

Validacija određivanja antiparazitika i pesticida u aktivnom mulju MAE-HPLC-DAD metodom

Gudelj, Josip

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:245836>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Josip Gudelj

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2023.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Josip Gudelj

VALIDACIJA ODREĐIVANJA ANTIPARAZITIKA I PESTICIDA U AKTIVNOM MULJU
MAE-HPLC-DAD METODOM

ZAVRŠNI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof. dr. sc. Danijela Ašperger
2. prof. dr. sc. Šime Ukić
3. dr. sc. Lidija Furač, v. pred.

Zagreb, rujan 2023.

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom prof. dr. sc. Danijele Ašperger
akademske godine 2022./2023.

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na predloženoj temi, prenesenom znanju, strpljenju i pomoći prilikom izrade ovoga rada. Također, zahvaljujem se Bruni Babić Visković, mag. ing. oecing. na svakom savjetu i nesebičnoj pomoći kada je to god bilo potrebno, kao i svom stručnom osoblju koji su za vrijeme moga rada u laboratoriju moj rad činili ugodnim i produktivnijim.

Hvala mojoj čitavoj obitelji i prijateljima na podršci za vrijeme rada.

SAŽETAK

VALIDACIJA ODREĐIVANJA ANTIPARAZITIKA I PESTICIDA U AKTIVNOM MULJU MAE-HPLC-DAD METODOM

U današnje vrijeme, uporaba farmaceutika je u stalnom porastu. Nakon konzumacije farmaceutici iz tijela ljudi i životinja izlaze kao smjesa metabolita i djelomično izvorne aktivne tvari te tako dospijevaju u okoliš. Naime, klasična postrojenja za obradu otpadnih voda ne uklanjaju tako male molekule iz otpadnih voda. Veliki problem su antiparazitici koji imaju vrlo široku primjenu u veterinarskoj medicini. Složene su kemijske strukture, slabo topljivi u vodi, sklone su kristalizaciji te se koncentriraju na sustavima za obradu voda i postojani su u okolišu. S druge strane pesticidi osobito herbicidi u poljoprivredi imaju sve veću primjenu i samom primjenom završavaju u okolišu osobito u obližnjim potocima i rijekama. Pesticidi su uglavnom topljivi u vodi i time lako dospijevaju i u podzemne vode.

Štetan utjecaj i farmaceutika i pesticida djelomično je poznat, no utjecaj njihovih razgradnih i transformacijskih produkata koji nastaju tijekom metaboličkih procesa u organizmima ili pod utjecajem fotolize i hidrolize nije uglavnom definiran za te spojeve koji također završavaju u okolišu. Stoga je potrebno pratiti spomenute spojeve i u okolišu, i prije i nakon obrade otpadnih voda primjenom adekvatnih analitičkih metoda.

Poseban slučaj je aktivni mulj koji nastaje tijekom obrade otpadnih voda. Naime, veliki broj postrojenja za obradu otpadnih voda koriste konvencionalnu biološku metodu obrade aktivnim muljem. U takvim procesima aktivni mulj postaje izlazni i potencijalno opasni produkt takve obrade kojeg treba zbrinuti. Stoga ga prije zbrinjavanja treba analizirati i utvrditi prisutnost opasnih tvari.

U ovom radu pratilo se antiparazitike albendazol, mebendazol i febantel, te pesticid tiaklopid u aktivnom mulju kromatografskom metodom nakon mikrovalne ekstrakcije otapalima. U radu se provela optimizacija postupka mikrovalne ekstrakcije uzoraka te su se određivali validacijski parametri s naglaskom na selektivnost metode.

Ključne riječi:

antiparazitici, albendazol, mebendazol, febantel, pesticidi, tiaklopid, aktivni mulj, mikrovalna ekstrakcija, optimizacija, validacijski parametri

ABSTRACT

VALIDATION OF DETERMINING ANTIPARASITICS AND PESTICIDES IN ACTIVATED SLUDGE USING MAE-HPLC-DAD METHOD

In today's world, the use of pharmaceuticals is on the rise. After consumption, pharmaceuticals are excreted from the bodies of humans and animals as a mixture of metabolites and partially unchanged active substances, thus entering the environment. Traditional wastewater treatment plants do not remove such small molecules from wastewater. A significant problem arises with antiparasitic drugs widely used in veterinary medicine. They have complex chemical structures, are poorly water-soluble, prone to crystallization, and persist in the environment, accumulating in water treatment systems. On the other hand, pesticides, especially herbicides in agriculture, are increasingly used and end up in the environment, particularly in nearby streams and rivers. Pesticides are mostly water-soluble and easily find their way into groundwater.

The harmful impact of both pharmaceuticals and pesticides is partially understood, but the influence of their degradation and transformation products that occur during metabolic processes in organisms or under the influence of photolysis and hydrolysis is not well-defined for these compounds, which also end up in the environment. Therefore, it is necessary to monitor these compounds in the environment, both before and after wastewater treatment, using appropriate analytical methods.

A special case is the activated sludge generated during wastewater treatment. Many wastewater treatment plants employ conventional biological methods with activated sludge. In such processes, activated sludge becomes an output and potentially hazardous product that needs to be managed. Therefore, it must be analyzed for the presence of dangerous substances before disposal.

This study focused on monitoring antiparasitic drugs albendazole, mebendazole, and febantel, as well as the pesticide thiacloprid in activated sludge using chromatographic methods after microwave-assisted solvent extraction. The study involved optimizing the microwave-assisted extraction procedure for samples and determining validation parameters with an emphasis on method selectivity.

Key words:

pharmaceuticals, albendazole, mebendazole, febantel, thiacloprid, optimization, validation parameters

Sadržaj:

| | |
|---|----|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. OPĆI DIO..... | 3 |
| 2.1. ANTIPARAZITICI..... | 3 |
| 2.2. PESTICIDI..... | 5 |
| 2.3. OBRADA OTPADNIH VODA..... | 6 |
| 2.4. METODE PRIPRAVE UZORAKA ZA KROMATOGRAFSKU ANALIZU .. | 10 |
| 2.5. KROMATOGRAFSKA ANALIZA..... | 13 |
| 2.6. VALIDACIJA..... | 15 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO..... | 17 |
| 3.1. MATERIJALI..... | 17 |
| 3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR..... | 18 |
| 3.3. METODE RADA..... | 23 |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA..... | 28 |
| 4.2. SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST..... | 30 |
| 4.3. LINEARNOST..... | 35 |
| 4.4. OSJETLJIVOST..... | 41 |
| 4.5. PRECIZNOST..... | 43 |
| 4.6. ISKORISTIVOST..... | 52 |
| 4.7. GRANICA KVATIFIKACIJE I DETEKCIJE..... | 53 |
| 4.8. RADNO PODRUČJE..... | 55 |
| 4.9. BIORAZGRADNJA..... | 56 |
| 5. ZAKLJUČAK..... | 62 |
| 6. IZVORI..... | 63 |
| 7. DODATAK..... | 66 |
| 7.2. POPIS SLIKA..... | 66 |
| 7.3. TABLICE..... | 67 |
| 8. ŽIVOTOPIS..... | 69 |

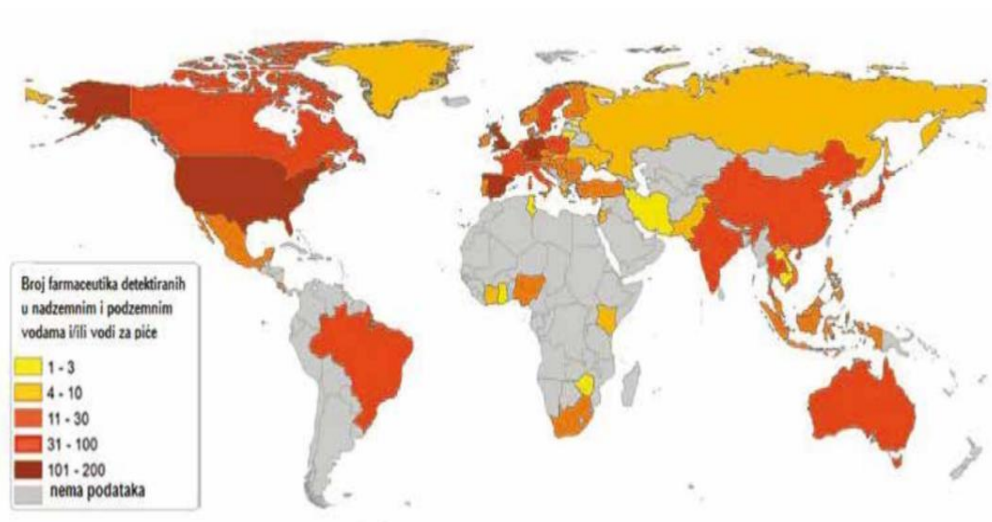
1. UVOD

Antiparazitici su skupina lijekova koja se koristi u liječenju infekcija kod ljudi i životinja, dok su pesticidi otrovne kemijske tvari ili mješavina tvari ili bioloških agenasa koje se koriste za suzbijanje štetnih nametnika. Antiparazitici i pesticidi dolaze u okoliš različitim putevima. Dok antiparazitici dolaze iz životinjskih i ljudskih organizama nakon probave, pesticidi u okoliš dolaze tako što se namjerno puštaju u okoliš kako bi se uništile populacije štetnih nametnika. Ksenobiotici su tvari strane okolišu i antiparazitici i pesticidi spadaju u tu skupinu. Antiparazitici se često bioakumuliraju u okolišu jer su izuzetno postojani i otporni na biorazgradnju, dok su pesticidi topljivi u vodi i toplinski stabilni. **Slika 1** prikazuje broj farmaceutika (u koje spadaju ispitivani antiparazitici) detektiran u vodama diljem svijeta. Kao takvi, antiparazitici i pesticidi završavaju u otpadnim vodama. Otpadne vode obično se odvede na pročišćavanje u komunalni sustav za obradu otpadne vode (**eng. Waste Water Treatment Plant, WWTP**). Tamo se primjenjuju različiti fizikalno-kemijski i biološki postupci razgradnje antiparazitika, pesticida i ostalih štetnih tvari.

Biološki stupanj obrade obuhvaća aerobnu razgradnju na pahuljicama aktivnog mulja. Patogene bakterijske vrste u doticaju s bioakumuliranim antiparaziticima stvaraju otpornost na iste što također predstavlja veliki problem jer se tako smanjuje terapijsko djelovanje aktualnih antiparazitika. S druge strane, pesticidi mogu uzrokovati toksičnost u prirodnoj flori i fauni i vodenom životu. Zbog navedenih činjenica, znanstvenici sve više istražuju potencijale aktivnog mulja. Također, kako bi se podigla svijest o opasnosti koje donosi prekomjerna akumulacija farmaceutika u okolišu reagiralo je i zakonodavstvo tog područja.

Aktivni mulj je izlazni produkt biološke metode obrade otpadnih voda. Aktivni mulj u sebi može sadržavati različite štetne tvari kao što su ispitivani antiparazitici i pesticid, te se kao takav treba analizirati i zbrinuti. Određivanje antiparazitika i pesticida u ovom radu provedeno je u aktivnom mulju nakon biološke obrade lokalnih komunalnih otpadnih voda.

Cilj ovog rada je bio je razviti i optimirati metodu mikrovalne ekstrakcije ispitivanih antiparazitika i pesticida iz aktivnog mulja pogodnim otapalima za kromatografsku analizu na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s nizom dioda.



Slika 1. Broj farmaceutika detektiran u nadzemnim, podzemnim vodama i vodi za piće [20]

2. OPĆI DIO

2.1. ANTIPARAZITICI

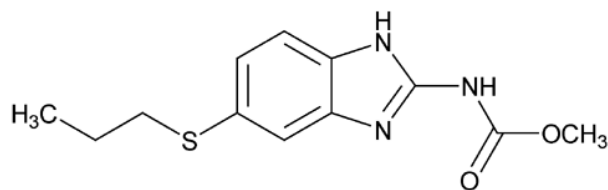
Antiparazitici su skupina lijekova koja se koristi u liječenju infekcija u ljudi i životinja uzrokovanih parazitima, uključujući protozoe, helminte i ektoparazite. [1] Obično se koriste zajedno s lijekovima za pražnjenje crijeva da se paraziti uklone iz tijela domaćina. Svaki antiparazitski lijek ima specifično djelovanje koje karakterizira: spektar djelovanja, djelotvornost, tip i podnošljivost parazitizma. Prema navedenim kriterijima bira se odgovarajući antiparazitski lijek za ciljano liječenje. [2] Antiparazitici se svrstavaju u sedam skupina obzirom na njihovu otpornost prema parazitima: benzimidazoli, imidazotiazoli, difenilsulfidi, makrociklički laktoni, heksahidropirazini, salicilanilid i tetrahidropirimidini. U liječenju životinja, najvažniji su benzimidazoli, a njihova sudbina u okolišu ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. [3]

2.1.1. ALBENDAZOL

Albendazol je antiparazitik iz grupe benzimidazola, širokog spektra djelovanja. Ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze sva tri razvojna stupnja. [2] Radi se o benzimidazolnom karbamatu koji se koristi za liječenje tkivnih i crijevnih nametnika i djeluje protiv ličinki. [4] Pokazao je svoju učinkovitost protiv širokog spektra helmintskih vrsta kod domaćih životinja, a kasnije, tijekom razvoja za ljudsku upotrebu, pokazao se djelotvornim protiv glavnih crijevnih nematoda i tri cestode koje inficiraju ljude. [5] Albendazol stvara nusprodukte nakon dugotrajne terapije. Može izazvati glavobolje, mučnine, vrtoglavica i bolove u donjem dijelu trbuha. Toksičan je za embrije i teratogen kod životinja. [4]

Slabo je topljiv u vodi i brzo se apsorbira tijekom oralne primjene. Benzimidazoli, općenito, imaju slabe interakcije s drugim lijekovima. [4]

Na **Slici 2** prikazana je molekulska struktura albendazola.

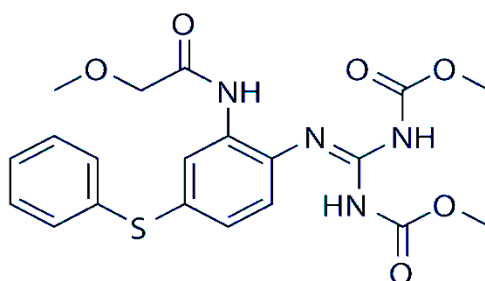


Slika 2. Molekulska struktura albendazola [6]

2.1.2. FEBANTEL

Febantel je antiparazitik širokog spektra djelovanja. Kod pasa, mačaka, goveda, ovaca, svinja i peradi djeluje protiv okruglih i trakavih glista. Spada u skupinu benzimidazola, ali je takozvani pro-benzimidazol jer se febantel nakon ulaska u organizam domaćina u želudcu i crijevima pretvara u febendazol. [7] Za ljude može predstavljati opasnost ako konzumiraju životinjske proizvode koji sadrže ostatke navedenog antiparazitika. [8] Primjena febantela je raznovrsna, a učinkovitost visoka, primjenjuje se u obliku tableta, suspenzije, paste ili kao medicinska hrana. [9]

Na **Slici 3** prikazana je molekulska struktura febantela.



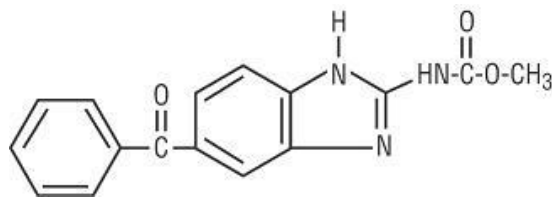
Slika 3. Molekulska struktura febantela [10]

2.1.3. MEBENDAZOL

Mebendazol je antiparazitik širokog spektra djelovanja iz grupe benzimidazola koji se koristi više od 40 godina za liječenje različitih parazitskih infestacija. Služi za liječenje gastrointestinalnih infekcija uzrokovanih ankilostomima, crvima i štapićavcima. Također, koristi se i u onkologiji s fokusom na stanice koje nisu otporne na odobrene terapije, pokazuje citotoksično djelovanje koje sinergizira s kemoterapijskim sredstvima i ionizirajućim zračenjem te potiče antitumorski imunološki sustav. Mebendazol se primjenjuje oralnim putem.

Kao nuspojave dugotrajnog korištenja, mogu se navesti: gubitak apetita, bol u trbuhu, nadutost, mučnina, glavobolja. [11]

Slika 4 prikazuje molekulsku strukturu mebendazola.



Slika 4. Struktura Mebendazola [12]

2.2. PESTICIDI

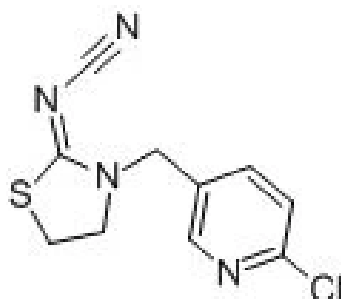
Pesticidi su tvari za suzbijanje štetnih organizama, mogu biti sintetičkog ili prirodnog podrijetla. Zaštitna sredstva su najčešće toksične tvari kojima je namjena selektivno uništavanja štetnika. Pesticidi su znatno doprinijeli povećanju prinosa u poljoprivredi uništavanjem štetnika i bolesti, također doprinos je očit i u suzbijanju bolesti koje prenose insekti u sektoru ljudskog zdravlja. Više od 45 % godišnje proizvedene hrane se gubi zbog štetnih infestacija na bilju uzrokovanih različitim nametnicima. Taj je efekt još izraženiji u tropskim zemljama gdje temperatura i vlaga osiguravaju povoljnije uvijete za razmnožavanje štetnika. Zbog navedenog, široka je primjena pesticida kako bi se gubitci smanjili i kako bi se proizvelo dovoljno hrane za današnju ljudsku populaciju. Međutim, prekomjerna uporaba pesticida dovodi do značajnih posljedica koje su štetne za ljudsko zdravlje, okoliš i druge kulture koje u njemu obitavaju. Neprikladnom upotrebom pesticida oni ulaze u hranidbeni lanac, onečišćuju u tlo, zrak, podzemne i površinske vode. Pesticidi koji se koriste na poljoprivrednim površinama otpuštaju se u okoliš i dolaze u kontakt s ljudima, izravno ili neizravno. Tako su ljudi izloženi pesticidima i unose ih u tijelo na različite načine kao što su inhalacija, ingestija i dermalni kontakt. Izloženost pesticidima može rezultirati akutnim i kroničnim zdravstvenim problemima. Također, zagađenje pesticidima utječe na životinje, poput ptica, divljih i domaćih životinja u svim dijelovima ekosustava. [13]

U ovom radu provodi se istraživanje na insekticidu tiaklopridu koji je prema odluci Europske Unije pod brojem 2018/840/EU stavljen na popis tvari za promatranje koje predstavljaju rizik na okoliš i ljude. [14]

2.2.1. TIAKLOPRID

Tiaklopid je žućkasti kristalni prah kemijske formule $C_{10}H_9ClN_4S$. Koristi se za zaštitu voća, pamuka i povrća. Kod ljudi nema akutnog toksičnog djelovanja u manjim količinama, ali je kancerogen. Kod manjih organizama djeluje toksično. [15] Zbog navedenih razloga, donesena je uredba Europske Komisije 2020/23 o neproduleđu odobrenja aktivne tvari tiaklopid, koje su stupile na snagu 3. veljače 2020. godine. Tom uredbom sve države članice Europske Unije morale su oduzeti registraciju sredstvima koja sadržavaju aktivnu tvar tiaklopid. [16]

Slika 5 prikazuje molekulsku strukturu tiakloprida.



Slika 5. Molekulska struktura tiakloprida [17]

2.3. OBRADA OTPADNIH VODA

Porast broja ljudi i životnog standarda rezultiralo je onečišćenjem okoliša. Najbitniji oblik onečišćenja upravo je voda. Otpadne vode prije ispuštanja u okoliš moraju zadovoljiti određene kriterije nametnute zakonima i uredbama za određeno područje. Kako bi se postigla željena kakvoća vode biraju se različiti postupci obrade otpadnih voda koji ponajprije ovise o početnom sastavu otpadne vode. Postoje različiti postupci koji se kombiniraju kako bi dobili najbolje moguće rezultate obrade. [18]

Postupci kojima se obrađuje otpadna voda dijele se na: fizikalne, fizikalno-kemijske, kemijske i biološke postupke.

Fizikalni procesi obuhvaćaju: sedimentaciju, flotaciju, ultrafiltraciju i reverznu osmozu. Sedimentacija je proces uklanjanja čvrstih čestica iz otpadne vode pomoću gravitacijske sile. Flotacija je proces u kojem sitnije čvrste čestice isplivavaju na površinu otpadne vode i tako bivaju uklonjene. U procesu ultrafiltracije otpadna voda prolazi kroz filter određene veličine pora pri čemu se iz vode uklanjaju mikroorganizmi, pigmenti, proteini i virusi. Reverzna osmoza je proces u kojem primjenom tlaka većeg od osmotskog molekule otapala putuju iz otopine u čisto otapalo, odnosno iz područja otopine veće koncentracije u područje otopine niže koncentracije kroz membranu. Radi se o procesu koji je po načelima suprotan procesu osmoze, što se da iščitati iz imena samoga procesa. Zadnje dvije nabrojane tehnike, ultrafiltracija i reverzna osmoza spadaju u napredne tehnike fizikalnih procesa obrade otpadnih voda.

Fizikalno-kemijski procesi su procesi pomoću kojih se kombiniranjem fizikalnih i kemijskih načela pročišćava otpadna voda. Oni obuhvaćaju adsorpciju na aktivnom ugljenu i ionsku izmjenu koje se također smatraju naprednim tehnologijama, te koagulacija i flokulacija. Adsorpcija se zasniva na sposobnosti adsorbensa (čvrsta tvar velike specifične površine) da na svoju površinu adsorbiraju molekule plina ili molekule iz otopine. Ionska izmjena se zasniva na izmjeni iona ionske smole s ionima iz otpadne vode. Procesima koagulacije i flokulacije izdvajaju se suspendirane čestice u vodu dodatkom sredstava za koagulaciju i flokulaciju.

Kemijska obrada otpadne vode svodi se na kemijsku pretvorbu tvari i razgradnju onečišćujućih tvari procesima oksidacije i redukcije.

Biološke metode obrade otpadnih uključuju obradu aktivnim muljem [19], o čemu će biti više govora u sljedećem poglavlju.

2.3.1. BIOLOŠKA OBRADA OTPADNIH VODA

Biološki procesi obrade otpadnih voda temelje se na upotrebi mikroorganizama. Zagađenja prisutna u otpadnoj vodi koja se uglavnom obrađuju u stupnju biološke obrade otpadnih voda su: aktivne farmaceutske tvari, međuprodukti i polazne sirovine koje predstavljaju biološki teže razgradive tvari. Mikroorganizmi sadržani na pahuljici aktivnog mulja navedene spojeve svojim metabolizmom i različitim enzimskim putovima razgrađuju. Količina spoja koji će biti uklonjen ovisi o njegovim kemijskim, fizikalnim i biološkim svojstvima, o uvjetima provedbe procesa i tehnologiji koja se primjenjuje. Ovisno o značajkama otpadne vode koja se obrađuje biraju se aerobni ili anaerobni postupci obrade.

Aerobni procesi obrade zasnivaju se na postupku mikrobiološke razgradnje organskih tvari u aeriranim reaktorima (**Slika 6.**). U navedenom procesu mikroorganizmi u prisustvu kisika razgrađuju organsku tvar do ugljikovog dioksida, vode i nerazgradivog ostatka. Najčešće primjenjivani postupci su postupak s membranskim reaktorom i postupak s aktivnim muljem o kojem će se u ovom poglavlju više posvetiti pažnja.

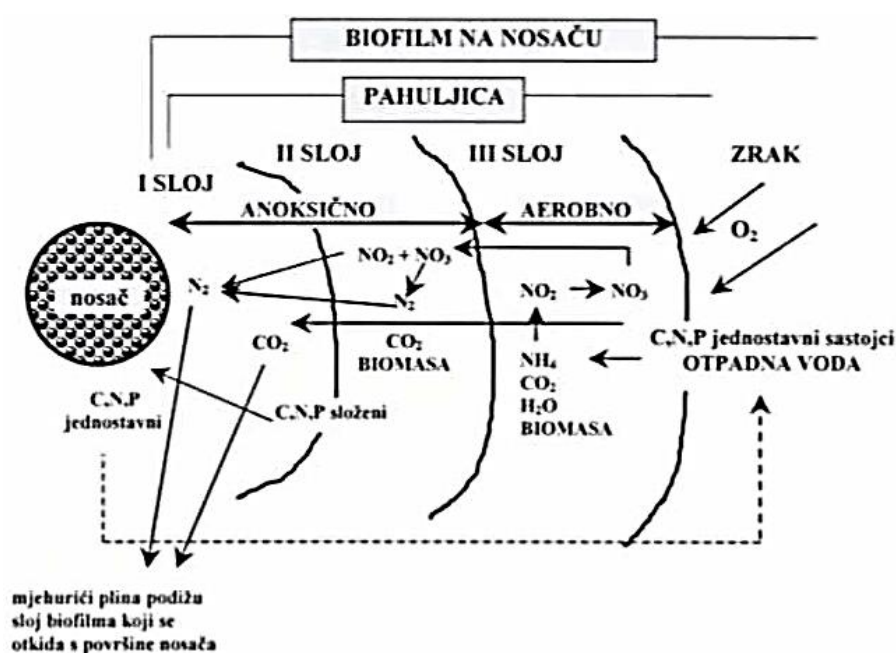
Konvencionalni postupak s aktivnim muljem je najčešće korišten postupak. [20] Aerobni postupak uklanjanja organske tvari iz otpadne vode aktivnim muljem uključuje prisustvo mješovite mikrobne zajednice koja se čitavo vrijeme aerira. Mikrobna zajednica koristi organsku tvar kao hranu i u prisustvu kisika je razgrađuje kako je već navedeno u prethodnom odjeljku. Na učinkovitost procesa glavni utjecaj imaju: temperatura, pH-vrijednost, otopljeni kisik, kakvoća otpadne vode i hranjivog supstrata, koncentracija i vrsta toksičnih sastojaka u otpadnoj vodi, održavanje mikrobiološke kakvoće i biokemijske aktivnosti mikroorganizama aktivnog mulja, te naravno praćenje procesa. Razgradnja je praćena reakcijama oksidacije, sinteze i endogene respiracije. Mikrobna zajednica održava se raspršena na pahuljici aktivnog mulja u otpadnoj vodi kako je to prikazano na **Slici 7** ili na nosačima u slojevima biomase aktivnog mulja koji se naziva biofilm kako je to prikazano na **Slici 8**. U površinskim slojevima zastupljeni su mikroorganizmi koji troše više kisika za razgradnju organske tvari, dok se prema unutrašnjosti nalaze vrste koje razgrađuju produkte prvog sloja i organske tvari iz otpadne vode za čiju je razgradnju potrebno manje kisika. [21]



Slika 6. Prikaz aeriranog bazena s aktivnim muljem u Zagrebu [26]



Slika 7. Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja [22]



Slika 8. Prikaz nosača, biofilma na nosaču i procesa koji se na njemu odvija [21]

Biosorpcija je proces kod kojeg se proces biorazgradnje događa na aktivnom mulju. Biosorpcija objedinjuje absorpciju i adsorpciju. Adsorpcija je vezanje tvari na površinu sorbensa (u ovom slučaju vezanje organske tvari na pahuljicu aktivnog mulja) stvaranjem kemijskih veza, a absorpcija podrazumijeva prijelaz otopljene tvari u čvrstu tvar vezanjem na sorbens. [23] Tako, aktivni mulj sa svojom mikrobnom zajednicom može biti sorbens na koji se vežu onečišćujuće

tvori iz otpadne vode. [24] Na biosorpciju tada utječu: pH-vrijednost, temperatura, koncentracija onečišćujućih tvari i koncentracija biomase. [23]

Prednosti obrade otpadnih voda aktivnim muljem su niski investicijski troškovi u usporedbi s naprednim oksidacijskim metodama. Izvedba uređaja je jednostavna, a visok je stupanj eliminacije ukupne suspendirane tvari i BPK₅. Također, postiže se dobra eliminacija dušika kod nitrifikacije i denitrifikacije i proces je ekološki prihvatljiviji od procesa kloriranja. Glavni nedostaci su velika potrošnja energije jer je mulj potrebno neprestano aerirati i stvaranje velikih količina mulja koji je potrebno adekvatno obraditi prije odlaganja u okoliš. [20]

Aktivni mulj bogat organskom tvari, nakon obrade otpadnih voda u nekim se državama koristi kao gnojivo, dok u nekim državama zbog upitnog sadržaja opasne tvari koja je zaostala nakon obrade biva zabranjen za korištenje. U situacijama gdje je korištenje aktivnog mulja u svrhu gnojidbe zabranjeno, postavlja se pitanje kako i gdje na adekvatan način odlagati aktivni mulj i postoji li način da ga se preradi u novu korisnu sirovinu. [25]

2.4. METODE PRIPRAVE UZORAKA ZA KROMATOGRAFSKU ANALIZU

Analiza uzorka iz proizvodnih procesa, pa tako i iz procesa obrade otpadnih voda radi se u pet koraka: uzrokovanje, priprava uzorka, odjeljivanje analita, detekcija i interpretacija rezultata s kvalitativnim i kvantitativnim informacijama vezanim uz analit. Uzorke koji se uzimaju iz okoliša ili različitih procesa obično nisu pogodni da se odmah postavljaju na analizu. Zbog toga se provodi priprema uzorka za analizu, što podrazumijeva da je uzorak preveden u oblik koji je pogodan za određenu vrstu analize instrumentalnom metodom.

Za čvrste uzorke priprava je nešto složenija u odnosu na plinovite i tekuće. Čvrste uzorke potrebno je osušiti, usitniti, homogenizirati i potom otopiti. Ovisno o potrebama, analiza uzorka se može provesti na više načina. Jedan od načina je da se početni uzorak potpuno ili djelomično raščinjava (ako se radi o anorganskom analitu u anorganskoj matici), da se uzorak otapa ili da se analit ekstrahira iz uzorka ili je zbog preniske koncentracije potrebno koncentriranje uzorka ako je početna koncentracija analita u uzorku preniska za određivanje na dostupnom instrumentu. [27]

2.4.1. EKSTRAKCIJA POTPOMOGNUTA MIKROVALOVIMA

Mikrovalna ekstrakcija ili ekstrakcija potpomognuta mikrovalovima (**eng.** *Microwave Assisted Extraction*, MAE) temelji se na metodi odjeljivanja analita iz matice uzorka u otapalo pomoću mikrovalnog zračenja. [28] Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi oštećuju vodikove veze potičući rotacije dipola. Kretanje otopljenih iona potiče povećava penetraciju otapala u maticu i tako potiče otapanje. Postoje dvije vrste sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. [29] Kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalno zračenje obzirom na svoje dielektrične konstante. Porastom dielektrične konstante spoja raste količina apsorpcije mikrovalne energije. Kod ekstrakcije u zatvorenim posudama otapalo i uzorak smješteni su u zatvorenu posudu kod primjene otapala koje apsorbira mikrovalove. Pod utjecajem mikrovalnog zračenja otapalo se zagrije iznad točke vrenja i omogućuje se brza ekstrakcija analita iz uzorka pod kontroliranim tlakovima. [28]

2.4.2. OPTIMIRANJE EKSTRAKCIJE POTPOMOGNUTE MIKROVALOVIMA

Učinkovitost ekstrakcije funkcija je postavljenih procesnih parametara, a neki od njih najviše utječu na ekstrakciju analita u ekstrakt. Parametri uključuju predtretmane provedene prije ekstrakcije, odnos otapala i uzorka, vrsta i polarnost otapala, te vrijeme i temperatura provođenja ekstrakcije. [30]

Vrijeme mikrovalne ekstrakcije obično se kreće između nekoliko minuta do pola sata. Važno je pripaziti da vrijeme ne bude prekratko kako bi se izbjegla termalna degradacija bioaktivnih spojeva i početak oksidacijskih promjena u ekstraktu. [31] Obično se produljenjem vremena ekstrakcije pokušava povećati prinos analita u ekstraktu, što je u slučaju mikrovalne ekstrakcije manje bitno. [32]

Temperatura procesa mikrovalne ekstrakcije je funkcija primijenjene snage mikrovalova. Količina energije koja se prenese na uzorak pretvara se u kinetičku energiju, a zatim u toplinsku energiju što izaziva zagrijavanje uzorka. [33] Važno je ugoditi optimalno vrijeme i temperaturu

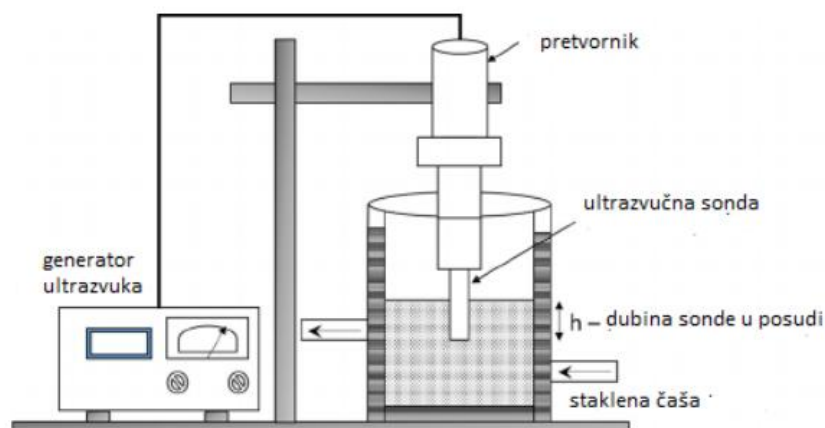
jer ekstrakti dobiveni brzo i intenzivnom ekstrakcijom obično sadrže više nečistoća zbog otapanja neželjenih tvari iz uzorka. [34] Također, pri višim temperaturama povećava se efikasnost otapala jer mu se smanjuje viskoznost i površinska napetost što omogućuje bolje prodiranje otapala u uzorak i povećava topljivost komponenti u otapalu. [35] Ipak, s temperaturom treba biti pažljiv jer u slučaju da je analit termolabilan spoj, može doći do neželjenih reakcija. [36] **Slika 9** prikazuje uređaj ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima.



Slika 9. Prikaz uređaja za mikrovalnu ekstrakciju [37]

2.4.3. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

Kod ultrazvučne ekstrakcije uzorak se kratko izlaže velikoj količini energije pri čemu se povisuje tlak unutar sonde. Frekvencije ultrazvuka koje se primjenjuju za ekstrakciju su između 20 i 100 kHz. Omogućuje se dobar kontakt između čvrste i tekuće faze, a zagrijavanje je rezultat ultrazvuka i doprinosi ekstrakciji. Prilikom ultrazvuka dolazi do kavitacije- stvaranja, rasta i raspada šupljina u tekućini, smanjuje se volumen otapala i vrijeme ekstrakcije. Ultrazvučna ekstrakcija je brza i jednostavna, ali je niže djelotvornosti u odnosu na ostale metode. [28] **Slika 10** prikazuje način rada ultrazvučne ekstrakcije.



Slika 10. Način rada ultrazvučne ekstrakcije [38]

2.5. KROMATOGRAFSKA ANALIZA

Kromatografija je fizikalna metoda separacije analita iz uzorka. Komponente uzorka se raspodjeljuju između pokretne i nepokretne faze i zbog različitih svojstava različito se raspodjeljuju i zbog toga putuju različitim brzinama. Prema sastavu pokretne faze kromatografija može biti: plinska, tekućinska i fluidna kromatografija pri superkritičnim uvjetima. Prema sastavu nepokretne faze kromatografiju dijelimo na plošnu i kolonsku kromatografiju. Prema ravnotežama koje se uspostavljaju između pokretne i nepokretne faze razlikujemo adsorpcijsku, afinitetnu, ionsku, razdjelnu kromatografiju i kromatografiju isključenjem.

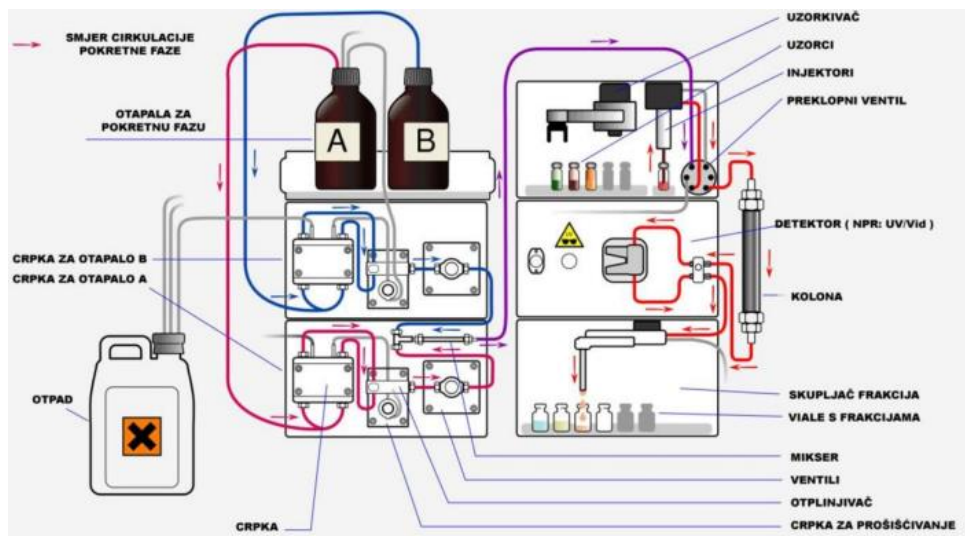
Kromatograf je uređaj na kojem se provodi kromatografska analiza, a rezultat analize naziva se kromatogram. Na kromatogramu se mogu uočiti krivulje - svaki analit se prikazuje pravilnom krivuljom Gaussove raspodjele. Vrh krivulje označava vrijeme zadržavanja analita i to je kvalitativna informacija, dok površina ispod krivulje označava koncentraciju analita i to je kvantitativna informacija. [39]

U ovom radu se koristila tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s nizom dioda (**eng.** *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*, HPLC-DAD). Pokretna faza se pumpom provodi kroz sustav i kad je sustav spreman uzorak se injektira iz viala ili posudica u kromatografski sustav pomoću injektora. Uzorak prolazi kroz kromatografsku kolonu gdje se nalazi nepokretna faza. Kromatografska kolona može imati

različita fizikalna i kemijska svojstva, ovisno o potrebama analize. Na koloni dolazi do separacije komponenti iz uzorka, tako svaka komponenta iz kolone izlazi iz kolone u različitom vremenu (što se kasnije očituje na kromatogramu) i dolazi do detektora s nizom dioda. Detektor mjeri koncentracije pojedinih komponenti mjerenjem apsorbancije u vidljivom i ultraljubičastom dijelu spektra elektromagnetskog zračenja (što se kasnije očituje površinom ispod kromatografskih krivulja kromatograma). [39] Kromatografski sustavi mogu izgledati različito, a prikaz jednog sustava prikazuje **Slika 11**, dok **Slika 12** prikazuje procesnu shemu opisanog rada tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti.



Slika 11. Prikaz kromatografskog sustava tvrtke Shimadzu [40]



Slika 12. Shema rada tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti [41]

Lambert-Beerovim zakonom (1) se izražava apsorbanacija elektromagnetskog zračenja:

$$A = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = \varepsilon * c * B \quad (1).$$

Gdje A predstavlja apsorbanaciju, I_0 i I intenzitet ulaznog, odnosno izlaznog zračenja, ε molarni apsorpcijski koeficijent, c predstavlja koncentraciju komponente, a b duljinu puta zrake kroz ćeliju. [39]

Općenito, to je jedna od najkorištenijih kromatografskih metoda jer je cjenovno dostupna. Često se koristi za analizu farmaceutika, pesticida, droga, steroida i drugih biomolekula, također se koristi i za analizu polimera organskih i anorganskih komponenti. [39]

2.6. VALIDACIJA

Validacija je postupak kojim se utvrđuje odgovara li djelotvornost neke metode zahtjevima za određenu analitičku primjenu. Validacija se provodi pri razvoju i uvođenju nove analitičke metode i pri izmjeni bilo kojeg dijela već validirane analitičke metode. Obično je da se validacija i razvoj odnosno modifikacija analitičke metode stalno ciklički ponavljaju sve dok parametri ne zadovolje zahtjeve predviđene određenom regulativom.

Validacijske značajke i parametri koji se procjenjuju su: točnost, preciznost, selektivnost, granica detekcije, granica kvantifikacije, linearnost i područje mjerenja.

Točnost (istinitost) analitičke metode izražava podudaranje dobivenih rezultata sa stvarnim rezultatima. Pod stvarnim rezultatima smatraju se rezultati konvencionalno prihvaćeno kao točni ili referentne vrijednosti određenog standarda. Računa se prema jednadžbi (2).

$$I = \frac{\bar{x}}{x_{sd}} * 100 \quad (2)$$

Gdje je \bar{x} srednja vrijednost niza mjerenja koncentracije analita, a x_{sd} točna koncentracija. Rezultat je izražen u postotku.

Preciznost se izražava kao rasipanje pojedinog rezultata od srednje vrijednosti rezultata serije mjerenja višestrukog uzrokovanja istog uzorka pod propisanim uvjetima. Ponovljivost izražava preciznost metode izvedene pod istim uvjetima u kratkom vremenskom intervalu. Dok, međupreciznost izražava varijabilnost u istim laboratorijskim uvjetima s tim da se mjerenje provodi u različite dane ili ga provodi drugi analitičar.

Selektivnost metode definirana je kao sposobnost metode da kvantitativno odredi analit u prisustvu drugih komponenata u uzorku.

Granica detekcije predstavlja najmanju količinu analita u uzorku koja se sa sigurnošću može detektirati, a ne mora nužno biti kvantificirana. Granica detekcije računa se prema izrazu (3).

$$GD = \frac{3,3 * \sigma}{S} \quad (3)$$

Gdje je σ standardna devijacija odaziva, a S nagib kalibracijske krivulje.

Granica kvantifikacije predstavlja najmanju količinu analita koju kvantitativno možemo odrediti u uzorku. Računa se prema izrazu (4).

$$GK = \frac{10 * \sigma}{S} \quad (4)$$

Gdje je σ opet standardna devijacija odaziva, a S nagib kalibracijske krivulje.

Linearnost analitičke metode podrazumijeva njenu sposobnost da rezultati analize budu direktno proporcionalni koncentraciji analita u uzorku. Područje mjerenja označava interval između najviše i najniže koncentracije analita u uzorku za koju je dokazano da analitička metoda ima odgovarajuću preciznost, točnost i linearnost. [42]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. MULJ

Aktivni mulj je uziman iz lokalnog postrojenja za obradu otpadnih voda i nije karakteriziran. Snimanjem slijepa probe utvrđeno je kako mulj nije prethodno zagađen antiparazitcima i pesticidom koji su obrađivani u ovom radu. Zbog navedenog, sastav mulja nije ometao kvalitativno i kvantitativno određivanje antiparazitika i pesticida. Prije svakog eksperimenta mulj je ispiran tri puta sa demineraliziranom vodom, te nakon slijeganja mulja tekući dio je oddekantiran. Prema potrebi, dodavala se glukoza s ciljem dohrane mikroorganizama prisutnih u mulju. Mulj je namjerno tretiran (špikan) standardnim otopinama ispitivanih tvari.

3.1.2. KEMIKALIJE

Tablica 1 prikazuje popis svih kemikalija koje su korištene u istraživanju.

Tablica 1. Popis kemikalija korištenih u istraživanju, njihove čistoće i njihova proizvođača

| Naziv | Kemijska formula | Čistoća | Proizvođač |
|---------|----------------------------------|---------|------------------------------|
| Metanol | CH ₃ OH | HPLC | J. T. Baker, Nizozemska |
| Etanol | C ₂ H ₅ OH | p. a. | Carlo Erba Reagenti, Italija |
| Voda | H ₂ O | Mili Q | FKIT, Zagreb |

3.1.3. ANTIPARAZITICI I PESTICID

Za potrebe eksperimenta, pripremane su temeljne standardne otopine antiparazitika: albendazola, febantela i mebendazola (Veterina d.o.o., Hrvatska) i pesticida tiakloprida (Sigma Aldrich) u koncentracijama 50 mg/L koje su se ovisno o potrebama razrjeđivale do nižih koncentracija.

3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI I PRIBOR

3.2.1. ANALITIČKA VAGA

Za vaganje lađica s aktivnim muljem korištena je analitička vaga Mettler Toledo, AB 104, Švicarska prikazana na **Slici 13**. Za vaganje ispitivanih tvari korištena je analitička vaga Mettler Toledo, XA105 prikazana na **Slici 14**.



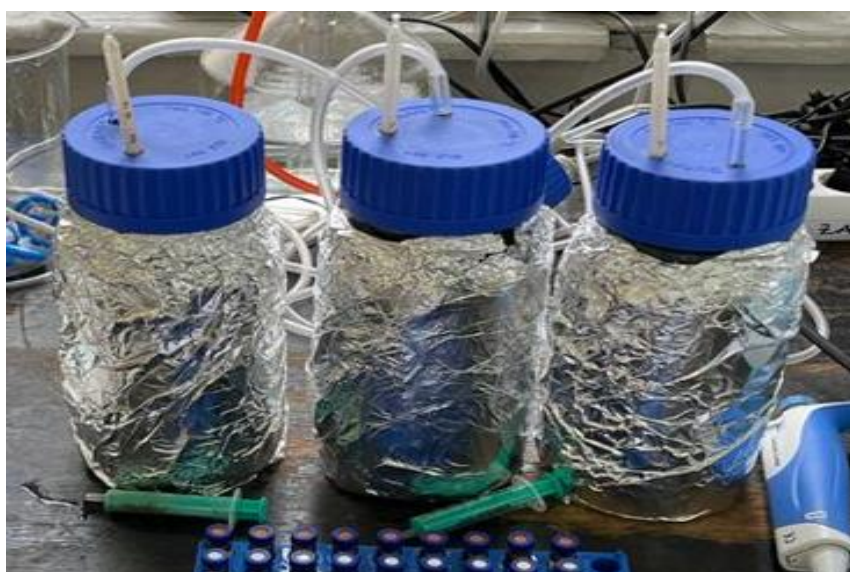
Slika 13. Analitička vaga Mettler Toledo, AB 104, Švicarska



Slika 14. Analitička vaga Mettler Toledo, XA105 [44]

3.2.2. AERIRANI REAKTORI

U svrhu praćenja ponašanja ispitivanih tvari u smislu njihove biosorpcije i nastajanja transformacijskih produkata koristila su se tri reaktora volumena 1000 mL (**Slika 15.**). Jedan reaktor je sadržavao ispitivanu tvar i vodu, drugi ispitivanu tvar i mulj, a treći sam mulj i vodu (slijepa proba). Proces praćenja trajao je 24 sata uz neprekidnu aeraciju reaktora, a uzorci su se uzimali u dogovorenim intervalima. U svakom intervalu uzimano je 500 μ L uzoraka iz svih reaktora, te je praćena temperatura i pH-vrijednost.



Slika 15. Aerirani reaktori

3.2.3. UREĐAJ ZA MIKROVALNU EKSTRAKCIJU

Ekstrakcija pripremljenih uzoraka provedena je u uređaju za mikrovalnu ekstrakciju i digestiju MarsX (CEM, Matthews, NC, USA) 1200 W koji prikazuje **Slika 16.** Uređaj omogućuje istovremenu ekstrakciju 12 uzoraka koji se smještaju u karusel. U referentnoj posudi smješta se osjetilo tlaka i osjetilo temperature koji omogućuju praćenje parametara tijekom same ekstrakcije te automatsku regulaciju unaprijed određenih parametara ekstrakcije. Za ekstrakciju su korištene teflonske „GreenChem“ posude volumena 100 mL koje prikazuje **Slika 17.** Posude su zatvorene tijekom čitave ekstrakcije kako bi se spriječio gubitak otapala i analita.



Slika 16. Uređaju za mikrovalnu ekstrakciju i digestiju MarsX (CEM, Matthews, NC, USA)
1200 W



Slika 17. Teflonske „GreenChem“ posude volumena 100 mL

3.2.4. UREĐAJ ZA ULTRAZVUČNU EKSTRAKCIJU

Ekstrakcija ispitivanih tvari iz mulja provodila se u ultrazvučnoj kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka, 1200 W, koja je prikazana na **Slici 18**. Na uređaju je moguće podešavati temperaturu kupelji, vrijeme trajanja ekstrakcije i snagu ultrazvuka.



Slika 18. Ultrazvučna kupelji SONOREX DIGITAL 10P, Bandelin, Berlin, Njemačka, 1200W

3.2.5 ROTAVAPOR

Uparavanje ekstrakta provodilo se na uparivaču Büchi Waterbath B-480, Švicarska prikazanom na **Slici 19**, pri temperaturi 40°C.



Slika 19. Uparivač Büchi Waterbath B-480

3.2.6. HPLC KROMATOGRAFI

Nakon biorazgradnje i ekstrakcije, ekstrakti su analizirani na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (**eng.** *High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection*, HPLC-DAD) Varian ProStar, SAD prikazan na **Slici 20**. Sastavni dijelovi kromatografa su: automatski injektor 410, pumpe 230, detektor s nizom dioda 330, boca za pokretnu fazu, boca za otpad i računalo kojim se preko računalnog programa upravlja kromatografom i na kojem se također očitavaju rezultati analize. Za analizu je korištena kolona s obrnutom fazom InterSustain™ C18 (GLSciences INC., Japan). Dimenzije kolone su 250 mm * 4,6 mm, a veličine zrnaca su 5 µm.



Slika 20. Kromatograf Varian ProStar, SAD

3.2.7. pH-METAR

Za mjerenje pH-vrijednosti korišten je pH-metar Mettler Toledo, S20, SevenEasy, Švicarska prikazan na **Slici 21**.



Slika 21. pH-metar Mettler Toledo, S20, SevenEasy, Švicarska [43]

3.2.8. OSTALI PRIBOR

Tijekom izvođenja eksperimenata koristilo se standardno laboratorijsko posuđe kao što su: odmjerne tikvice, stakleni štapići, lijevci, čaše, Petrijeve zdjelice, trbušaste pipete i tikvice s okruglim dnom te Büchnerov lijevak. Metalno posuđe koje je korišteno su špatulice i žlice različitih veličina. Također, korištene su plastične lađice za odvagu, šprice za filtraciju i najlonski 0,45 mikronski Syringe filtri (proizvođača Filter-bio) za filtriranje svih uzoraka prije kromatografske analize, te propipeta.

3.3. METODE RADA

3.3.1. AERIRANI REAKTORI

U svrhu praćenja biorazgradnje ispitivanih tvari korištena su tri reaktora volumena po 1000 mL. Prvo su se pripravile dvije otopine ispitivane tvari koncentracije 10 mg/L. Analitički standardi ispitivanih tvari prvo su se termostatirali na sobnoj temperaturi, a zatim bi se u čašu od 10 mL na analitičkoj vagi Mettler Toledo, XA105 (**Slika 14.**) odvagalo 10 mg ispitivane tvari. Iz čaše bi se u odmjernu tikvicu od 10 mL kvantitativno uz pomoć lijevka prenio sadržaj i otopio u 10 mL metanola. U prvi reaktor se stavljalo 990 mL vode Milli Q i 10 mL pripremljene otopine. U

drugi reaktor se stavljalo 300 mL aktivnog mulja i 700 mL Milli Q vode. U treći reaktor se stavljalo 300 mL dopremljenog mulja, 690 mL Milli Q vode i 10 mL pripremljene otopine ispitivane tvari. Svi reaktori oblagani su aluminijskom folijom (**Slika 15**) kako bi se spriječio fotolitički raspad spojeva.

Biorazgradnja je trajala 24 sata, a svaki reaktor se aerirao čitavo vrijeme. Uzroci su se uzimali u početnom trenutku (odmah kada se u reaktore doda pripremljena otopina), te u: 15 minuti i 30 minuti, te nakon: 1 h, 1,5 h, 1,75 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h i nakon 24 h. Prilikom svakog uzrokovanja mjerila se temperatura i pH-vrijednost unutar reaktora. Svi uzorci su se pohranjivali u vijale i analizirali na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti Varian ProStar, SAD (**Slika 20.**).

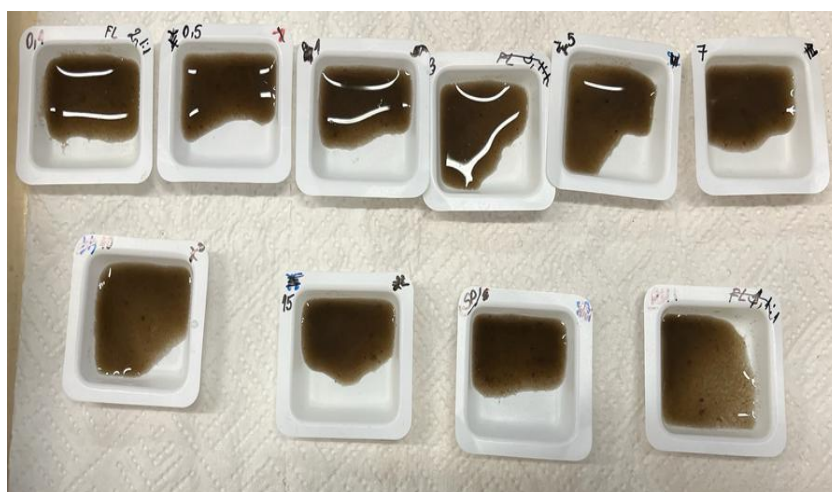
3.3.2. PRIPREMA KALIBRACIJSKIH OTOPINA

Kalibracijske otopine pripremane su u svrhu validacije izabrane metode za ekstrakciju i analizu ispitivanih aktivnih tvari. Odabrane koncentracije otopina za ispitivanje linearnosti bile su: 0,1, 0,5, 1, 3, 5, 7, 10 i 15 mg/L. Otopine koje su pripremane za ispitivanje ponovljivosti, odnosno međupreciznosti imale su koncentracije: 2, 4 i 8 mg/L. Za linearnost je pripremana po jedna otopina za svaku koncentraciju, a za ponovljivost, odnosno međupreciznost po pet otopina iste koncentracije. Otopine su pripremane na način da bi se prvo pripremila temeljna standardna otopina ispitivane tvari koncentracije 50 mg/L. Na analitičkoj vagi Mettler Toledo, XA105 (**Slika 14.**) bi se odvagalo 5 mg ispitivane tvari u čaši od 10 mL nakon čega bi se sadržaj kvantitativno prenio u odmjernu tikvicu od 100 mL pomoću lijevka i otopio u metanolu. Kasnije bi se iz tako pripremljene temeljne standardne otopine uzimali potrebni alikvoti i razrjeđivali Mili Q vodom u odmjernim tikvicama od 10 mL kako bi se dobila kalibracijska otopina potrebne koncentracije.

3.3.3. OBRADA AKTIVNOG MULJA I ŠPIKANJE

Aktivni mulj iz drugog reaktora (aktivni mulj i voda) prvo se filtrirao na Büchnerovom lijevku do suha, a zatim bi se na tehničkoj vagi u čašu od 100 mL odvagalo 8,5 g tako filtriranog mulja. U čašu bi se zatim dodala voda Milli Q do oznake 20 mL i sadržaj bi se staklenim štapićem dobro homogenizirao. Nakon toga se u lađice na analitičkoj vagi Mettler Toledo, AB 104,

Švicarska (Slika 13.) vagalo po 0,3 g pripremljenog mulja. U tako odvagani i pripremljeni mulj u lađicama prvo se dodavalo (špikalo) po 1 mL vode Milli Q za slijepu probu i redom po 1 mL kalibracijske otopine za svaku koncentraciju. Nakon toga sadržaj u lađicama se dobro homogenizirao staklenim štapićem. Tako pripremljeni sadržaj kvantitativno bi se prenio u teflonske „GreenChem“ posude volumena 100 mL (Slika 17.) (za slučaj mikrovalne ekstrakcije) ili u čaše od 50 mL koje bi se prekrile parafilmom (za slučaj ultrazvučne ekstrakcije) ispiranjem sa po 5 mL metanola. Slika 22 prikazuje konačno homogenizirani aktivni mulj u lađicama.



Slika 22. Konačno homogenizirani aktivni mulj u lađicama

3.3.4. EKSTRAKCIJA POTPOMOŽNUTA MIKROVALOVIMA

Špikani i homogenizirani mulj se ispirao sa po 5 mL metanola kao otapala u teflonske „GreenChem“ posude volumena 100 mL (Slika 17.) za ekstrakciju. Posude s tako pripremljenim uzorcima su nakon toga postavljane na karusel i dobro pričvršćene. Kako bi se za vrijeme ekstrakcije mogla pratiti temperatura i tlak, u posudu sa slijepom probom stavljaju se osjetila tlaka i temperature. Kada se karusel smjestio u pećnicu i zatvorio, odabirala se metoda ekstrakcije s točno poznatim parametrima. Zadana temperatura je bila 55 °C, vrijeme ekstrakcije 15 minuta, snaga 600 W, a zadana metoda zvala se „TLO“. Vrijeme postizanja radnih uvjeta prije početka ekstrakcije trajalo je 5 minuta, a nakon ekstrakcije čekalo bi se dok se pećnica ne bi ohladila do 30 °C. U prvom trenutku ekstrakcije (nakon 5 minuta postizanja

radnih uvjeta) i nakon toga svakih 5 minuta bilježili su se tlak i temperatura sustava. Vrijeme same ekstrakcije bilo je 15 minuta.

3.3.5. ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA

Špikani i homogenizirani mulj se ispirao sa po 5 mL metanola kao otapala u čaše volumena 50 mL za ekstrakciju. Sve čaše su prekrivane parafilmom kako bi se za vrijeme ekstrakcije očuvao sadržaj unutar čaša. Vrijeme ekstrakcije je trajalo 15 minuta, a zadana temperatura ekstrakcije bila je 55 °C.

3.3.6. FILTRIRANJE I UPRAVANJE

Nakon provedenih ekstrakcija slijedilo je filtriranje uzoraka u tikvice s okruglim dnom. Filtriranje se provodilo na standardnoj aparaturi za filtriranje kao što to prikazuje **Slika 23**. Standardna aparatura uključuje držač za lijevjak, lijevjak i filter papir (u ovom slučaju najlonski 0,45 mikronski filter papir). Prije same filtracije, filter papir navlažen je otopinom etanola kako bi tijekom filtracije gubitak uzorka na filter papiru bio što manji.



Slika 23. Standardna aparatura za filtraciju

Nakon što bi se uzorci profiltrirali, tikvice s okruglim dnom postavljanje su na uparivač Büchi Waterbath B-480, Švicarska (**Slika 19.**). Tikvica bi se postavila na prikladno mjesto na uparivaču, nakon čega bi se podesio podtlak, a voda u posudi koja zagrijava tikvicu već bi bila postavljena na 40 °C. Uparavanje se provodilo uz konstantu rotaciju tikvice. Sadržaj suhe tikvice bi se rekonstruirao s 1 mL metanola HPLC čistoće i pažljivo mućkanjem doveo u sve dijelove tikvice kako bi se pokupio sav zaostali suhi sadržaj. Sadržaj tikvice, zatim se prenosio u vialu.

3.3.7. KROMATOGRAFSKA ANALIZA

Kvantifikacija i detekcija ispitivanih tvari provedena je na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti (**eng. High-Performance Liquid Chromatography with Diode-Array Detection, HPLC-DAD**) Varian ProStar, SAD (**Slika 20.**). Volumen injektiranja uzorka je 30 µL, tlak 20-25 atmosfera, a temperatura 25-30 °C.

Analizirani su uzorci iz aeriranih reaktora, ekstrahirani uzorci i kalibracijske otopine. Prije i nakon analize uzoraka kolona se prala 65 %-tnim acetonitrilom jedan sat uz protok 0,5 mL/min. Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 %mrvlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mrvlje kiseline u acetonitrilu) pri čemu se provodila gradijenta separacija analita (**Tablica 2.**). Brzina protoka pokretne faze je 0,5 mL/min. Iz snimljenih kromatograma očitane su površine krivulja ispitivanih tvari pri odgovarajućim valnim duljinama za pojedinu tvar.

Tablica 2. Gradijent pokretne faze korišten pri HPLC-DAD analizama

| t_R , min | protok, mL/min | A, % | B, % |
|-------------|----------------|------|------|
| 0 | 0,5 | 100 | 0 |
| 2,30 | 0,5 | 92 | 8 |
| 6,00 | 0,5 | 90 | 10 |
| 11,00 | 0,5 | 70 | 30 |
| 15,00 | 0,5 | 40 | 60 |
| 18,00 | 0,5 | 5 | 95 |
| 28,00 | 0,5 | 5 | 95 |
| 28,06 | 0,5 | 100 | 0 |
| 30,00 | 0,5 | 100 | 0 |

4. REZULTATI I RASPRAVA

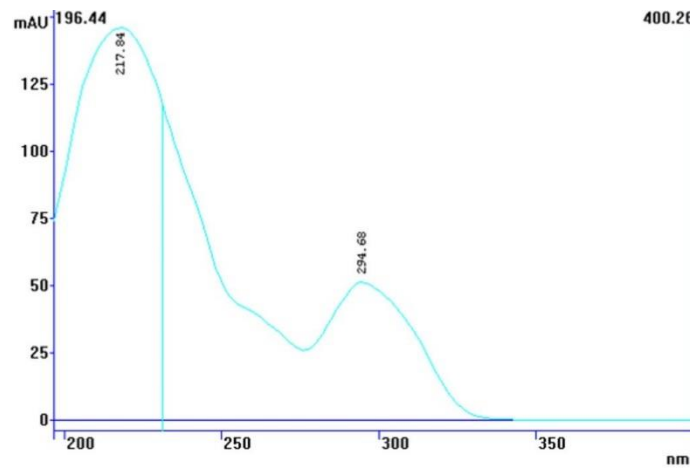
Glavni cilj ovih eksperimenata bio je razviti i optimirati metode mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije ispitivanih antiparazitika i pesticida iz aktivnog mulja za kromatografsku analizu. Postupak razvoja i optimizacije metoda podrazumijevao je validaciju same kromatografske metode, a potom i validaciju kromatografske metode uz prethodnu ekstrakciju otapalima potpomognutu mikrovalovima i ultrazvukom.

Tablica 3 prikazuje kriterije prihvatljivosti metode koje je potrebno usporediti s izračunatim vrijednostima. Osim toga praćena je biorazgradnja ispitivanih tvar, što će se također prokomentirati u ovoj obradi rezultata i raspravi.

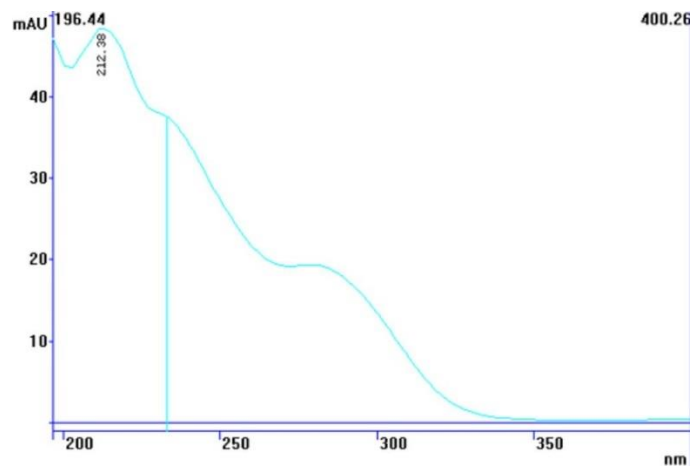
Tablica 3. Kriteriji prihvatljivosti

| Izvedbena značajka | Kriterij |
|---|--------------------------------------|
| Selektivnost | informacija |
| Linearnost | $R^2 \geq 0,995$ |
| Preciznost: <ul style="list-style-type: none">• Ponovljivost• Međupreciznost | $RSD \leq 10 \%$ $RSD \leq 15 \%$ |
| Iskoristivost | 90-110 %, 80 – 120% |
| Granica detekcije | informacija |
| Granica kvantifikacije | informacija |
| Radno područje | interval |

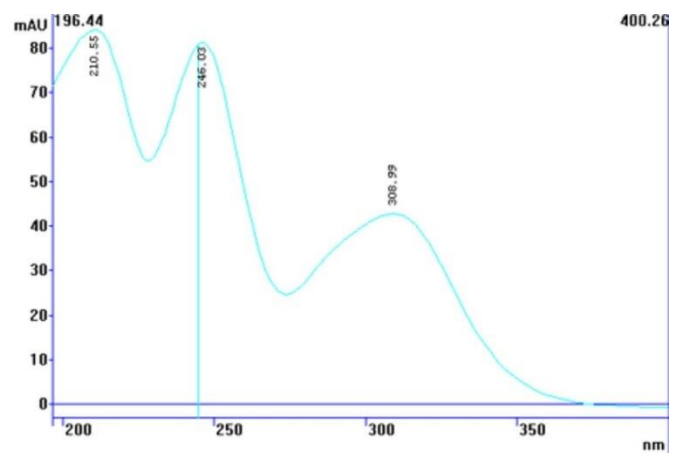
Za sve uzorke snimljeni su apsorpcijski spektri koji su prikazani na **Slikama 24, 25, 26 i 27** te su ustanovljene valne duljine pri kojima je apsorpcija elektromagnetskog zračenja najveća (**Tablica 4.**). Pri maksimumima dobivenih spektara integrirani su kromatogrami za pojedinu ispitivanu aktivnu tvar.



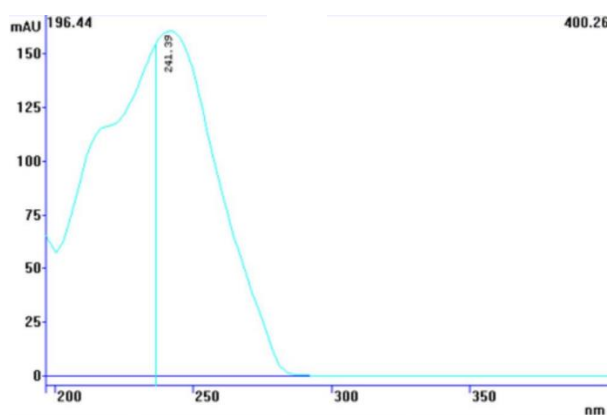
Slika 24. Apsorpcijski spektar albendazola



Slika 25. Apsorpcijski spektar febantela



Slika 26. Apsorpcijski spektar mebendazola



Slika 27. Apsorpcijski spektar tiakloprida

Tablica 4. Ispitivane tvari i njihovi apsorpcijski maksimumi i vremena zadržavanja

| Ispitivana tvar | Apsorpcijski maksimum, nm | t_R , min |
|-----------------|---------------------------|-------------|
| Albendazol | 210 | 23,4 |
| Febantel | 210 | 25,9 |
| Mebendazol | 254 | 23,9 |
| Tiakloprid | 241 | 22,7 |

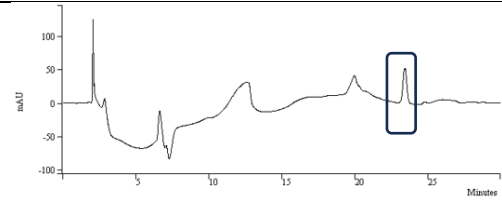
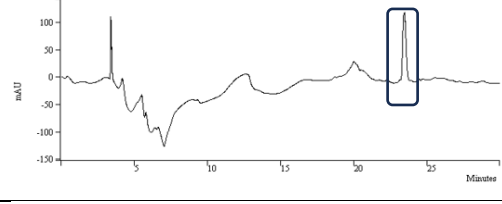
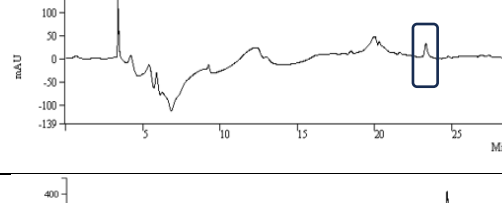
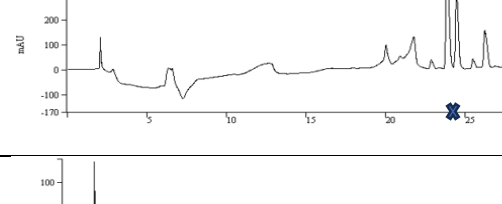
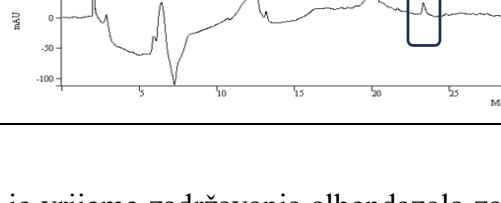
4.2. SELEKTIVNOST/SPECIFIČNOST

Selektivnost se utvrđuje usporedbom kromatograma ispitivane tvari u uzorku nakon ekstrakcije u Milli Q vodi za istu koncentraciju i usporedbom s realnim uzorkom. Kada je vrijeme zadržavanja analita u oba slučaja jednako ili približno jednako, može se zaključiti da je metoda selektivna.

4.2.1. ALBENDAZOL

Tablica 5 prikazuje redom kromatograme albendazola koncentracije 10 mg/L u: Milli Q vodi, nakon mikrovalne ekstrakcije i realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije, nakon ultrazvučne ekstrakcije i realni uzorak nakon ultrazvučne ekstrakcije te vrijeme zadržavanja albendazola.

Tablica 5. Kromatogrami uzoraka albendazola i vremena zadržavanja

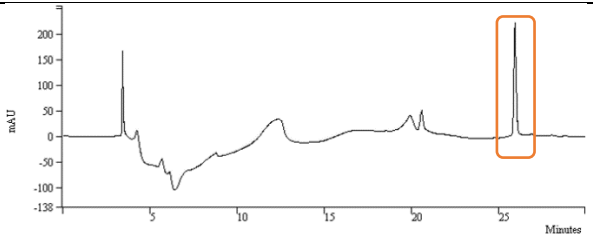
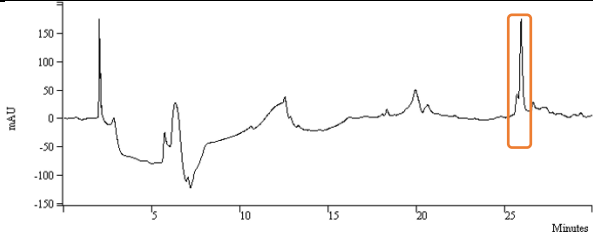
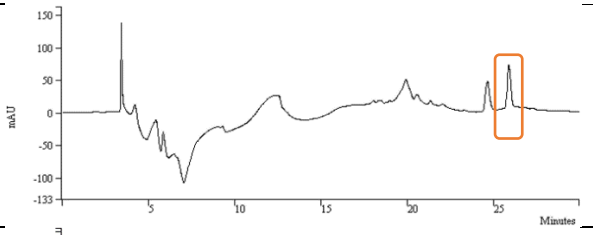
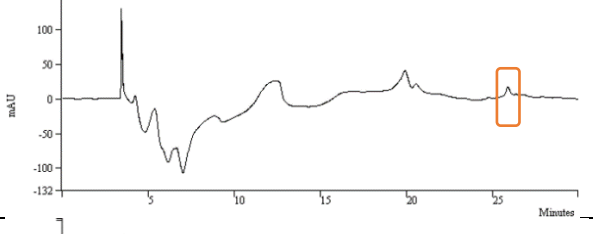
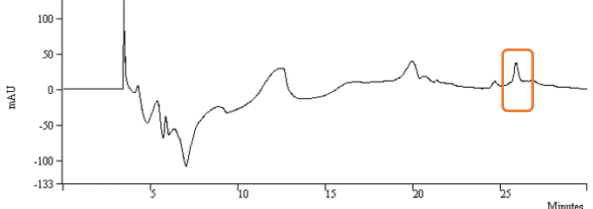
| Uzorak s albendazolom | Kromatogram | t_R , min |
|---|--|-------------|
| Koncentracije 10 mg/L u Milli Q vodi |  | 23,373 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon mikrovalne ekstrakcije |  | 23,400 |
| Realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije |  | 23,400 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon ultrazvučne ekstrakcije |  | - |
| Realni uzorak nakon ultrazvučne |  | 23,317 |

Iz **Tablice 5** je vidljivo kako je vrijeme zadržavanja albendazola za mikrovalnu ekstrakciju u slučaju realnog uzorka i uzorka špikanog otopinom albendazola koncentracije 10 mg/L gotovo jednako, tako da se može zaključiti kako je metoda selektivna u slučaju mikrovalne ekstrakcije za albendazol. S druge strane, za uzorak pripremljen ultrazvučnom metodom nije dobivena krivulja kod specifičnog vremena zadržavanja za albendazol za masenu koncentraciju od 10 mg/L. To se također dogodilo i za koncentraciju od 15 mg/L, dok se za koncentracije niže od 10 mg/L i koncentracije više od 1 mg/L albendazol pojavio na vremenu zadržavanja specifičnom za albendazol pri navedenim kromatografskim uvjetima. Stoga se može zaključiti da metoda nije selektivna za albendazol za koncentracije niže od 1 mg/L i više od 10 mg/L.

4.2.2. FEBANTEL

Tablica 6 prikazuje redom kromatograme febantela koncentracije 10 mg/L u: Milli Q vodi, nakon mikrovalne ekstrakcije i realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije, nakon ultrazvučne ekstrakcije i realni uzorak nakon ultrazvučne ekstrakcije te vrijeme zadržavanja febantela.

Tablica 6. Kromatogrami uzoraka febantela i vremena zadržavanja

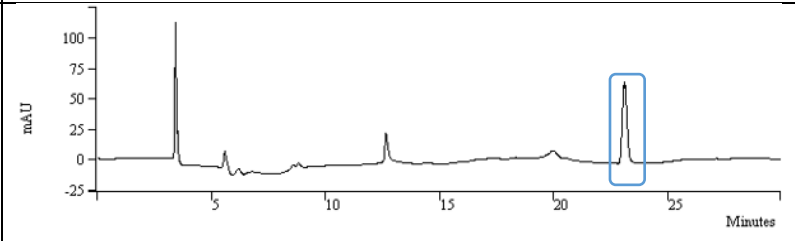
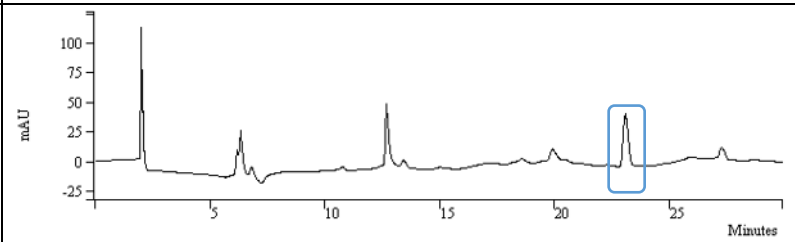
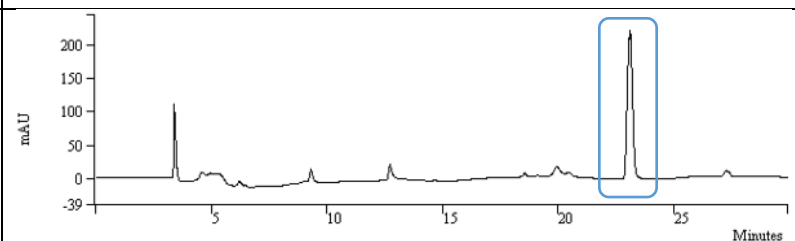
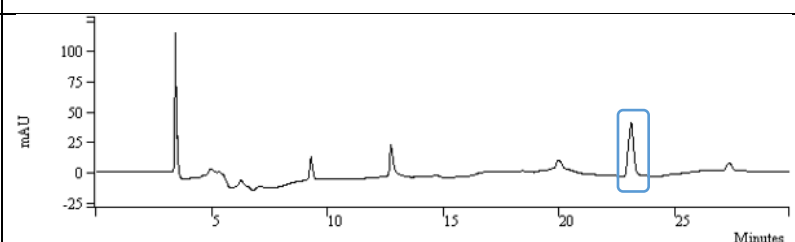
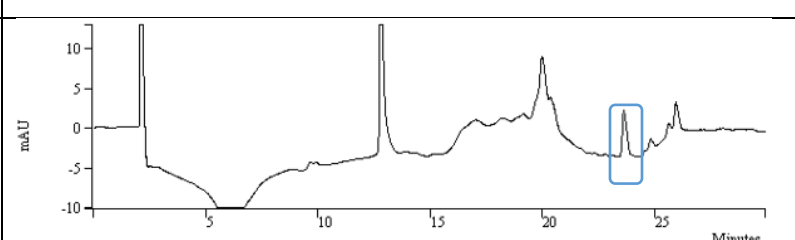
| Uzorak s febantelom | Kromatogram | t_R , min |
|---|--|-------------|
| Koncentracije 10 mg/L u Milli Q vodi |  | 25,583 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon mikrovalne ekstrakcije. |  | 25,800 |
| Realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije |  | 25,837 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon ultrazvučne ekstrakcije |  | 25,583 |
| Realni uzorak nakon ultrazvučne |  | 25,582 |

Iz **Tablice 6** je vidljivo kako je vrijeme zadržavanja febantela približno jednako za sve uzorke te se može zaključiti kako je metoda selektivna za febanfel.

4.2.3. MEBENDAZOL

Tablica 7 prikazuje redom kromatograme mebendazola koncentracije 10 mg/L u: Milli Q vodi, nakon mikrovalne ekstrakcije i realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije, nakon ultrazvučne ekstrakcije i realni uzorak nakon ultrazvučne ekstrakcije te vrijeme zadržavanja mebendazola.

Tablica 7. Kromatogrami uzoraka mebendazola i vremena zadržavanja

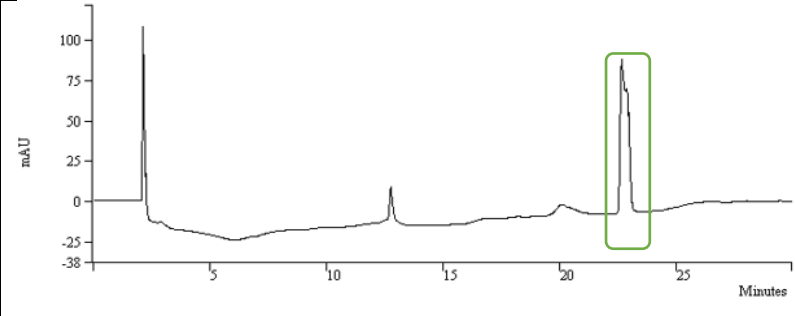
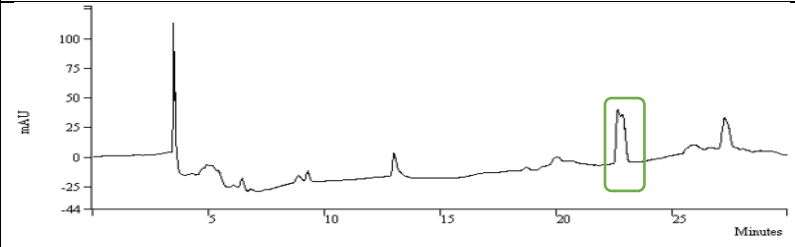
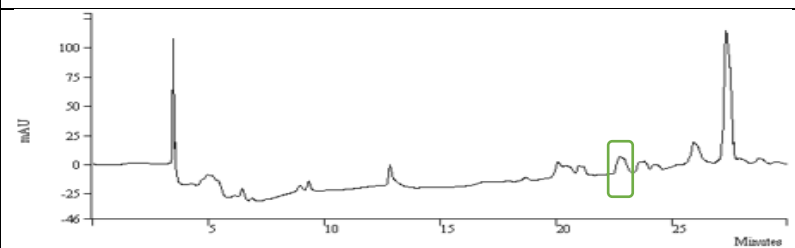
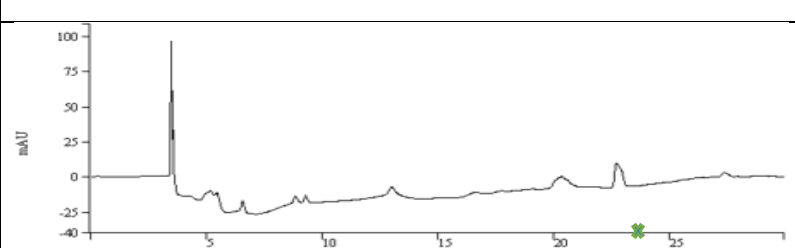
| Uzorak s mebendazolom | Kromatogram | t_R , min |
|---|--|-------------|
| Koncentracije 10 mg/L u Milli Q vodi |  | 23,099 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon mikrovalne ekstrakcije. |  | 23,082 |
| Realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije |  | 23,107 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon ultrazvučne ekstrakcije |  | 23,017 |
| Realni uzorak nakon ultrazvučne |  | 23,088 |

Iz **Tablice 7** je vidljivo kako je vrijeme zadržavanja mebendazola približno jednako za sve uzorke te se može zaključiti kako je metoda selektivna za mebendazol.

4.2.4. TIAKLOPRID

Tablica 8 prikazuje redom kromatograme tiakloprida koncentracije 10 mg/L u: Milli Q vodi, nakon mikrovalne ekstrakcije i realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije, nakon ultrazvučne ekstrakcije i realni uzorak nakon ultrazvučne ekstrakcije te vrijeme zadržavanja tiakloprida.

Tablica 8. Kromatogrami uzoraka tiakloprida i vremena zadržavanja

| Uzorak s tiaklopridom | Kromatogram | t_R , min |
|---|--|-------------|
| Koncentracije 10 mg/L u Milli Q vodi |  | 22,627 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon mikrovalne ekstrakcije. |  | 22,627 |
| Realni uzorak nakon mikrovalne ekstrakcije |  | 22,773 |
| Koncentracije 10 mg/L nakon ultrazvučne ekstrakcije |  | - |

Iz **Tablice 8** je vidljivo kako je vrijeme zadržavanja tiakloprida približno jednako za sve uzorke pripremljene mikrovalnom ekstrakcijom, tako da je metoda selektivna za uzorke tiakloprida pripremljene mikrovalnom ekstrakcijom. Za ultrazvučnu ekstrakciju uzorka tiakloprida koncentracije 10 mg/L nije dobivena jasna krivulja, isto se dogodilo i za uzorak koncentracije 15 mg/L, dok je uzorke koncentracije niže od 10 mg/L i više od 1 mg/L dobivene su kromatografske krivulje na očekivanim vremenima zadržavanja za tiaklopid. Stoga se može zaključiti da metoda nije selektivna za uzorke tiakloprida koncentracije više od 10 mg/L i niže od 1 mg/L kada su pripremani metodom ultrazvučne ekstrakcije.

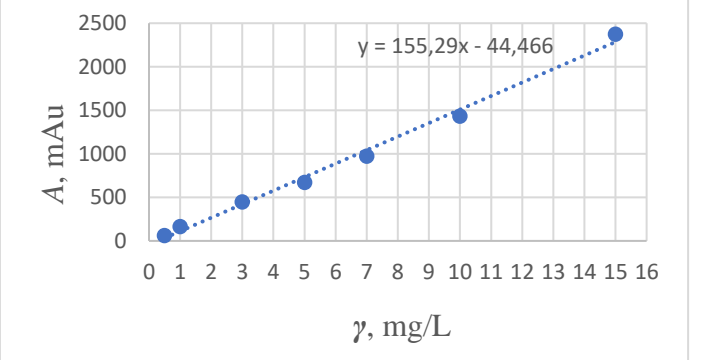
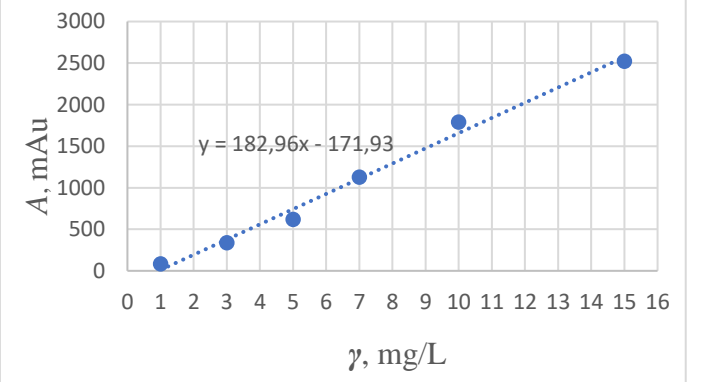
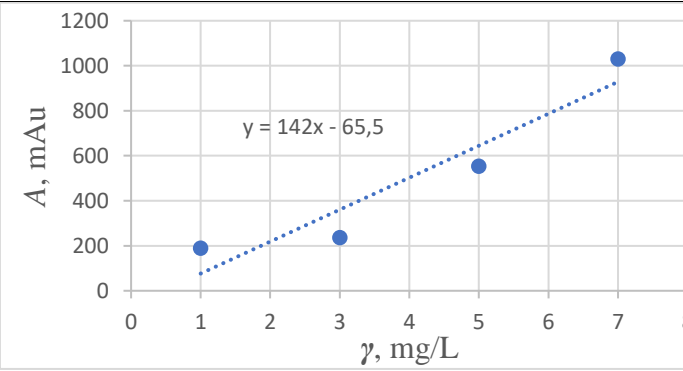
4.3. LINEARNOST

Ovisno u koncentraciji analita u uzorku dobivene su kromatografske krivulje različitih površina na kromatogramu. Površine kromatografskih krivulja proporcionalne su koncentraciji analita. Funkcijom integriranja u računalu izračunate su površine ispod krivulja, a u računalnom programu Excel su u grafove ucrtane točke kroz koje su se metodom najmanjeg srednjeg kvadratnog odstupanja ucrtali regresijski pravci. Tako se dobila funkcijska ovisnost površine ispod pika o koncentraciji analita i izradili su se umjerni pravci. Usporedbom dobivenih kvadratnih odstupanja R^2 s uvjetom u **Tablici 3** za linearnost koji kaže da za linearne metode vrijedi $R^2 > 0,995$ određeno je da li je metoda linearna za pojedinu ispitivanu tvar.

4.3.1. ALBENDAZOL

Tablica 9 prikazuje način obrade uzorka albendazola, graf ovisnosti površine ispod kromatografske krivulje kromatograma o koncentraciji albendazola u uzorku, navodi vrijednost R^2 i donosi zaključak o linearnosti metode.

Tablica 9. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za albendazol

| Metoda obrade uzorka. | Graf ovisnosti površine kromatografske krivulje o koncentraciji uzorka. | R^2 | Vrijedi li linearnost? |
|-----------------------------------|--|--------|------------------------|
| Analit pripremljen u Milli Q vodi |  <p>Scatter plot showing a linear relationship between concentration (γ, mg/L) and absorbance (A, mAu) for the Milli Q water method. The regression equation is $y = 155,29x - 44,466$.</p> | 0,9936 | DA |
| Mikrovalna ekstrakcija |  <p>Scatter plot showing a linear relationship between concentration (γ, mg/L) and absorbance (A, mAu) for the microwave extraction method. The regression equation is $y = 182,96x - 171,93$.</p> | 0,9902 | NE |
| Ultrazvučna ekstrakcija. |  <p>Scatter plot showing a linear relationship between concentration (γ, mg/L) and absorbance (A, mAu) for the ultrasonic extraction method. The regression equation is $y = 142x - 65,5$.</p> | 0,8968 | NE |

Iz **Tablice 9** vidi se kako metoda nije linearna za albendazol nakon provedene mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije za isto koncentracijsko područje kao što je to ostvareno bez prethodne pripreme uzoraka za kromatografsku analizu. R^2 vrijednost nije dovoljno velika u oba slučaja. Ipak, vidi se kako je vrijednost R^2 za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima značajno veća nego ona za ultrazvučnu i bliža tomu da se postigne linearnost. Također, za ultrazvučnu e

kstrakciju nisu dobivene kromatografske krivulje za koncentracije albendazola u uzorku niže od 1 mg/L i više od 7 mg/L. Stoga se može zaključiti da se ultrazvučnom ekstrakcijom kao metodom pripreme uzorka za kromatografsku analizu značajno smanjuje raspon linearnosti odnosno primjena ove metode za analizu albendazola u realnim uzorcima.

4.3.2. FEBANTELE

Tablica 10 prikazuje način obrade uzorka febantela, graf ovisnosti površine ispod kromatografske krivulja kromatograma o koncentraciji febantela u uzorku, navodi vrijednost R^2 i donosi zaključak o linearnosti metode.

Tablica 10. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za febantel

| Metoda obrade uzorka. | Graf ovisnosti površine kromatografske krivulje o koncentraciji uzorka. | R^2 | Vrijedi li linearnost? |
|-----------------------------------|---|--------|------------------------|
| Analit pripremljen u Milli Q vodi | | 0,9978 | DA |
| Mikrovalna ekstrakcija | | 0,9933 | NE |
| Ultrazvučna ekstrakcija. | | 0,9802 | NE |

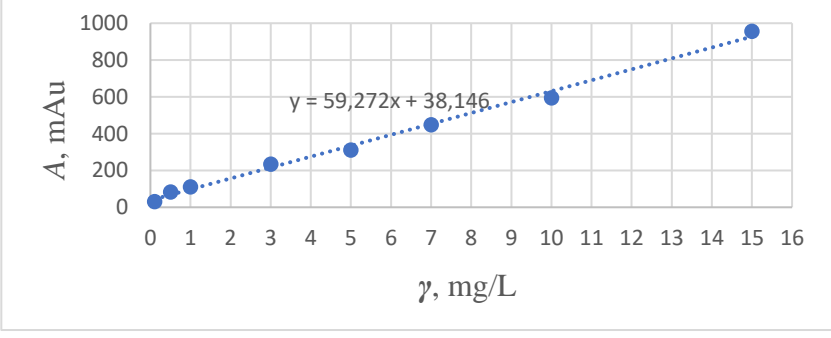
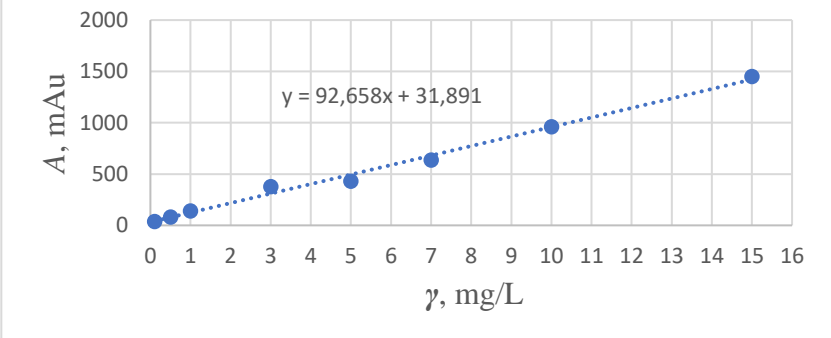
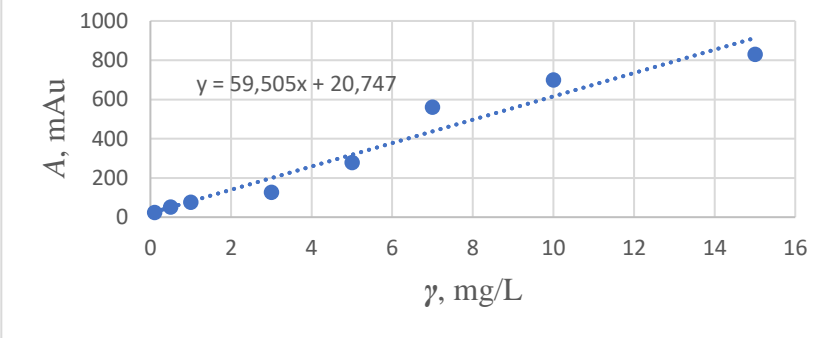
Iz **Tablice 10** vidi se kako metoda nije linearna za febantel nakon provedene mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije za isto koncentracijsko područje kao što je to ostvareno bez prethodne pripreme uzorka za kromatografsku analizu. R^2 vrijednost nije dovoljno velika u oba slučaja. Ipak, vidi se kako je vrijednost R^2 za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima značajno veća nego ona za ultrazvučnu i bliža tomu da se postigne linearnost. Također, za ultrazvučnu ekstrakciju nisu dobivene kromatografske krivulje za koncentracije febantela u uzorku niže od 5 mg/L. Stoga se može zaključiti da se ultrazvučnom ekstrakcijom kao metodom pripreme uzorka za kromatografsku analizu značajno smanjuje raspon linearnosti odnosno primjena ove metode za analizu febantela u realnim uzorcima.

4.3.3. MEBENDAZOL

Tablica 11 prikazuje način obrade uzorka mebendazola, graf ovisnosti površine ispod kromatografske krivulja kromatograma o koncentraciji mebendazola u uzorku, navodi vrijednost R^2 i donosi zaključak o linearnosti metode.

Iz **Tablice 11** vidi se kako metoda nije linearna za mebendazol nakon provedene mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije za isto koncentracijsko područje kao što je to ostvareno bez prethodne pripreme uzorka za kromatografsku analizu. R^2 vrijednost nije dovoljno velika u oba slučaja. Ipak, vidi se kako je vrijednost R^2 za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima značajno veća nego ona za ultrazvučnu i bliža tomu da se postigne linearnost.

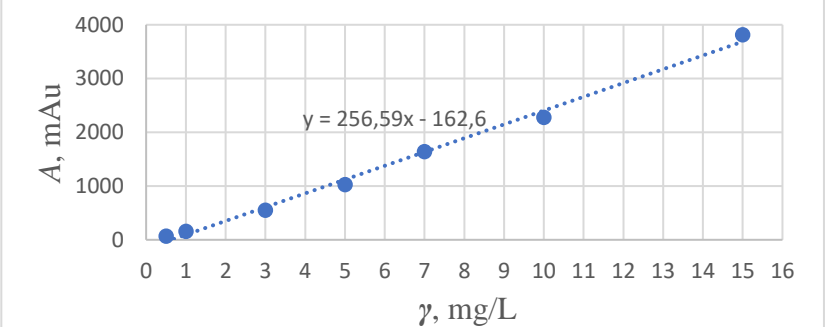
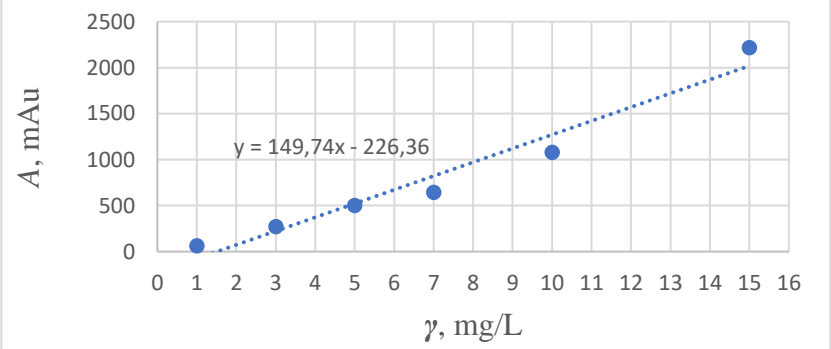
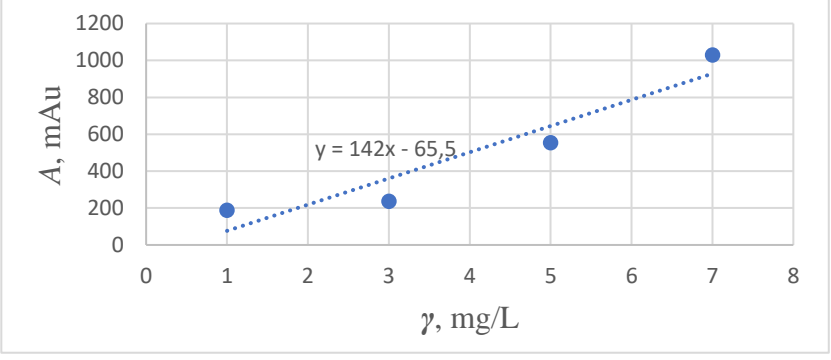
Tablica 11. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za mebendazol

| Metoda obrade uzorka. | Graf ovisnosti površine kromatografske krivulje o koncentraciji uzorka. | R^2 | Vrijedi li linearnost? |
|--------------------------------|---|--------|------------------------|
| Analit otopljen u Milli Q vodi |  <p>Scatter plot showing the linear relationship between concentration (γ, mg/L) and absorbance (A, mAu) for mebendazol in Milli Q water. The regression equation is $y = 59,272x + 38,146$.</p> | 0,9945 | DA |
| Mikrovalna ekstrakcija |  <p>Scatter plot showing the linear relationship between concentration (γ, mg/L) and absorbance (A, mAu) for mebendazol in microvalve extraction. The regression equation is $y = 92,658x + 31,891$.</p> | 0,9931 | NE |
| Ultrazvučna ekstrakcija. |  <p>Scatter plot showing the linear relationship between concentration (γ, mg/L) and absorbance (A, mAu) for mebendazol in ultrasonic extraction. The regression equation is $y = 59,505x + 20,747$.</p> | 0,9498 | NE |

4.3.4. TIAKLOPRID

Tablica 12 prikazuje način obrade uzorka tiakloprida, graf ovisnosti površine ispod kromatografske krivulja kromatograma o koncentraciji tiakloprida u uzorku, navodi vrijednost R^2 i donosi zaključak o linearnosti metode.

Tablica 12. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za tiaklopid

| Metoda obrade uzorka. | Graf ovisnosti površine kromatografske krivulje o koncentraciji uzorka. | R^2 | Vrijedi li linearnost? |
|--------------------------------|--|--------|------------------------|
| Analit otopljen u Milli Q vodi |  <p>Scatter plot showing a strong positive linear correlation between concentration (γ, mg/L) and area (A, mAu) for tiaclopid in Milli Q water. The regression equation is $y = 256,59x - 162,6$.</p> | 0,9945 | DA |
| Mikrovalna ekstrakcija |  <p>Scatter plot showing a positive linear correlation between concentration (γ, mg/L) and area (A, mAu) for tiaclopid after microwave extraction. The regression equation is $y = 149,74x - 226,36$.</p> | 0,9575 | NE |
| Ultrazvučna ekstrakcija. |  <p>Scatter plot showing a weak positive linear correlation between concentration (γ, mg/L) and area (A, mAu) for tiaclopid after ultrasonic extraction. The regression equation is $y = 142x - 65,5$.</p> | 0,8968 | NE |

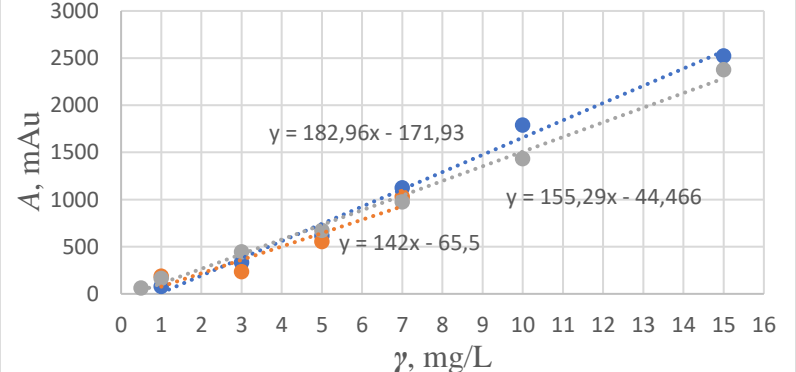
Iz **Tablice 12** vidi se kako metoda nije linearna za tiaklopid nakon provedene mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije za isto koncentracijsko područje kao što je to ostvareno bez prethodne pripreme uzoraka za kromatografsku analizu. R^2 vrijednost nije dovoljno velika u oba slučaja. Ipak, vidi se kako je vrijednost R^2 za ekstrakciju potpomognutu mikrovalovima značajno veća nego ona za ultrazvučnu i bliža tomu da se postigne linearnost. Također, za ultrazvučnu ekstrakciju nisu dobivene kromatografske krivulje za koncentracije tiakloprida u uzorku niže

od 1 mg/L i više od 7 mg/L. Stoga se može zaključiti da se ultrazvučnom ekstrakcijom kao metodom pripreme uzorka za kromatografsku značajno smanjuje raspon linearnosti odnosno primjena ove metode za analizu tiakloprida u realnim uzorcima.

4.4. OSJETLJIVOST

Osjetljivost metoda određena je nagibima umjernih pravaca ovisnosti površine ispod kromatografske krivulje o koncentraciji analita. **Tablica 13** prikazuje odnos osjetljivosti metoda za pojedinu ispitivanu tvar u slučaju mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije, te osjetljivost za slučaj kada je ispitivana tvar pripremljena u Milli Q vodi.

Tablica 13. Osjetljivosti metoda za pojedinu ispitivanu tvar u slučaju mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije, te za ispitivanu tvar pripremljenu u Milli Q vodi. (Plave točke u svim grafovima predstavljaju mikrovalnu ekstrakciju zajedno s plavim regresijskim pravcem, isto vrijedi za ultrazvučnu ekstrakciju označenu narančastom bojom i za analit pripremljen u Milli Q vodi označen sivom bojom)

| Analit | Graf usporedbe osjetljivosti za metode | Osjetljivost, mg/L |
|------------|--|---|
| Albendazol |  | Mikrovalna: 182,96 Ultrazvučna: 142,00 Milli Q: 155,29 |

Tablica 13. (nastavak na str. 41.) Osjetljivosti metoda za pojedinu ispitivanu tvar u slučaju mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije, te za ispitivanu tvar pripremljenu u Milli Q vodi. (Plave točke u svim grafovima predstavljaju mikrovalnu ekstrakciju zajedno s plavim regresijskim pravcem, isto vrijedi za ultrazvučnu ekstrakciju označenu narančastom bojom i za analit pripremljen u Milli Q vodi označen sivom bojom)

| Analit | Graf usporedbe osjetljivosti za metode | Osjetljivost, mg/L |
|------------|--|---|
| Febantel | | Mikrovalna: 123,64 Ultrazvučna: 29,16 Milli Q: 192,26 |
| Mebendazol | | Mikrovalna: 92,658 Ultrazvučna: 59,505 Milli Q: 59,272 |
| Tiaklopid | | Mikrovalna: 149,74 Ultrazvučna: 142,00 Milli Q: 256,59 |

Iz **Tablice 13** vidi se kako je metoda za svaki analit osjetljivija u slučaju mikrovalne ekstrakcije u odnosu na ultrazvučnu. Također, može se zaključiti kako osjetljivost raste sljedećim redoslijedom za ispitivane spojeve kod mikrovalne ekstrakcije: mebendazol, febantel, tiaklopid, albendazol. Uspoređujući osjetljivost za metodu mikrovalne ekstrakcije i za analite pripremljene u Milli Q vodi, vidi se kako je za slučaj albendazola i mebendazola osjetljivost veća za metodu mikrovalne ekstrakcije, dok je za febantel i tiaklopid osjetljivost veća u slučaju analita pripremljenih u Milli Q vodi. Očigledno, matica ima veći utjecaj u slučaju febantela i tiakloprida što smanjuje osjetljivost metode.

4.5. PRECIZNOST

Preciznost se ispitivala karakteristikama ponovljivosti i međupreciznosti za koncentracije: 2, 4 i 8 mg/L. Za svaku koncentraciju pripremano je po pet otopina prvo za preciznost, a onda sljedeći dan za međupreciznost.

Maksimalne dozvoljene vrijednosti relativnih standardnih odstupanja (*RSD*) za ponovljivost u ultra čistoj vodi je $RSD < 10 \%$, a za ponovljivost u uzorku s muljem $RSD < 15 \%$.

Nakon statističke obrade podataka za ispitivane tvari napravljene su tablice s konačnim rezultatima koje prikazuju standardno odstupanje (*SD*) i relativno standardno odstupanje (*RSD*) za provedenu preciznost i međupreciznost za ponovljivost koncentracija, ali i vremena zadržavanja ispitivane tvari.

4.5.1 ALBENDAZOL

Tablice 14, 15 i 16 prikazuju navedene podatke redom za ponovljivost u Milli Q vodi, u slučaju obrade uzorka mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom.

Tablica 14. Podatci za ponovljivost albendazola pripremljenog u Milli Q vodi

| PONOVLJIVOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
|--|-----------------|--------------------|----------|--------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 3,04 | 0,032108 | 0,40 |
| | t_R , min | 23,48 | 0 | 0,00 |
| 4,0 | γ , mg/L | 1,69 | 0,024679 | 0,62 |
| | t_R , min | 23,46 | 0,000894 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 0,94 | 0,020834 | 1,04 |
| | t_R , min | 23,46 | 0,000447 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 7,74 | 0,5439 | 6,80 |
| | t_R , min | 23,48 | 0 | 0,00 |
| 4,0 | γ , mg/L | 4,05 | 0,324031 | 8,10 |
| | t_R , min | 23,46 | 0,000894 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,39 | 0,422251 | 21,11 |
| | t_R , min | 23,46 | 0,000447 | 0,00 |

Tablica 15. Podatci za ponovljivost uzorka albendazola pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|---|-----------------|--------------------|------|--------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 8,29 | 0,06 | 0,70 |
| | t_R , min | 23,45 | 0,02 | 0,09 |
| 4,0 | γ , mg/L | 5,18 | 0,35 | 8,77 |
| | t_R , min | 23,44 | 0,00 | 0,01 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,26 | 0,33 | 16,64 |
| | t_R , min | 23,42 | 0,01 | 0,03 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 12,59 | 2,86 | 35,73 |
| | t_R , min | 23,41 | 0,01 | 0,06 |
| 4,0 | γ , mg/L | 4,62 | 1,41 | 35,33 |
| | t_R , min | 23,37 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 3,06 | 0,20 | 9,97 |
| | t_R , min | 23,34 | 0,01 | 0,02 |

Tablica 16. Podatci za ponovljivost uzorka albendazola pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|--|-----------------|--------------------|-----------|----------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 9,03 | 0,54 | 6,70 |
| | t_R , min | 23,39 | 0,01 | 0,05 |
| 4,0 | γ , mg/L | 4,29 | 0,07 | 1,87 |
| | t_R , min | 23,37 | 0,00 | 0,02 |
| 2,0 | γ , mg/L | 1,03 | 0,19 | 9,63 |
| | t_R , min | 23,37 | 0,00 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 5,23 | 1,00 | 12,55 |
| | t_R , min | 23,14 | 0,25 | 1,08 |
| 4,0 | γ , mg/L | 2,78 | 0,21 | 5,16 |
| | t_R , min | 23,15 | 0,00 | 0,01 |
| 2,0 | γ , mg/L | 0,98 | 0,06 | 3,19 |
| | t_R , min | 23,12 | 0,01 | 0,05 |

Iz **Tablice 14** vidi se kako su zadovoljni kriteriji *RSD* vrijednosti za albendazol u ultra čistoj vodi u slučaju ponovljivosti, dok za međupreciznost postoji odstupanje kod koncentracije od 2 mg/L gdje *RSD* vrijednost iznosi 21,11 %. Sva odstupanja za vremena zadržavanja su zadovoljena.

Iz **Tablice 15** vidi se kako nisu zadovoljni kriteriji *RSD* vrijednosti za albendazol za metodu mikrovalne ekstrakcije za koncentracije. Postoji manje odstupanje kod ponovljivosti pri koncentraciji od 2 mg/L i dva veća odstupanja kod međupreciznosti za koncentracije 8 i 4 mg/L, dok *RSD* vrijednosti za vremena zadržavanja zadovoljavaju vrijednost.

Iz **Tablice 16** vidi se kako su zadovoljeni sve *RSD* vrijednosti i za koncentracije i za vremena zadržavanja kod ultrazvučne ekstrakcije.

Metoda pripreme uzorka mikrovalnom ekstrakcijom se ovaj put nije pokazala dovoljno preciznom, dok je metoda pripreme uzorka ultrazvučnom ekstrakcijom ovaj put dala bolje rezultate.

4.5.2. FEBANTEL

Tablice 17, 18 i 19 prikazuju navedene podatke redom za ponovljivost u Milli Q vodi, u slučaju obrade uzorka mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom.

Tablica 17. Podatci za ponovljivost febantela otopljenog u Milli Q vodi

| PONOVLJIVOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
|--|-----------------|--------------------|------|-------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 9,61 | 0,03 | 0,35 |
| | t_R , min | 25,87 | 0,01 | 0,06 |
| 4,0 | γ , mg/L | 5,21 | 0,02 | 0,49 |
| | t_R , min | 25,88 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,64 | 0,09 | 4,57 |
| | t_R , min | 25,88 | 0,00 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 2,96 | 0,04 | 0,56 |
| | t_R , min | 25,93 | 0,01 | 0,05 |
| 4,0 | γ , mg/L | 1,43 | 0,03 | 0,74 |
| | t_R , min | 25,91 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 0,78 | 0,02 | 1,25 |
| | t_R , min | 25,91 | 0,00 | 0,00 |

Tablica 18. Podatci za ponovljivost uzorka febantela pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|---|-----------------|--------------------|-------|---------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 9,36 | 0,41 | 5,08 |
| | t_R , min | 25,86 | 0,01 | 0,18 |
| 4,0 | γ , mg/L | 5,55 | 0,04 | 0,93 |
| | t_R , min | 25,83 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,59 | 0,08 | 3,91 |
| | t_R , min | 25,83 | 0,00 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 17,56 | 16,37 | 204,59 |
| | t_R , min | 25,93 | 0,01 | 0,05 |
| 4,0 | γ , mg/L | 9,38 | 8,89 | 222,24 |
| | t_R , min | 25,91 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 3,96 | 3,69 | 184,51 |
| | t_R , min | 25,91 | 0,00 | 0,00 |

Tablica 19. Podatci za ponovljivost uzorka febantela pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|--|-----------------|--------------------|-----------|----------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 30,08 | 3,04 | 37,99 |
| | t_R , min | 25,94 | 0,01 | 0,18 |
| 4,0 | γ , mg/L | 17,80 | 0,70 | 17,42 |
| | t_R , min | 25,88 | 0,01 | 0,13 |
| 2 | γ , mg/L | 11,77 | 0,17 | 8,30 |
| | t_R , min | 25,85 | 0,00 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 7,16 | 0,82 | 10,25 |
| | t_R , min | 25,91 | 0,00 | 0,02 |
| 4,0 | γ , mg/L | 5,31 | 0,26 | 6,48 |
| | t_R , min | 25,87 | 0,02 | 0,27 |
| 2 | γ , mg/L | -0,04 | 0,03 | 1,57 |
| | t_R , min | 25,87 | 0,01 | 0,05 |

Iz **Tablice 17** vidi se kako sve *RSD* vrijednosti zadovoljavaju kriterije za febantel pripremljen u Milli Q vodi. Iz **Tablice 18** vidi se kako su za mikrovalnu ekstrakciju kod ponovljivosti sve *RSD* vrijednosti zadovoljene, dok za međupreciznost jako odskaču za sve ispitivane koncentracije. Iz **Tablice 19** vidi se kako za ultrazvučnu ekstrakciju prilikom ponovljivosti, uglavnom nisu zadovoljene *RSD* vrijednosti za koncentracije, dok kod međupreciznosti jesu. Sve *RSD* vrijednosti su zadovoljene za vremena zadržavanja.

Može se zaključiti kako metoda nije dovoljno precizna u oba slučaja za febantel.

4.5.3. MEBENDAZOL

Tablice 20, 21 i 22 prikazuju navedene podatke redom za ponovljivost u Milli Q vodi, u slučaju obrade uzorka mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom.

Tablica 20. Podatci za ponovljivost mebendazola pripremljenog u Milli Q vodi

| PONOVLJIVOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
|--|-----------------|---------------------------|-----------|---------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 13,99 | 0,26 | 3,27 |
| | t_R , min | 23,15 | 0,00 | 0,00 |
| 4,0 | γ , mg/L | 12,08 | 0,20 | 5,02 |
| | t_R , min | 23,15 | 0,01 | 0,04 |
| 2,0 | γ , mg/L | 6,09 | 0,14 | 7,07 |
| | t_R , min | 23,18 | 0,00 | 0,01 |
| MEĐUPRECIZNOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 10,10 | 0,11 | 1,41 |
| | t_R , min | 23,16 | 0,01 | 0,05 |
| 4,0 | γ , mg/L | 3,88 | 0,38 | 9,43 |
| | t_R , min | 23,16 | 0,02 | 0,08 |
| 2,0 | γ , mg/L | 0,48 | 0,16 | 7,78 |
| | t_R , min | 23,15 | 0,00 | 0,02 |

Tablica 21. Podatci za ponovljivost uzorka mebendazola pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|---|-----------------|---------------------------|-----------|---------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 7,65 | 1,44 | 17,94 |
| | t_R , min | 23,17 | 0,01 | 0,03 |
| 4,0 | γ , mg/L | 3,49 | 0,14 | 3,52 |
| | t_R , min | 23,15 | 0,01 | 0,06 |
| 2,0 | γ , mg/L | 0,83 | 0,46 | 22,98 |
| | t_R , min | 23,14 | 0,00 | 0,01 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 5,13 | 0,20 | 2,52 |
| | t_R , min | 23,25 | 0,20 | 0,86 |
| 4,0 | γ , mg/L | 4,58 | 0,12 | 2,91 |
| | t_R , min | 23,19 | 0,01 | 0,03 |
| 2,0 | γ , mg/L | 3,75 | 0,18 | 8,87 |
| | t_R , min | 23,18 | 0,00 | 0,02 |

Tablica 22. Podatci za ponovljivost uzorka mebendazola pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|--|-----------------|---------------------------|-----------|---------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 1,13 | 0,10 | 1,24 |
| | t_R , min | 23,08 | 0,01 | 0,05 |
| 4,0 | γ , mg/L | 0,98 | 1,34 | 33,39 |
| | t_R , min | 23,08 | 0,02 | 0,10 |
| 2,0 | γ , mg/L | -0,62 | 0,33 | 16,48 |
| | t_R , min | 23,07 | 0,01 | 0,04 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 1,10 | 0,11 | 1,42 |
| | t_R , min | 23,07 | 0,00 | 0,02 |
| 4,0 | γ , mg/L | 1,19 | 0,91 | 22,69 |
| | t_R , min | 23,07 | 0,00 | 0,01 |
| 2,0 | γ , mg/L | 0,21 | 0,26 | 13,04 |
| | t_R , min | 23,07 | 0,00 | 0,01 |

Iz **Tablice 20** vidljivo je kako sve *RSD* vrijednosti zadovoljavaju kriterije za mebendazol pripremljen Milli Q vodi. Iz **Tablice 21** vidi se kako su za mikrovalnu ekstrakciju kod međupreciznosti sve *RSD* vrijednosti zadovoljene, dok za ponovljivost manje odskaku za koncentracije. Iz **Tablice 22** vidi se kako za ultrazvučnu ekstrakciju prilikom ponovljivosti nisu zadovoljene *RSD* vrijednosti kod koncentracija osim za koncentraciju 8 mg/L, dok kod međupreciznosti samo vrijednost *RSD* za koncentraciju 4 mg/L manje odskaku. Sve *RSD* vrijednosti su zadovoljene za vremena zadržavanja. Konačno, može se zaključiti kako metoda nije precizna u oba slučaja.

4.5.4. TIAKLOPRID

Tablice 23, 24 i 25 prikazuju podatke za ponovljivost redom u Milli Q vodi, u slučaju obrade uzorka mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom

Tablica 23. Podatci za ponovljivost tiakloprida pripremljenog u Milli Q vodi

| PONOVLJIVOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
|--|-----------------|--------------------|-----------|----------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 8,25 | 0,54 | 6,76 |
| | t_R , min | 22,73 | 0,00 | 0,00 |
| 4,0 | γ , mg/L | 4,21 | 0,04 | 1,04 |
| | t_R , min | 22,73 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,66 | 0,06 | 3,18 |
| | t_R , min | 22,71 | 0,00 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST U ULTRAČISTOJ VODI | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 7,17 | 0,05 | 0,65 |
| | t_R , min | 22,73 | 0,00 | 0,00 |
| 4,0 | γ , mg/L | 3,66 | 0,55 | 13,79 |
| | t_R , min | 22,72 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 1,95 | 0,72 | 35,82 |
| | t_R , min | 22,73 | 0,02 | 0,09 |

Tablica 24. Podatci za ponovljivost uzorka tiakloprida pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|---|-----------------|--------------------|-----------|----------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 9,10 | 0,42 | 5,24 |
| | t_R , min | 22,71 | 0,00 | 0,01 |
| 4,0 | γ , mg/L | 3,94 | 0,18 | 4,49 |
| | t_R , min | 22,70 | 0,01 | 0,07 |
| 2,0 | γ , mg/L | 3,59 | 0,04 | 1,99 |
| | t_R , min | 22,71 | 0,00 | 0,00 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE MIKROVALNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | <i>SD</i> | <i>RSD</i> , % |
| 8,0 | γ , mg/L | 9,06 | 0,03 | 0,34 |
| | t_R , min | 22,69 | 0,01 | 0,06 |
| 4,0 | γ , mg/L | 4,73 | 0,14 | 3,44 |
| | t_R , min | 22,70 | 0,01 | 0,05 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,84 | 0,10 | 4,82 |
| | t_R , min | 22,69 | 0,01 | 0,07 |

Tablica 25. Podatci za ponovljivost uzorka tiakloprida pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom

| PONOVLJIVOST ZA PRIPREMU UZORAKA ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
|--|-----------------|--------------------|------|--------------|
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 4,42 | 0,40 | 4,99 |
| | t_R , min | 22,80 | 0,01 | 0,06 |
| 4,0 | γ , mg/L | 2,17 | 0,05 | 1,14 |
| | t_R , min | 22,65 | 0,22 | 0,98 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,11 | 0,55 | 27,62 |
| | t_R , min | 22,87 | 0,12 | 0,53 |
| MEĐUPRECIZNOST ZA UZORKE DOBIVENE ULTRAZVUČNOM EKSTRAKCIJOM | | | | |
| γ , mg/L | | srednja vrijednost | SD | RSD, % |
| 8,0 | γ , mg/L | 3,85 | 0,07 | 0,86 |
| | t_R , min | 22,74 | 0,01 | 0,05 |
| 4,0 | γ , mg/L | 2,60 | 0,05 | 1,32 |
| | t_R , min | 22,75 | 0,00 | 0,00 |
| 2,0 | γ , mg/L | 2,11 | 0,02 | 1,22 |
| | t_R , min | 22,79 | 0,00 | 0,00 |

Iz **Tablice 23** vidljivo je kako sve *RSD* vrijednosti zadovoljavaju kriterije za tiaklopid pripremljen u Milli Q vodi kod ponovljivosti, do manjih odstupanja dolazi kod ispitivanja međupreciznosti za koncentracije. Iz **Tablice 24** vidi se kako su za mikrovalnu ekstrakciju kod ponovljivosti i međupreciznosti sve *RSD* vrijednosti zadovoljene. Iz **Tablice 25** vidi se kako za ultrazvučnu ekstrakciju prilikom ponovljivosti nije zadovoljena jedna *RSD* vrijednosti kod koncentracije 2 mg/L. Odstupanje pri koncentraciji od 2 mg/L može se povezati s odstupanjem od linearnosti prilikom pripreme uzoraka metodom ultrazvučne ekstrakcije kod tiakloprida pri koncentracijama nižima od 1 mg/L. Očito je kako pri nižim koncentracijama analita matrica ima značajniji utjecaj. Zbog većeg utjecaja matrice pri nižim koncentracijama smanjuje se linearnost i preciznost metode. Kod međupreciznosti za pripremu uzoraka metodom ultrazvučne ekstrakcije sve *RSD* vrijednosti su zadovoljene. Sve *RSD* vrijednosti su zadovoljene za vremena zadržavanja.

Može se zaključiti kako je metoda precizna za pripremu uzoraka tiakloprida metodom mikrovalne ekstrakcije.

4.6. ISKORISTIVOST

Iskorištenja su računata kao koncentracije računate iz umjernih pravaca iz poznatih vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja podijeljene s teoretskom koncentracijom.

Granice prihvatljivosti iskorištenja su 90 – 100 % za ultra čistu vodu, odnosno 80 -120 % za uzorke pripremljene mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom. **Tablice 26, 27, 28 i 29** prikazuju podatke za istinitost za ispitivane tvari koje su dobivene nakon statističke obrade podataka.

Tablica 26. Iskoristivost metoda za albendazol

| ULTRAČISTA VODA | | | ULTRAZVUČNA-MULJ | | | MIKROVALNA-MULJ | | |
|--------------------|---------------------|------------------|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|
| γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % |
| 8,0 | 85,42 | 76,82 | 8,0 | 112,84 | 90,53 | 8,0 | 103,68 | 115,44 |
| 4,0 | 76,66 | | 4,0 | 107,28 | | 4,0 | 129,60 | |
| 2,0 | 68,37 | | 2,0 | 51,46 | | 2,0 | 113,05 | |

Tablica 27. Iskoristivost metoda za febantel

| ULTRAČISTA VODA | | | ULTRAZVUČNA-MULJ | | | MIKROVALNA-MULJ | | |
|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|
| γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % |
| 8,0 | 120,15 | 127,51 | 8,0 | 89,51 | 73,50 | 8,0 | 117,01 | 128,39 |
| 4,0 | 130,20 | | 4,0 | 132,82 | | 4,0 | 138,70 | |
| 2,0 | 132,17 | | 2,0 | -1,83 | | 2,0 | 129,46 | |

Tablica 28. Iskoristivost metoda za mebendazol

| ULTRAČISTA VODA | | | ULTRAZVUČNA-MULJ | | | MIKROVALNA-MULJ | | |
|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|
| γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % |
| 8,0 | 141,46 | 81,65 | 8,0 | 13,70 | 17,94 | 8,0 | 64,14 | 122,01 |
| 4,0 | 100,99 | | 4,0 | 29,72 | | 4,0 | 114,55 | |
| 2,0 | 2,50 | | 2,0 | 10,40 | | 2,0 | 187,33 | |

Tablica 29. Iskoristivost metoda za tiaklopid

| ULTRAČISTA VODA | | | ULTRAZVUČNA-MULJ | | | MIKROVALNA-MULJ | | |
|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|--------------------|---------------------|---------------|
| γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % | γ , mg/L | iskoristivost, % | $i_{sr.}$, % |
| 8,0 | 103,28 | 114,22 | 8,0 | 39,10 | 36,25 | 8,0 | 113,81 | 130,61 |
| 4,0 | 105,62 | | 4,0 | 34,68 | | 4,0 | 98,44 | |
| 2,0 | 133,77 | | 2,0 | 34,95 | | 2,0 | 179,58 | |

Iz tablica je vidljivo kako su rasponi iskoristivosti zadovoljeni za albendazol u slučaju pripreme uzoraka metodom mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije, što nije slučaj za pripremu uzoraka albendazola u Milli Q vodi. Za mebendazol raspon je zadovoljen samo u slučaju pripreme uzorka u Milli Q vodi. U slučaju mebendazola rasponi iskoristivosti nisu zadovoljeni, osim u slučaju pripreme uzorka u Milli Q vodi i pripreme uzorka metodom mikrovalne ekstrakcije za koncentraciju 4 mg/L u oba slučaja. Kod ispitivanja iskoristivosti tiakloprida rasponi su zadovoljeni za pripreme uzoraka u Milli Q vodi i pripreme uzoraka metodom mikrovalne ekstrakcije za koncentracije 4 i 8 mg/L u oba slučaja

Iz navedenog, može se zaključiti kako su metode pripreme uzoraka mikrovalnom i ultrazvučnom ekstrakcijom zadovoljile samo za albendazol. Za sve ostale slučajeve pripreme uzoraka i za sve analite vrijednosti iskoristivosti nisu u željenom rasponu. Također, vidi se kako su odstupanja najveća pri nižim koncentracijama iz čega se može zaključiti da je utjecaj matice znatniji pri nižim koncentracijama.

4.7. GRANICA KVANTIFIKACIJE I DETEKCIJE

Granica kvantifikacije i granica detekcije računata su prema izrazima (4) i (3) i to su teorijske vrijednosti dobivene navedenim proračunom. Drugi način određivanja granica kvantifikacije i granica detekcije je grafički. Kao granica kvantifikacije uzima se najmanja koncentracija analita koja je uspješno kvantificirana, a kao granica detekcije uzima se vrijednost duplo manja od granice kvantifikacije. Rezultati su prikazani u **Tablici 30**.

Tablica 30. Prikaz ispitivane tvari, metoda i granica kvantifikacije i detekcije

| Analit | Metoda | GK, mg/L | | GD, mg/L | |
|------------|-------------------------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| | | prema izrazu (4) | grafičkom metodom | prema izrazu (3) | grafičkom metodom |
| Albendazol | Otopljen u Milli Q vodi | 7,40 | 0,5 | 2,44 | 0,25 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 10,10 | 1 | 3,32 | 0,5 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 21,98 | 1 | 7,25 | 0,5 |
| Febantel | Otopljen u Milli Q vodi | 3,91 | 0,1 | 1,29 | 0,05 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 6,95 | 0,1 | 2,30 | 0,05 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 20,10 | 5 | 6,62 | 2,5 |
| Mebendazol | Otopljen u Milli Q vodi | 6,14 | 0,1 | 2,02 | 0,05 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 6,91 | 0,1 | 2,28 | 0,05 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 18,99 | 0,1 | 6,27 | 0,05 |
| Tiaklopid | Otopljen u Milli Q vodi | 6,71 | 0,5 | 2,21 | 0,25 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 10,55 | 1 | 3,48 | 0,5 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 21,30 | 1 | 7,03 | 0,5 |

Iz **Tablice 30** vidi se kako su velike razlike određivanja granice kvantifikacije i granice detekcije metodom proračuna po jednadžbama (4) i (3) u odnosu na grafičku metodu određivanja. Kao relevantni rezultati ovaj put su uzeti rezultati određeni grafičkom metodom jer su zadovoljavajući odazivi za analite dobiveni pri koncentracijama granice kvantifikacije

koji su određeni grafičkom metodom (koji su također puno manji od onih dobivenih računskom metodom). Promatrajući rezultate dobivene grafičkom metodom vidi se kako su granice kvantifikacije, a tako i detekcije dobivene za albendazol u slučaju pripreme uzorka u Milli Q vodi niže u odnosu na vrijednosti dobivene za pripremu uzoraka metodom mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije koje su međusobno jednake. Očito je da su zbog utjecaja matrice vrijednosti granice kvantifikacije i detekcije više u odnosu na uzorak pripremljen u Milli Q vodi. Kod febantela su se priprava uzorka u Milli Q vodi i metoda priprave uzorka mikrovalnom ekstrakcijom pokazale jednako uspješne, dok je je ultrazvučna metoda dala lošiji rezultat. Kod mebendazola vrijednosti granica kvantifikacija i granica detekcije jednake su za sve metode. Za tiakloprid priprema uzorka u Milli Q vodi dala je bolji rezultat u odnosu na metode mikrovalne ekstrakcije i ultrazvučne ekstrakcije koje su međusobno jednake.

Iz navedenog, može se zaključiti kako se zbog utjecaja matrice povećavaju granica kvantifikacije i detekcije (osim u slučaju mebendazola). Također, metoda pripreme uzorka mikrovalnom ekstrakcijom pokazala se bolja kod febantela u odnosu na ultrazvučnu metodu pripreme uzoraka. U svim ostalim slučajevima metoda pripreme uzorka (mikrovalna ili ultrazvučna) nije donosila razliku u vrijednostima granicama kvantifikacije i detekcije kod pojedinog analita.

4.8. RADNO PODRUČJE

Kao donja granica radnog područja uzeta je granica kvantifikacije pojedinog analita u metodi određena grafički, a kao gornja granica radnog područja uzeta je najviša koncentracija ispitivanog analita koja je zadovoljavala linearnost umjernog pravca. **Tablica 31** prikazuje radna područja za pojedinu metodu i pojedini analit.

Tablica 31. Prikaz radnih područja za pojedinu metodu i pojedini analit

| Analit | Metoda | Donja granica, mg/L | Gornja granica, mg/L |
|---------------|-------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| Albendazol | Otopljen u Milli Q vodi | 0,5 | 15,0 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 1,0 | 15,0 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 1,0 | 15,0 |
| Febantel | Otopljen u Milli Q vodi | 0,1 | 15,0 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 0,1 | 15,0 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 5,0 | 15,0 |
| Mebendazol | Otopljen u Milli Q vodi | 0,1 | 15,0 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 0,1 | 15,0 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 0,1 | 15,0 |
| Tiaklopid | Otopljen u Milli Q vodi | 0,5 | 15,0 |
| | Mikrovalna ekstrakcija | 1,0 | 15,0 |
| | Ultrazvučna ekstrakcija | 1,0 | 7,0 |

Iz **Tablice 31** vidi se kako su u svim slučajevima za gornju granicu radnog područja uzete najviše koncentracije s kojima se radilo (15 mg/L) jer su pratile linearnost regresijskih pravaca, a za donju granicu radnog područja uzeta je granica kvantifikacije određena grafičkom metodom.

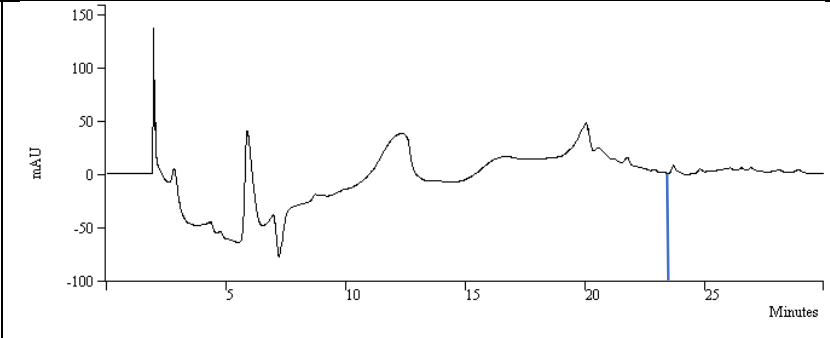
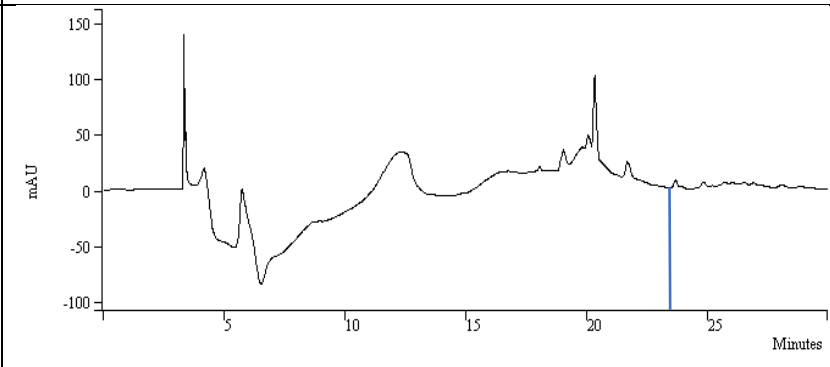
4.9. BIORAZGRADNJA

Biorazgradnja je provedena prema postupku opisanom u poglavlju **3.3.1**. Očitane su površine ispod kromatografskih krivulja za svaku ispitivanu tvar u svim trenucima uzimanja uzoraka iz aeriranih reaktora. Površine kromatografskih krivulja za pojedinu ispitivanu tvar iz kromatograma očitavaju se za karakteristično vrijeme zadržavanja za pojedinu tvar (**Tablica 4.**) Površina kromatografske krivulje proporcionalna je koncentraciji analita, tako se na osnovu površine kromatografske krivulje može odrediti koliko je analita u suspenziji vode i mulja, a koliko ga je apsorbirano na mulj ili razgrađeno u transformacijske/razgradne produkte.

4.9.1. ALBENDAZOL

U **Tablici 32** prikazani su kromatogrami za otopinu albendazola u reaktoru s vodom i aktivnim muljem na početku biorazgradnje i nakon 24 sata. Već u samom početku sav je albendazol adsorbiran na mulj, što se vidi iz kromatograma (nema kromatografske krivulje u vremenu zadržavanja specifičnom za albendazol). U toku 24 sata nisu zabilježeni tragovi desorpcije i tako je ostalo do samog kraja eksperimenta. Tijekom eksperimenta nisu uočene nikakve nove kromatografske krivulje što znači da nije došlo do nastajanja transformacijskih produkata. U reaktoru u kojem se nalazi otopina albendazola i voda nije dolazilo do značajnih promjena iz čega se može zaključiti da nije došlo do hidrolize. Može se zaključiti kako u procesu biorazgradnje albendazola prevladava utjecaj adsorpcije.

Tablica 32. Kromatogrami albendazola prilikom biorazgradnje

| Vrijeme uzrokovanja, h | Kromatogram |
|------------------------|--|
| 0 |  The chromatogram at 0 hours shows a baseline with several peaks. A prominent peak is observed at approximately 23 minutes, marked by a vertical blue line. The y-axis is labeled 'mAU' and ranges from -100 to 150. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0 to 25. |
| 24 |  The chromatogram at 24 hours shows a similar profile to the 0-hour sample. A peak is still present at approximately 23 minutes, marked by a vertical blue line. The y-axis is labeled 'mAU' and ranges from -100 to 150. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0 to 25. |

4.9.2. FEBANTEL

Površina ispod kromatografske krivulje na vremenu zadržavanja karakterističnom za febantel smanjuje se tijekom vremena što ukazuje na adsorpciju molekula febantela na pahuljice

aktivnog mulja tijekom biorazgradnje. Vrijednosti spomenutih površina su čitavo vrijeme eksperimenta jako male u odnosu na vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja febantela u reaktoru gdje se nalaze otopina febantela i voda. Naime, tijekom eksperimenta biorazgradnje ne nastaju nove kromatografske krivulje što ukazuje da ne nastaju niti razgradni niti transformacijski produkti febantela tijekom biorazgradnje. Može se zaključiti kako je adsorpcija ima najznačajniji doprinos u procesu biorazgradnje. U **Tablici 33** prikazani su kromatogrami za otopinu febantela u reaktoru s vodom i aktivnim muljem na početku procesa biorazgradnje i nakon 24 sata.

Tablica 33. Kromatogrami febantela prilikom biorazgradnje

| Vrijeme uzrokovanja, h | Kromatogram |
|------------------------|-------------|
| 0 | |
| 24 | |

4.9.3. MEBENDAZOL

Vrijednosti površina ispod kromatografskih krivulja mebendazola u reaktoru gdje se nalaze otopina mebendazola i mulj su jako male čitavo vrijeme tijekom eksperimenta ako ih se uspoređi s vrijednostima u reaktoru gdje se nalazi otopina mebendazola i voda. To znači da ne dolazi do značajne hidrolize spoja, već dolazi do značajne adsorpcije. U 24-tom satu eksperimenta uočena je nova kromatografska krivulja s vremenom zadržavanja $t_R = 22,881$ min, pošto je koncentracija spoja bila ispod granice detekcije za nju se nije mogao očitati apsorpcijski spektar. Također, ustanovljeno je da u reaktoru gdje je sami aktivni mulj i voda nema takve

kromatografske krivulje iz čega se može zaključiti kako se radi o transformacijskom spoju mebendazola. Pošto su površine kromatografskih krivulja mebendazola čitavo vrijeme male (u reaktoru gdje se nalaze otopina mebendazola i mulj) i pošto je došlo do nastajanja transformacijskog produkta može se zaključiti kako je utjecaj adsorpcije i razgradnje mikroorganizmima znan. U **Tablici 34** prikazani su kromatogrami za otopinu mebendazola u reaktoru s vodom i aktivnim muljem u početnom trenutku i nakon 24 sata.

Tablica 34. Kromatogrami mebendazola prilikom biorazgradnje

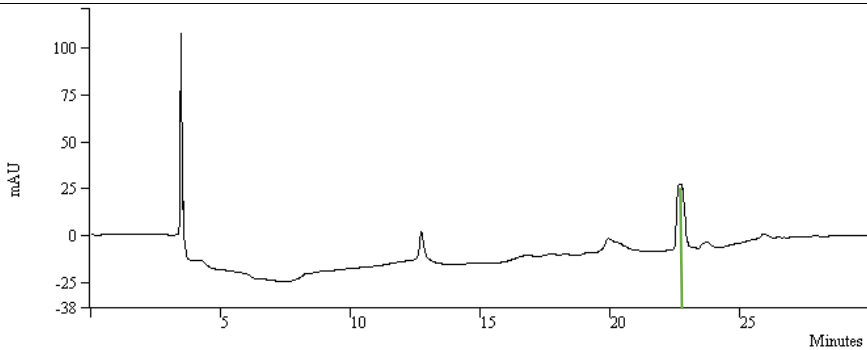
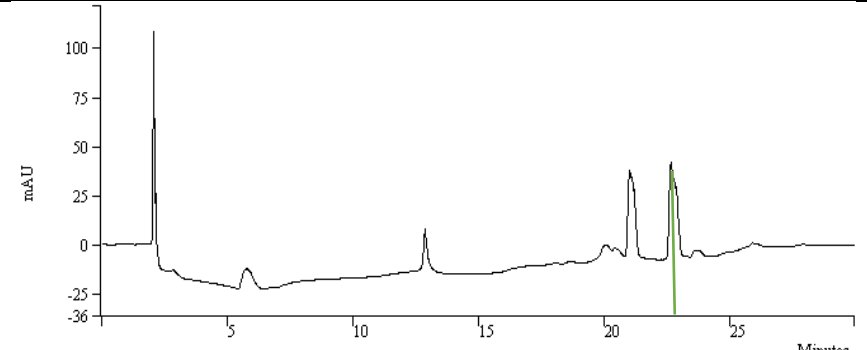
| Vrijeme uzrokovanja, h | Kromatogram |
|------------------------|-------------|
| 0 | |
| 24 | |

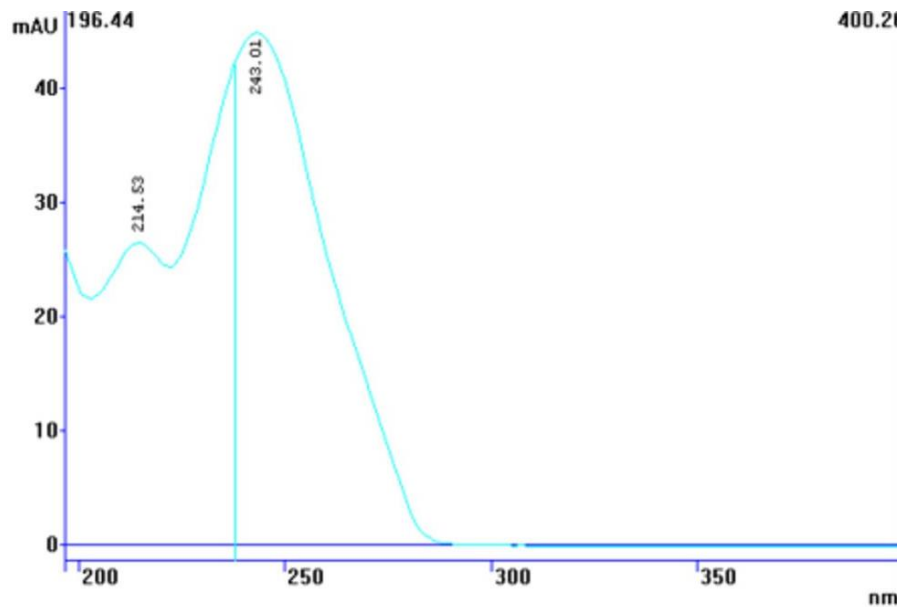
4.9.4. TIAKLOPRID

Kod biorazgradnje tiakloprida površine ispod kromatografskih krivulja sa specifičnim vremenom zadržavanja za tiaklopid su za otprilike polovinu manje u odnosu na reaktor gdje su se nalazili otopina tiakloprida i voda. To znači da ne dolazi do značajne hidrolize spoja, već dolazi do značajne adsorpcije. Najveća adsorpcija, odnosno najmanje vrijednosti površina kromatografske krivulje bile su na početku biorazgradnje i na samom kraju eksperimenta. U međuvremenu vrijednosti su bile nešto više i međusobno slične. Nova kromatografska krivulja s vremenom zadržavanja $t_R = 21,00$ min primijećena je već u 2 satu eksperimenta. To je vrijeme zadržavanja blisko vremenu zadržavanja tiakloprida. Krivulja svoj apsorpcijski maksimum

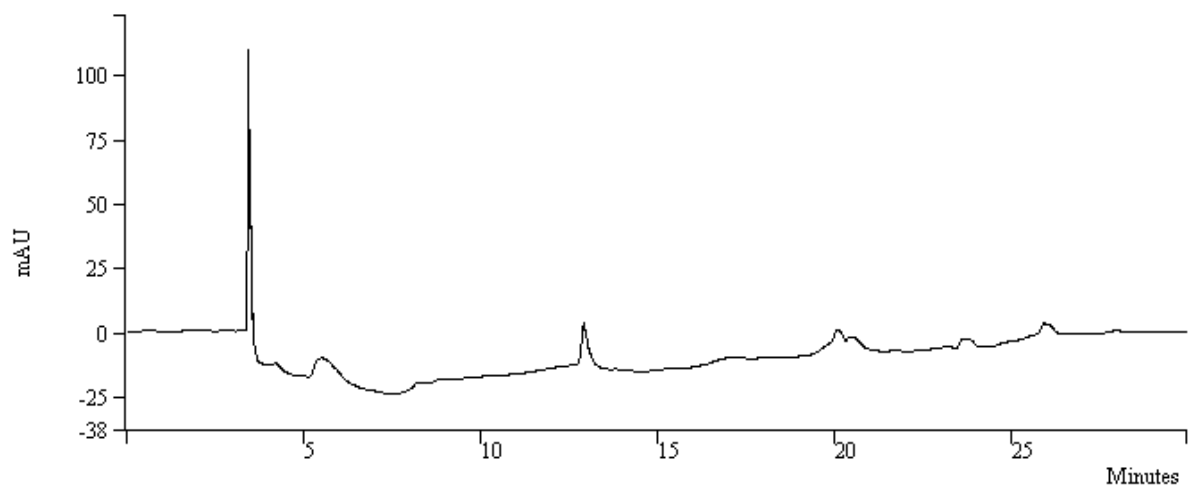
postiže u 24-tom satu eksperimenta s maksimum površine od 797 mAu. Njezin apsorpcijski spektar prikazan je na **Slici 28**, a kromatografska krivulja jasno je uočljiva na kromatogramu (**Tablica 35.**) za 24.-ti sat eksperimenta na za nju navedenom vremenu zadržavanja. Na kromatogramu uzorka iz reaktora gdje se nalazi aktivni mulj i voda ne postoji slična kromatografska krivulja (**Slika 29.**) iz čega se može zaključiti kako se radi o transformacijskom ili razgradnom spoju tiakloprida. Može se zaključiti kako su doprinosi razgradnje mikroorganizama i adsorpcije znatni u procesu biorazgradnje tiakloprida.

Tablica 35. Kromatogrami tiakloprida prilikom biorazgradnje

| Vrijeme uzrokovanja, h | Kromatogram |
|------------------------|--|
| 0 |  <p>The chromatogram at 0 hours shows a single sharp peak at approximately 22 minutes. The y-axis is labeled 'mAU' and ranges from -38 to 100. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0 to 25. A vertical green line marks the peak at approximately 22 minutes.</p> |
| 24 |  <p>The chromatogram at 24 hours shows multiple peaks. The y-axis is labeled 'mAU' and ranges from -36 to 100. The x-axis is labeled 'Minutes' and ranges from 0 to 25. A vertical green line marks a peak at approximately 22 minutes, which is the most prominent peak in this chromatogram.</p> |



Slika 28. Prikaz apsorpcijskog spektra transformacijskog ili razgradnog produkta tiakloprida



Slika 29. Prikaz kromatografske krivulje u 24-tom satu za reaktor aktivnog mulja i vode

5. ZAKLJUČAK

Rezultati validacije:

Metoda je selektivna za sve ispitivane spojeve u rasponu radnog područja koje je navedeno u **Tablici 30**. Linearnost je zadovoljena za sve ispitivane tvari pripremljene u Milli Q vodi, ali u slučaju mikrovalne ekstrakcije linearnost nije zadovoljena u željenom rasponu koncentracija. Vrijednosti R^2 kod febantela i mebendazola su se značajno približile granici da zadovolje linearnost, ali ipak nedovoljno. Utjecaj matice na osjetljivost najviše je izražen kod febantela i tiakloprida gdje je osjetljivost navedenih analita otopljenih u Milli Q vodi bila veća od osjetljivosti za metodu mikrovalne ekstrakcije. Ponovljivost je zadovoljena za sva vremena zadržavanja kod obje metode i kod svih analita. Što se tiče ponovljivosti koncentracija za sve analite pripremljene u Milli Q vodi zadovoljena je ponovljivost uz odstupanja pri određivanju međupreciznosti kod albendazola i tiakloprida. Kod albendazola do odstupanja je došlo pri koncentraciji 2 mg/L gdje *RSD* iznosi 21,11 %, te kod tiakloprid pri koncentracijama 2 mg/L i 4 mg/L gdje *RSD* iznosi 35,82 % i 13,79 %. Kod ponovljivosti koncentracija za slučaj pripreme uzoraka metodom mikrovalne ekstrakcije uvjet za ponovljivost zadovoljen je samo kod tiakloprida, dok za sve druge analite to nije slučaj. Iskoristivost za pripremu uzoraka metodom mikrovalne ekstrakcije zadovoljena je samo kod albendazola, dok ostala tri analita nisu zadovoljila kriterije.

Rezultati biorazgradnje:

Kod biorazgradnje ispitivanih spojeva vidljivo je da su sve ispitivane tvari sklone adsorpciji na pahuljice aktivnog mulja. Pri čemu su za mebendazol i tiakloprid prilikom procesa biorazgradnje uočene nove kromatografske krivulje za koje se pretpostavlja prema adsorpcijskom spektru i vremenu zadržavanja da se radi o njihovim transformacijskim ili razgradnim produktima. Za sve spojeve utjecaj hidrolize na biorazgradnju bio je zanemariv u odnosu na adsorpciju.

6. IZVORI

1. **S. Campbell; K. Soman-Faulkner.**, Antiparasitic Drugs, National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK544251/>, (pristup: 24.8.2023.).
2. **Antiparazitici, Antihelminatici - mebendazol, albendazol, ivermectin tablete za ljude** (stetoskop.info), (pristup: 24.8.2023.)
3. **A. J. M. Horvat, M. Petrović, S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko, A. D. Mance, M. Kaštelan-Macan:** Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 1 (2012) 61-82
4. **L. S. Goodman, A. Gilman,** The Pharmacological Basis Of Therapeutics, The McGraw-Hill Companies, 10 (2001) 1125-1251
5. **J. Hortron,** Albendazole: a review of anthelmintic efficacy and safety in humans. *Parasitology*, 320 (2000) 113-132
6. **ALBENDAZOL,** <http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/images/v32270/cas-54965-21-8.gif>, (preuzeto 24.8.2023.)
7. **FEBANTEL,** <http://hr.hsp-pharma.com/apis-and-intermediates/febantel-cas-58306-30-2.html>, (pristup: 24.8.2023.)
8. **S. C. Su, H. H. Chou, P. C. Chang, C. H. Liu, H. S. Chou,** Simultaneous determination of febantel, fenbendazole, oxfendazole and oxfendazolesulfone in livestock by matrix solid phase dispersion extraction technique and HPLC, *Journal of Food and Drug Analysis*, 3 (2004) 244-253
9. **G. Dusi, V. Gamba, E. Faggionato,** Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38 (2005) 375-379
10. **FEBANTEL,** [febantel-chemical-structure-s5092.gif](http://www.absorbe.de/febantel-chemical-structure-s5092.gif) (600×400) (absorbe.de), (preuzeto 24.8.2023.)
11. **K. Thakur; P. Shivani,** Mebendazole, National Library of Medicine, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK557705/>, (pristup: 24.8.2023.)
12. **MEBENDAZOL,** <https://www.drugs.com/pro/images/107c3ad5-6ebe-4c98-a4a8-ac36663bd6a7/b32633b3-168d-4cc8-abd1-58efd8766129-01.jpg>, (preuzeto:24.8.2023.)

13. **P.C. Abhilash, S. Nandita**, Pesticide use and application: An Indian scenario, *Journal of Hazardous Materials*, 165 (2009) 1-12
14. **Odluka EU komisije 2018/840/EU**, <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32018D0840>, (pristup: 24.8.2023.)
15. **TIAKLOPRID**, [Thiacloprid | C10H9ClN4S | CID 115224 - PubChem \(nih.gov\)](https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Thiacloprid), (pristup 24.8.2023.)
16. **Povlačenje s tržišta Republike Hrvatske sredstava za zaštitu bilja na osnovi aktivne tvari tiakloprid**, <https://poljoprivreda.gov.hr/vijesti/povlacenje-s-trzista-republike-hrvatske-sredstava-za-zastitu-bilja-na-osnovi-aktivne-tvari-tiakloprid/3964>, (pristup: 24.8.2023.)
17. **TIAKLOPRID**, <http://hr.plant-growth-regulator.com/Content/uploads/2020264467/202009101558085fcd9135cdb3418e8323282b27dff9e1.png>, (preuzeto: 24.8.2023.)
18. **B. Tušar**, Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, *Croatiaknjiga*, Zagreb, (2004) 62-66
19. **D. Dolar, S. Radman, K. Košutić, A. J. M. Horvat**, Removal of anthelmintic drugs and their photodegradation products from water with RO/NF membranes, *Process Safety and Environmental Protection*, 90 (2012) 147-152
20. **S. Zrnčević**, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode*, 24 (2016) 119-136.
21. **T. Landeka Dragičević**, Biotehnologija u zaštiti okoliša, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu, predavanje na webu (pristupljeno: 24.8.2023.)
22. **M. Vuković Domanovac**, Proces s aktivnim muljem, OSVJEŽIMO ZNANJE, *Kemija u industriji*, 70 (3-4) (2021) 192–193.
23. **M. Fomina, G. M. Gadd**, Biosorption: Current perspectives on concept, definition and application, *Bioresource Technology*, (2014) 23-26
24. **J. Paul Chen, D. Lie, L. Wang, S. Wu, B. Zhang**, Dried waste activated sludge as biosorbents for metal removal: Adsorptive characterization and prevention of organic leaching, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77 (2002) 657-661
25. **E. Sanz-Santos, S. Álvarez-Torrellas**, Enhanced removal of neonicotinoid pesticides present in the Decision 2018/840/EU by new sewage sludge-based carbon materials, *Journal of Environmental Management*, 313 (2022) 14-19

26. **Aerirani bazen s aktivnim muljem**, <https://d19p4plxg0u3gz.cloudfront.net/0a94df28-8f27-11ec-9bb0-0242ac120012/original.jpeg>, (preuzeto 26.8.2023.)
27. **I. Mador-Božinović**, Određivanje ksenobiotika u aktivnom mulju, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, (2019)
28. **F. Settle**, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Prentice Hall PTR, New Jersey, (1997) 620-624
29. **M. Blekić, A. Režek Jambrak, F. Chemat**, Mikrovalna ekstrakcija bioaktivnih spojeva, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 1, (2011) 33-35
30. **G. Spingo, L. Tramelli**, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, *Journal of Food Engineering*, 81 (2007), 200-208 str
31. **M. Al-Harahshed, S. Kingman**, Microwave assisted leaching, a review, *Hydrometallurgy*, 73 (2004) 189-203
32. **Y. Wang, J. You, Y. Yu, C. Qu, H. Zhang, L. Ding**, Analysis of ginsenosides in Panax ginseng in high pressure microwave – assisted extraction, *Food Chemistry*, (2008) 161-167
33. **W. Xiao, L. Han, B. Shi**, Microwave – assisted extraction of flavonoids from Radix astragali, *Separation and Purification Technology*, 62 (2008) 614-618
34. **CS. Eskilsson, E. Björklund**, Analytical–scale microwave–assisted extraction, *Journal of Chromatography*, 902 (2000) 227-250
35. **M. Khajeh, AR. Akbari Moghaddam, E. Sacnhooli**, Application of Doehlert design in the optimization of microwave assisted extraction for determination of zinc and copper in cereal samples using FAAS, *Food Analytical Methods*, 3 (2009) 133-137
36. **G. Spigno, L. Tramelli**, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *Journal of Food Engineering*, 81 (2007) 200-208
37. **A. Čović**, Određivanje farmaceutika u aktivnom mulju, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb (2017)
38. **ULTRAZVUČNA**, https://www.researchgate.net/profile/Shekhar_Kadam3/publication/236601532/figure/fig1/AS:29399545671689@1448393822944/Figure-1-Schematic-diagram-of-ultrasound-assistedextraction-UAE..png, (preuzeto 26.8.2023.)

39. **D. Cerić**, Razvoj i optimizacija metoda ekstrakcije za kromatografsku analizu farmaceutika u sedimentu, Doktorski rad, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, (2018)
40. **KROMATOGRAFSKI SUSTAV**, <https://www.imi.hr/wp-content/grand-media/image/HPLC-UFLC.png>, (preuzeto 28.8.2023.)
41. **SHEMA RADA KROMATOGRAFSKOG SUSTAVA**, https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Preparative_HPLC.svg, (pristup 26.8.2023.)
42. **M. Medić-Šarić, I. Jasprica, Ž. Debeljak**, Uvod u validaciju metoda analize lijekova, *Farmaceutski glasnik*, 62 (2006) 1–7
43. **pH metar**, [2669520-400x300.jpg \(400×300\) \(biocompare.com\)](https://www.biocompare.com/images/2669520-400x300.jpg), (preuzeto 27.8.2023.)
44. **ANALITIČKA VAGA**, <https://www.affordablescales.com/images/big/XA204DR.jpg>, (preuzeto 27.8.2023.)

7. DODATAK

7.2. POPIS SLIKA

- Slika 1.** Broj farmaceutika detektiranim u nadzemnim, podzemnim vodama i vodi za piće.
- Slika 2.** Struktura albendazola.
- Slika 3.** Struktura febantela.
- Slika 4.** Struktura mebendazola.
- Slika 5.** Struktura tiakloprida.
- Slika 6.** Prikaz aeriranog bazena s aktivnim muljem u Zagrebu.
- Slika 7.** Mikrofotografija pahuljica aktivnog mulja.
- Slika 8.** Prikaz nosača biofilma, biofilma i procesa koji se odvija na njemu.
- Slika 9.** Prikaz uređaja za mikrovalnu ekstrakciju.
- Slika 10.** Način rada ultrazvučne ekstrakcije.
- Slika 11.** Prikaz kromatografskog sustava tvrtke Shimadzu.
- Slika 12.** Shema rada tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti.
- Slika 13.** Analitička vaga Mettler Toledo, AB 104, Švicarska.
- Slika 14.** Analitička vaga Mettler Toledo, XA105.
- Slika 15.** Aerirani reaktori.
- Slika 16.** Uređaju za mikrovalnu ekstrakciju i digestiju MarsX (CEM, Matthews, NC, USA) 1200 W.
- Slika 17.** Teflonske „GreenChem“ posude volumena 100 mL.
- Slika 18.** Ultrazvučna kupelji SONOREX DIGITAL 10P, Bandelin, Berlin, Njemačka, 1200W
- Slika 19.** Uparivaču Büchi Waterbath B-480.
- Slika 20.** Kromatograf Varian ProStar, SAD.
- Slika 21.** pH metar Mettler Toledo, S20, SevenEasy, Švicarska
- Slika 22.** Konačno homogenizirani aktivni mulj u lađicama.
- Slika 23.** Standardna aparatura za filtraciju.

- Slika 24.** Apsorpcijski spektar albendazola.
Slika 25. Apsorpcijski spektar febantela.
Slika 26. Apsorpcijski spektar mebendazola.
Slika 27. Apsorpcijski spektar tiakloprida.
Slika 28. Prikaz apsorpcijskog spektra transformacijskog produkta tiakloprida.
Slika 29. Prikaz kromatografske krivulje u 24-tom satu za reaktor aktivnog mulja i vode.

7.3. TABLICE

- Tablica 1.** popis kemikalija korištenih u istraživanju, njihove čistoće i njihova proizvođača.
Tablica 2. Gradijent pokretne faze korišten pri HPLC-DAD analizama.
Tablica 3. Kriteriji prihvatljivosti.
Tablica 4. Ispitivane tvari i njihovi apsorpcijski maksimumi i vremena zadržavanja.
Tablica 5. Kromatogrami uzoraka albendazola i vremena zadržavanja.
Tablica 6. Kromatogrami uzoraka febantela i vremena zadržavanja.
Tablica 7. Kromatogrami uzoraka mebendazola i vremena zadržavanja.
Tablica 8. Kromatogrami uzoraka tiakloprida i vremena zadržavanja.
Tablica 9. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za albendazol.
Tablica 10. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za febantel.
Tablica 11. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za febantel.
Tablica 12. Tablica utvrđivanja linearnosti metode za tiakloprid
Tablica 13. Osjetljivosti metoda za pojedinu ispitivanu tvar u slučaju mikrovalne i ultrazvučne ekstrakcije, te za ispitivanu tvar pripremljenu u Milli Q vodi. (Plave točke u svim grafovima predstavljaju mikrovalnu ekstrakciju zajedno s plavim regresijskim pravcem, isto vrijedi za ultrazvučnu ekstrakciju označenu narančastom bojom i za analit otopljen u Milli Q vodi označen sivom bojom).
Tablica 14. Podatci za ponovljivost albendazola pripremljenog u Milli Q vodi.
Tablica 15. Podatci za ponovljivost uzorka albendazola pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom.
Tablica 16. Podatci za ponovljivost uzorka albendazola pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom.
Tablica 17. Podatci za ponovljivost febantela pripremljenog u Milli Q vodi.
Tablica 18. Podatci za ponovljivost uzorka febantela pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom.
Tablica 19. Podatci za ponovljivost uzorka febantela pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom.
Tablica 20. Podatci za ponovljivost mebendazola pripremljenog u Milli Q vodi.
Tablica 21. Podatci za ponovljivost uzorka mebendazola pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom.
Tablica 22. Podatci za ponovljivost uzorka mebendazola pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom.
Tablica 23. Podatci za ponovljivost tiakloprida pripremljenog u Milli Q vodi.
Tablica 24. Podatci za ponovljivost uzorka tiakloprida pripremljenog mikrovalnom ekstrakcijom.
Tablica 25. Podatci za ponovljivost uzorka tiakloprida pripremljenog ultrazvučnom ekstrakcijom.
Tablica 26. Iskoristivost metoda za albendazol.
Tablica 27. Iskoristivost metoda za febantel.
Tablica 28. Iskoristivost metoda za mebendazol.

Tablica 29. Iskoristivost metoda za tiaklopid.

Tablica 30. Prikaz ispitivane tvari, metoda i granica kvantifikacije i detekcije.

Tablica 31. Prikaz radnih područja za pojedinu metodu i pojedini analit.

Tablica 32. Kromatogrami albendazola prilikom biorazgradnje.

Tablica 33. Kromatogrami febantela prilikom biorazgradnje.

Tablica 34. Kromatogrami mebendazola prilikom biorazgradnje.

Tablica 35. Kromatogrami tiakloprida prilikom biorazgradnje.

8. ŽIVOTOPIS

Josip Gudelj [REDACTED] Završio je Prirodoslovno-matematičku gimnaziju dr. Mate Ujevića u Imotskom nakon čega je 2020. godine upisao Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer: kemijsko inženjerstvo. Sve godine je položio u rokovima, a prosjek njegovih ocjena je 4,094. 2022. godine postao je član studentske sekcije Hrvatskog društva kemijskih inženjera, te je sudjelovao u organizaciji projekta „*Business week*“. 2023. godine je sudjelovao na Festivalu znanosti gdje je asistirao dr. sc. Andreju Vidaku u izvedbi radionice „*Simulacija električne sile pomoću tehnologije proširene stvarnosti*“.