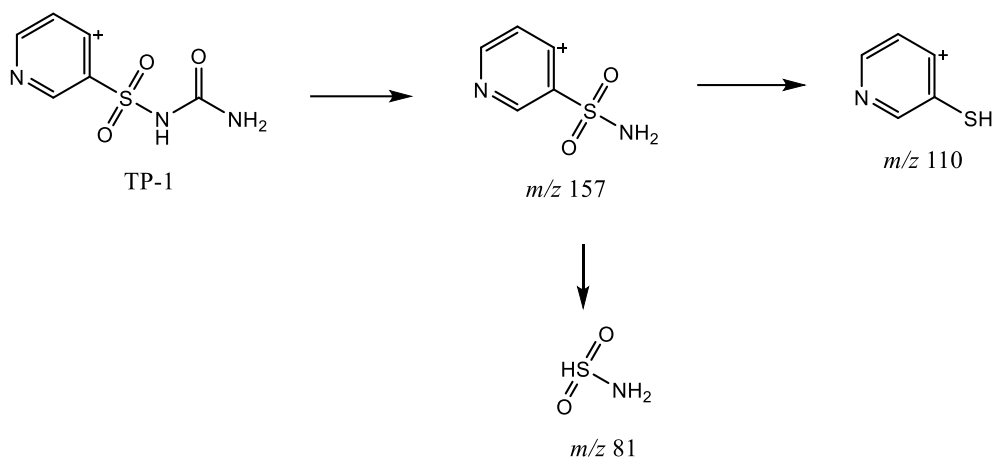


Slika 43. *Moguća fragmentacija torasemida*

Iz priloženog uočavamo kako fragmentacija torasemida započinje cijepanjem lateralne veze NH-CO u strukturi uree i nastavlja se eliminacijom karbonilne skupine. Istraživanjem iz 2013. [65] potvrđeno je da torasemid ima vrlo slabu vezu u strukturi gdje je hidroliza očekivana. Dio sulfoniluree podliježe hidrolizi pri kiselo kataliziranim uvjetima. Prisutnost vode dovodi do gubitka amina i stvaranja derivata karbaminske kiseline (m/z 290). Nadalje, gubitak ugljikovog dioksida iz derivata karbaminske kiseline daje odgovarajući sulfonamid (m/z 264).

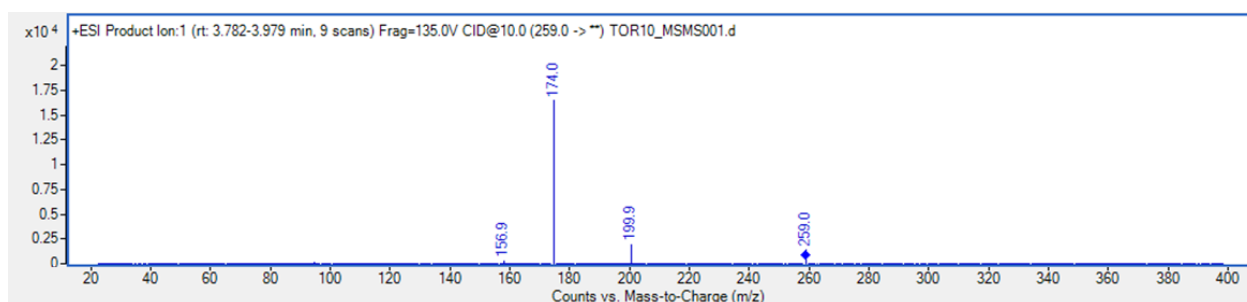


Slika 44. *MS/MS spektar produkta transformacije TP-1*

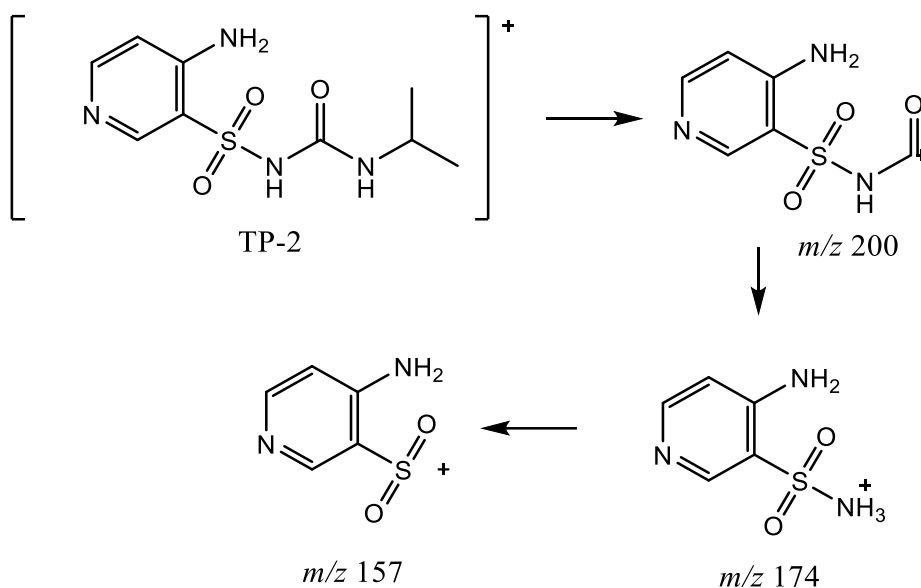


Slika 45. *Moguća fragmentacija TP-1*

TP-1 nastaje odcjepljenjem skupine $-C_7H_8N$ čime se masa umanjuje za 106 te skupine izopropanola, $-C_3H_7$, umanjnjem mase za 43, što zajedno rezultira dobivanjem fragmenta iona m/z 200. TP-1 dalje se može fragmentirati sve do skupine sulfonamida (m/z 81).

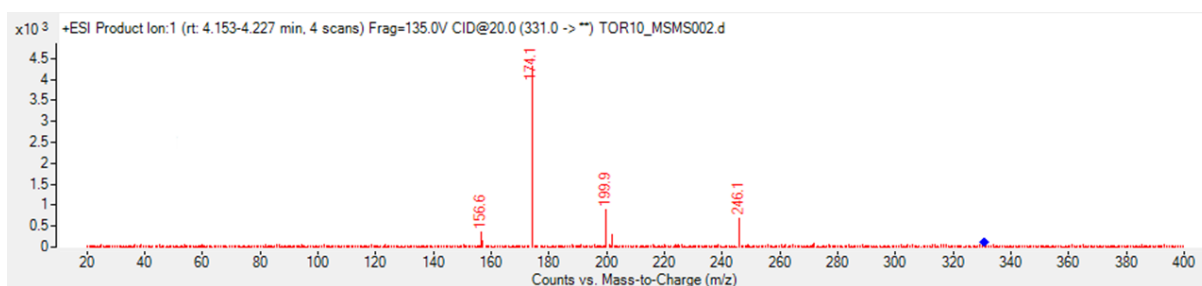


Slika 46. *MS/MS spektar produkta transformacije TP-2*

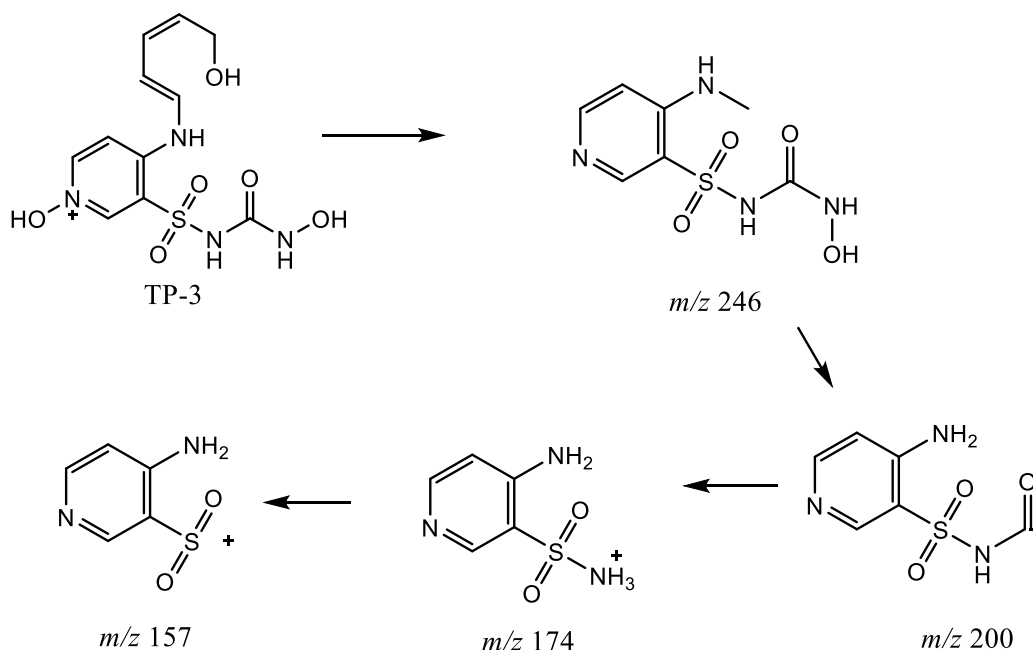


Slika 47. *Moguća fragmentacija TP-2*

TP-2 nastaje odcjepljenjem skupine toluena, $-C_7H_7$, pri čemu se masa umanjuje za 91, a amino skupina ostaje protonirana, stoga dobivamo ion fragmenta od m/z 259. TP-2 se dalje može fragmentirati do produkt iona m/z 157 kako je predloženo na Slici 47.

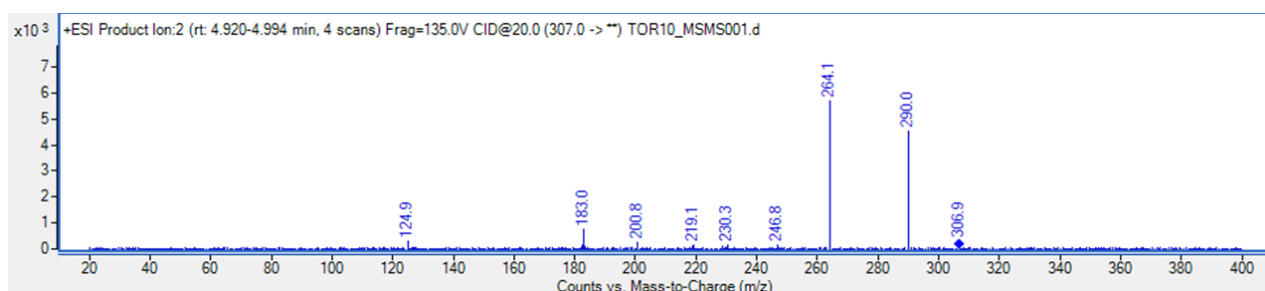


Slika 48. *MS/MS spektar produkta transformacije TP-3*

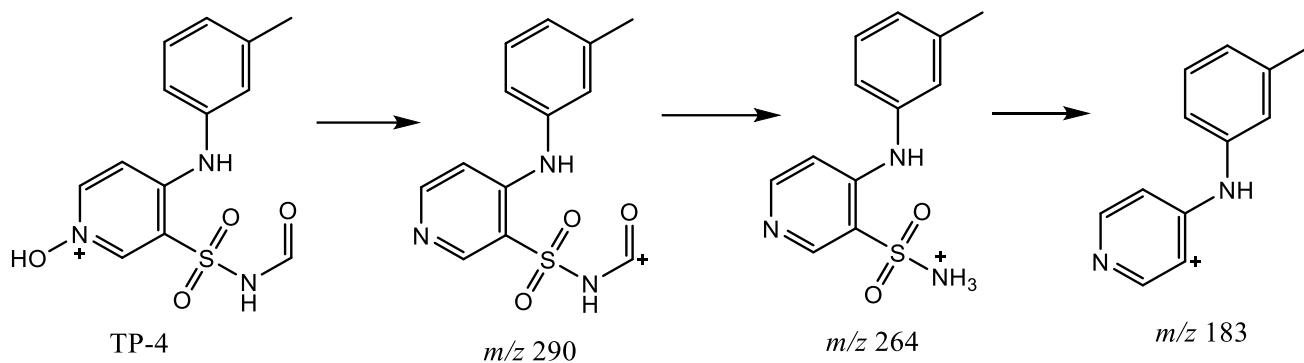


Slika 49. *Moguća fragmentacija TP-3*

TP-3 moguće nastaje cijepanjem unutar aromatskog prstena skupine toluena pri čemu dolazi do izdvajanja -CH i -CH₃ skupine, a na slobodan ugljik veže se hidroksilna skupina. Iz priloženog može se zaključiti kako je vjerojatno hidroksilni radikal, za koji je utvrđeno da u najvećoj mjeri utječe na razgradnju torasemida, zaslužan za stvaranje polisupstituiranog hidroksilirano derivata torasemida, TP-3 (*m/z* 331).

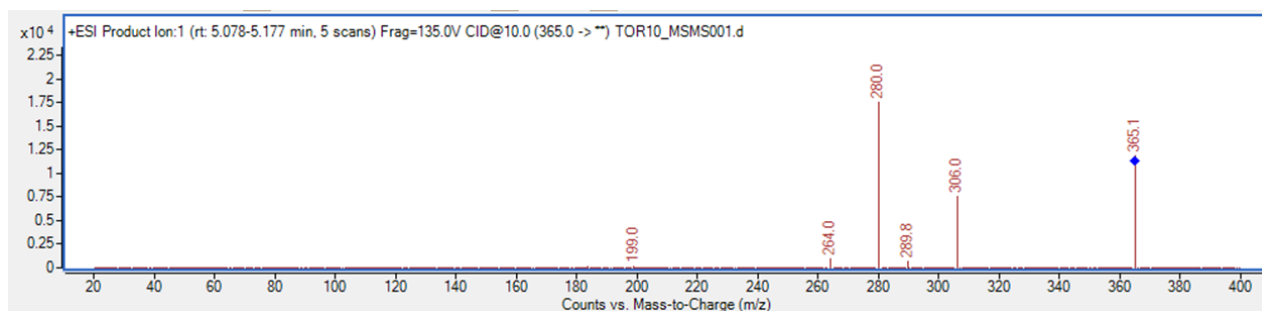


Slika 50. *MS/MS spektar produkta transformacije TP-4*

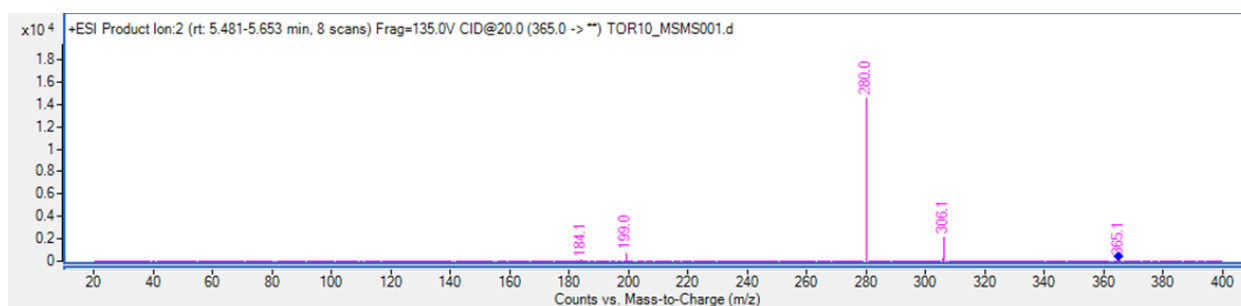


Slika 51. *Moguća fragmentacija TP-4*

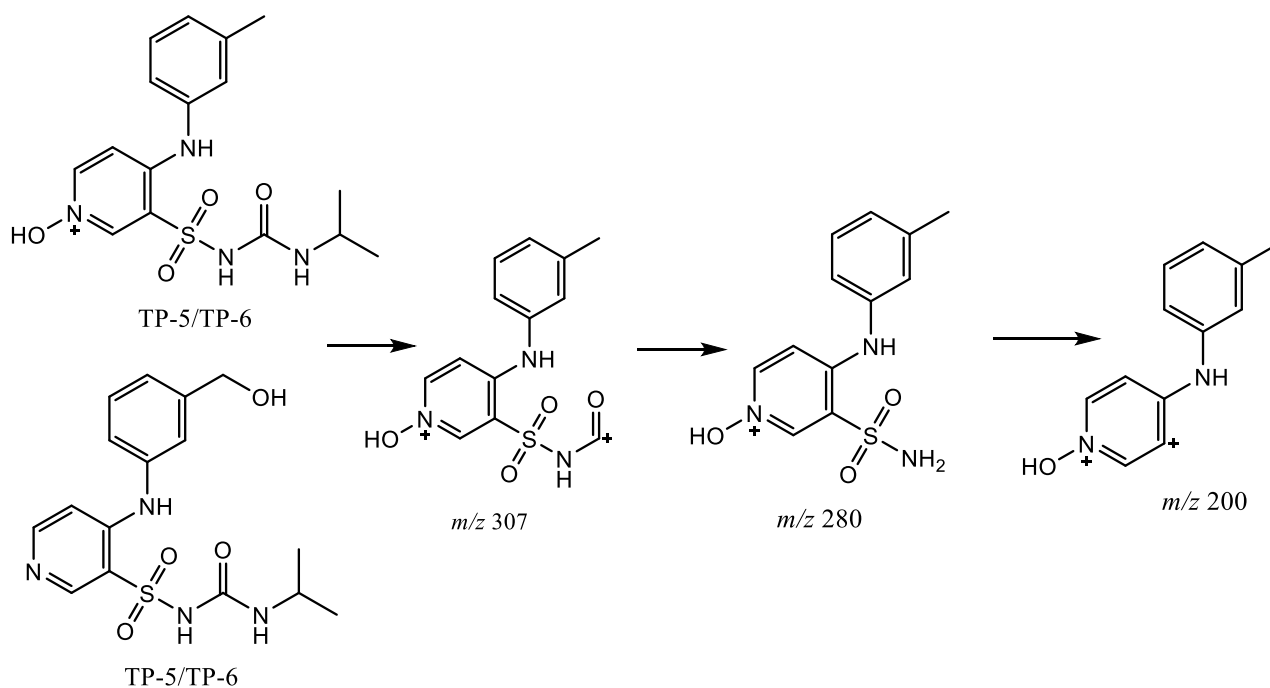
TP-4 može nastati odcjepljenjem 2-aminopropana, $\text{NH-C}_3\text{H}_7$, i hidroksiliranjem piridina, pri čemu nastaje fragmentirani ion m/z 307. Nastali produkt može se fragmentirati na nekoliko produkt iona kako je vidljivo na MS/MS spektru, a predložena fragmentacija ide do sekundarnog amina m/z 183.



Slika 52. *MS/MS spektar produkta transformacije TP-5*

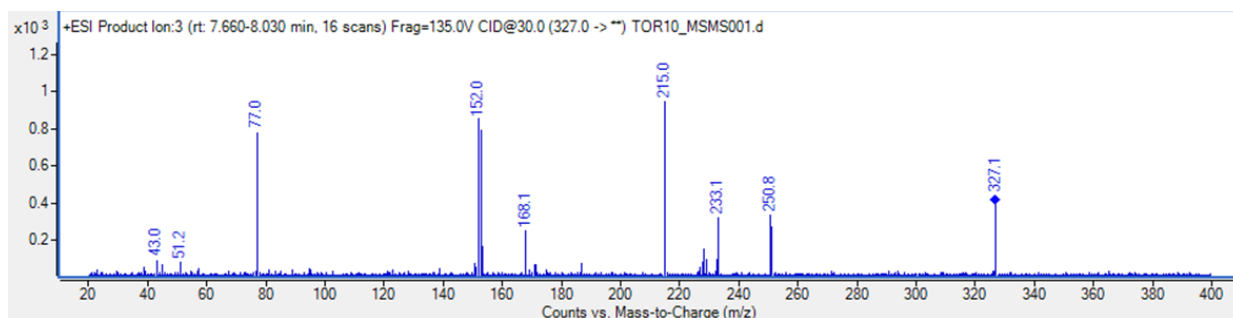


Slika 53. *MS/MS spektar produkta transformacije TP-6*

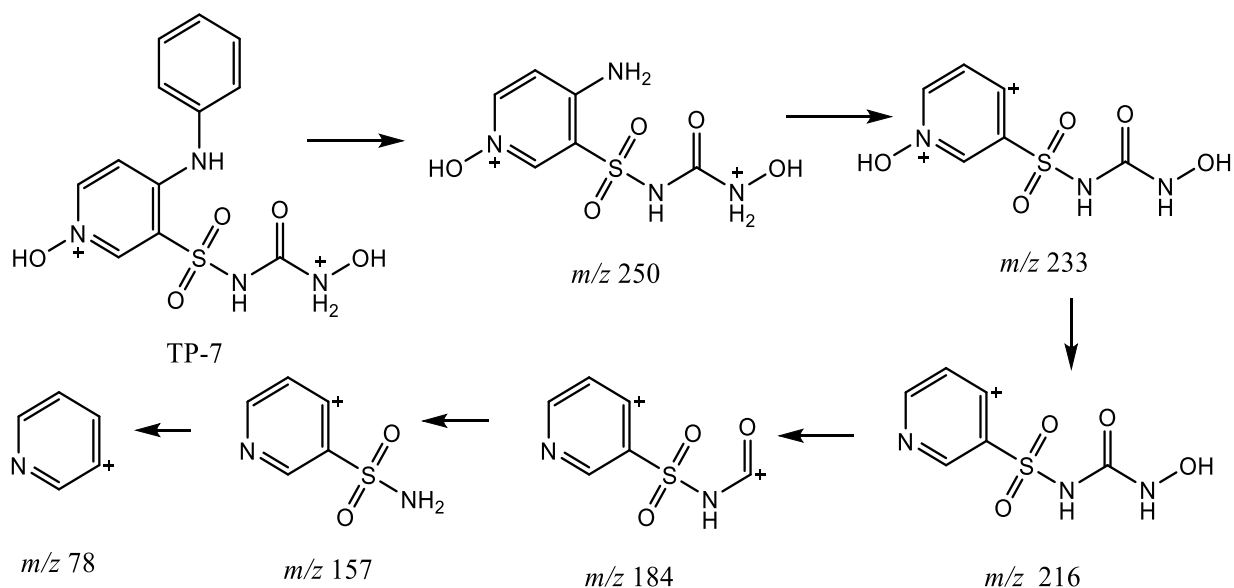


Slika 54. Moguća fragmentacija TP-5 i TP-6

TP-5 i TP-6 različitih vremena zadržavanja prema literaturi nastaju oksidacijom torasemida, odnosno vezanjem kisika na dušik iz piridina, budući da je razlika između m/z 349 nerazgrađenog torasemida i m/z 365 fragmentiranih iona TP-5 i TP-6 upravo 16, što odgovara masi kisika. [65, 66] Također, hidroksilna skupina može se vezati na metilnu skupinu toulena.



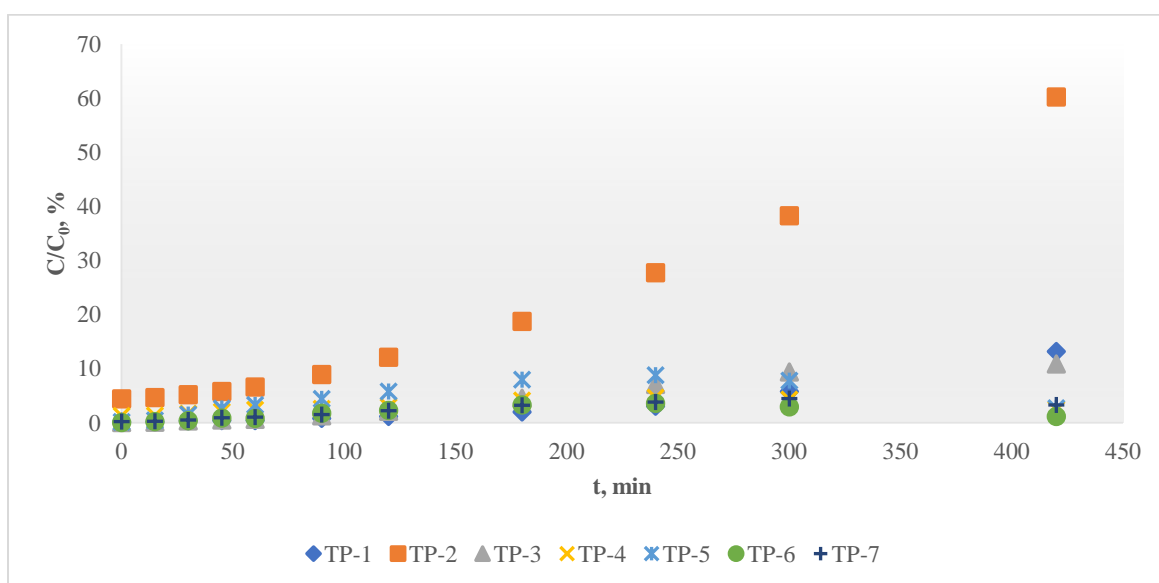
Slika 55. MS/MS spektar produkta transformacije TP-7



Slika 56. Moguća fragmentacija TP-7

Posljednji detektirani transformacijski produkt torasemida, TP-7, razlikuje se u masi u odnosu na nerazgrađeni torasemid za 23, što odgovara odcijepljenoj metilnoj skupini toluena i izopropanu te oksidiranim dušikovim atomima hidroksilnim skupinama, što u konačnici daje omjer m/z 326. Nadalje se dobiveni produkt može fragmentirati sve do pozitivnog piridina, m/z 78, ili benzena, m/z 77.

Na Slici 57. prikazan je vremenski tijek nastajanja pojedinih produkata transformacije torasemida u postocima.



Slika 57. Vremenski prikaz nastajanja transformacijskih produkata

Iz priloženih rezultata spektrometra masa vidljivo je kako nastaje 7 različitih produkata transformacije torasemida. Prema Slici 57., unutar promatranih 8 h, vidljivo je kako koncentracija TP-2 eksponencijalno raste te je njegova koncentracija u odnosu na ostale produkte najveća. Također, raste koncentracija TP-1, TP-2 i TP-3 produkta, no puno sporijim tempom u odnosu na TP-2. Koncentracija produkata TP-4, TP-5, TP-6 i TP-7 unutar 8 h raste, ali već i opada, što znači da u tom vremenu dolazi i do njihove razgradnje.

5. *ZAKLJUČAK*

Ovim eksperimentalnim radom opisana je fotokatalitička razgradnja torasemida, iz farmaceutske skupine diuretika, uz TiO_2 kao fotokatalizator imobiliziran na staklene mrežice. Najprije je odrađena validacija metode kako bi se potvrdila prikladnost metode za ovu svrhu ispitivanja. Nakon toga su uslijedili preliminarni testovi hidrolize, adsorpcije i fotolize kako bi odredili koliki stvarni učinak imaju ovi procesi zasebno na razgradnju torasemida. Uslijedilo je ispitivanje utjecaja raznih parametara na fotokatalizu: utjecaj pH vrijednosti i početne koncentracije otopine farmaceutika, utjecaj „hvatača“ radikala, utjecaj drugog farmaceutika imatiniba, raznih iona koji mogu biti prisutni u matici vode, njihove smjese te realnog uzorka otpadne vode. Završno su analizirani transformacijski produkti torasemida. Iz ispitivanja fotokatalitičke razgradnje torasemida može se zaključiti sljedeće:

- ❖ Provedbom validacije utvrđeno je da je metoda linearna, osjetljiva i precizna uz granicu detekcije od 0,003 mg/L i granicu kvantifikacije od 0,009 mg/L.
- ❖ Preliminarni eksperimenti nisu se pokazali kao vodeći procesi u razgradnji torasemida, stoga se rezultati razgradnje torasemida pripisuju isključivo fotokatalitičkom procesu.
- ❖ Ispitivanjem utjecaja pH vrijednosti i početne koncentracije otopine torasemida na fotokatalitičku razgradnju određeni su optimalni uvjeti eksperimenta koji iznose pH 4 i 5 mg/L. Konstanta brzine razgradnje iznosi $0,199 \text{ min}^{-1}$, a vrijeme poluraspada farmaceutika 34,83 min.
- ❖ Potpuna razgradnja torasemida ostvariva je i pri drugim vrijednostima pH i koncentracije, no konstante brzine su manje.
- ❖ Tijekom ispitivanja „hvatača radikala“ utvrđeno je da glavnu ulogu u razgradnji torasemida imaju hidroksilni radikali budući da se dodatkom izopropanola konstanta brzine razgradnje smanjila na $0,0007 \text{ min}^{-1}$, a vrijeme poluraspada produljilo na 16,5 h.
- ❖ Dodatak imatiniba rezultira smanjenjem brzine razgradnje torasemida, pri čemu veća koncentracija imatiniba više otežava razgradnju.
- ❖ Rezultati utjecaja matice vode daju do znanja kako na fotokatalitičku razgradnju utječu prisutni ioni u vodenom mediju. Najveće usporenje razgradnje torasemida ostvarilo se dodatkom huminske kiseline, a najmanji utjecaj na razgradnju imaju kloridni ioni.
- ❖ Dodatkom smjese svih ispitivanih iona i realne otpadne vode rezultati se uvelike mijenjaju jer se razgradnja torasemida znatno usporila. Dodatkom smjese iona razgradnja je nakon 8 h eksperimenta dosegla 17,2%, a u slučaju primjene otpadne vode koja je koncentrirana raznim zagađivačima doseže tek 4,4%.

- ❖ Spektrometrijom masa potvrđena je prisutnost 7 različitih transformacijskih produkata od kojih je TP-2 s omjerom m/z od 259 najzastupljeniji i najstabilniji budući da se ne razgrađuje ni nakon 8 sati eksperimenta.

Napredni proces oksidacije nedvojbeno je pokazao svoju izrazitu sposobnost u obradi organskih zagađivala prisutnih u prirodi i daleko je učinkovitiji od konvencionalnih tehnika. No ipak, njegovi visoki operativni troškovi predstavljaju prepreku njegovoj širokoj primjeni u industrijskim razmjerima. Potreban je veći naglasak na ekonomskoj izvedivosti i održivosti procesa kako bi se njime upravljalo u velikim razmjerima, što bi se moglo postići uporabom u kombinaciji s konvencionalnim tehnikama, optimizacijom procesa i mnogim drugim alternativnim načinima.

6. *POPIS SIMBOLA*

WWTP- postrojenje za pročišćavanje otpadnih voda

PhAC- farmaceutski aktivni spojevi

NSAID- nesteroidni protuupalni lijekovi

AOP- napredni oksidacijski procesi

TiO₂- titanijev dioksid

HPLC- tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

DAD- detektora s nizom dioda

MS- spektrometrija masa

C- koncentracija analita

C₀- početna koncentracija analita

k- konstanta brzine reakcije

t_{1/2}- vrijeme poluraspada

R²- regresijski koeficijent

RSD- relativno standardno odstupanje

GD- granica detekcije

GK- granica kvantifikacije

TOR- torasemid

IMT- imatinib

pK_k- konstante disocijacije

pH_{pzc}- izoelektrična točka

TP- transformacijski produkt

m/z- omjer mase i naboja

7. LITERATURA

- [1] C. R. dos Santos, G. S. Arcanjo, L. V. de Souza Santos, K. Koch, M. C. S. Amaral, Aquatic concentration and risk assessment of pharmaceutically active compounds in the environment, *Environmental Pollution* **290** (2021) 118049.
- [2] K. B. Arun, A. Madhavan, A. Tarafdar, R. Sirohi, A. N. Anoopkumar, L. L. Kuriakose, M. K. Awasthi, P. Binod, S. Varjani, R. Sindhu, Filamentous fungi for pharmaceutical compounds degradation in the environment: A sustainable approach, *Environmental Technology & Innovation* **31** (2023) 103182.
- [3] T. aus der Beek, F.-A. Weber, A. Bergmann, *Pharmaceuticals in the environment: Global occurrence and potential cooperative action under the Strategic Approach to International Chemicals Management (SAICM)*, IWW Rheinisch-Westfälisches Institut für Wasser (2016) str. 22-55.
- [4] M. Zrnčić, M. Gros, S. Babić, M. Kaštelan-Macan, D. Barcelo, M. Petrović, Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry, *Chemosphere* **99** (2014) 224.–232.
- [5] World Health Organization (WHO) (2014), World Health Statistics 2014. http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112738/1/9789240692671_eng.pdf (Pristup 7.6.2023.)
- [6] Š. Ukić, M. Sigurnjak, M. Cvetnić, M. Markić, M. Novak Stankov, M. Rogošić, B. Rasulev, A. Lončarić Božić, H. Kušić, T. Bolanča, Toxicity of pharmaceuticals in binary mixtures: Assessment by additive and non-additive toxicity models, *Ecotoxicology and Environmental Safety* **185** (2019) 109696.
- [7] L. Mzukisi Madikizela, S. Ncube, H. Tutu, H. Richards, B. Newman, K. Ndungu, L. Chimuka, Pharmaceuticals and their metabolites in the marine environment: Sources, analytical methods and occurrence, *Trends in Environmental Analytical Chemistry* **28** (2020) e00104.
- [8] A. Küster, N. Adler, Pharmaceuticals in the environment: Scientific evidence of risks and its regulation, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **369** (2014) 1656.
- [9] V. Vrček, Farmakoekologija—okolišna sudbina lijekova, *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **66**(3-4) (2017) 135-144.

- [10] <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A52019DC0128>
(Pristup 10.6.2023.)
- [11] S. Kumar, B. Pratap, D. Dubey, A. Kumar, S. Shukla, V. Dutta, Constructed wetlands for the removal of pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) from wastewater: origin, impacts, treatment methods, and SWOT analysis, *Environmental Monitoring and Assessment* **194**(12) (2022) 885.
- [12] K. Samal, S. Mahapatra, M. Hibzur Ali, Pharmaceutical wastewater as Emerging Contaminants (EC): Treatment technologies, impact on environment and human health, *Energy Nexus* **6** (2022) 100076.
- [13] D. Dolar, T. Ignjatić Zokić, K. Košutić, D. Ašperger, D. Mutavdžić Pavlović, RO/NF membrane treatment of veterinary pharmaceutical wastewater: Comparison of results obtained on a laboratory and a pilot scale, *Environmental Science and Pollution Research* **19**(4) (2012) 1033–1042.
- [14] R. Hernández-Tenorio, E. González-Juárez, J. L. Guzmán-Mar, L. Hinojosa-Reyes, A. Hernández-Ramírez, Review of occurrence of pharmaceuticals worldwide for estimating concentration ranges in aquatic environments at the end of the last decade, *Journal of Hazardous Materials Advances* **8** (2022) 100172.
- [15] C. Di Marcantonio, A. Chiavola, V. Gioia, A. Frugis, G. Cecchini, C. Ceci, M. Spizzirri, M. R. Boni, Impact of COVID19 restrictions on organic micropollutants in wastewater treatment plants and human consumption rates, *Science of the Total Environment* **811** (2022) 152327.
- [16] M. Al Aukidy, P. Verlicchi, A. Jelić, M. Petrović, D. Barcelò, Monitoring release of pharmaceutical compounds: Occurrence and environmental risk assessment of two WWTP effluents and their receiving bodies in the Po Valley, Italy, *Science of the Total Environment* **438** (2012) 15–25.
- [17] V. Kumar, S. K. Lakkaboyana, N. Sharma, P. Chakraborty, M. Umesh, R. Pasrija, J. Thomas, V. U. Kalebar, I. Jayaraj, M. Kumar Awasthi, T. Das, A. A. Oladipo, D. Barcelo, L. F. Dumeé, A critical assessment of technical advances in pharmaceutical removal from wastewater – A critical review, *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering* **8** (2023) 100363.
- [18] P. Kumari, A. Kumar, Advanced oxidation process: A remediation technique for organic

- and non-biodegradable pollutant, *Results in Surfaces and Interfaces* **11** (2023) 100122.
- [19] Y. Wang, Y. Li, A. Hu, A. Rashid, M. Ashfaq, Y. Wang, H. Wang, H. Luo, C.-P. Yu, Q. Sun, Monitoring, mass balance and fate of pharmaceuticals and personal care products in seven wastewater treatment plants in Xiamen City, China, *Journal of Hazardous Materials* **354** (2018) 81–90.
- [20] M. Papageorgiou, C. Kosma, D. Lambropoulou, Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece, *Science of the Total Environment* **543** (2016) 547–569.
- [21] C. I. Kosma, D. A. Lambropoulou, T. A. Albanis, Investigation of PPCPs in wastewater treatment plants in Greece: Occurrence, removal and environmental risk assessment, *Science of the Total Environment* **466–467** (2014) 421–438.
- [22] M. Antonopoulou, C. Kosma, T. Albanis, I. Konstantinou, An overview of homogeneous and heterogeneous photocatalysis applications for the removal of pharmaceutical compounds from real or synthetic hospital wastewaters under lab or pilot scale, *Science of the Total Environment* **765** (2021) 144163.
- [23] S. H. Khan, V. K. Yadav, Advanced Oxidation Processes for Wastewater Remediation: An Overview, In: *Removal of Emerging Contaminants Through Microbial Processes* (ur. M. P. Shah), Springer, Singapore 2021., str. 71–93.
- [24] M. Długosz, P. Zmudzki, A. Kwiecień, K. Szczubiałka, J. Krzek, M. Nowakowska, Photocatalytic degradation of sulfamethoxazole in aqueous solution using a floating TiO₂-expanded perlite photocatalyst, *Journal of Hazardous Materials* **298** (2015) 146–153.
- [25] D. N. Nguyen, H. M. Bui, H. Q. Nguyen, Heterogeneous photocatalysis for the removal of pharmaceutical compounds, In: *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering* (ur. S. Varjani, A. Pandey, R. D. Tyagi, H. H. Ngo, C. Larroche), Elsevier 2020., str.161-183.
- [26] M. Malakootian, A. Nasiri, M. Amiri Gharaghani, Photocatalytic degradation of ciprofloxacin antibiotic by TiO₂ nanoparticles immobilized on a glass plate, *Chemical Engineering Communications* **207**(1) (2020) 56–72.

- [27] J. Trawiński, R. Skibiński, Studies on photodegradation process of psychotropic drugs: a review, *Environmental Science and Pollution Research* **24**(2) (2017) 1152–1199.
- [28] F. Jović, V. Tomašić, Heterogena fotokataliza: Osnove i primjena za obradu onečišćenog zraka, *Kemija u industriji: Časopis kemičara i kemijskih inženjera Hrvatske* **60**(7-8) (2011) 387-403.
- [29] C. Daou, S. Rafqah, F. Najjar, H. Anane, A. Piram, A. Hamade, S. Briche, P. Wong-Wah-Chung, TiO₂ and activated carbon of Argania Spinosa tree nutshells composites for the adsorption photocatalysis removal of pharmaceuticals from aqueous solution, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **388** (2020) 112183.
- [30] J.-M. Herrmann, Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants, *Catalysis Today* **53** (1999) 115–129.
- [31] K. V. Kumar, K. Porkodi, F. Rocha, Langmuir-Hinshelwood kinetics - A theoretical study, *Catalysis Communications* **9**(1) (2008) 82–84.
- [32] J. M. Herrmann, Fundamentals and misconceptions in photocatalysis, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **216**(2–3) (2010) 85–93.
- [33] B. Ohtani, Photocatalysis A to Z-What we know and what we do not know in a scientific sense, *Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **11**(4) (2010) 157–178.
- [34] A. Kot-Wasik, J. Debska, J. Namieśnik, Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and personal-care products, *Trends in Analytical Chemistry* **26**(6) (2007) 557–568.
- [35] A. Braithwaite, J. F. Smith, Chromatographic methods, *Springer Science & Business Media* (2012) str. 7.
- [36] <https://microbenotes.com/high-performance-liquid-chromatography-hplc/>
(Pristup 20.7.2023.)
- [37] S. Babić, D. Ašperger, D. Mutavdžić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater, *Talanta* **70**(4) (2006) 732–738.
- [38] M. R. Siddiqui, Z. A. AlOthman, N. Rahman, Analytical techniques in pharmaceutical

- analysis: A review, *Arabian Journal of Chemistry* **10** (2017) S1409–S1421.
- [39] M. Petrović, M. D. Hernando, M. S. Díaz-Cruz, D. Barceló, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the analysis of pharmaceutical residues in environmental samples: A review, *Journal of Chromatography A* **1067**(1–2) (2005) 1–14.
- [40] A. Vrabec, Primjena spektrometrije masa u analizi biljnih pripravaka s ciljem pronalaska ilegalnih farmaceutski aktivnih tvari, *Završni rad*, Prehrambeno-biotehnološki Fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2021.
- [41] M. D. Hernando, M. J. Gómez, A. Agüera, A. R. Fernández-Alba, LC-MS analysis of basic pharmaceuticals (beta-blockers and anti-ulcer agents) in wastewater and surface water, *Trends in Analytical Chemistry* **26**(6) (2007) 581–594.
- [42] C. Hao, X. Zhao, P. Yang, GC-MS and HPLC-MS analysis of bioactive pharmaceuticals and personal-care products in environmental matrices, *Trends in Analytical Chemistry* **26**(6) (2007) 569–580.
- [43] L. Z. Zhou, Handbook of Pharmaceutical Analysis by HPLC, *Separation Science and Technology* **6** (2005) 499–568.
- [44] M. W. Vernon, R. C. Heel, R. N. Brogden, Enoximone: A Review of its Pharmacological Properties and Therapeutic Potential, *Drugs* **42**(6) (1991) 997–1017.
- [45] J. M. Rollinger, E. M. Gstrein, A. Burger, Crystal forms of torasemide: New insights, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **53**(1) (2002) 75–86.
- [46] S. Lege, J. Sorwat, J. E. Yanez Heras, C. Zwiener, Abiotic and biotic transformation of torasemide - Occurrence of degradation products in the aquatic environment, *Water Research* **177** (2020) 115753.
- [47] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Torseamide>. (Pristup 3.7.2023.)
- [48] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00214>. (Pristup 3.7.2023.)
- [49] M. Pulpeiro Gutiérrez, Advanced processes for the removal of organic micropollutants from wastewater by the addition of powdered activated carbon to membrane bioreactor *Doktorska disertacija (Cotutelle)* Sveučilište u Ferrari, Italija i Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, 2023.
- [50] C. Orona-Návar, I. Levchuk, J. Moreno-Andrés, Y. Park, A. Mikola, J. Mahlkecht, M.

- Sillanpää, N. Ornelas-Soto, Removal of pharmaceutically active compounds (PhACs) and bacteria inactivation from urban wastewater effluents by UVA-LED photocatalysis with Gd^{3+} doped $BiVO_4$, *Journal of Environmental Chemical Engineering* **8**(6) (2020).
- [51] J. J. Rueda-Márquez, C. Palacios-Villarreal, M. Manzano, E. Blanco, M. Ramírez del Solar, I. Levchuk, Photocatalytic degradation of pharmaceutically active compounds (PhACs) in urban wastewater treatment plants effluents under controlled and natural solar irradiation using immobilized TiO_2 , *Solar Energy* **208** (2020) 480–492.
- [52] D. K. Dhaked, P. V. Bharatam, On the stability of zwitterions of pyridine sulfonylureas: The effect of isosterism, acidity, and microsolvation, *The Journal of Physical Chemistry A* **118**(1) (2014) 187–196.
- [53] M. Garg, M. K. Singh, S. M. Koli, B. Sreedhar, S. Ramakrishna, J. B. Nanubolu, Crystalline salts of a diuretic drug torasemide with improved solubility and dissolution properties, *CrystEngCom* **24**(23) (2022) 4235-4250.
- [54] H. Yang, G. Li, T. An, Y. Gao, J. Fu, Photocatalytic degradation kinetics and mechanism of environmental pharmaceuticals in aqueous suspension of TiO_2 : A case of sulfa drugs, *Catalysis Today* **153**(3–4) (2010) 200–207.
- [55] Y. Ye, Y. Feng, H. Bruning, D. Yntema, H. H. M. Rijnaarts, Photocatalytic degradation of metoprolol by TiO_2 nanotube arrays and UV-LED: Effects of catalyst properties, operational parameters, commonly present water constituents, and photo-induced reactive species, *Applied Catalysis B: Environmental* **220** (2018) 171–181.
- [56] P.H. Secrétan, M. Karoui, H. Sadou Yayé, Y. Levi, L. Tortolano, A. Solgadi, N. Yagoubi, B. Do, Imatinib: Major photocatalytic degradation pathways in aqueous media and the relative toxicity of its transformation products, *Science of the Total Environment* **655** (2019) 547–556.
- [57] M. A. Barros, M. J. Sampaio, A. R. Ribeiro, C. G. Silva, A. M. T. Silva, J. L. Faria, Interactions of pharmaceutical compounds in water matrices under visible-driven photocatalysis, *Journal of Environmental Chemical Engineering* **9**(2) (2021) 104747.
- [58] K. Duić, Sorpcija imatiniba na staklenu mrežicu s imobiliziranim TiO_2 , *Završni rad*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2020.
- [59] M. Pranjić, Sorpcija imatiniba na staklenu mrežicu s TiO_2 i ugljikovim nanocijevima,

Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2020.

- [60] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Imatinib>. (Pristup 4.8.2023.)
- [61] <https://go.drugbank.com/drugs/DB00619>. (Pristup 4.8.2023.)
- [62] C. Guillard, E. Puzenat, H. Lachheb, A. Houas, J. M. Herrmann, Why inorganic salts decrease the TiO₂ photocatalytic efficiency, *International Journal of Photoenergy* **7**(1) (2005) 1–9.
- [63] L. Ismail, C. Ferronato, L. Fine, F. Jaber, J. Chovelon, Effect of water constituents on the degradation of sulfaclozine in the three systems: UV/TiO₂, UV/K₂S₂O₈, and UV/TiO₂/K₂S₂O₈, *Environmental Science and Pollution Research* **25**(3) (2018) 2651.-2663.
- [64] <https://www.ecofarmingdaily.com/build-soil/humus/humic-acid/>. (Pristup 23.8.2023.)
- [65] Ž. Jović, L. Živanović, A. Protić, M. Radišić, M. Laušević, M. Malešević, M. Zečević, Forced degradation study of torasemide: Characterization of its degradation products, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **36**(15) (2013) 2082–2094.
- [66] M. Kurmi, N. Patel, S. Jhajra, P. V. Bharatam, S. Singh, Characterization of forced degradation products of torasemide through MS tools and explanation of unusual losses observed during mass fragmentation of drug and degradation products through density functional theory, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **145** (2017) 209–218.

8. ŽIVOTOPIS

Minea Pranjić

████████████████████ Pohađala Osnovnu školu Klinča Sela do upisa u Opću gimnaziju Jastrebarsko 2013. godine. Nakon mature, u 10. mjesecu 2017. upisuje Fakultet kemijskoj inženjerstva i tehnologije, smjer Primijenjena kemija te u rujnu 2020. postaje Prvotupnik primijenjene kemije obranom završnog rada na temu „Sorpcija imatiniba na staklene mrežice s imobiliziranim TiO_2 i ugljikovim nanocijevima“ pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Muzavdžić Pavlović. Iste godine pohađala je studentsku praksu na Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo, Odjel za fizikalno kemijska ispitivanja voda, u trajanju od mjesec dana. Nakon završetka preddiplomskog studija, iste godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije upisuje diplomski studij, smjer Primijenjena kemija, modul Kemija okoliša. Dobitnica je Dekanove nagrade u akademskoj godini 2020./2021. za znanstveno-istraživački rad na temu "Određivanje sorpcijskog afiniteta krizotiniba prema TiO_2 imobiliziranim fotokatalizatorima" također pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Muzavdžić Pavlović.

Od početka studentskih dana odrađivala je razne studentske poslove poput demonstratura na istoimenom fakultetu na Zavodu za analitičku kemiju, poslove u skladištu i trgovini. Koristi se engleskim jezikom u govoru i pismu te vrlo dobro vlada programima MS Office paketa (posebice Excel, Word i PowerPoint) te osnovama rada u programima Matlab, ChemDraw, ImageJ, Visual MINTEQ 3.1. i Design Expert 7.1.5.