

# Biorazgradnja antiparazitika u vodi

---

Papac, Josipa

Master's thesis / Diplomski rad

2017

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:484424>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ**

Josipa Papac

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, lipanj 2017.



Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zavodu za analitičku kemiju pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger, na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu, Sveučilišta u Zagrebu, Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo u Laboratoriju za biološku obradu otpadnih voda pod vodstvom prof. dr. sc. Tibeke Landeke Dragičević, te dijelom u Pliva istraživanje i razvoj d.d. pod vodstvom dr. sc. Sanje Radman, akademske godine 2016./2017.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-2353 i izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2016./2017. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



## **ZAHVALA:**

*Žahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na divnoj dugogodišnjoj suradnji te stručnom vodstvu, podršci, pomoći i trudu koji mi je pružila tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se profesorici prof.dr.sc. Tibli Landeki Dragičević s Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Zavoda za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo, Laboratorija za biološku obradu otpadnih voda na pomoći te svim savjetima i sugestijama tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se dr.sc. Sanji Radman na stručnim savjetima, velikoj pomoći i trudu tijekom izrade ovog rada.*

*Žahvaljujem se tehničkim suradnicama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.*

*Žahvaljujem se svojoj obitelji i dragim prijateljima koji su mi uvijek velika podrška.*

## SAŽETAK

### BIORAZGRADNJA ANTIPARAZITIKA U VODI

Uporaba farmaceutika je svakim danom u porastu te stoga kontinuirano dospijevaju u otpadne vode. Zbog složene kemijske strukture i postojanosti, iako prisutni u niskim koncentracijama podliježu procesu nagomilavanja u okolišu (akumulacije) te zaostaju u vodi nakon obrade u klasičnom komunalnom postrojenju. Upitan je njihov štetan utjecaj na okoliš, a definirani su kao „nove onečišćujuće tvari“. Potrebno je razvijati i primijenjivati osjetljive analitičke i bioanalitičke metode detekcije farmaceutika i njihovih razgradnih produkata. Time je moguće definirati profil razgradnje i ekotoksični utjecaj farmaceutika na okoliš te posredno predvidjeti njihov učinak na okoliš i zdravlje ljudi.

Cilj ovog rada je motrenje biorazgradnje veterinarskih farmaceutika antiparazitika febantela, prazikvantela, pirantel pamoata i njihove smjese u šaržnom reaktoru sa aktivnim muljem, praćenjem fizikalno-kemijskih pokazatelja mikrobne razgradnje odabranih antiparazitika u aerobnim uvjetima u vodenom mediju. Učinkovitost biorazgradnje farmaceutika i identifikacija transformacijskih produkata biorazgradnje motrena je i određena analitičkim i bioanalitičkim metodama.

U ovom radu postignuta je biorazgradnja antiparazitika u vodi sa aktivnim muljem. No, ne smije se zanemariti i utjecaj hidrolize i adsorpcije farmaceutika na pahuljicu aktivnog mulja. Transformacijski produkti su detektirani i identificirani tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti praćenu spektrometrijom masa, a procjena toksičnosti nakon provedene biorazgradnje odabranih istraživanih antiparazitika provedena je bioluminiscentnom metodom određivanja akutne toksičnosti pomoću bakterijske vrste *Vibrio fischeri*.

#### **Ključne riječi:**

*farmaceutici, febantel, prazikvantel, pirantel pamoat, biorazgradnja, toksičnost*

## **ABSTRACT**

### **BIODEGRADATION OF ANTHELMINTICS IN WATER**

The use of the pharmaceuticals is growing daily and therefore they continuously appear in the wastewaters. Because of their complex structure and persistence, although present at low concentrations, they bioaccumulate and are detected in water after treatment in a conventional wastewater treatment plant. Therefore their harmful environmental impact is matter of further investigation and they are defined as "new emerging contaminants". Sensitive analytical and bioanalytical methods of detection of pharmaceuticals and their degradation products need to be developed and applied. Consequently it is possible to define the degradation profile and the ecotoxic effect of certain pharmaceuticals in the environment, thus predicting their impact on the environment and human health.

The aim of this study was to optimize the conditions of biodegradation veterinary pharmaceuticals from the group of anthelmintics: febantel, praziquantel and pyrantel pamoate in a batch reactor by monitoring the physical and chemical parameters in water media. The efficiency of the biodegradation proces and identification of transformation products formed during the process are monitored by analytical and bioanalytical methods.

In this study the biodegradation of anthelmintics in the water with activated sludge is achieved whereby the impact of hydrolysis on that process, and also the adsorption on the flocculae of active sludge it could not be ignored. Transformation products have been detected and identified by ultrahigh performance liquid chromatography, and toxicity assessment of biodegradation process was made with bioluminiscent methodology of acute toxicity determination with *Vibrio fischeri* bacterial species.

#### **Key words:**

*pharmaceuticals, febantel, praziquantel, pirantel pamoate, biodegradation, toxicity*

1.	UVOD .....	1
2.	OPĆI DIO .....	3
2.1.	Farmaceutici-antiparazitici .....	3
2.1.1.	Febantel .....	7
2.1.2.	Prazikvantel .....	7
2.1.3.	Pirantel pamoat .....	8
2.2.	Zakonodavstvo u području zaštite okoliša .....	8
2.3.	Obrada otpadne vode .....	10
2.3.1.	Biološka obrada otpadne vode aktivnim muljem .....	10
2.3.2.	Biorazgradnja farmaceutika .....	12
2.4.	Analitičke metode praćenja farmaceutika u okolišu .....	13
2.5.	Bioanalitičke metode praćenja farmaceutika u okolišu .....	14
2.5.1.	Akutna toksičnost - metoda pomoću bakterijske kulture <i>Vibrio fischeri</i> .....	15
2.5.1.1.	Krivulja toksičnosti i definicije povezane s toksičnošću .....	16
3.	EKSPERIMENTALNI DIO .....	19
3.1.	MATERIJALI .....	19
3.1.1.	Kemikalije .....	19
3.1.2.	Farmaceutici .....	20
3.1.3.	Aktivni mulj .....	21
3.1.4.	Djelatni mikroorganizam za određivanje toksičnosti- bakterijska kultura <i>Vibrio fischeri</i> .....	21
3.1.5.	Hranjiva podloga .....	22
3.1.6.	Otopine potrebne za određivanje toksičnosti .....	22
3.1.6.1.	Otopina za resuspenziju .....	22
3.1.6.2.	Radna otopina .....	23
3.1.6.3.	Otopina referentnih tvari .....	23
3.2.	INSTRUMENTI, UREĐAJI, PRIBOR .....	23
3.2.1.	Analitička vaga .....	23
3.2.2.	Kisikova i pH elektroda .....	24
3.2.3.	Termoreaktor .....	24
3.2.4.	Ultrazvučna kupelj .....	25
3.2.5.	Autoklav .....	25
3.2.6.	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti .....	26
3.2.7.	Luminometar .....	27
3.3.	METODE RADA .....	28
3.3.1.	Priprema standardnih otopina farmaceutika .....	28
3.3.1.1.	Priprema standardnih otopina farmaceutika za eksperiment biorazgradnje (modalne otopine) .....	28
3.3.1.2.	Priprema standardnih otopina farmaceutika za kromatografsku analizu .....	28
3.3.2.	Provedba procesa biorazgradnje aktivnim muljem .....	28
3.3.2.1.	Metoda određivanja KPK vrijednosti .....	29
3.3.3.	Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje .....	30
3.3.3.1.	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (UHPLC-DAD) .....	30
3.3.3.2.	Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti uz detektor spektrometar masa .....	31
3.3.3.3.	(UHPLC-MS/MS) .....	31
3.3.4.	Ispitivanje toksičnosti farmaceutika i uzoraka nakon biorazgradnje na bakterijama <i>Vibrio fischeri</i> .....	32
4.	REZULTATI I RASPRAVA .....	35
4.1.	Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje .....	35
4.1.1.	Razgradnja febantela .....	37
4.1.2.	Razgradnja prazikvantela .....	39
4.1.3.	Razgradnja pirantel pamoata .....	40
4.1.4.	Razgradnja smjese antiparazitika .....	35
4.2.	Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje .....	41
4.2.1.	UHPLC-DAD metoda .....	44
4.2.2.	UHPLC-MS/MS metoda .....	47
4.3.	Određivanje akutne toksičnosti bakterijama <i>Vibrio fischeri</i> .....	57
5.	ZAKLJUČAK .....	63
6.	LITERATURA .....	64
7.	DODACI .....	67
7.1.	Popis slika .....	67
7.2.	Popis tablica .....	68
7.3.	Popis kratica i simbola .....	68
	Životopis .....	69



# 1.UVOD

---

Farmaceutici ili lijekovi se definiraju kao kemijske tvari ili grupe tvari namijenjene za uporabu u medicinskoj dijagnostici, liječenju ili sprječavanju bolesti. To su vrlo složene molekule s točno određenim ciljem djelovanja za što je zaslužna aktivna komponenta (**eng. Active Pharmaceutical Ingredient, API**). Kao takvi odgovorni su za podizanje kvalitete životnog standarda, ali i produžen životni vijek prosječne osobe. Farmaceutska industrija je u sve većem porastu proizvodnje na globalnoj razini. Isto tako se izrazito ulaže u razvoj i formiranje novih farmaceutskih pripravaka. Kako navodi američka agencija za hranu i lijekove FDA (**eng. Food and Drug Administration**) proces razvoja novog lijeka do njegovog puštanja na tržište uključuje 5 stadija i u prosjeku traje i do 10 godina. [1]

Treba naglasiti da proces istraživanja i razvoja novih lijekova ne uključuje procjenu njihovog utjecaja na okoliš, vodu, tlo. U komunalnim ili u industrijskim otpadnim vodama mogu biti prisutni kao glavne komponente farmaceutika, ali i metaboliti te time mogu dospjeti i u tlo te u organizam životinja, a na kraju i ljudi. Detekcija farmaceutika kao onečišćujućih tvari u okolišu je predmet znanstvenog istraživanja već nekoliko posljednjih desetljeća, a prva istraživanja zabilježena su još 1940. godine. [2]

Kao takvi, farmaceutici su definirani pojmom ksenobiotici, odnosno tvari strane okolišu. Otpadne vode se najčešće odvođe na pročišćavanje u komunalni sustav za obradu otpadne vode (**eng. Waste Water Treatment Plant, WWTP**) koji se temelji na primjeni fizikalno-kemijskih postupaka te aerobne razgradnje aktivnim muljem. Farmaceutici su detektirani u vodi i nakon ovakve vrste obrade. Zbog složene strukture, a samim time i postojanosti na razgradnju, farmaceutici se u okolišu najčešće bioakumuliraju. Tako s vremenom u okolišu nastaje jedan od ključnih problema, a to je stvaranje imunosti patogenih bakterijskih vrsta na ovakve komponente, kojima je i glavni cilj određeno terapijsko djelovanje. [3]

Potaknuti tom činjenicom, znanstvenici sve više istražuju potencijal aktivnog mulja za biorazgradnju ovakvih vrsta onečišćujućih tvari. Osim biorazgradnje, sve se više daje naglasak na potencijal adsorpcije tvari na površinu pahuljice aktivnog mulja vrlo specifične strukture. Kako bi se povećala razina opće osvještenosti i povećanje kvalitete okolišnih segmenata, tla i vode, važno je istaknuti zakonodavstvo tog područja. Provedba zaštite voda u Hrvatskoj regulirana je: Zakonom o vodama (NN 153/09, 130/11, 56/13, 14/14), Strategijom upravljanja vodama (NN 91/08), Državnim planom za zaštitu voda (NN 8/99), Pravilnikom o

graničnim vrijednostima emisije otpadnih tvari (NN 80/13, NN 43/14, NN 27/15, NN 3/16) i Uredbom o standardu kakvoće voda (NN73/13). [4]

Okvirna direktiva o vodama (ODV), kao krovni dokument na nivou Europske zajednice u području vodne politike, uspostavlja, između ostalog, i osnovne principe zaštite voda od onečišćenja. Strategija sprečavanja onečišćenja voda uključuje i listu od 45 prioriternih tvari ili grupe tvari koje predstavljaju značajan rizik za vodni okoliš. Neke tvari sa liste su, zbog karakteristika kao što su postojanost u okolišu, bioakumuliranje i toksičnost, dodatno označene kao prioritne opasne tvari, a neke od njih su i farmaceutici. Upravo zato je ključna procjena utjecaja farmaceutika na okoliš.

Važno je definirati njihov životni ciklus (**eng.** *Life Cycle Assessment, LCA*). [5] To je omogućeno razvojem i primjenom vrlo osjetljivih analitičkih metoda sa niskim granicama detekcije i kvantifikacije. LCA je set tehnika kombiniranih zajedno kao jedna objektivna, sistematična metoda za identificiranje, klasificiranje i kvantificiranje utjecaja onečišćujućih tvari na okoliš, kao i materijalnih i energetske resursa vezanih za neki proizvod, proces ili aktivnost od ideje pa sve do kraja životnog ciklusa. Naime, farmaceutici su u okolišu detektirani u vrlo niskim koncentracijama, od nekoliko mg/L (ppm) do nekoliko µg/L (ppb). Uz to, potrebno je provesti i bioanalitičke metode određivanja utjecaja farmaceutika na okoliš, kao što je toksičnost. Važno je pritom odabrati dovoljno osjetljivu metodu kojom se može ostvariti dobra ponovljivost. Jedna od najčešće primjenjivanih metoda za procjenu akutne toksičnosti je ona s bakterijskom vrstom *Vibrio fischeri*. Vrlo je malo podataka o akutnoj toksičnosti antihelmintika. [6]

Farmaceutici se u okolišu nalaze u smjesi ili „koktelu“ različitih tvari kao što su organska otapala, boje, pesticidi, tenzidi, ali i neke druge vrste farmaceutika. Pritom, važno je uzeti u obzir sinergijski učinak kojim različiti farmaceutici mogu međusobno djelovati nepovoljno na ishodišne rezultate analitičkih i bioanalitičkih metoda. [7, 8]

Sve to će u budućnosti konačno rezultirati određivanjem maksimalno dopuštene koncentracije ovakvih komponenata u vodi što omogućuje bolju kontrolu nad kvalitetom vode i tla odnosno općeg stanja okoliša.

## 2. OPĆI DIO

---

### 2.1. Farmaceutici-antiparazitici

Farmaceutici se definiraju kao tvari ili skupina tvari koje zbog svoje specifične strukture i fizikalno-kemijskih obilježja djeluju terapijski ili kao prevencija mnogim bolestima za što je odgovorna farmaceutska aktivna tvar (API). Upravo zbog toga svoju široku upotrebu pronalaze u medicinskoj primjeni. Pri tome farmakokinetika definira najvažnije mehanizme djelovanja farmaceutika odnosno proučava sudbinu lijekova u organizmu, njihovu resorpciju, raspodjelu, izmjenu tvari zbog fizikalno-kemijskih procesa u organizmu i izlučivanje. [9]

Time su određeni parametri kao što su: koeficijent raspodjele oktanol/voda, biodostupnost, konstantna disocijacije kiseline, topljivost u vodi i drugo, pomoću kojih se može predvidjeti kako će se i zašto farmaceutska tvar kretati u organizmu sve do izlučivanja. Nadalje, ti parametri nam mogu poslužiti i za definiranje sudbine farmaceutika u okolišu. U okoliš mogu dospjeti u nepromijenjenom obliku ili u obliku metabolita. Osim metabolita, u okolišu se mogu detektirati i razni oblici razgradnih produkata glavne komponente farmaceutika. Farmaceutici mogu biti podložni procesima kao što su: hidroliza, fotorazgradnja te procesi biorazgradnje. Upravo iz tog razloga važno je ispitati kakav je utjecaj tih procesa na pojedine komponente simulacijama u laboratorijskim uvjetima. Vrlo često spojevi nastali reakcijama redukcije, oksidacije ili hidrolize u okolišu jednaki su metabolitima koji nastaju u tijelu domaćina. [10]

Osnovna podjela farmaceutika je na prirodne, polusintetske i sintetske. S obzirom na upotrebu dijelimo ih na humane i veterinarske farmaceutike. [11]

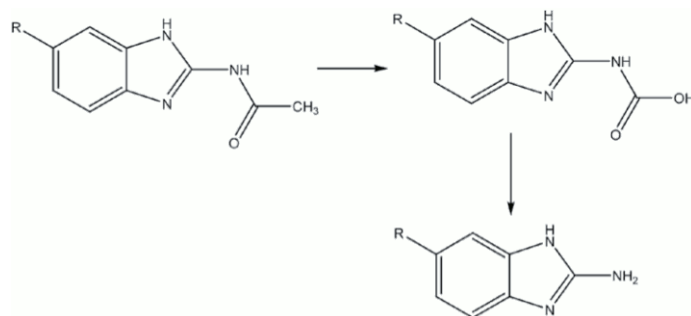
Veterinarski lijekovi najvećim dijelom dolaze u okoliš sa životinjskih farmi i ribogojilišta, gdje se farmaceutici koriste ne samo u liječenju bolesti stoke, peradi i riba nego i za prevenciju bolesti, protiv parazita te kao promotori rasta i dodaci hrani. U veterinarskoj praksi najviše se upotrebljavaju antibiotici i antiparazitici (antihelmintici). Antiparazitici ili antihelmintici su grupa farmaceutika koja se koristi u liječenju crijevnih nametnika u ljudi i životinja, parazita iz skupine *Nematoda* i *Cestoda*. Benzimidazoli su selektivno toksični antihelmintici koji se vežu na  $\beta$ -tubulin parazita i inhibiraju polimerizaciju tubulina i stvaranje mikrotubula čime narušavaju funkciju diobenog vretena. Na taj način uzrokuju smrt parazitskih stanica.

Antiparazitici su detektirani u vodi, ali i tlu pri vrlo niskim koncentracijama. Stalnom emisijom određene količine takvih molekula u okoliš, dolazi do razvoja rezistentnosti nižih organizama, što može dovesti do nepredvidivih posljedica. Razlog povećanja brzine rezistencije je i specifična biološka aktivnost te specifična struktura koja osigurava postojanost.

U živim organizmima lijekovi se metaboliziraju kroz metabolitički put jedne od dviju faza (faze I ili faze II). Metabolitički put faze I uključuje oksidaciju, redukciju ili hidrolizu, a metaboliti su obično znatno reaktivniji i toksičniji nego polazni lijek. Metabolitički put faze II obično uključuje nastajanje neaktivnih spojeva.

Febantel je predlijek, koji se *in vivo* metabolizira u benzimidazolni antihelmintik fenbendazol. Febantel se koristi za liječenje i kontrolu gastrointestinalnih glista, plućnih nametnika i trakavica.

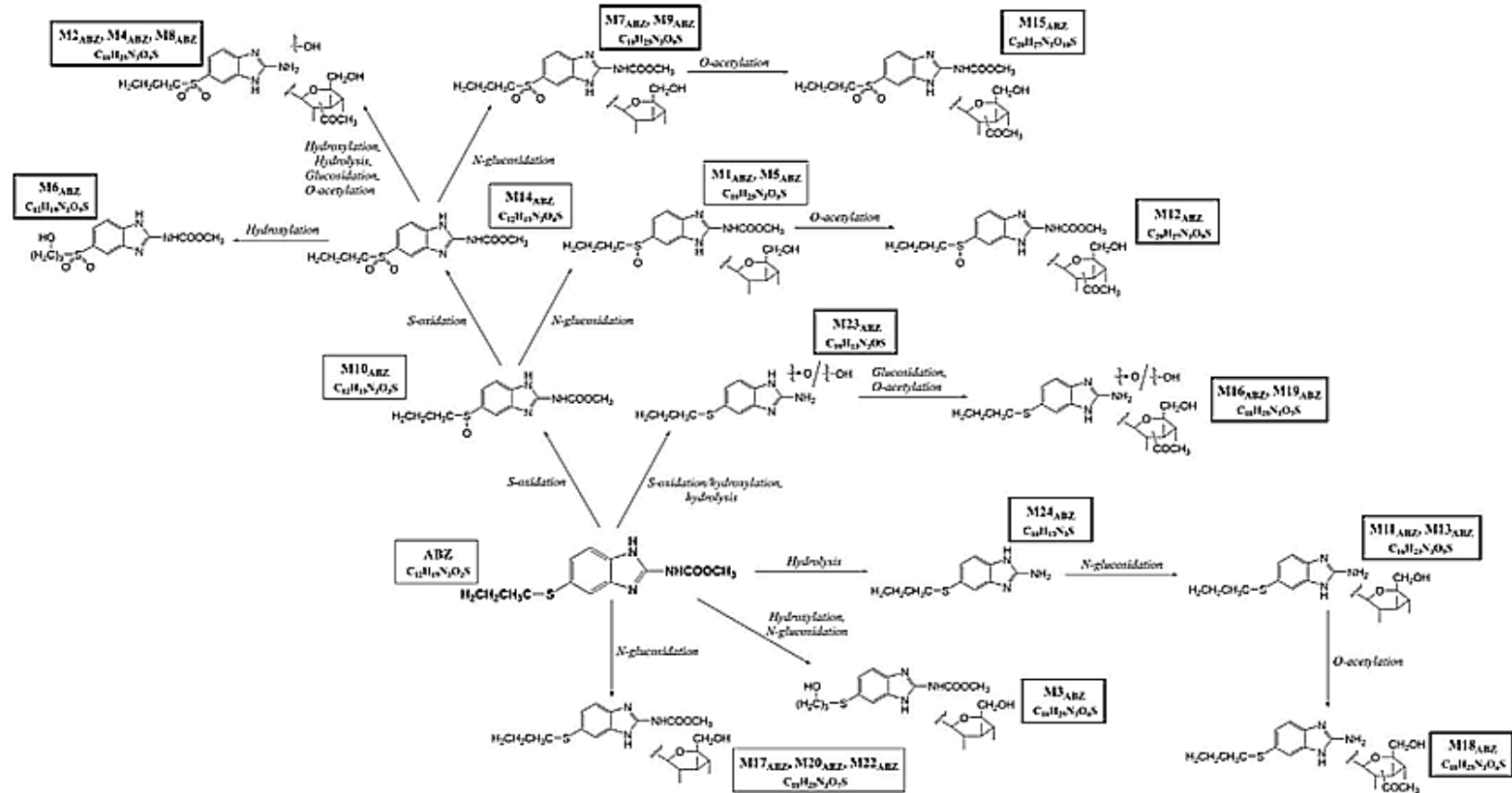
Fenbendazol sulfid se vrlo lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol, koji je isto tako vrlo važan antihelmintik. Sulfoksid se dalje može oksidirati u sulfon, manje aktivan metabolit. Osim njega kao produkt oksidacije na položaju 4 fenolnog prstena nastaje *p*-hidroksifenbendazol za kojeg se smatra da isto tako posjeduje slabu antihelmintičnu aktivnost. Fenbendazol oksidira u aktivni fenbendazol sulfoksid poznatiji kao oksfendazol. Flubendazol posjeduje keto-grupu koja se može reducirati u hidroksilnu grupu, karbamatnu grupu koja se može hidrolizirati. Zbog svoje kemijske strukture, svi benzimidazolni lijekovi osjetljivi su na svjetlo. Glavni produkti fotorazgradnje su amini derivati nastali demetilacijom esterske grupe i dekarboksilacijom karbamatne grupe kao što je prikazano na **Slici 1**.



**Slika 1.** Fotorazgradnja benzimidazolnih antihelmintika [12]

Neki antihelmintici su učinkoviti tek nakon što se biotransformiraju u aktivne metabolite u životinjskom organizmu. [12, 13]

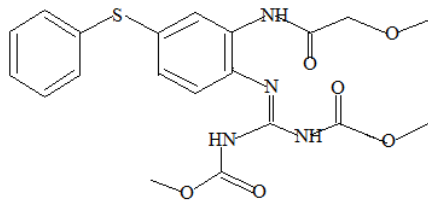
Osim toga, zanimljiva su i istraživanja kojima se detektiraju metaboliti koji su nastali u biljkama koje rastu na pašnjacima i tako preko tretiranih životinja dolaze u direktan kontakt sa antihelminticima. U biljnim stanicama se odvija metabolizam odnosno biotransformacija prisutnim enzimima. Tako je ispitana fitotoksičnost i biotransformacija albendazola, flubendazola i fenbendazola kod vrste *Campanula rotundifolia* te je detektirano 24 (Slika 2.), 18 i 29 metabolita. Takva istraživanja su od velike pomoći pri detekciji razgradnih produkata tih farmaceutika nastalih nekim drugim procesima u tlu i vodi. [14, 15]



Slika 2. Shema metaboličkog puta albendazola u stanicama *Campanula rotundifolia* (u podebljanim okvirima navedeni su metaboliti koji dosad nisu zabilježeni)

### 2.1.1. Febantel

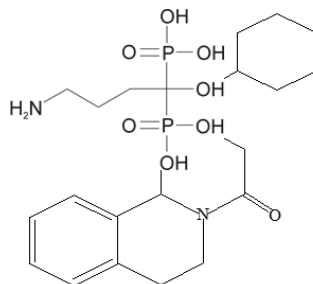
Febantel je farmaceutik koji spada u skupinu probenzimidazola koji se nakon resorpcije iz crijeva u jetri prevodi u djelatne metabolite (fenbendazol i oksfendazol) koji djeluju protiv nametnika odnosno helmintatako da koče resorpciju i razgradnju hranjivih tvari endoparazita (**Slika 3.**). Veže se na  $\beta$ -tubulin i time sprječava razvojni proces helminta. Febantel se koristi za liječenje i kontrolu gastrointestinalnih glista, parazitskih glista (*Cyathostomins*, *Toxocara*), plućnih nametnika i trakavica kod životinja. Fenbendazol sulfid se vrlo lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol, koji je isto tako važan antihelmintik. Upotrebljavaju se uglavnom u veterinarskoj terapiji. [16]



**Slika 3.** Molekulska struktura febantela

### 2.1.2. Prazikvantel

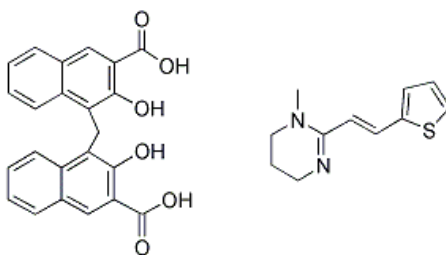
Prazikvantel je antihelmintik širokog spektra djelovanja (**Slika 4.**). Djeluje povećavajući permeabilnost nematoda za kalcij i tako izaziva mišićne kontrakcije i eventualno paralizu i smrt parazita. Također povećava osjetljivost parazita na imunološki obrambeni sustav domaćina. Učinkovit je protiv ehinokokoze. Dobro se metabolizira te se brzo izlučuje iz organizma, uglavnom u mokraći i to kao glukuronid ili sulfat. Upotrebu pronalazi u veterinarskoj, ali i humanoj medicinskoj praksi. [17]



**Slika 4.** Molekulska struktura prazikvantela

### 2.1.3. Pirantel pamoat

Pirantel pamoat je antiparazitik iz široke skupine benzimidazola koji djeluje protiv nametnika (*Strongylus vulgaris*, *S. edentatus*) (Slika 5.). Djeluje kao depolarizacijsko neuromuskularno blokirajuće sredstvo čime izaziva mišićnu paralizu kod helminta nakon čega se izlučuju iz organizma. U terapijskim dozama nema farmakološko djelovanje kod ljudi. U upotrebi je u veterinarskoj praksi. [18]



Slika 5. Molekulska struktura pirantel pamoata

## 2.2. Zakonodavstvo u području zaštite okoliša

Zakon o vodama Republike Hrvatske onečišćenje definira kao izravno ili neizravno unošenje tvari ili topline u vodu i tlo izazvano ljudskom djelatnošću, što može biti štetno za ljudsko zdravlje ili kakvoću vodnih ekosustava ili kopnenih ekosustava izravno ovisnih o vodnim ekosustavima, koje dovodi do štete po materijalnu imovinu, remeti značajke okoliša, zaštićene prirodne vrijednosti ili utječe na druge pravovaljane oblike korištenja okoliša. [19]

Postoje različite vrste onečišćenja: fizikalno, biološko, kemijsko te radiološko. Onečišćujuće tvari su s druge strane definirane kao tvari koje mogu izazvati onečišćenje, a uključuju opasne, prioritetne i druge onečišćujuće tvari.

Do početka 21.stoljeća u središtu pozornosti bila su postojana organska onečišćivala (**eng.** *Persistent Organic Pollutants*, POPs) i teški metali zbog naglog povećanja njihove koncentracije u prirodi uslijed njihovog intenzivnog korištenja. 2001. godine potpisana je Stockholmska konvencija prema kojoj zemlje potpisnice moraju smanjiti ili ukloniti proizvodnju, uporabu ili ispuštanje najopasnijih kemijskih spojeva. U tu skupinu spojeva ubrojani su: aldrin, klordan, DDT, dieldrin, endrin, heptaklor, heksaklorbenzen, mirex, toksafen, poliklorirani bifenili, poliklorirani dioksini i furani. [20]

Nove onečišćujuće tvari se mogu definirati kao one koje trenutno nisu uključene u redoviti nadzor, a mogući su kandidati za buduće ozakonjenje, ovisno o rezultatima istraživanja



njihove štetnosti te mogućim utjecajima na zdravlje i ekosustave. Farmaceutici su zabilježeni kao jedna od glavnih grupa novih onečišćujućih tvari budući da je identificirana i kvantificirana njihova prisutnost u okolišu. Kako literatura navodi oni svojim fizikalno-kemijskim karakteristikama i prisutnosti u prirodnim vodama ugrožavaju okoliš te biljni i životinjski svijet kao i kvalitetu života. Nepotpuno uklanjanje u postrojenjima za obradu otpadnih voda navodi se kao glavni put njihova ispuštanja u okoliš. Zbog toga su svrstani u kategoriju „novih onečišćujućih tvari“. Humani i veterinarski farmaceutici se kontinuirano unose u okoliš kao rezultat proizvodnog procesa, odlaganja neupotrijebljenih farmaceutskih proizvoda ili kao izlučevine. [21, 22]

Europska komisija je u kolovozu 2013. godine usvojila novu Direktivu 2013/39/EU o prioritetnim tvarima koja dopunjava i mijenja Okvirnu direktivu o vodama (ODV) 2000/60/EZ i Direktivu 2008/105/EZ. Strategija sprječavanja onečišćenja uključuje listu od 45 prioritetnih tvari koje predstavljaju rizik za vodni okoliš. Neke tvari su zbog karakteristika poput postojanosti u okolišu, bioakumulativnosti i toksičnosti dodatno označene kao prioritetne opasne tvari. ODV propisuje reviziju liste prioritetnih tvari svake četiri godine. Novom Direktivom bi se emisije u vodeni okoliš prioritetno opasnih tvari trebale obustaviti unutar sljedećih 20 godina. Također, uvodi se i tzv. „*Watch lista*“, odnosno popis od 10 novih, do sada neidentificiranih opasnih i onečišćujućih tvari koje bi, ukoliko su prisutne, mogle štetno djelovati na vodni okoliš i ljudsko zdravlje. Europska komisija će do rujna 2017. godine trebati odrediti mjere koje će se poduzimati na razini Unije ili države članice, a kojima će se smanjivati ispuštanje i gubitci ovih tvari u vodni okoliš. [23]

Zahtjev za odobrenje novih lijekova za ljudsku primjenu mora sadržavati ocjenu rizika koju taj farmaceutik može imati za okoliš (**eng.** *Environmental Risk Assessment*, ERA). Ocjena rizika koju farmaceutik može imati za okoliš je proces koji se sastoji od dvije faze. U fazi I se ispitivanja temelje isključivo na djelatnoj tvari, neovisno o načinu primjene, farmaceutskom obliku, njegovom izlučivanju ili metabolizmu lijeka. Ukoliko se u fazi I utvrdi da farmaceutik predstavlja rizik za okoliš, provodi se faza II u kojoj se rade analize postojanosti lijeka u okolišu i njegovog utjecaja na okoliš.

U Republici Hrvatskoj je potreba ocjene rizika za okoliš tijekom davanja odobrenja za stavljanje lijeka u promet regulirana Zakonom o lijekovima i Pravilnikom o davanju odobrenja za stavljanje lijeka u promet. Propisuje se i da u sažetku opisa svojstva lijeka i na vanjskom pakiranju gotovog lijeka moraju biti navedene posebne mjere za uklanjanje

neupotrijebljenog farmaceutika ili ostataka farmaceutika, a kada je potrebno, s uputom o prikladnom sustavu prikupljanja koji se primjenjuje. [24]

Važno je odrediti i kontinuirano provoditi proces određivanja mogućeg rizika negativnog utjecaja ksenobiotika, odnosno u ovom slučaju farmaceutika na okoliš. Integrirano upravljanje okolišem (**eng.** *Integrated Environmental Management, IEM*) jest sveobuhvatan proces planiranja i gospodarenja prirodnim resursima koji uključuje okolišne, društvene i ekonomske ciljeve. Uzima u obzir međusobnu zavisnost i utjecaje između različitih sastavnica okoliša i elemenata ekosustava. Osnovne karakteristike se ostvaruju primjenom raznih alata, a jedan od najvažnijih jest procjena rizika (**eng.** *Environmental Risk Assessment, ERA*). Postoji i priručnik u svrhu procjene rizika za okoliš veterinarskih farmaceutika. [25]

### **2.3. Obrada otpadne vode**

Razvoj naselja i povećanje životnog standarda stanovništva rezultiralo je između ostalog i onečišćenjem okoliša. Među najbitnije oblike onečišćenja ubraja se onečišćenje vode. Izbor postupaka pročišćavanja kojima će se podvrgnuti otpadna voda prije nego se ispusti u prirodnu sredinu ovisi o količini i sastavu otpadne vode, kao i zahtijevanoj kakvoći vode na mjestu ispuštanja. Obično je riječ o kombinaciji niza postupaka kako bi učinak svakog od pojedinih postupaka i njihova kombinacija dali što bolje rezultate obrade. [26]

U fizikalne procese obrade otpadne vode spadaju sedimentacija, flotacija, ultrafiltracija, reverzna osmoza. Sedimentacija je proces uklanjanja čvrstih čestica iz otpadne vode pomoću gravitacijske sile. Flotacija je proces u kojem se čvrste tvari iz tekućine izdvajaju izdizanjem na površinu. Ultrafiltracija je proces filtriranja vode kroz filtar sa određenom veličinom pora 0,01-0,10  $\mu\text{m}$  pri čemu se iz vode uklanjaju mikroorganizmi, virusi, proteini i pigmenti. Reverzna osmoza je postupak suprotan osmozi, što znači da primjenom tlaka većeg od osmotskog na otopinu dolazi do protiskivanja molekula otapala iz otopine u čisto otapalo ili iz otopine veće koncentracije u otopinu niže koncentracije kroz membranu. Tehnike ultrafiltracije i reverzne osmoze svrstavaju se u napredne tehnike obrade voda.

Fizikalno-kemijski procesi su: adsorpcija na aktivnom ugljenu, ionska izmjena, koje se još nazivaju napredne tehnologije. Adsorpcija je proces koji se osniva na sposobnosti da (adsorbensi) neke čvrste tvari mogu na svojoj površini vezati (adsorbirati) molekule plina ilimolekule i ione iz otopine. Ionska izmjena je proces u kojem neke tvari (ionske smole) imaju sposobnost zamjene svojih iona s ionima iz otpadne vode. Procesom

koagulacija/flokulacija izdvajaju se suspendirane čestice dodatkom sredstva za koagulaciju/flokulaciju.

Kemijske metode obrade voda uključuju kemijske pretvorbe tvari, razgradnju prisutnih onečišćujućih tvari procesima oksidacije i redukcije. Biološke metode obrade otpadne vode uglavnom podrazumijevaju obradu upotrebom aktivnog mulja koji se sastoji od bakterija, protozoa, algi, kvasaca i metazoa povezanih sa suspendiranim česticama u nakupine koje se zovu flokule (pahuljice aktivnog mulja). Glavni cilj obrade otpadnih voda biološkim postupcima je pretvaranje biorazgradivih organskih tvari u mikrobiološku biomasu, koja se zatim može odvojiti nekom od prikladnih separacijskih tehnika. Najčešće upotrebljavani biološki postupci pročišćavanja svrstani su u tri skupine, a to su: uređaji s aktivnim muljem, biološki filtri ili prokapnici, te pročišćavanje otpadne vode u lagunama.

U novije vrijeme sve više se pažnje posvećuje razvoju novih metoda obrade vode kojima se ostvaruje razgradnja postojećih organskih onečišćujućih tvari odnosno ksenobiotika. Najčešća je primjena naprednih vrsta filtracije. U jednom istraživanju naveden je visoki stupanj učinkovitosti procesa fotorazgradnje antihelminatika albandazola, levamisola, febantela i prazikvantela te primjene reverzne osmoze (RO) i nanofiltracije (NF). Fotorazgradnjom pod utjecajem UV svjetlosti nastaje nekoliko razgradnih produkata koji su uspješno izdvojeni primjenom RO/NF membrana. [27] S druge strane navodi se i primjena naprednih oksidacijskih procesa za razgradnju nekih antihelminatika. [28]

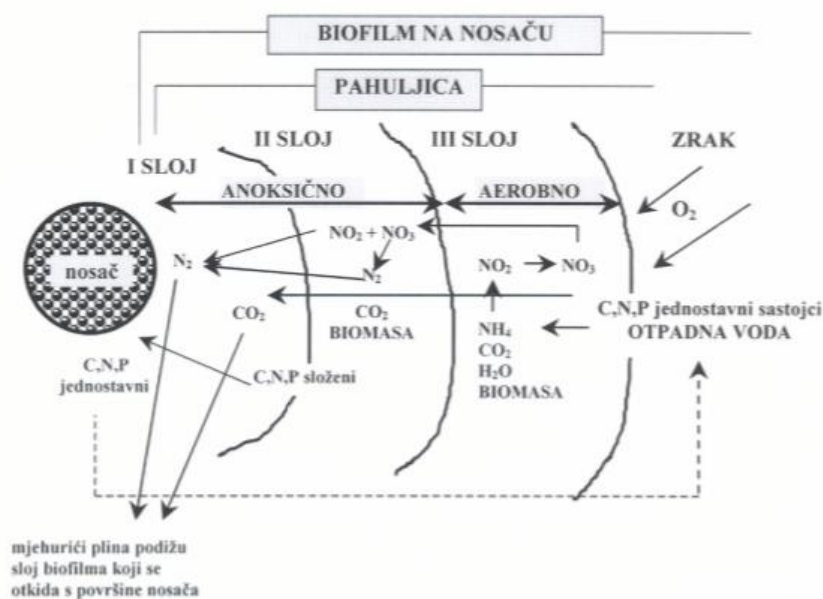
### **2.3.1. Biološka obrada otpadne vode aktivnim muljem**

Konvencionalni sustav za obradu otpadne vode (**eng.** *Waste Water Treatment Plant*, WWTP) temelji se na aerobnoj biorazgradnji organskog opterećenja. Naime, farmaceutici i njihovi metaboliti i razgradni produkti su detektirani u vodi i nakon obrade. Važno je imati na umu da je na taj način ugrožena i kvaliteta vode za piće te opću uporabu što dugoročno može imati znatne negativne posljedice za zdravlje ljudi. [29, 30]

Aerobni postupak uklanjanja organskih sastojaka iz otpadne vode s aktivnim muljem podrazumijeva primjenu mješovite mikrobne zajednice koja uz prozračivanje kisikom koristi organske tvari kao hranu i tako ih razgrađuje. Učinkovitost procesa ovisi o više čimbenika: kakvoći otpadne vode kao hranjivog supstrata, temperaturi, otopljenom kisiku, pH vrijednosti izvanstaničnog okoliša, koncentraciji toksičnih sastojaka u otpadnoj vodi, održavanju

mikrobiološke kakvoće i biokemijske aktivnosti mikroorganizama aktivnog mulja te provedbi i praćenju procesa. Aerobnu biološku razgradnju organskih sastojaka iz otpadne vode prate reakcije: oksidacije, sinteze i endogene respiracije.

Mikroorganizmi aktivnog mulja pomoću kojih se tijekom aerobne obradbe uklanjaju otopljeni sastojci iz otpadne vode održavaju se: raspršeni u vodenom okolišu u obliku pahuljica aktivnog mulja ili na nosačima kao slojevi biomase aktivnog mulja nazvan biofilm ili bioobraštaj (**Slika 6.**). U pahuljici i biofilmu aktivnog mulja nije ujednačen raspored vrsta mikroorganizama. Mješovita mikrobna zajednica temelji se na zakonitostima: simbioze, komensalizma, mutualizma, kompeticije, neutralizma, amensalizma, parazitizma i predacije.



**Slika 6.** Shematski prikaz mogućih reakcija razgradnje otopljenih sastojaka iz otpadne vode koje se odvijaju u pahuljici ili biofilmu aktivnog mulja [31]

U površinskom sloju zastupljene su one vrste mikroorganizama koje upotrebljavaju više kisika za razgradnju sastojaka iz otpadne vode kao supstrata, a središnje (dublje) slojeve pahuljice ili biofilma čine mikroorganizmi koji razgrađuju produkte razgradnje mikroorganizama površinskog sloja ili one sastojke iz otpadne vode za čiju razgradnju je potrebno manje kisika.

### 2.3.2. Biorazgradnja farmaceutika

Važno je razlikovati dva procesa: biorazgradnju pomoću metabolizma i enzimatskog sustava mikroorganizama koji čine sustav aktivnog mulja te biosorpciju na pahuljici aktivnog mulja. Kod farmaceutika, s obzirom na njihovu specifičnu strukturu te fizikalno-kemijska obilježja,

često se uz proces biorazgradnje naglašava i velika vjerojatnost biosorpcije. Jedan od primjera istraživanja jest biosorpcija antibiotika sulfametazina kojom je određeno dobro poklapanje linearnog particijskog modela sa eksperimentalnim rezultatima s obzirom na različite uvjete temperature i pH te je određen koeficijent razdiobe ( $K_d$ ) pri 20 °C iznosio 100,5 L/kg, a distribucija farmaceutika na organski ugljik aktivnog mulja kao glavni mehanizam adsorpcije.[32]

Literaturno nije naveden primjer ispitivanja mogućnosti biosorpcije antihelmintika na površinu aktivnog mulja.

Jedan od najboljih primjera biorazgradnje farmaceutika aktivnim muljem jest mineralizacija diklofenaka i ibuprofena aerobnim procesom tijekom 27 dana, a već je nakon 4 dana zabilježen pad koncentracije od 75 %. [33]

Sam proces biorazgradnje antihelmintika primjenom procesa s aktivnim muljem nije naveden. Farmaceutici vrlo često pokazuju nisku učinkovitost procesa biorazgradnje aktivnim muljem i iz tog razloga istraživanja su često usmjerena na biorazgradnju izoliranim kulturama mikroorganizama. Tako jedan od rijetkih primjera biorazgradnje antihelmintika albendazola različitim sojevima plijesni prvenstveno ukazuje na nastanak novih razgradnih produkata, uz već poznate metabolite: albendazol sulfoksid i albendazol sulfon. [34]

## 2.4. Analitičke metode praćenja farmaceutika u okolišu

Kako bi uspješno pratili farmaceutik kada dospije u okoliš te detektirali i kvantificirali njegove metabolite i razgradne produkte razvijene su brojne analitičke metode. Važno je naglasiti da te metode moraju biti osjetljive, točne i precizne. Također moraju omogućiti određivanje farmaceutika u vodenom mediju odnosno tlu. Samim time je neophodno koristiti sofisticirane metode pripreme uzorka.

Preduvjet za praćenje stanja i kvalitete okoliša, tj. podzemnih i površinskih voda, otpadnih voda i pitke vode te tla i sedimenta je dostupnost metoda koje mogu točno i precizno analizirati čak i ispod ng/L odnosno ng/g. Najčešće metode identifikacije i kvantifikacije su plinska kromatografija i spektrometrija masa (**eng.** *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, GC–MS) ili plinska kromatografija sa spregnutom (tandemskom) spektrometrijom masa (**eng.** *Gas Chromatography tandem Mass Spectrometry*, GC–MS/MS) ili tekućinska kromatografija sa spregnutom (tandemskom) spektrometrijom masa (**eng.** *Liquid Chromatography tandem Mass Spectrometry*, LC–MS/MS). [36]

Kako bi se provelo uspješno određivanje razgradnih produkata i definirao profil razgradnje farmaceutika sustav tekućinske kromatografije povezuje se s naprednim sustavima detekcije kao što su: nova generacija trostrukog kvadripola (**eng.** *triple quadrupol*, QqQ), ionska klopka (**eng.** *ion trap*, IT), te hibridni instrumenti kvadripol– brzinski s mjerenjem vremena preleta (**eng.** *quadrupole–time–of–flight*, QqTOF), kvadripol– linearni analizator masa s ionskom klopkom (**eng.** *quadrupole–linear ion trap*, QqLIT), linearna ionska klopka–ionsko–ciklotronska rezonancija s Fourierovim transformacijama (**eng.** *linear ion trap–Fourier transformation ion cyclotron resonance*, LIT–FT–ICR) i linearna kvadripolna ionska klopka–orbitalna klopka (**eng.** *linear trap quadrupole Orbitrap*, LTQ Orbitrap).[35]

Iznenadujuće je malo informacija i podataka o utjecaju, distribuciji i sudbini antihelmintika u okolišu. S obzirom na veliki postotak u ukupnoj svjetskoj upotrebi veterinarskih farmaceutika, antihelmintici nisu dosada toliko istraživani. U kontekstu antihelmintika kao onečišćujuće tvari, odnosno ksenobiotika u okolišu postoji vrlo malo informacija u literaturi. Pojedine vrste tek su odnedavno detektirane u okolišu, budući da su prisutne u malim količinama. Upravo je razvoj novih osjetljivih analitičkih metoda i uređaja s vrlo niskim granicama kvantifikacije i detekcije omogućio detekciju veterinarskih farmaceutika u okolišu.[37]

Jedan od primjera analiza antihelmintika levamisola i fenbendazola je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti praćenu tandem spektrometrijom masa (HPLC-MS/MS) kojom je uspješno kvantificirana glavna komponenta prisutna pri nekoliko µg/kg. [38]

Navodi se i istraživanje u kojem je razvijena i korištena LC-MS/MS analitička metoda pri čemu analit detektira upotrebom kvadripol–linearni analizator masa s ionskom klopkom. Analizirani su i između ostalog febantel, prazikvantel te albendazol i levamisol koji se u kombinaciji pojavljuju u farmaceutskom pripravku komercijalnog naziva Prazinon odnosno Ecsital. Samim time je ispitan i njihov sinergijski učinak. [39]

## **2.5. Bioanalitičke metode praćenja farmaceutika u okolišu**

Važno je naglasiti da su farmaceutici u okolišu prisutni u vrlo niskim koncentracijama. Ipak, oni u okoliš dospijevaju kontinuiranim ulaskom s obzirom na stalnu upotrebu. Specifična struktura te fizikalno-kemijske karakteristike rezultiraju visokim stupnjem postojanosti. Zato se bioakumuliraju u okolišu i okolišnim organizmima. S obzirom da su antihelmintici, odnosno benzimidazoli dizajnirani sa specifičnom namjenom da djeluju protiv nametnika

*Nematoda* i *Cestoda* njihov kontinuiran unos u okoliš predstavlja prijetnju od mogućeg razvoja rezistentnosti nametnika na te aktivne spojeve. [40]

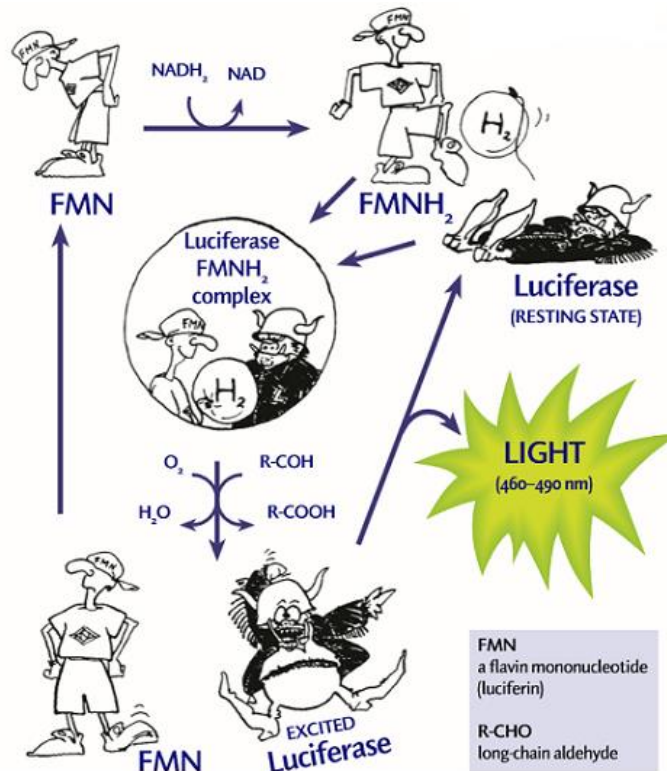
Iz tog razloga uz analitičke, ključno je provesti i bioanalitičke analize praćenja farmaceutika u okolišu. Biološki nadzor ili biomonitoring analizira biološku sastavnicu okoliša i reakcije s ciljem otkrivanja promjena u okolišu nastalih onečišćenjem, a dobivene se informacije upotrebljavaju u nadzoru stanja okoliša i procjeni okolišnog rizika. Danas usporedno egzistiraju dva glavna pristupa biološkoj detekciji stanja odnosno onečišćenja ekosustava pri čemu se koriste ekološki indikatori i bioindikatorske vrste. S druge strane biomarker je u širem smislu bilo koja analiza koja ukazuje na interakciju biološkoga sustava i potencijalno štetnoga kemijskog, fizikalnog ili biološkog djelovanja, uključujući promjene od razine organizma do stanice. Među metode kojima se mjeri odziv na razini organizma treba navesti testove akutne i kronične letalnosti odnosno smrtnosti. Moguće je koristiti normirane testove akutne i kronične letalnosti, uglavnom na vodenim organizmima: račićima roda *Daphnia* ili *Thamnocephalus*, manjim akvarijskim ribama zebričama *Danio rerio*, kalifornijskoj pastrvi *Oncorhynchus mykiss*, itd. Od standardnih metoda za ispitivanje toksičnosti na bakterijskim organizmima (ISO norma) treba izdvojiti dvije poznatije metode: ispitivanje inhibicije razmnožavanja bakterija vrsta *Pseudomonas putida* i *Vibrio fischeri*. Uz to, u upotrebi su i razne metode koje spadaju u skupinu analiza kojima se mjeri odziv na razini organskih sustava, organa i tkiva te stanice kao što su: analiza histopatoloških promjena, imunološke metode, lizosomske promjene, oksidacijski stres, metode određivanja genotoksičnog učinka. [41]

Veliki pomor triju vrsta supova zabilježen je 2004. godine na području Indije i Pakistana gdje se kao glavni razlog navodi prisutnost puno veće koncentracije diklofenaka u vodenom okolišu nego što je to uobičajeno. To je samo jedan od mnogih primjera ekoloških katastrofa zbog kojih se prvenstveno podigla svijest o potrebi za ekotoksikološkom procjenom utjecaja farmaceutika na okoliš. [42]

### **2.5.1. Akutna toksičnost- metoda pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri***

Za određivanje toksičnosti u ovom radu korištena je njemačka standardna metoda DIN 38412-L-34. Radi se o bioluminiscentnoj metodi koja se ubraja u testove kratkog trajanja. S obzirom na vrijeme trajanja testa od 30 minuta ima velike prednosti u odnosu na ostale „short term“ odnosno kratkotrajne metode koje obično traju 48 ili 96 sati. Kao test organizmi se koriste

bakterije *Vibrio fischeri*. To je bioluminiscentna, Gram negativna bakterija koja živi kao simbiot u bioluminiscentnim ribama i u svjetlosnim organima lignji. Danju i noću prirodno emitira svjetlost ujednačenog intenziteta kao sastavni dio svog metabolizma. Uzrok tome je enzim luciferaza. Mjerenjem intenziteta emitirane svjetlosti moguće je utvrditi svako oštećenje bakterijskog metabolizma koje je nastalo kao posljedica djelovanja toksina. [43]



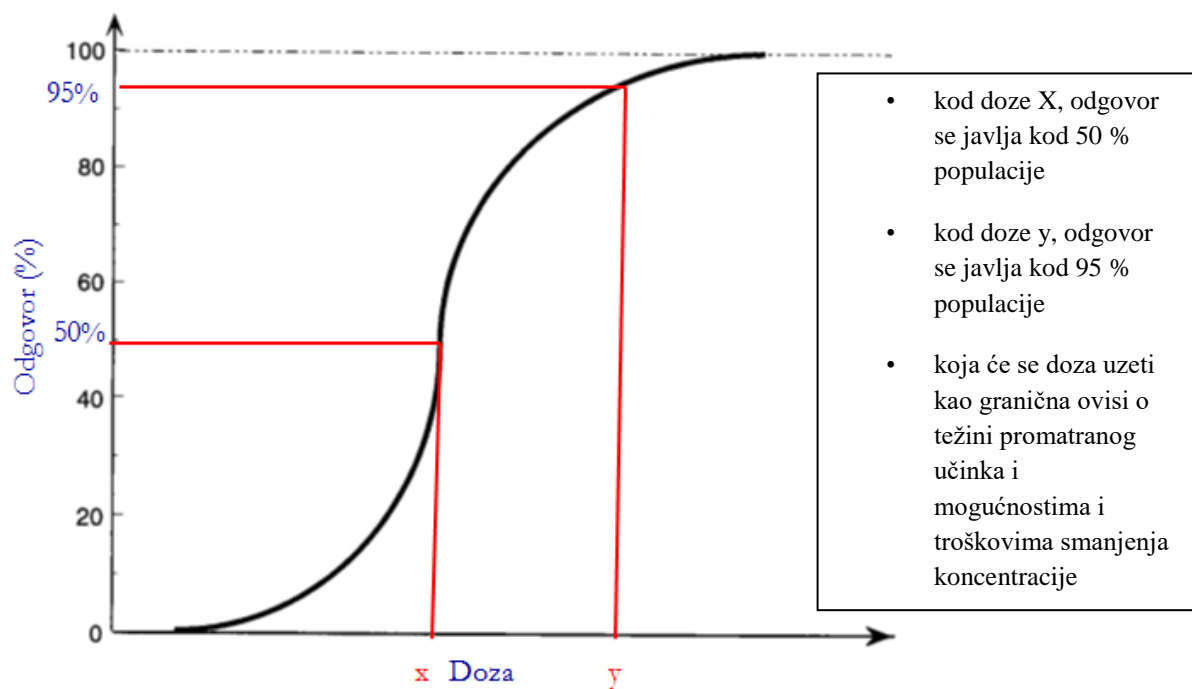
Slika 7. Princip djelovanja luciferaze [43]

Kod vrste *Vibrio fischeri* luminiscencija je kontinuirani proces i sastoji se od više reakcija u različitim fazama. U toj reakciji reducirani luciferin (FMNH<sub>2</sub>) tvori kompleks sa enzimom luciferazom. Kompleks dalje reagira s molekularnim kisikom i tvori oksidirani luciferin (FMN) i pobuđenu luciferazu. Dugolančani aldehidi su obavezni u ovoj fazi reakcije. Povratak luciferaze u stanje mirovanja rezultira emisijom fotona (Slika 7.). [44]

### 2.5.1.1. Krivulja toksičnosti i definicije povezane s toksičnošću

Krivulja toksičnosti (Slika 8.) pokazuje međuovisnost DOZE i ODGOVORA. Najčešće (kod normalne razdiobe) ima karakteristični oblik slova S. [45]





Slika 8. Opći izgled krivulje toksičnosti [45]

Tijekom provođenja određene analitičke metode potrebno je definirati fizikalno-kemijske veličine koje se pritom ispituju. Prilikom određivanja toksičnosti prvo je potrebno odrediti početnu luminiscenciju bakterijske suspenzije kako bi se poslije moglo pratiti kako otopina uzorka, odnosno ispitivanog farmaceutika djeluje na korištenu bakterijsku kulturu što vidimo u vrijednostima mjerene luminiscencije. Potom se uz pomoć gotovih matematičkih izraza računa postotak inhibirane kulture nakon određenog vremena što ujedno i predstavlja os ordinatu na grafu toksičnosti otopine ispitivanog farmaceutika dok se na apscisi nalazi logaritam koncentracije otopine farmaceutika.

Kasnije se iz grafa očitaju vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  koje uzrokuju inhibiciju 20 %, odnosno 50 % bakterijske kulture što nam omogućava lakšu interpretaciju rezultata i definiranje utjecaja uzorka na ispitivanu bakterijsku kulturu.

Prikaz određivanih fizikalno-kemijskih veličina:[46]

$l_0$  – luminiscencija bakterija u suspenziji prije nego je dodan uzorak (početna luminiscencija)

$l_t$  – luminiscencija testirane otopine nakon inkubacije u vremenu  $t$  (konačna luminiscencija nakon dodavanja uzorka)

$l_0K/l_tK$  – početna i konačna luminiscencija kontrolne otopine (2 % NaCl)

$fK$  – faktor korekcije

$$fK = l_t K / l_0 K \quad (1)$$

$l_c$  – ispravljeni  $fK$

$$l_c = fK \times l_0 \quad (2)$$

% inhib.t. – postotak inhibicije luminiscencije nakon inkubacije u vremenu  $t$

$$\% \text{ inhib.t.} = (l_c - l_t) \times 100 / l_c \quad (3)$$

GL vrijednost – faktor razrjeđenja kojim je postignut % inhib.t. < 20

$EC_{20}$  – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije

$EC_{50}$  – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50% inhibicije

## 3. EKSPERIMENTALNI DIO

---

Na **Slici 9.** dan je shematski dijagram toka eksperimentalnog dijela rada.



**Slika 9.** Dijagram toka eksperimentalnog dijela rada: shema reaktora za biorazgradnju, pH-metar, filter za injekcije (0,22  $\mu\text{m}$ ), kiveta s reagensima za analizu KPK, UPLC, luminometar

### 3.1. MATERIJALI

#### 3.1.1. Kemikalije

U **Tablici 1** navedene su kemikalije koje su korištene prilikom provođenja kromatografskih analiza, analiza u svrhu određivanja toksičnosti uzoraka te prilikom određivanja KPK vrijednosti (kemijska potrošnja kisika).

**Tablica 1.** Kemikalije korištene u analizama

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Kalijev bikromat	$K_2Cr_2O_7$	p.a.	Merck, Njemačka
Srebrov sulfat	$Ag_2SO_4$	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
Sulfatna kiselina	$H_2SO_4$	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska
Amonijevželjezo (II) sulfat	$(NH_4)_2Fe(SO_4)_2$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Živin (II) sulfat	$Hg_2SO_4$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Feroin indikator	$C_{36}H_{24}FeN_6^{2+}$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Etanol	$C_2H_5OH$	96 %	Gram-mol d.o.o., Hrvatska
Metanol	$CH_3OH$	HPLC čistoća	J.T.Baker, Nizozemska
Acetonitril	$CH_3CN$	HPLC čistoća	Fischer Chemical, Velika Britanija
Mravlja kiselina	$CH_2O_2$	p.a.	Merck, SAD
Agar	$C_{14}H_{24}O_9$	p.a.	Liofilchem, Italija
Cink sulfat heptahidrat	$ZnSO_4 \times 7H_2O$	p.a.	Lach-ner, Češka
D(+)-rafinoza pentahidrat	$C_{18}H_{32}O_{16}$	99 %	Alfa Aesar, Njemačka
D-glukoza	$C_6H_{12}O_6$	p.a.	Lach-ner, Češka
Feroin indikator	$C_{36}H_{24}FeN_6^{2+}$	p.a.	Sigma-Aldrich, SAD
Glicerol	$C_3H_8O_3$	p.a.	Lach-ner, Češka
Kalcij karbonat	$CaCO_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalcij klorid	$CaCl_2$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalij dihidrogen fosfat	$KH_2PO_4$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev bikromat	$K_2Cr_2O_7$	p.a.	Merck, Njemačka
Kvašćev ekstrakt	$C_{19}H_{14}O_2$	p.a.	Biolife, Italija
Magnezij sulfat	$MgSO_4$	p.a.	T.T.T., Hrvatska
Natrijev klorid	$NaCl$	p.a.	Lach-ner, Češka
Pepton	-	p.a.	Biolife, Italija
Srebrov sulfat	$Ag_2SO_4$	p.a.	Kemika d.d., Hrvatska

### 3.1.2. Farmaceutici

U **Tablici 2** navedeni su osnovni podaci o farmaceuticima koji su korišteni u radu.

**Tablica 2.** Popis korištenih farmaceutika

Farmaceutik	Molekulska formula	CAS broj	$M_w$ , g/mol	Čistoća	Proizvođač
<b>Febantel</b>	$C_{20}H_{22}N_4O_6S$	58306-30-2	446,478	99 %	Veterina d.o.o.
<b>Prazikvantel</b>	$C_{19}H_{24}N_2O_2$	55268-74-1	312,413	99 %	Veterina d.o.o.
<b>Pirantel pamoat</b>	$C_{34}H_{30}N_2O_6S$	22204-24-6	594,6768	99 %	Veterina d.o.o.

Za pripravu radnih otopina (RO) farmaceutika korištena je MiliQ voda.

### 3.1.3. Aktivni mulj

U pokusima biorazgradnje uporabljen je aktivni mulj podrijetlom iz uređaja za obradu otpadne vode grada Velika Gorica, koji je prethodno u laboratorijskim uvjetima istražen za uklanjanje organskih i anorganskih sastojaka. Za svaki pokus istraživanja biorazgradnje odabranog antihelmintika uzeto je 5 mL aktivnog mulja iz boce Kultura, pri aeraciji. U pokusima biorazgradnje koncentracija suhe tvari, MLSS (eng. *Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS) iznosila je 0,022 g MLSS/L (na 1,0 L) ili 4,34 g MLSS/L (u 5 mL).

### 3.1.4. Djelatni mikroorganizmi za određivanje toksičnosti- bakterijska kultura *Vibrio fischeri*

Za određivanje toksičnosti korištenjem standardne metode DIN 38 412-L-34 u ovom radu kao djelatni mikroorganizam korištena je bakterijska kultura *Vibrio fischeri*. Ta bakterijska vrsta odlikuje se sposobnošću bioluminiscencije određenog intenziteta kao sastavni dio svog metabolizma.

Za uzgoj bakterijske kulture korišten je kruti hranjivi agar, inkubacijom u mračnom prostoru na temperaturi od 15 °C do 22°C. Već nakon 24 h inkubacije na hranjivom agaru vidljive su izrasle kolonije svijetlo-žute boje koje emitiraju bioluminiscenciju određenog intenziteta. Obzirom na optimalnu stabilnost kulture odnosno luminiscencije najbolje je analize provoditi s kulturom starom 48-72 h (**Slika 10.**). Pri navedenim uvjetima, kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepljivanja.



**Slika 10.** Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura nakon 48 h inkubacije)

### 3.1.5. Hranjiva podloga

Sve sastojke (**Tablica 3.**) otopiti u hladnoj deioniziranoj vodi u Erlenmeyer tikvici. Ostaviti 15 minuta da agar nabubri i potom zagrijati do vrenja. Budući da većina kalcijevog karbonata ostaje neotopljena, zagrijavanje treba izvoditi u vodenoj kupelji. Kada se sastojci u potpunosti otope zagrijavati suspenziju do vrenja direktno na azbestnoj mrežici nad plamenikom. Čim dođe do vrenja treba odmah maknuti suspenziju s mrežice. Sterilizirati u autoklavu na 121°C 15 minuta.

Sterilnu podlogu ohlađenu na 45°C izliti u Petrijeve zdjelice (ili se može neizlivena čuvati u hladnjaku na 4°C). Prije izlivanja podlogu lagano homogenizirati kako bi se kalcijev karbonat koji je na dnu ravnomjerno rasporedio u podlozi (ako se jako miješa podloga se može zapjeniti). Podlogu koja se naknadno otapa najbolje je otapati u vodenoj kupelji (tikvicu staviti u posudu s vodom na plamenik i povremeno protresti).

**Tablica 3.** Sastav hranjive podloge

Sastojci	Odvaga u 1000 mL
NaCl	30 g
Agar	15 g
Glicerol	10 g
CaCO <sub>3</sub>	5 g
Pepton	5 g
Kvašćev ekstrakt	3 g

### 3.1.6. Otopine potrebne za određivanje toksičnosti

#### 3.1.6.1. Otopina za resuspenziju

Otopina za resuspenziju je hranjiva izoosmotska otopina za resuspendiranje bakterijske kulture. U destiliranoj vodi se otope sastojci (**Tablica 4.**). Otopina se prokuha, ohladi i profiltrira. Sterilizira se u autoklavu. Tako pripremljena se čuva u hladnjaku do 4°C do 2

tjedna ili do pojave zamućenja, a može se i zamrznuti u manjim bočicama (100 mL) i duže čuvati do uporabe.

**Tablica 4.** Sastav otopine za resuspenziju

Sastojci	Odvaga u 1000mL
NaCl	36 g
KHPO	0,2 g
CaCl	0,5 g
MgSO	0,2 g
Glicerol	0,5 mL

### 3.1.6.3. Otopina referentnih tvari

Otopina standarda za provjeru valjanosti bakterijske suspenzije priprema se kao otopina masene koncentracije 25 mg/L odvagom soli  $ZnSO_4 \times 7 H_2O$  koja se otopi u 100 mL redeionizirane vode.

### 3.1.6.2. Radna otopina

Radna otopina za resuspenziju bakterija *Vibrio fischeri* (2 % NaCl) priprema se tako da se odvaži 20 g NaCl koji se otopi u 1000 mL deionizirane vode te se sterilizira u autoklavu, a koristi se i za pripremu niza razrjeđenja.

pH-vrijednost otopine za resuspenziju, radne otopine i otopine referentnih tvari mora iznositi između 6,8 i 7,2.

## 3.2. INSTRUMENTI, UREĐAJI, PRIBOR

### 3.2.1. Analitička vaga

U radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska, prikazana na **Slici 11**.



Slika 11. Analitička vaga

### 3.2.2. Kisikova i pH elektroda

Mjerenje pH-vrijednosti vrši se kombiniranom staklenom elektrodom koja se sastoji od mjernog i referentnog sustava uklopljenih u zajedničko kućište. Elektroda se između mjerenja ispire deioniziranom vodom. pH-vrijednost odnosno otopljeni kisik izražen u mg/L na kisikovoj elektrodi i temperatura izražena u °C se očitava nakon ustaljenja vrijednosti na uređaju. Staklena pH elektroda se čuva u otopini kalijevog klorida (KCl) ili otopini za punjenje elektroda.

Za mjerenje pH korišten je pH-metar Boeco, Germany, PT-370 (Slika 12.), a za mjerenje koncentracije otopljenog kisika kisikova elektroda Oximeter 320, WTW, Germany (Slika 13.).



Slika 12. pH-metar



Slika 13. Kisikova elektroda

### 3.2.3. Termoreaktor

Termoreaktor Hach, Model 45600-18, SAD (Slika 14.) uporabljen je za termičku obradu uzoraka pri određivanju KPK. Temperaturno područje primjene je od 20 °C do 150 °C.





Slika 14. Termoreaktor

### 3.2.4. Ultrazvučna kupelj

Nakon pripreme standardnih otopina farmaceutika u odmjernim tikvicama, svaka tikvica se uronila u ultrazvučnu kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka (Slika 15.), kako bi se poboljšao proces otapanja farmaceutika u smjesi otapala. Ultrazvučna kupelj je programibilna, tj. omogućuje podešavanje temperature kupelji i snage ultrazvuka te pohranjivanja do 10 programa s različitim postavkama eksperimentalnih uvjeta. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C, vrijeme od 1 do 99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W.

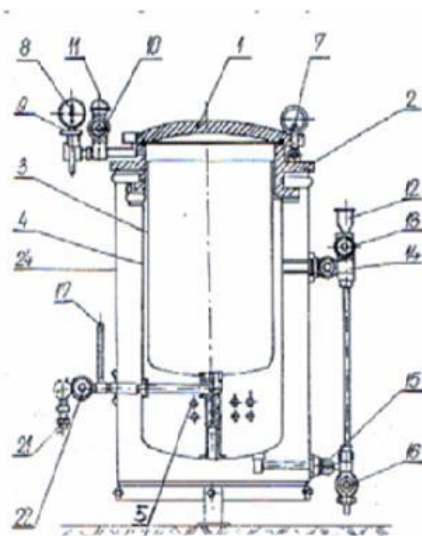


Slika15. Ultrazvučna kupelj

### 3.2.5. Autoklav

Autoklav je uređaj za provedbu sterilizacije zasićenom vodenom parom pod pritiskom (Slika 16.). Građen je od vrlo čvrstog materijala, najčešće u vidu cilindra. Ima dvostruke stjenke i poklopac koji se pomoću podesivih vijaka i gumenog obruča hermetički zatvara. Uložak s termometrom, manometar i sigurnosni ventil najčešće su postavljeni bočno, obično u gornjem dijelu. Postranično se nalazi i staklena cijev za kontrolu nivoa vode u autoklavu. U donjem dijelu nalazi se ventil za ispuštanje pare. U dnu je postavljen izvor topline (plinski ili električni grijač). Sterilizacija zasićenom vodenom parom pod pritiskom najčešće se provodi pri pritisku od 1 atmosfere pretlaka i 121 °C tijekom 15 do 30 min i smatra se najpouzdanijom

metodom sterilizacije jer povećani pritisak povećava temperaturu, a time i prodor vodene pare u materijal koji se sterilizira. [47]



Slika 1. Autoklav: 1-poklopac, 2-prsten, 3-unutrašnja stjenka, 4--vanjska stjenka, 5-električni grijači, 7-metalni zavrtanj, 8-manometar, 9-sigurnosni ventil, 10-ventilacijski ventil, 11-ventilacijska šaljica, 12-ljevak za punjenje, 13-, 14-, 15- i 16-ventili sustava za punjenje, 17-termometar, 21-odvod, 22-ventil za ispuštanje, 24-plašt autoklava

Slika16. Shematski prikaz autoklava [47]

### 3.2.6. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti (UHPLC)

Ispitivanja su provedena na tekućinskom kromatografu ultravisoke djelotvornosti ACQUITY® UPLC I-Class system (Waters, Velika Britanija) s binarnom pumpom ACQUITY® UPLC BinarySolvent Manager, automatskim dodavačem uzoraka ACQUITY® UPLC Sample Manager, odjeljkom za kolonu ACQUITY® UPLC Column Manager i fotoelektričnim detektorom s diodnim nizom (**eng. photodiode array, PDA**) ACQUITY® UPLC Photodiode Array Detector (**Slika 17.**)

Kao sredstvo za ispiranje igle izvana (**engl. wash solvent**) korištena je mješavina acetonitrila i metanola u volumnom omjeru 50:50, kao sredstvo za ispiranje igle iznutra (**eng. purge solvent**) 1 % acetonitril u pročišćenoj vodi, a kao sredstvo za ispiranje brtvi (**engl. seal wash**) 10 % acetonitril u pročišćenoj vodi. Kao pokretne faze korištene su 0,1 % mravlja kiselina u vodi (kanal A) i acetonitril (kanal B). Separacija kromatografskih krivulja provedena je na koloni BEH C8 (100 mm x 2,1 mm, 1,7 µm) Waters Acquity, SAD. Temperatura kolone je bila 32 °C, a temperatura automatskog dodavača uzoraka 25 °C.



Slika 17. Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti [48]

U radu je najprije korišten UHPLC sustav praćen detektorom s nizom dioda (DAD). Kao detektor koristio se i spektrometar masa (MS) Waters Synapt G2-Si. Svi kromatogrami procesirani su u programskom paketu Empower i MassLynx (Waters, Velika Britanija).

### 3.2.7. Luminometar

Toksičnost je određivana na mjernom instrumentu LUMISTox 300 mjereći bioluminiscenciju bakterija *Vibrio fischeri*. LUMISTox 300 objedinjuje računalnu tehnologiju s tehnologijom mjernih instrumenata (u ovom slučaju luminometrom). LUMISTox 300 ima vlastiti operativni sustav sa ugrađenom disketom na kojoj su pohranjeni svi podaci i programi potrebni za rad. LUMISTox 300 ima ugrađen fotometar i ustaljeni rad automatskog mjerenja i razvijanja podataka čime je omogućeno prepoznavanje boje uzorka u testu s luminiscirajućim bakterijama (Slika 18.). Radna temperatura instrumenta je 15 °C ( $\pm 1$  °C).



Slika 18. Uredaj za provedbu toksičnosti (LUMISTox 300)

### **3.3. METODE RADA**

#### **3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika**

##### **3.3.1.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika za eksperiment biorazgradnje (modalne otopine)**

Temeljna standardna otopina (TSO) masene koncentracije 500 mg/L pripremljena je otapanjem točno izvagane mase farmaceutika u metanolu (MeOH). Pripremljena je otapanjem 0,05 g farmaceutika (API) u metanolu i nadopunjavanjem u tikvicu od 100 mL te je tikvica dodatno uronjena u ultrazvučnu kupelj kako bi se ubrzao i poboljšao proces otapanja farmaceutika. Pripremljene su i otopine smjese febantela, prazikvantela te pirantel pamoata na isti način. Iz te otopine pripremljeno je razrjeđenje masene koncentracije 10 mg/L tako da je 20 mL TSO pipetirano u 1000 mL vodovodne vode u reaktoru.

##### **3.3.1.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika za kromatografsku analizu**

Temeljne standardne otopine (TSO) febantela, prazikvantela te pirantel pamoata pripremljene su pri masenoj koncentraciji od 500 mg/L. Odvagama antihelmintika (API i standardi) dodan je metanol u volumenu 70 % volumetrijske tikvice. Tikvice su stavljene u ultrazvučnu kupelj 30 min, a zatim nadopunjene do oznake acetonitrilom. Pripremljene su i otopine smjese febantela, prazikvantela te pirantel pamoata na isti način. Iz te otopine pripremana su razrjeđenja masene koncentracije 10 mg/L u vodenom mediju (MiliQ voda). Sve otopine pirantel pamoata pripremane su u tamnim tikvicama kako bi se izbjeglo stvaranje fotoizomera.

#### **3.3.2. Provedba procesa biorazgradnje aktivnim muljem**

Pokusi biorazgradnje odabranih antihelmintika provedeni su u volumno graduiranim plastični spremnicima maksimalnog volumnog kapaciteta (zapremine) 3,2 L kao šaržni reaktor (**Slika 19.**). Ukupan radni volumen koji se sastojao od 1,0 L radne otopine (RO) odabranog farmaceutika masene koncentracije 10 mg/L i 5 mL aktivnog mulja konstantno je prozračivan - aeriran pomoću akvarijske crpke koja je gumenom cijevi preko filtera za zrak spojena s plastičnom sterilnom pipetom koja je uronjena u sadržaj reaktora kako bi se osigurala dobava zraka na dno spremnika, a time osiguralo i miješanje sadržaja u reaktoru. Reaktor je omotan aluminijskom folijom kako bi se spriječio utjecaj foto-razgradnih procesa pod utjecajem Sunčevog zračenja, te se prilikom analize moglo zaključiti koji produkti nastaju isključivo pod utjecajem biorazgradnje ili hidrolize. Reaktor je bio smješten u digestoru. Parametri

kojima je praćena prilagodba aktivnog mulja na otopinu te proces biorazgradnje farmaceutika su pH-vrijednost, koncentracija otopljenog kisika (mg/L), temperatura (°C), kemijska potrošnja kisika-KPK (mg O<sub>2</sub>/L) i preostali radni volumen sadržaja u reaktoru (L).

Paralelno, uz pokuse biorazgradnje, za svaki odabrani antihelmintik, u istim procesnim i okolišnim uvjetima, provedeni su pokusi bez dodane mikrobne biomase aktivnog mulja, kao slijepi pokusi, a istom dinamikom su uzimani uzorci i motreni su isti analitički pokazatelji.

Uzorci za analizu su uzimani u definiranim vremenskim razmacima, svakih 24 sata, i to oko 5 mL uzorka. Neposredno nakon filtriranja uzorka kroz filter papir veličine pora 0,22 μm, provedeno je određivanje KPK vrijednosti, a preostali uzorak za daljnju analizu je pohranjen na +4 °C.

### 3.3.2.1. Metoda određivanja KPK vrijednosti

KPK vrijednost određivana je standardnom metodom APHA 5520 C. U suhoj i čistoj staklenoj kiveti se nalazi 1,2 mL otopine kalijevog bikromata i živinog (II) sulfata u koju se trbušastom pipetom dodaje 2 mL profiltriranog uzorka, a zatim se još pažljivo uz rub kivete doda 2,8 mL otopine sulfatne kiseline i srebrovog sulfata. Čvrsto se zatvori i pažljivo promiješa jer se stvara visoka temperatura. Kivete se stave u zagrijani termoreaktor na spaljivanje kroz 1 h na 150 °C, a nakon toga se ostave hladiti na tamnom mjestu, ne pod mlaz hladne vode. Ohlađeni sadržaj iz kivete se zatim prenese u Erlenmeyerovu tikvicu od 100 mL i pritom se kiveta tri puta ispere s destiliranom vodom te se dodaju tri kapi redoks indikatora feroina. Otopina je u tikvici crveno-narančaste boje, a dodavanjem reagensa amonijevog željezo (II) sulfata prelazi u plavo-zelenu, obezboji se i konačno u točki pretitracije poprima crveno-smeđu boju. Volumen utrošenog alikvota koristi se za računanje KPK pomoću formule:

$$KPK = \frac{(V_{slijepaprba} - V_{uzorak}) \times 0,1 \times 8000 \times f}{2} \quad (4)$$

$V_{slijepa\ proba}$  -volumen slijepe probe

$V_{uzorak}$  -volumen uzorka

$f$ - faktor korekcije



**Slika 19.** Reaktor u kojem se vodio proces biorazgradnje

### **3.3.3. Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje**

#### **3.3.3.1. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda (UHPLC-DAD)**

Nakon uzorkovanja uzorci su najprije profiltrirani kroz filtar za injekcije Ny Syringe Filter, FilterBio, Labex Ltd., veličine pora  $0,22\ \mu\text{m}$  (**Slika 20.**), zatim je provedena kromatografska analiza. Pripremljene standardne otopine farmaceutika (API i standardi) i uzorci uzimani tijekom biorazgradnje su snimani na kromatografu ultravisoke djelotvornosti (UPLC) kojim je omogućena identifikacija razgradnih produkata biorazgradnje čija je koncentracija u realnim uzorcima vrlo niska.



**Slika 20.** Filtar za injekcije ( $0,22\ \mu\text{m}$ )

Volumen injektiranih standardnih otopina farmaceutika (API i standard) i uzoraka je  $10\ \mu\text{L}$ . Pokretna faza se sastojala od: A  $0,1\ \%$  mravlja kiselina u vodi i B acetonitril uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u **Tablici 5**. Brzina protoka pokretne faze je  $0,6\ \text{mL/min}$ .

**Tablica 5.** UHPLC metoda za određivanje onečišćenja za febantel/pirantel/prazikvantel

Vrijeme (min)	Pokretna faza A (%)	Pokretna faza B (%)
0	95	5
1	95	5
3	75	25
6	68	32
13	68	32
18	20	80
19	20	80

Vrijeme ujednačavanja (**eng.** *equilibration time*) nakon eluiranja iznosilo je jednu minutu. Temperatura automatskog dodavača uzoraka (**eng.** *autosampler*) namještena je na 20 °C. Glavnu komponentu pratili smo pomoću kvantitativnog parametra, površine ispod kromatografske krivulje (A) za dani analit, izražene jedinicama mAU. Osim toga, kvalitativni parametri bili su vrijeme zadržavanja ( $t_R$ ) te apsorpcijski spektar karakterističan za pojedinu komponentu. Apsorbancija je mjerena pri 240 nm za FEB i pamoat, 310 nm za PIR i 195 nm za PRZ sa rezolucijom od 4,8 nm te je mjeren cijeli UV spektar od 190 – 400 nm sa rezolucijom od 1,2 nm.

### 3.3.3.2. Tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti uz detektor spektrometar masa (UHPLC-MS/MS)

Sve analize su provedene i na tekućinskom kromatografu ACQUITY® UPLC I-Class System (Waters, Velika Britanija) uz detektor tandemski spektrometar masa (MS/MS) Waters Synapt G2-Si. Analize su provedene pod istim uvjetima navedenim u eksperimentalnom dijelu **3.3.3.1.**

MS analize provedene su poduvjetima prikazanim u **Tablici 6.** Kao ionski izvor korišten je ionizator temeljen na elektroraspršenju ESI<sup>+</sup> (**eng.** *electrospray ionization*). Provedena je kvalitativna analiza TIC (**eng.** *Total Ion Chromatogram*) metodom, a instrument je podešen za uzimanje masenih spektara ovisno o molekulskoj masi komponente, u rasponu  $m/z$  60–1000 Da. Za kalibraciju instrumenta pripravljena je otopina natrijeva formijat, a kao masa za umjeravanje instrumenta korišten je leucin-enkefalin. Volumen injektiranih standardnih otopina farmaceutika (API i standard) je 1  $\mu$ L, dok je volumen injektiranja ostalih uzoraka iznosio 10  $\mu$ L.

**Tablica 6.** Parametri MS analize (TOF)

Parametri	TOF
Napon na kapilari ( <b>eng.</b> <i>capillary voltage</i> )	3,8 kV
Temperatura ionskog izvora ( <b>eng.</b> <i>source temperature</i> )	150 °C
Temperatura uparavanja ( <b>eng.</b> <i>desolvation temperature</i> )	600 °C
Protok plina s konusa ( <b>eng.</b> <i>cone gas flow</i> )	10 L/h
Protok plina za uparavanje ( <b>eng.</b> <i>desolvation gas flow</i> )	1200 L/h
Protok magličastog/rashladnog plina ( <b>eng.</b> <i>nebuliser gas flow</i> )	3,0 bar

Korištena je metoda spregnute spektrometrije masa, LC–MS/MS, u ovom slučaju UPLC/HDMS<sup>E</sup> (**eng.** *High Definition Mass Spectrometry*) koji prvenstveno služi za identifikaciju spojeva jer analizira masu na 4 decimalne jedinice. Uzorci su snimani pri niskoj kolizijskoj energiji tj. 0 V, te pri uvjetima kolizijske energije 10-40 V (MS/MS) tako da se simultano odvija snimanje bez/sa kolizijskom energijom i dobivaju dva kromatograma (niske/visoke energije).

### 3.3.4. Metodika određivanja toksičnosti farmaceutika i uzoraka nakon biorazgradnje na bakterijama *Vibrio fischeri*

Postupak provedbe određivanja toksičnosti metodom s *Vibrio fischeri* je uključivala reaktiviranje liofiliziranih bakterija, njihovo precjepljivanje na hranjivu podlogu i inkubaciju na 18-22 °C, 24-48 h. Ključno je prije samih analiza podesiti pH svih otopina za rad (optimalno 6,8-7,2), te termostatirati ih na 15 °C. U radu je najprije mjerena luminiscencija bakterijskih suspenzija bez čistih aktivnih supstanci farmaceutika, a potom su se sljedeći pravilo geometrijskog niza dodavale otopine farmaceutika različitih koncentracija, počevši od najmanje do najveće (navedeno u eksperimentalnom dijelu **3.1.5.1.**). Nakon toga provedena je analiza uzoraka uzimanih tijekom procesa biorazgradnje.

Nakon 30 min očitavani su rezultati testa provedenog na uređaju LUMISTox 300 i na temelju rezultata u programskom paketu MS Office-*Excell* crtani su grafovi toksičnosti za otopine pojedinačnih farmaceutika iz kojih su očitane vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$ .

Bakterijsku suspenziju pripremamo sterilnom tehnikom rada. Prema propisu, u kivetu koja je netom izvađena iz dubokog smrzavanja pipetira se netom izvađena otopina za resuspenziju (na temperaturi najviše do 8°C) te se pripravljena suspenzija dobro homogenizira na stolnoj mućkalici i stavi na 15 minuta na termostat koji je prethodno namješten na radnu temperaturu



od 15 °C. Nakon 15 minuta odmah se kreće sa radom i mjerenjem jer s vremenom kultura gubi sposobnost luminiscencije i postaje nestabilna za rad.

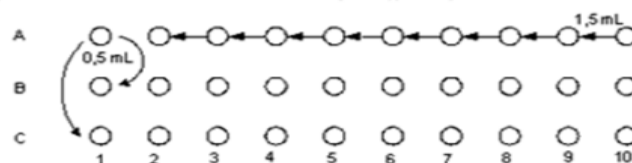
Budući da takve test kivete volumno ne zadovoljavaju naše metode analize, pripremljena suspenzija se koristi za uzgoj svježe bakterijske kulture. Sadržaj kivete se pažljivo, sterilnom tehnikom rada, izlije na svježu, sterilnu čvrstu hranjivu podlogu na Petrijevoj zdjelici.

Kultura se inkubira i raste u Petrijevim zdjelicama na hranjivoj podlozi temperaturi od 15 °C do 22 °C. Petrijeva posuda se postavi poklopcem prema dolje kako bi se spriječila kondenzacija. Pri navedenim uvjetima, kultura je upotrebljiva najmanje dva, a najviše devet dana od precjepljivanja. Optimalna luminiscencija i stabilnost bakterijske suspenzije opaža se od drugog do četvrtog dana. pH–vrijednost otopine za resuspenziju, radne otopine i otopine referentnih tvari mora iznositi između 6,8 i 7,2.

Sterilnom tehnikom rada, što podrazumijeva upaljeni plamenik s oksidirajućim plamenom te radna površina očišćena etanolom, se sterilnom mikrobiološkom ezom pokupi malo kulture izrasle na hranjivoj podlozi (**Slika 10.**), stavi se u 5 mL sterilne otopine za resuspenzije u kivetu, dobro se homogenizira te se inkubira na termostatu kroz 15 minuta na temperaturi od 15 °C.

### **Priprema geometrijskog niza razrjeđenja**

U prvu kivetu se stavi 2/3 kivete 2 % NaCl, a u zadnju 2/3 uzorka razrijeđenog onoliko puta koliko se utvrdi preliminarnim ispitivanjima (najveća koncentracija). U sve ostale kivete stavi se po 1,5 mL 2 % NaCl. U **A** nizu napravi se niz željenih razrjeđenja počevši od najmanjeg do najvećeg, tako da se po 1,5 mL dobro homogeniziranog uzorka prebacuje iz kivete u kivetu (iz smjera kivete broj 10 prema 1). U sve ostale kivete **B** i **C** niza stavi se po 0,5 mL inokuluma (**Slika 21.**). Nakon što se očita prva kiveta **B1** vraća se na termo blok, na luminometar se stavlja iduća po redu **C1**, a istovremeno se iz kivete **A1** u kivetu **B1** pipetira po 0,5 mL otopine. **C1** se vraća na termo blok, **B2** se stavlja na luminometar, a iz **A1** se također pipetira 0,5 mL otopine u kivetu **C1**. I tako sve do kraja mjerenja. [65]



**Slika 21.** Geometrijski niz razrjeđenja

# 4. REZULTATI I RASPRAVA

---

## 4.1. Fizikalno-kemijski pokazatelji procesa biorazgradnje

Antihelmintici su vrlo učestali u veterinarskoj praksi i time lako dospijevaju u okoliš jer ih se klasičnim metodama obrade otpadne vode ne može ukloniti. Danas se usavršavaju razne metode obrade otpadnih voda s ciljem uklanjanja specifičnih komponenata kao što su farmaceutici, ali i njihovi razgradni odnosno transformacijski produkti. Stoga je kao zadatak ovog rada prvenstveno bilo ispitati mogućnost uklanjanja febantela, prazikvantela i pirantel pamoata iz otpadnih voda biorazgradnjom sa aktivnim muljem.

Proces biorazgradnje motren je kromatografskim metodama, ali i testom toksičnosti pomoću *Vibrio fischeri*.

Analitičkim metodama kromatografije definirat će se učinkovitost procesa biorazgradnje te odrediti eventualno novonastali spojevi, a testom toksičnosti odredit će se da li procesom biorazgradnje nastaju toksičniji produkti od početnog – izvornog spoja.

Topljivost ispitivanih antihelmintika je vrlo slaba u vodenom mediju. Iz tog razloga za pripremu temeljnih standardnih otopina (TSO) primjenjeno je polarnih organsko otapalo, metanol (MeOH). [49]

Obzirom na pojavu sinergijskog učinka farmaceutika kada se nađu u kontaktu u vodenom okolišu, u ovom radu je osim biorazgradnje pojedinačnih komponenata istražena i pripremljena smjesa odnosno modelna otopina svih triju odabranih komponenata-antihelmintika u vodenom mediju (**MIX**).

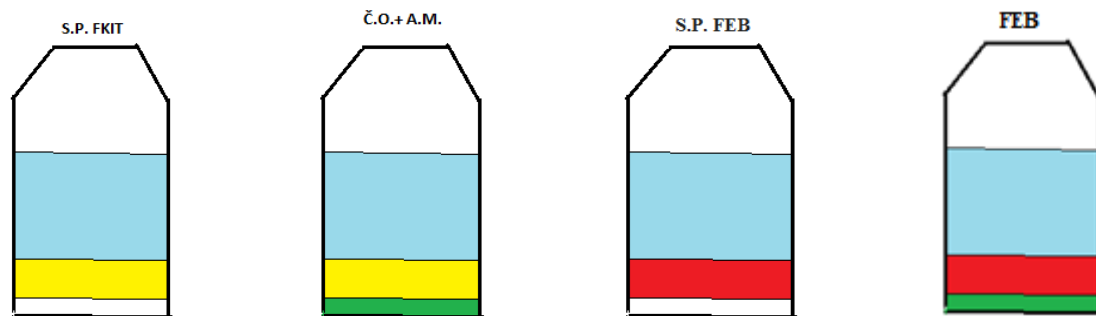
Kombinacija ovih triju farmaceutika dolazi u obliku gotovog farmaceutskog pripravka komercijalnog naziva Prazinon, pa je velika vjerojatnost prisutnosti sve tri komponente u vodenom okolišu. [51]

Kako bi se postignuti rezultati biorazgradnje odabranih pojedinačnih i smjese farmaceutika mogli pripisati i tumačiti kao isključivi rezultat aktivnosti aktivnog mulja, eksperimenti su za svaki pojedinačni odabrani antihelmintik i za smjesu antihelmintika provedeni na način da su osmišljeni i kreirani u više sustava, i to (**Slika 22**):

- ✓ **S.P. FKIT** -> reaktor sa 20 mL čistog otapala (bez dodatka farmaceutika i aktivnog mulja) i vodovodna voda do razine 1,0 L;
- ✓ **Č.O.+A.M.** -> reaktor sa 20 mL čistog otapala (MeOH) i 5 mL aktivnog mulja, sve u 1,0 L vodovodne vode;

- ✓ **S.P. FEB** (ili **PRAZ, PYR PAM, MIX**) -> 20 mL TSO (500 mg/L) svakog pojedinog i smjese antihelmintika i ostatak vodovodna voda do razine 1,0 L što daje RO od 10 mg/L, bez dodatka aktivnog mulja u reaktor;
- ✓ **FEB** (ili **PRAZ, PYR PAM, MIX**) -> 20 mL TSO i ostatak vodovodna voda do 1,0 L (RO= 10 mg/L) i 5 mL aktivnog mulja. Jedino se u tom reaktoru očekivala biorazgradnja.

Takvim vođenjem pokusa, u tumačenju rezultata aktivnosti aktivnog mulja za biorazgradnju odabranih antihelmintika, pretpostavljeni mogući putevi razgradnje, odnosno definiranjem nastalih međuprodukata, osigurava se donošenje korektnog zaključka provedenih eksperimenata biorazgradnje sa aktivnim muljem.



**Slika 22.** Sheme reaktora potrebnih za izvedbu eksperimenata biorazgradnje farmaceutika febantela (legenda: crvena- TSO farmaceutika, zelena- aktivni mulj, žuta- čisto otapalo, plava- vodovodna voda)

Kako bi se mogao pratiti proces biorazgradnje svih odabranih antihelmintika i ustanoviti što se s farmaceutikom u reaktoru zbiva, kroz određeni vremenski tijek motreno je i određivano nekoliko odabranih parametara: pH-vrijednost otopine, koncentracija otopljenog kisika, temperatura sadržaja u reaktoru, preostali radni volumen reaktora i kemijska potrošnja kisika (KPK).

#### 4.1.1. Razgradnja febantela

U reaktoru **FEB** praćen je proces biorazgradnje antihelmintika febantela i to pri masenoj koncentraciji od 10 mg/L (ppm) u vodenom mediju, sa aktivnim muljem, koncentracije 0,022 g MLSS/L, tijekom 14 dana. Vrijednost pokazatelja KPK se od početnih 27139,2 mg/L

znatno smanjuje kroz prvih nekoliko dana, a nakon toga se ustaljuje oko vrijednosti 100 mg O<sub>2</sub>/L uz manje oscilacije u vrijednosti u 13. danu (**Slika 23.**). To ukazuje da aktivni mulj ima aktivnost za razgradnju febantela, nema perioda prilagodbe, ali uz ove podatke nužno je razmotriti i rezultate kromatografije, kako bi se zaključilo o razgradnji ili transformaciji ili hidrolizi febantela. Također, važno je razmotriti i uzeti u obzir i moguću apsorpciju farmaceutika na pahuljicu aktivnog mulja što bi se trebalo dodatno ispitati drugim analitičkim tehnikama (FTIR).

pH-vrijednost se kreće od 7,50 do 7,98. Koncentracija otopljenog kisika oscilira vrlo malo, od 3,5 do 3,7 mg/L. Temperatura oscilira od 18,0 do 20,45 °C. Najznačajniji je pad volumena od početnog 1,0 L do 0,64 L.

Svi motreni parametri iz pokusa razgradnje febantela su prikazani u **Tablici 7.**

Osim reaktora u kojima se pratio proces biorazgradnje febantela (reaktor **FEB**), razgradnja sa aktivnim muljem, paralelno je određen učinak odabranih – definiranih procesnih i okolišnih čimbenika u pokusima sa slijepim probama (**S.P. FEB, S.P. FKIT i Č.O.+A.M.**).

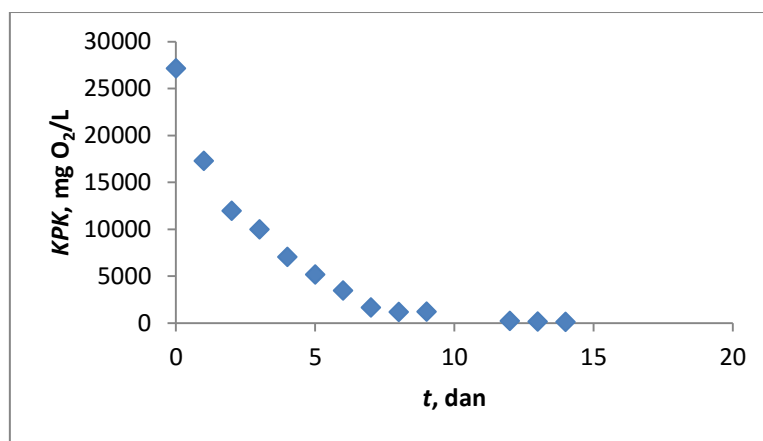
Reaktor **S.P. FEB** u kojem se nalazila otopina farmaceutika koncentracije 10 mg/L u 1,0 L vodovodne vode bez dodatka aktivnog mulja, je također aeriran pri istim procesnim uvjetima kao i reaktor **FEB**. Svrha ovog pokusa (bez dodanog aktivnog mulja) je isključiti moguće ostale procese, poput hidrolize farmaceutika, a koji bi ukoliko bi se zbivali mogli imati učinak na tumačenje rezultata aktivnosti aktivnog mulja za razgradnju farmaceutika.

U reaktoru **S.P.FKIT** u kojem se nalazilo 20 mL čistog otapala MeOH u 1,0 L vodovodne vode, bez dodatka aktivnog mulja, motreno je smanjenje ukupnog volumena reaktora što je djelomično prisutno u svim reaktorima.

U reaktor **Č.O.+A.M.** nalazilo se čisto otapalo uz dodatak aktivnog mulja kako bi se ustanovio utjecaj aktivnog mulja na smjesu otapala, odnosno postoji li inhibicija rasta aktivnog mulja zbog prisutnosti MeOH kao otapala.

**Tablica 7.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **FEB**

Radni dan	Datum	Vrijeme (h)	pH	O <sub>2</sub> (mg/L)	T (°C)	V (L)	KPK (mg O <sub>2</sub> /L)
0.	07.12.2016. (sri)	10:00	7,50	3,6	18,0	1,0	27139,2
1.	08.12.2016. (čet)	9:30	7,52	3,6	17,95	1,0	17263,05
2.	09.12.2016. (pet)	10:30	7,86	3,7	19,55	0,95	11958,8
3.	10.12.2016. (sub)	10:00	7,86	3,6	20,1	0,92	9963,8
4.	11.12.2016. (ned)	9:30	7,93	3,7	18,35	0,90	7039,7
5.	12.12.2016. (pon)	9:30	7,87	3,6	19,5	0,86	5154,6
6.	13.12.2016. (uto)	10:00	7,98	3,6	19,7	0,84	3450,9
7.	14.12.2016. (sri)	10:00	7,79	3,7	18,4	0,80	1630,2
8.	15.12.2016. (čet)	10:00	7,80	3,6	18,95	0,75	1163,5
9.	16.12.2016. (pet)	9:00	7,86	3,7	20,45	0,70	1188,8
10.	17.12.2016. (sub)	-	-	-	-	-	-
11.	18.12.2016. (ned)	-	-	-	-	-	-
12.	19.12.2016. (pon)	10:00	7,82	3,6	19,6	0,68	221,9
13.	20.12.2016. (uto)	10:00	7,85	3,5	20,15	0,66	136,92
14.	21.12.2016. (sri)	9:00	7,86	3,6	19,9	0,64	103,7



**Slika 23.** Promjene koncentracije KPK tijekom 14 dana u reaktoru **FEB**

#### 4.1.2. Razgradnja prazikvantela

U reaktoru **PRAZ** motren je proces biorazgradnje prazikvantela u aerobnim uvjetima, te istim okolišnim i procesnim uvjetima kao i pokusi sa febantelom, tijekom 14 dana. Vrijednost pokazatelja KPK se od početnih 26460,7 mg/L znatno smanjuje kroz prvih nekoliko dana, a vrijednost ispod 100 mg O<sub>2</sub>/L postiže se u 12. danu (**Slika 24.**). I ovi pokusi biorazgradnje prazikvantela pokazuju da aktivni mulj ima aktivnost za biorazgradnju prazikvantela te da nema perioda prilagodbe aktivnog mulja na susprtat, ali provođenjem paralelnih pokusa bez aktivnog mulja (slijepi pokusi u različitim kombinacijama) pokazuju da i u ovom slučaju (kao i kod febantela) dolazi do hidrolize farmaceutika, što je potvrđeno i kromatografskom

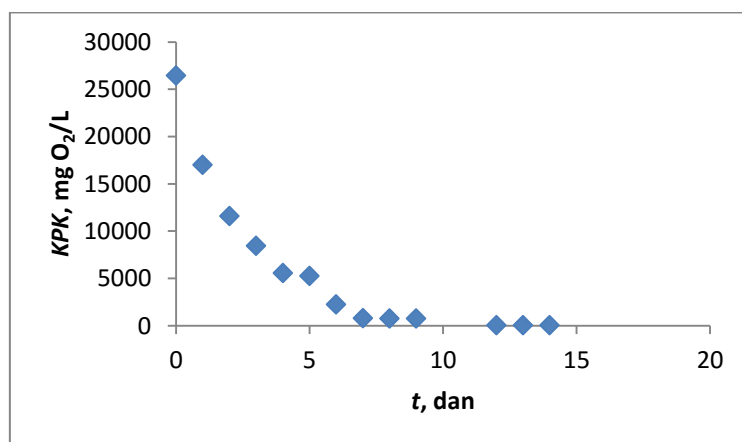
analizom. pH-vrijednost se u reaktoru **PRAZ** kreće od 7,75 do 7,87. Koncentracija otopljenog kisika se kreće od 3,6 do 3,7 mg/L. Temperatura oscilira od 17,8 do 20,25 °C. Najznačajniji je pad volumena od početnog 1,0 L do 0,56 L.

U **Tablici 8.** prikazani su svi motreni parametri iz pokusa razgradnje prazikvantela.

Reaktor **S.P. PRAZ** u kojem se nalazila otopina farmaceutika koncentracije 10 mg/L u 1,0 L vodovodne vode bez dodatka aktivnog mulja, postavljena je pri istim procesnim i okolišnim uvjetima kao i reaktor **PRAZ**. Provođenjem ovog pokusa zaključilo se da je prisutan znatan utjecaj hidrolize na prazikvantel u vodenom mediju te se to mora uzeti u obzir kada se analiziraju podaci biorazgradnje.

**Tablica 8.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **PRAZ**

Radni dan	Datum	Vrijeme (h)	pH	O <sub>2</sub> (mg/L)	T (°C)	V (L)	KPK (mg O <sub>2</sub> /L)
0.	07.12.2016. (sri)	10:00	7,85	3,6	20,0	1,0	26460,7
1.	08.12.2016. (čet)	9:30	7,87	3,6	20,0	1,0	17010,4
2.	09.12.2016. (pet)	10:30	7,75	3,7	17,95	0,94	11586,4
3.	10.12.2016. (sub)	10:00	7,81	3,7	19,35	0,90	8432,3
4.	11.12.2016. (ned)	9:30	7,95	3,7	17,8	0,85	5573,4
5.	12.12.2016. (pon)	9:30	7,80	3,6	19,15	0,84	5249,9
6.	13.12.2016. (uto)	10:00	7,86	3,6	19,95	0,80	2235,3
7.	14.12.2016. (sri)	10:00	7,78	3,7	18,0	0,70	799,9
8.	15.12.2016. (čet)	10:00	7,80	3,6	19,8	0,76	748,5
9.	16.12.2016. (pet)	9:00	7,86	3,7	19,0	0,62	740,2
10.	17.12.2016. (sub)	-	-	-	-	-	
11.	18.12.2016. (ned)	-	-	-	-	-	
12.	19.12.2016. (pon)	10:00	7,82	3,6	19,5	0,60	56
13.	20.12.2016. (uto)	10:00	7,81	3,6	20,25	0,58	49,65
14.	21.12.2016. (sri)	9:00	7,85	3,6	19,4	0,56	30



**Slika 24.** Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 14 dana u reaktoru **PRAZ**

### 4.1.3. Razgradnja pirantel pamoata

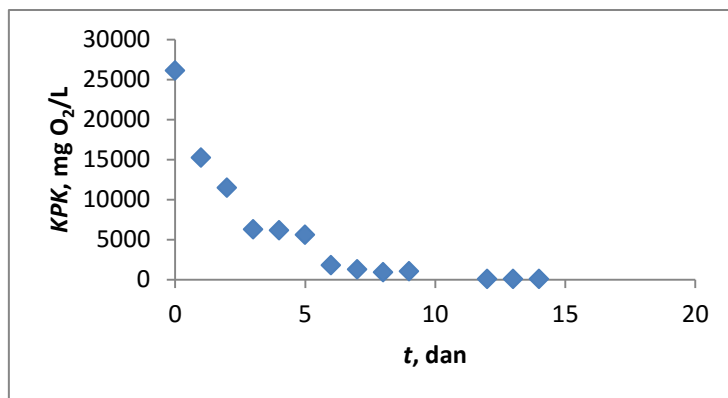
U reaktoru **PYR PAM** praćen je proces biorazgradnje farmaceutika pirantel pamoata pri istim uvjetima i procesnim i okolišnim kao i febantel i prazikvantel, u vremenskom razdoblju od 14 dana. Vrijednost pokazatelja KPK se od početnih 26121,5 mg/L znatno smanjuje kroz prvih nekoliko dana, a vrijednost oko 100 mg O<sub>2</sub>/L postiže se u 12. danu (**Slika 25**). To ukazuje na prilagođeni aktivni mulj i na postignutu razgradnju, ali i u ovom slučaju dolazi do hidrolize farmaceutika pirantel pamoata dokazano kromatografskom analizom. pH-vrijednost se u reaktoru **PYR PAM** kreće od 7,60 do 7,98. Koncentracija otopljenog kisika oscilira vrlo malo, od 3,5 do 3,7 mg/L. Temperatura oscilira od 17,3 do 20,45 °C. Najznačajniji je pad volumena na 0,60 L do 14. dana.

U **Tablici 9.** prikazani su svi motreni parametri iz pokusa razgradnje pirantel pamoata.

Reaktor **S.P. PYR PAM** u kojem se nalazila otopina farmaceutika koncentracije 10 mg/L u 1,0 L vodovodne vode bez dodatka aktivnog mulja, postavljena pri istim procesnim uvjetima kao i reaktor **PYR PAM**. Tim pokusom se zaključilo da je prisutan znatan utjecaj hidrolize pirantela kao aktivne tvari u vodenom mediju i to se mora uzeti u obzir kada se analiziraju podaci biorazgradnje. Uz to svakako treba imati na umu i moguću apsorpciju farmaceutika na pahuljicu aktivnog mulja.

**Tablica 9.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **PYR PAM**

Radni dan	Datum	Vrijeme (h)	pH	O <sub>2</sub> (mg/L)	T (°C)	V (L)	KPK (mg O <sub>2</sub> /L)
0.	07.12.2016. (sri)	10:00	7,60	3,7	18,5	1,0	26121,5
1.	08.12.2016. (čet)	9:30	7,61	3,7	18,75	1,0	15242,2
2.	09.12.2016. (pet)	10:30	7,98	3,7	18,6	0,93	11478,85
3.	10.12.2016. (sub)	10:00	7,84	3,7	19,1	0,90	6275,55
4.	11.12.2016. (ned)	9:30	8,02	3,7	18,15	0,90	6169,25
5.	12.12.2016. (pon)	9:30	7,84	3,5	19,65	0,89	5605,6
6.	13.12.2016. (uto)	10:00	7,89	3,6	19,64	0,88	1803,9
7.	14.12.2016. (sri)	10:00	7,80	3,6	18,15	0,80	1282,9
8.	15.12.2016. (čet)	10:00	7,85	3,6	19,65	0,76	919,4
9.	16.12.2016. (pet)	9:00	7,86	3,6	20	0,68	1061,7
10.	17.12.2016. (sub)	-	-	-	-	-	-
11.	18.12.2016. (ned)	-	-	-	-	-	-
12.	19.12.2016. (pon)	10:00	7,82	3,6	19,45	0,66	109,1
13.	20.12.2016. (uto)	10:00	7,81	3,6	19,45	0,64	88,77
14.	21.12.2016. (sri)	9:00	7,80	3,5	20,45	0,62	76,77



Slika 25. Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 14 dana u reaktoru PRAZ

#### 4.1.4. Razgradnja smjese antiparazitika

U reaktoru MIX praćen je proces biorazgradnje smjese farmaceutika: febantela, prazikvantela i pirantel pamoata dodanih u jednakim volumnim udjelima, pri istim procesnim i okolišnim uvjetima kao i svi pokusi razgradnje pojedinačnih farmaceutika, u vremenskom razdoblju od 15 dana. Vrijednost pokazatelja KPK se od početnih 27817,7 mg/L znatno smanjuje kroz prvih nekoliko dana, a vrijednost oko 100 mg O<sub>2</sub>/L postiže u 15. danu (Slika 26.). I u razgradnji smjese farmaceutika nema perioda prilagodbe aktivnog mulja, aktivni mulj ima aktivnost za razgradnju smjese odabranih antihelmintika.

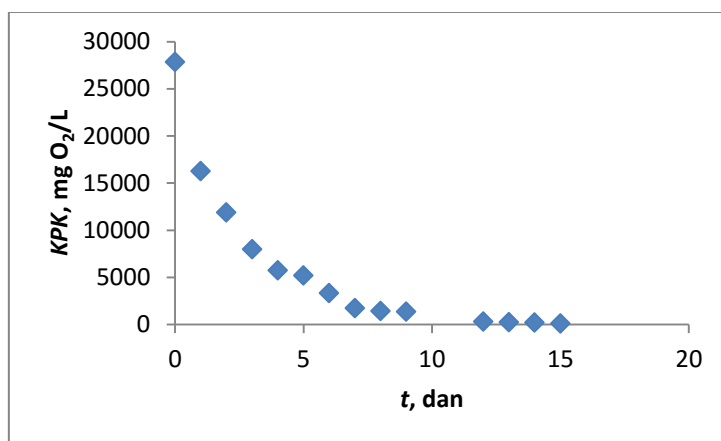
U reaktoru MIX pH-vrijednost je u rasponu 7,80 do 7,98. Koncentracija otopljenog kisika oscilira vrlo malo, od 3,5 do 3,7 mg/L. Temperatura oscilira od 17,2 do 20,30 °C. Najznačajniji je pad volumena od početnog 1,0 L do 0,64 L.

Svi motreni parametri iz pokusa razgradnje smjese odabranih farmaceutika: febantela, prazikvantela i pirantel pamoata dodanih u jednakim volumnim udjelima prikazani su u **Tablici 10.**



**Tablica 10.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor MIX

Radni dan	Datum	Vrijeme (h)	pH	O <sub>2</sub> (mg/L)	T (°C)	V (L)	KPK (mg O <sub>2</sub> /L)
0.	07.12.2016. (sri)	10:00	7,80	3,7	20,0	1,0	27817,7
1.	08.12.2016. (čet)	9:30	7,88	3,7	19,9	1,0	16252,6
2.	09.12.2016. (pet)	10:30	7,69	3,7	18,0	0,95	11883,6
3.	10.12.2016. (sub)	10:00	7,85	3,6	19,1	0,91	7954,05
4.	11.12.2016. (ned)	9:30	7,90	3,7	18,05	0,90	5717,05
5.	12.12.2016. (pon)	9:30	7,83	3,6	19,45	0,88	5194,8
6.	13.12.2016. (uto)	10:00	7,87	3,6	19,05	0,86	3333,2
7.	14.12.2016. (sri)	10:00	7,78	3,7	17,85	0,85	1705,6
8.	15.12.2016. (čet)	10:00	7,81	3,7	19,6	0,83	1399,3
9.	16.12.2016. (pet)	9:00	7,87	3,7	20,3	0,72	1338,3
10.	17.12.2016. (sub)	-	-	-	-	-	-
11.	18.12.2016. (ned)	-	-	-	-	-	-
12.	19.12.2016. (pon)	10:00	7,84	3,7	19,55	0,70	300,9
13.	20.12.2016. (uto)	10:00	7,81	3,6	19,75	0,68	218,17
14.	21.12.2016. (sri)	9:00	7,86	3,7	20,2	0,66	197,38
15.	22.12.2016. (čet)	10:00	7,90	3,7	17,05	0,64	105,6



Slika 26. Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 15 dana u reaktoru MIX

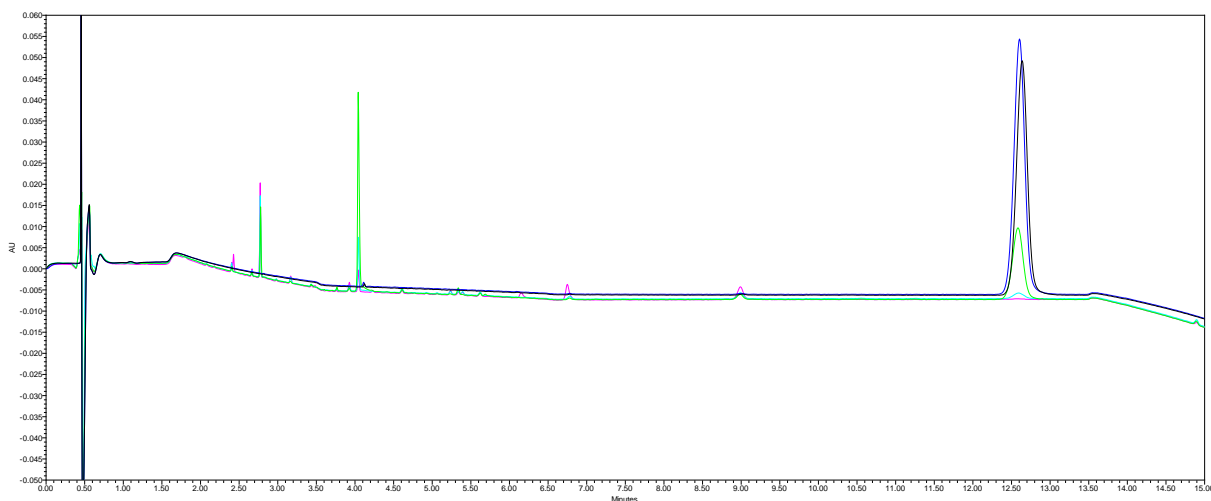
## 4.2. Kromatografska analiza uzoraka nakon biorazgradnje

Kako bi se dobio bolji uvid u proces biorazgradnje provela se kromatografska analiza i to na dva načina, tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti uz detektor s nizom dioda u svrhu kvantifikacije i praćenja glavne komponente te uz spektrometriju masa čime je omogućena potvrda i identifikacija razgradnih produkata.

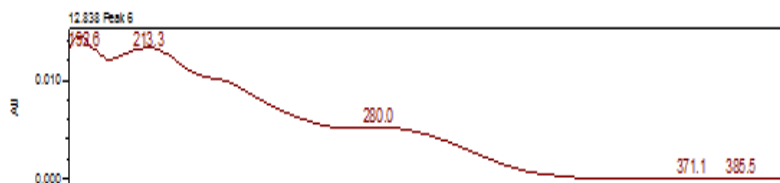
### 4.2.1. UHPLC-DAD metoda

Realni uzorci uzimani su svakih 24 sata kroz promatrano razdoblje biorazgradnje od 14 odnosno 15 dana te su snimani na UHPLC-DAD uređaju pod kromatografskim uvjetima kako je navedeno u eksperimentalnom dijelu **3.3.3.1.**

Detekcija i identifikacija febantela provedena je pomoću apsorpcijskog spektra čiji je maksimum pri 240 nm (**Slika 27**). Kvantifikacija je određena pomoću kromatografskih krivulja za glavnu komponentu koja je na kromatogramu definirana vremenom zadržavanja ( $t_R$ ) koje iznosi 12,8 minuta i određene površine ispod kromatografske krivulje izražene u mAU. Na kromatogramima snimljenima za uzorke tijekom 14 dana uočene su novonastale kromatografske krivulje (**Slika 28**). Kvantifikacija je provedena na isti način, a identifikacija je provedena usporedbom njihovih apsorpcijskih spektara sa apsorpcijskim spektrom glavne komponente farmaceutika u standardnim otopinama. Na temelju sličnosti apsorpcijskog spektra s velikom vjerojatnošću se moglo pretpostaviti da se radi o mogućim novonastalim razgradnim produktima farmaceutika.

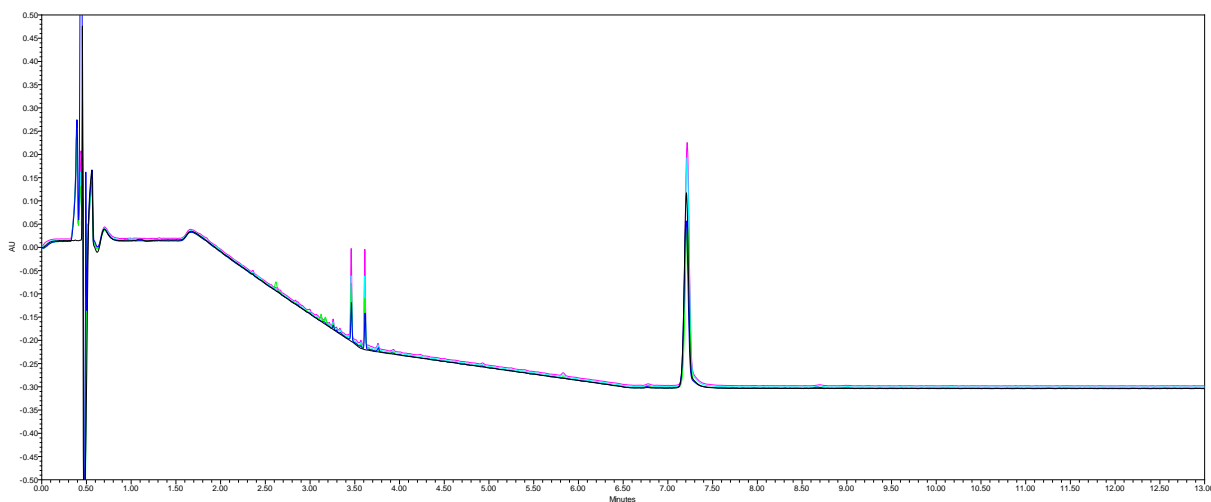


**Slika 27.** Kromatogram uzoraka: standard febantela te uzorci iz reaktora **FEB** za dane 0, 7, 14 redosljedom: crvena, crna, plava zelena kromatografska krivulja

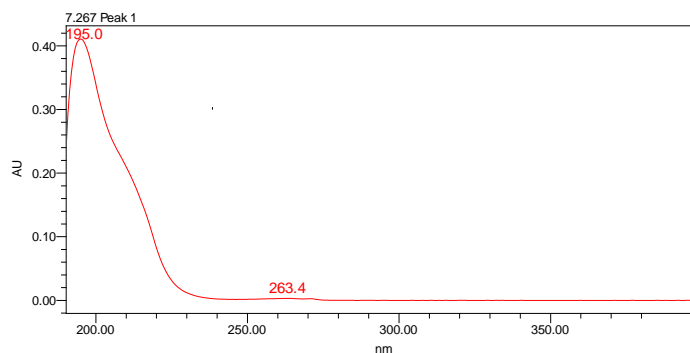


**Slika 28.** Apsorpcijski spektar febantela na 240 nm u standardnoj otopini (10 mg/L)

Detekcija i identifikacija prazikvantela provedena je pomoću apsorpcijskog spektra čiji je maksimum pri 195 nm (**Slika 30**). Kvantifikacija je određena pomoću kromatografskih krivulja za glavnu komponentu koja je na kromatogramu definirana vremenom zadržavanja ( $t_R$ ) koje iznosi 7,3 minuta i određene površine ispod kromatografske krivulje izražene u mAU. Za kromatografske krivulje koje se pojavljuju kod nekih uzoraka tijekom 14 dana pretpostavljeno je da pripadaju novonastalim nepoznatim spojevima. Za svaki uzorak tijekom procesa biorazgradnje nepoznate krivulje prikazane su na odgovarajućem kromatogramu te okarakterizirane vremenom zadržavanja i apsorpcijskim spektrom (**Slika 29**.)

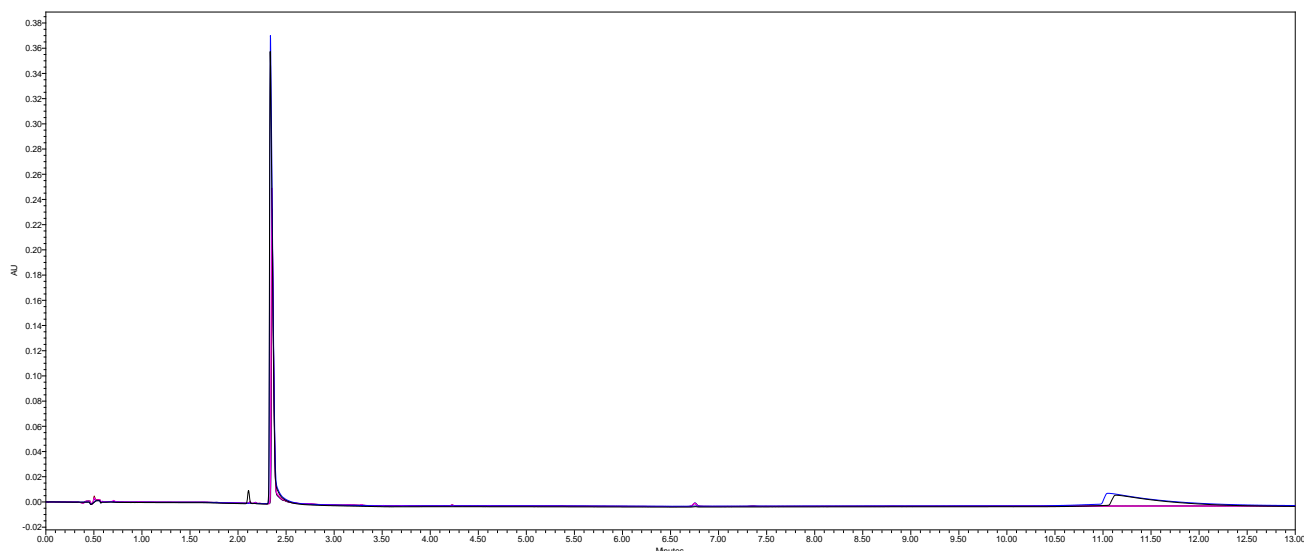


**Slika 29.** Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora **PRAZ** za dane 0, 9, 12, 14 redosljedom: ružičasta, crna, plava zelena kromatografska krivulja

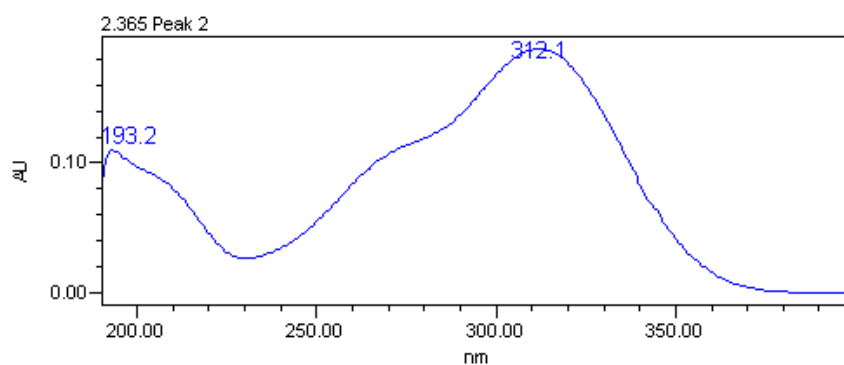


**Slika 30.** Apsorpcijski spektar prazikvantela na 195 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

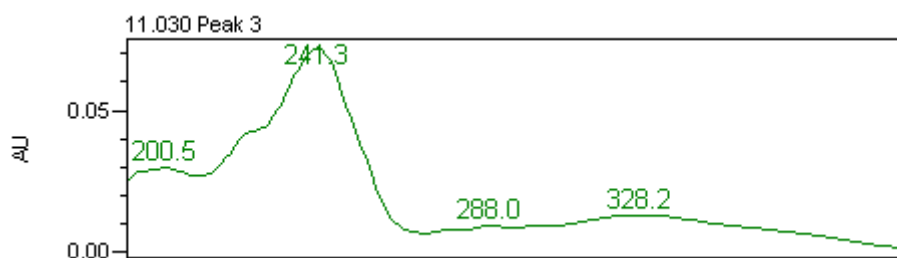
Detekcija i identifikacija pirantel pamoata provedena je pomoću apsorpcijskog spektra za pirantel čiji je maksimum pri 240 nm (**Slika 32**) te za pamoat pri 310 nm (**Slika 33**). S obzirom da je pirantel aktivna komponenta pratio se nastanak njegovih razgradnih produkata. Pamoat je praćen prvenstveno kako bi se eliminirao iz sustava prilikom analize kromatografskih krivulja, odnosno kako njega i njegova onečišćenja ne bismo uzeli u obzir kao potencijalni razgradni produkt ili onečišćenje u uzorcima gdje se provodila biorazgradnja pirantela odnosno smjese farmaceutika. Kvantifikacija je određena pomoću kromatografskih krivulja za glavnu komponentu koja je na kromatogramu definirana vremenom zadržavanja ( $t_R$ ) koje za pirantel iznosi 2,4 min, a za pamoat iznosi 11,0 minuta i određene površine ispod kromatografske krivulje izražene u mAUs. Za kromatografske krivulje koje se pojavljuju kod nekih uzoraka tijekom 14 dana pretpostavljeno je da pripadaju novonastalim nepoznatim spojevima, a za svaki realni uzorak prikazani su odgovarajućim kromatogramom odnosno kromatografskom krivuljom te okarakterizirani vremenom zadržavanja i apsorpcijskim spektrom (**Slika 31**).



**Slika 31.** Kromatogram uzoraka: standard pirantelate uzorci iz reaktora **PYR PAM** za dane 0, 6, 12, 14 redosljedom: ružičasta, crna, plava zelena kromatografska krivulja



**Slika 32.** ApSORPCIJSKI SPEKTAR pirantela na 310 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

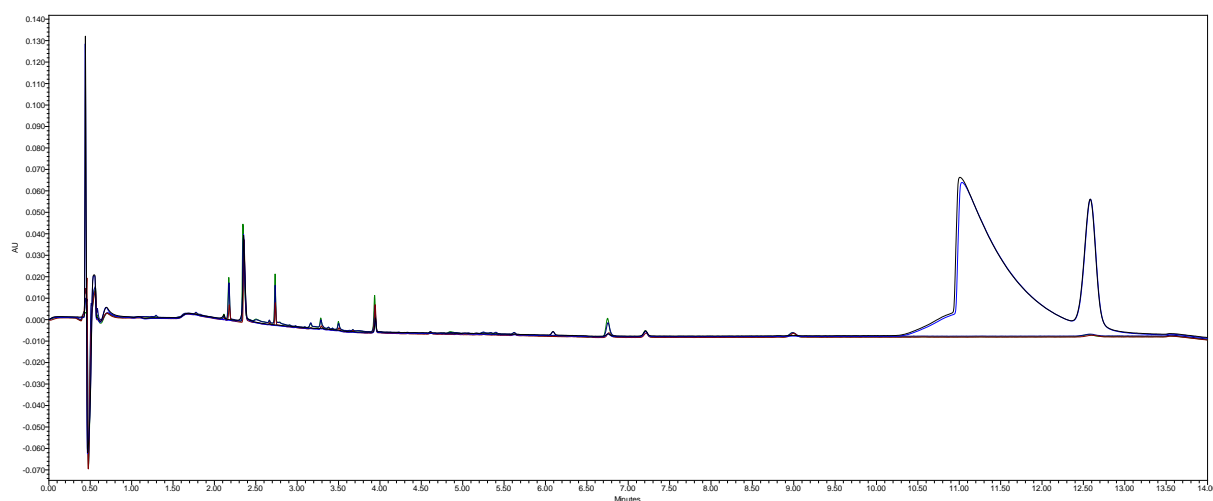


**Slika 33.** ApSORPCIJSKI SPEKTAR pamoata na 240 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

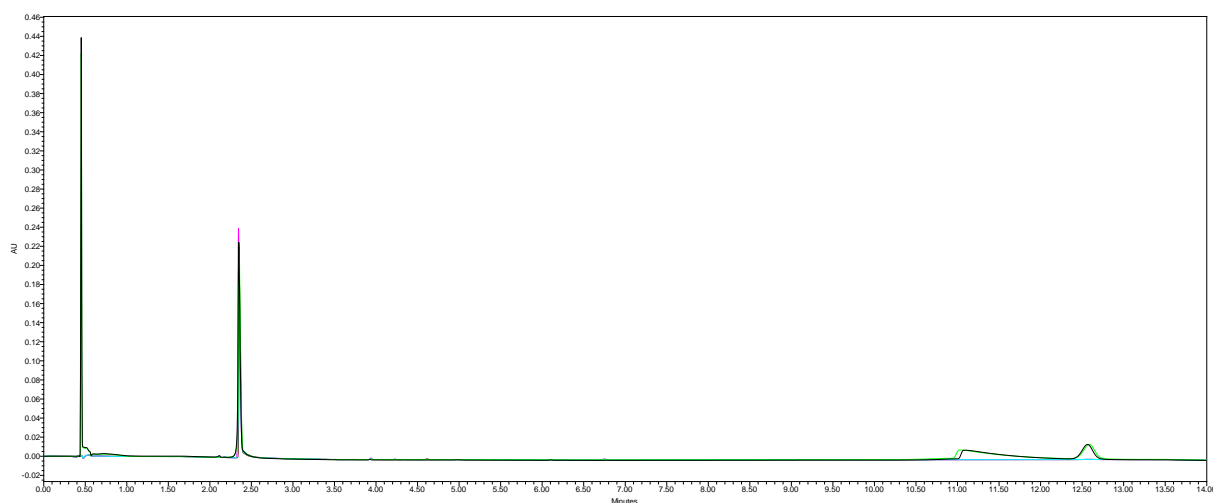
Uzorci iz reaktora **MIX** snimljeni su na tri valne duljine kako bi se identificirala glavna komponenta, ali i potencijalni razgradni produkti za pojedini farmaceutik, odnosno smjesu.

Detekcija i identifikacija provedena je pomoću apsorpcijskih spektara za glavne komponente (Slika 28., 30., 32., 33.).

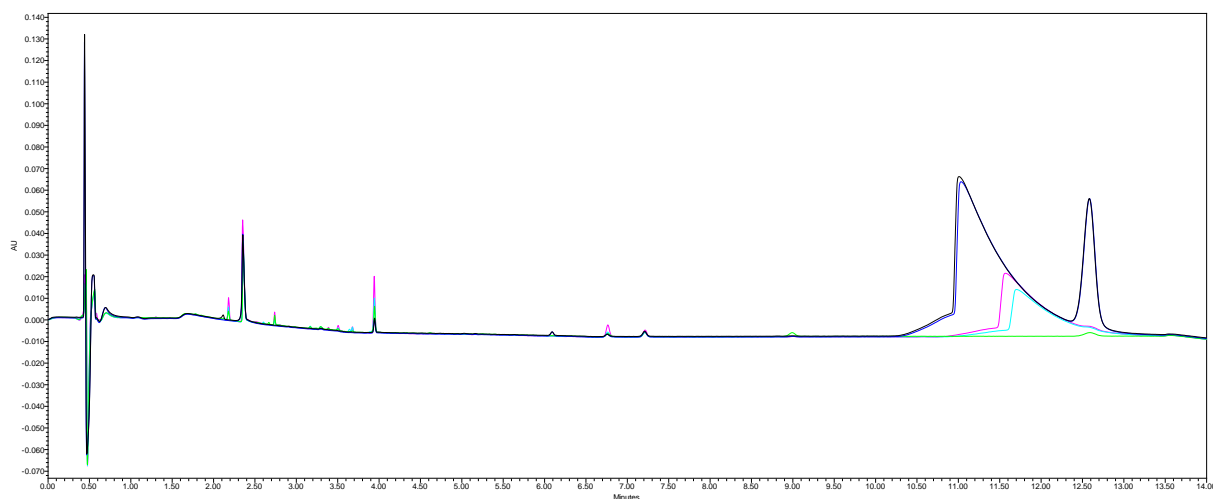
Sve prethodno navedeno za glavne komponente vrijedi i kod ovih uzoraka ( $t_R$ , A). Za kromatografske krivulje koje se pojavljuju kod nekih uzoraka tijekom 15 dana pretpostavlja se da pripadaju novonastalim nepoznatim spojevima, a za svaki realni uzorak prikazani su odgovarajućim kromatogramom odnosno kromatografskom krivuljom te okarakterizirani vremenom zadržavanja i apsorpcijskim spektrom (Slika 34., 35., 36.).



Slika 34. Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora MIX za dane 1, 8, 15 redosljedom: ružičasta, crna, plava zelena kromatografska krivulja (snimljen na 195 nm)

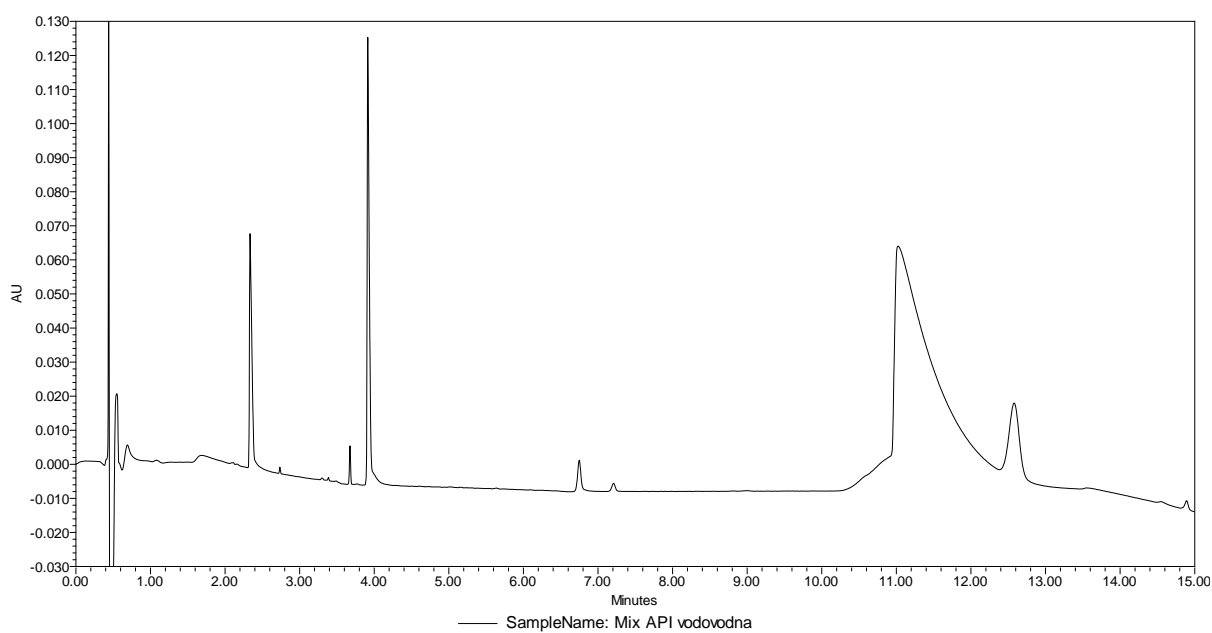


Slika 35. Kromatogram uzoraka: standard pirantelate uzorci iz reaktora MIX za dane 1, 8, 15 redosljedom: crvena, crna, plava zelena kromatografska krivulja (snimljen na 310 nm)

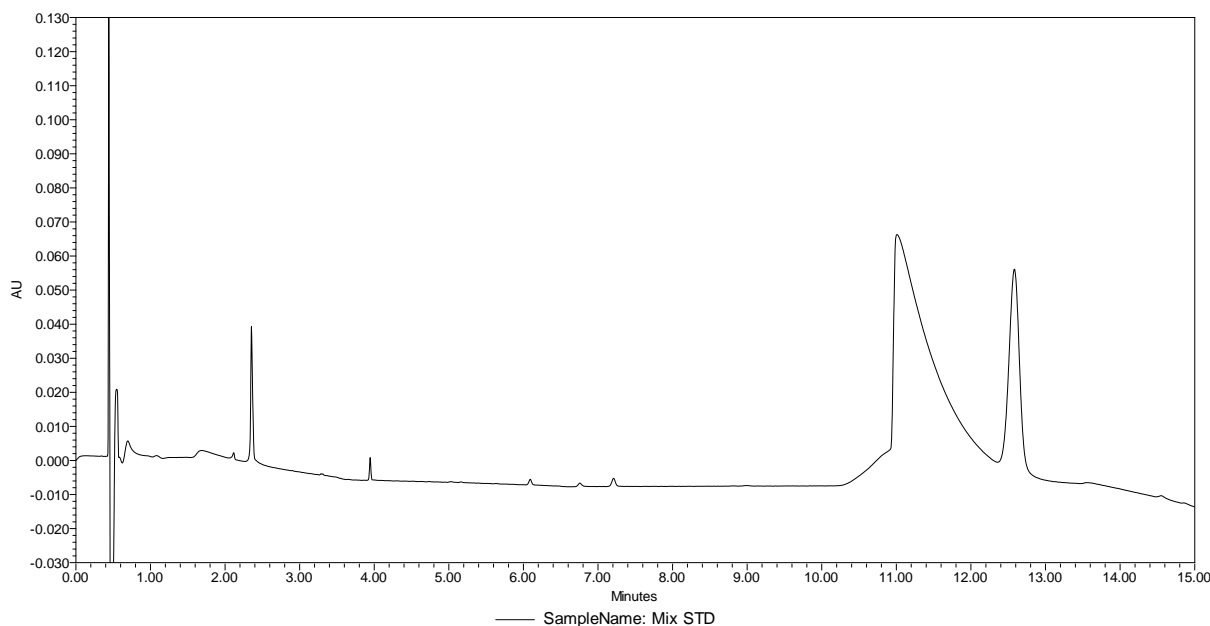


**Slika 36.** Kromatogram uzoraka: standard febantelate uzorci iz reaktora **MIX** za dane 1, 8, 15 redosljedom: crna, plava, ružičasta zelena kromatografska krivulja (snimljen na 240 nm)

Snimljen je i kromatogram standardne otopine smjese farmaceutika pripremljen u vodovodnoj vodi prema kojem se jasno vidi utjecaj hidrolize na raspad farmaceutika te nastanak novih kromatografskih krivulja pripisanih potencijalnim razgradnim produktima (**Slika 37.** i **38.**).



**Slika 37.** Kromatogram standardne otopine smjese farmaceutika pripremljene u vodovodnoj vodi



**Slika 38.** Kromatogram standardne otopine smjese farmaceutika (MiliQ voda)

Uspoređujući kromatogram realnog uzorka antihelmintika nakon 14 odnosno 15 dana izlaganja biorazgradnji pod utjecajem aktivnog mulja s kromatogramom prije biorazgradnje uočeno je smanjenje površina ispod kromatografskih krivulja glavnih komponenata i pojavljivanje kromatografskih krivulja kojih nije bilo na kromatogramu uzoraka na samom početku eksperimenta biorazgradnje. To su kromatografske krivulje razgradnih produkata definirane vremenom zadržavanja  $t_R$  te površinom ispod krivulje. Osim toga DAD detektor omogućuje uvid u apsorpcijske spektre pripadajućih krivulja pa je to bio prvi korak u odgonetavanju radi li se o novonastalim razgradnim produktima, postojećim onečišćenjima ili tek nečistoćama opreme i šumovima bazne linije.

#### 4.2.2. UHPLC-MS/MS metoda

Kromatogrami snimljeni za uzorke tijekom procesa biorazgradnje pokazuju kromatografske krivulje za glavnu komponentu, ali se pojavljuju i dodatne kromatografske krivulje. Kao dodatna kvalitativna potvrda odnosno identifikacija tih krivulja jest odgovarajući apsorpcijski spektar za određenu komponentu. No to nije dovoljno pouzdano, budući da višekomponentni sustav te složena matica utječu na pomak maksimuma odnosno promjenu izgleda apsorpcijske vrpce odnosno krivulje u spektru. Zato je pri odgonetavanju stvarnih struktura ostalih

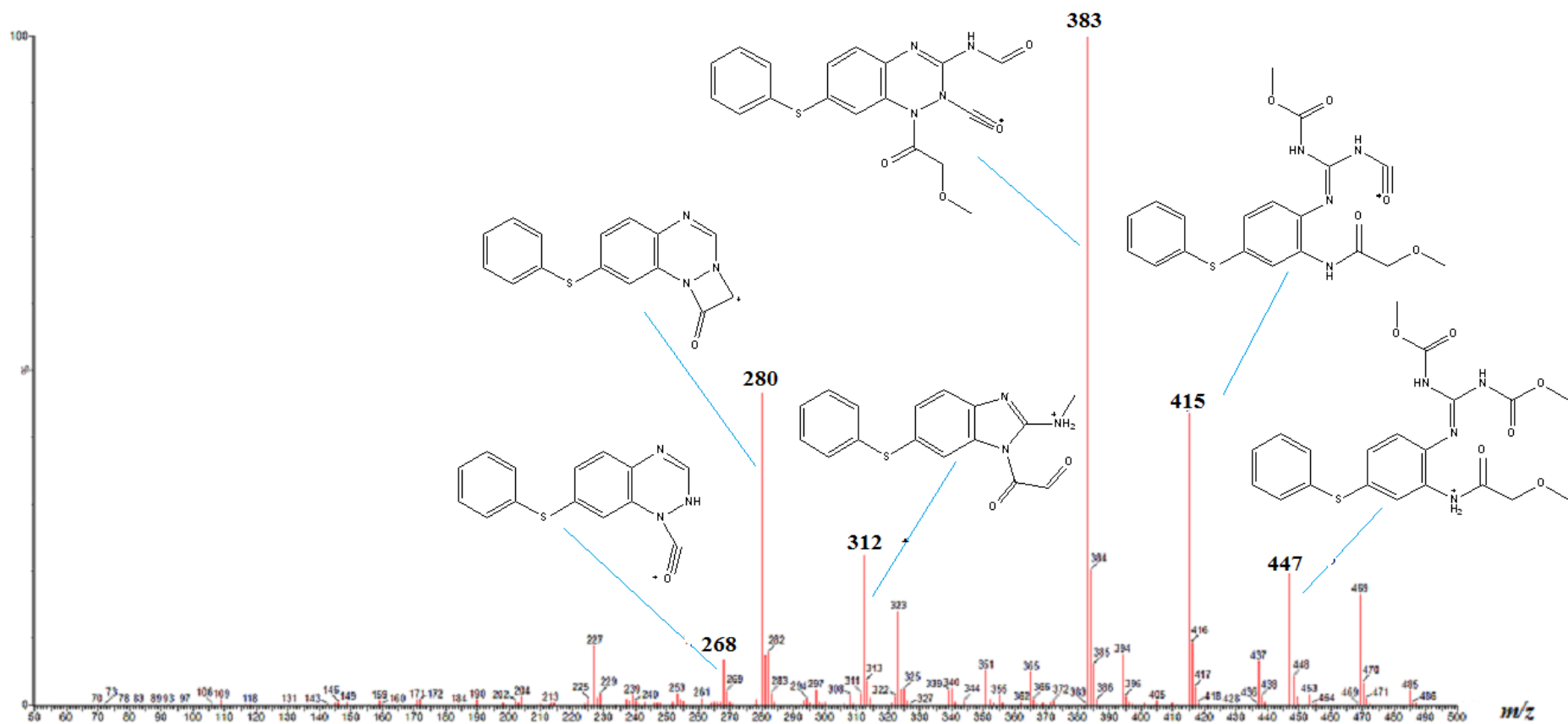


komponentata najviše koristila upotreba spektrometrije masa (MS) i podataka koji se dobivaju takvom analizom.

Standardne otopine (standard i API) febantela, prazikvantela, pirantel pamoata i njihove smjese masene koncentracije 10 mg/L injektirani su po 1  $\mu$ L. Ostali uzorci su injektirani po 10  $\mu$ L. Uzorci tijekom procesa biorazgradnje uzimani su redovito svakih 24 sata kroz promatrani period biorazgradnje od 14 odnosno 15 dana te su snimani na UPLC-MS uređaju pod kromatografskim uvjetima kako je navedeno u eksperimentalnom dijelu u poglavlju **3.3.3.2**. Dobiveni su kromatogrami na kojima su prisutne kromatografske krivulje glavnih i nepoznate kromatografske krivulje koje odgovaraju ili novonastalim razgradnim produktima (RP) ili onečišćenjima (**eng.** *Impurities*, Imp), a identifikacija njihove molekulske strukture provodi se pomoću MS-a.

Prema stupnju nezasićenosti, izračunatim i eksperimentalnim  $m/z$  vrijednostima te greškom izračunatom iz tih vrijednosti ponuđene su molekulske formule dobivenih razgradnih produkata i njihovih fragmenata.

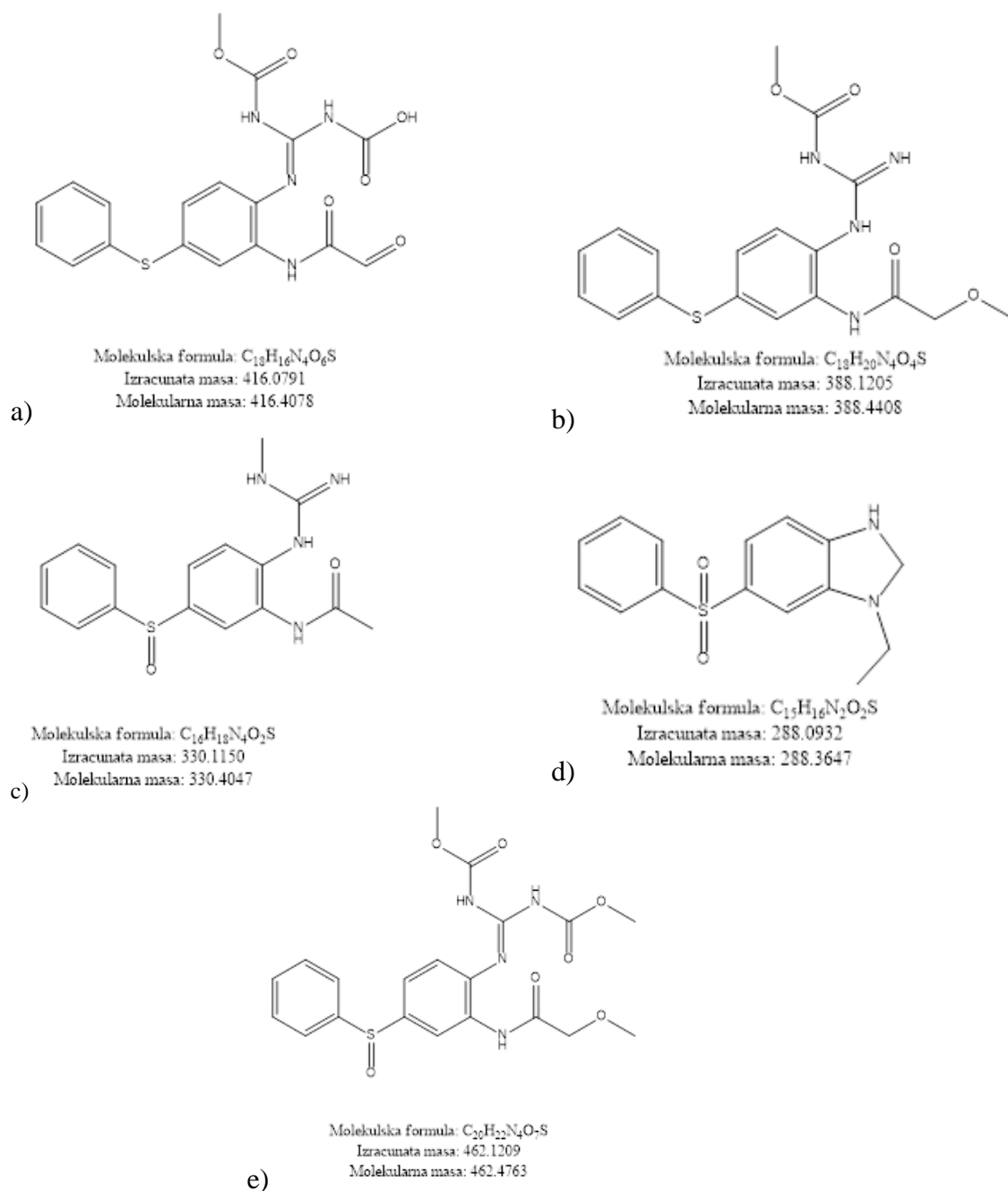
Molekulski ion febantela,  $m/z$  447, fragmentira u 5 glavnih fragmenata  $m/z$  vrijednostima: 415; 383; 312; 280 i 268 (**Slika 39**).



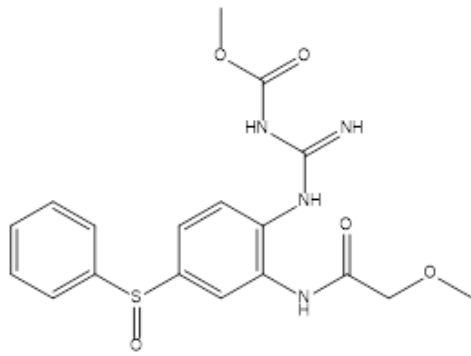
Slika 39. Spektar masa produktog iona febantela  $m/z$  477 i njegovih fragmenata

Fragmentiranjem matične molekule, a potom i razgradnih produkata pretpostavljene su njihove strukture.

MS analizom ustanovljena je prisutnost 12 mogućih novonastalih produkata odnosno onečišćenja. Pritom onečišćenja nastaju u nekim uzorcima i dalje se tijekom procesa kvantitativno ne mijenjaju (Slika 40.). Razgradni produkti i njihovi podaci su navedeni na Slici 41.

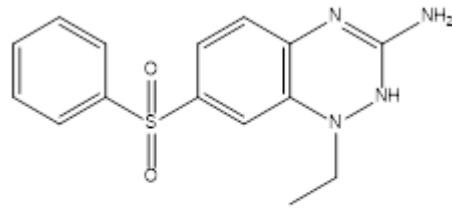


Slika 40. Strukture onečišćenja febantela: a) FEB Imp 1 b) FEB Imp 2 c) FEB Imp 3 d) FEB Imp 4 e) FEB Imp



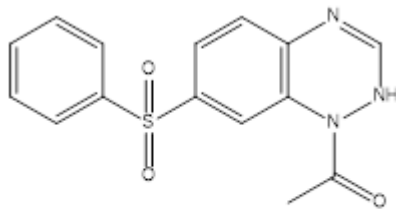
Molekulska formula:  $C_{12}H_{20}N_4O_5S$   
 Izračunata masa: 404.1154  
 Molekularna masa: 404.4402

a)



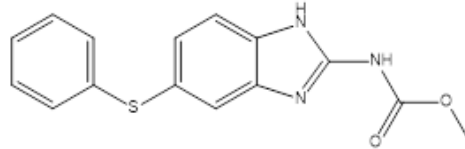
Molekulska formula:  $C_{15}H_{16}N_4O_2S$   
 Izračunata masa: 316.0994  
 Molekularna masa: 316.3781

b)



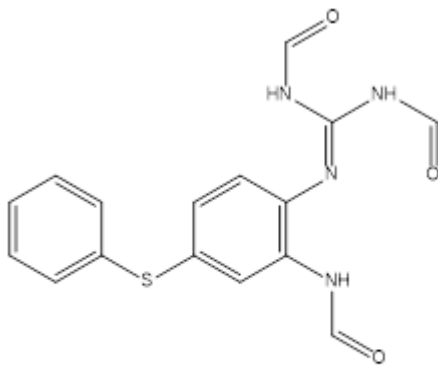
Molekulska formula:  $C_{13}H_{13}N_3O_3S$   
 Izračunata masa: 315.0678  
 Molekularna masa: 315.3470

c)



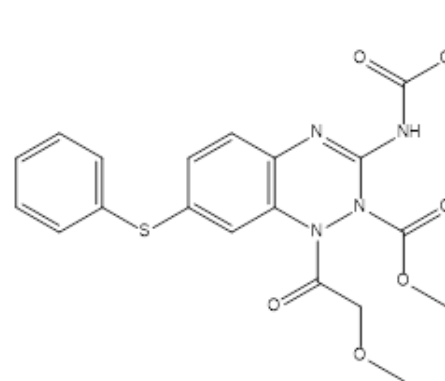
Molekulska formula:  $C_{15}H_{13}N_3O_3S$   
 Izračunata masa: 299.0728  
 Molekularna masa: 299.3476

d)



Molekulska formula:  $C_{16}H_{14}N_4O_3S$   
 Izračunata masa: 342.0787  
 Molekularna masa: 342.3724

e)

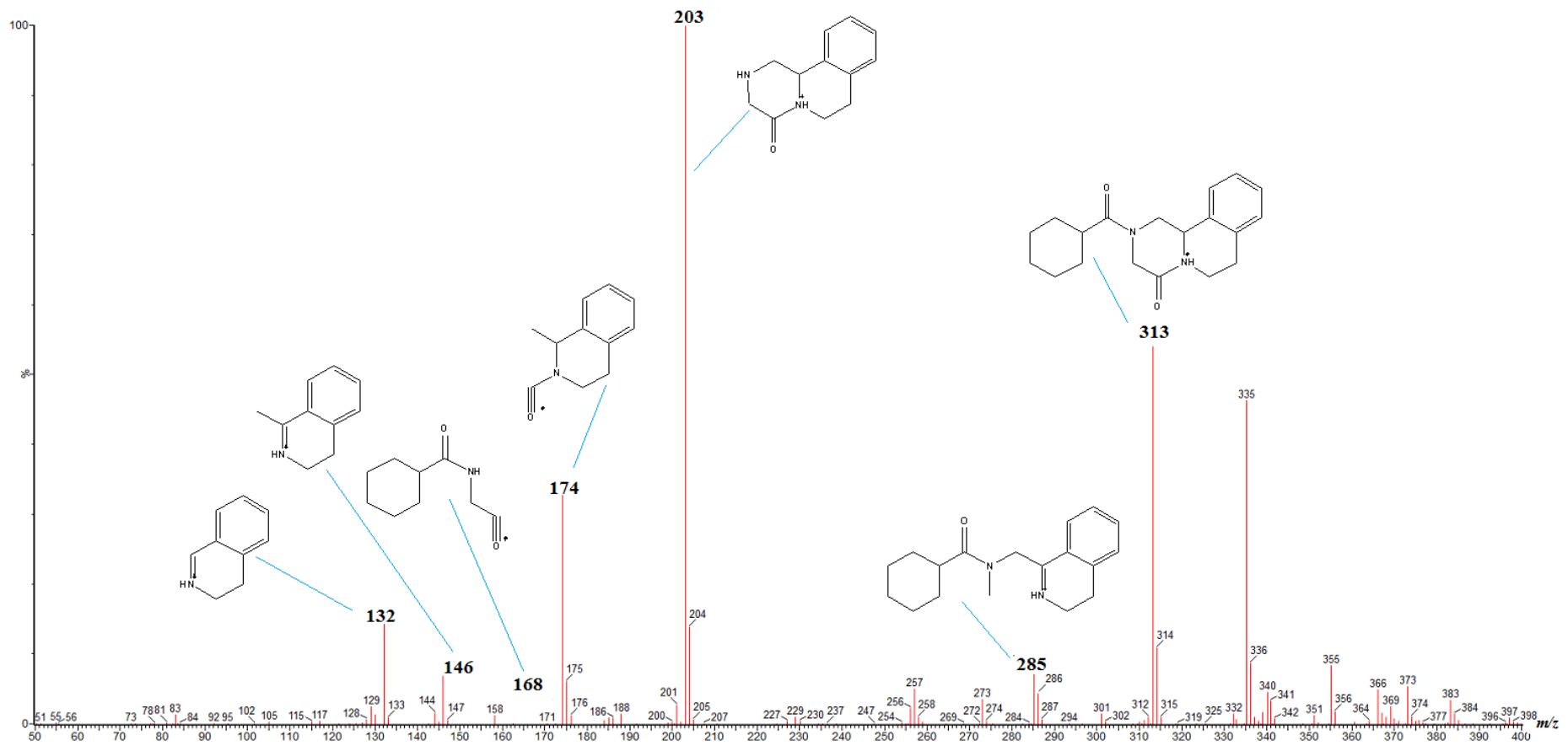


Molekulska formula:  $C_{20}H_{20}N_4O_6S$   
 Izračunata masa: 444.1104  
 Molekularna masa: 444.4610

f)

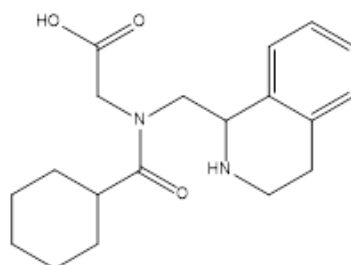
**Slika 41.** Strukture razgradnih produkata febantela: a) RP FEB1 b) RP FEB2 c) RP FEB3 d) RP FEB4 e) RP FEB5 f) RP FEB6

Molekulski ion prazikvantela,  $m/z$  313, fragmentira na 6 glavnih fragmenata  $m/z$  vrijednostima: 285; 203; 174; 168; 146 i 132. (Slika 42).



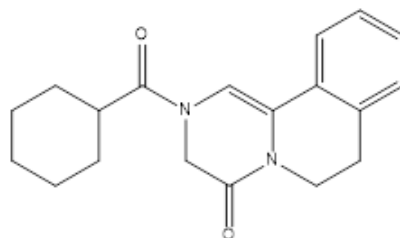
Slika 42. Spektar masa produktnog iona prazikvantela  $m/z$  313 i njegovih fragmenata

Fragmentiranjem matične molekule, a potom i razgradnih produkata pretpostavljene su njihove strukture. MS analizom ustanovljena je prisutnost 4 moguća novonastala produkta odnosno onečišćenja (Slika 43., 44.). Definirana je struktura jednog razgradnog produkta PRAZ RP 1 (Slika 45.).



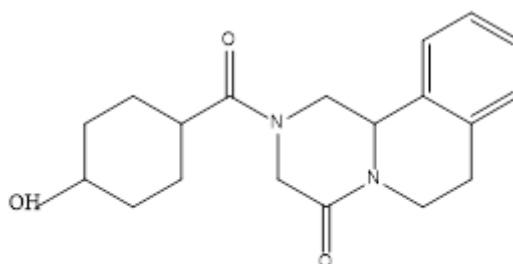
Molekulska formula:  $C_{19}H_{26}N_2O_3$   
Izračunata masa: 330.1943

Slika 43. PRAZ Imp 1



Molekulska formula:  $C_{19}H_{22}N_2O_2$   
Izračunata masa: 310.1681

Slika 44. PRAZ Imp 2

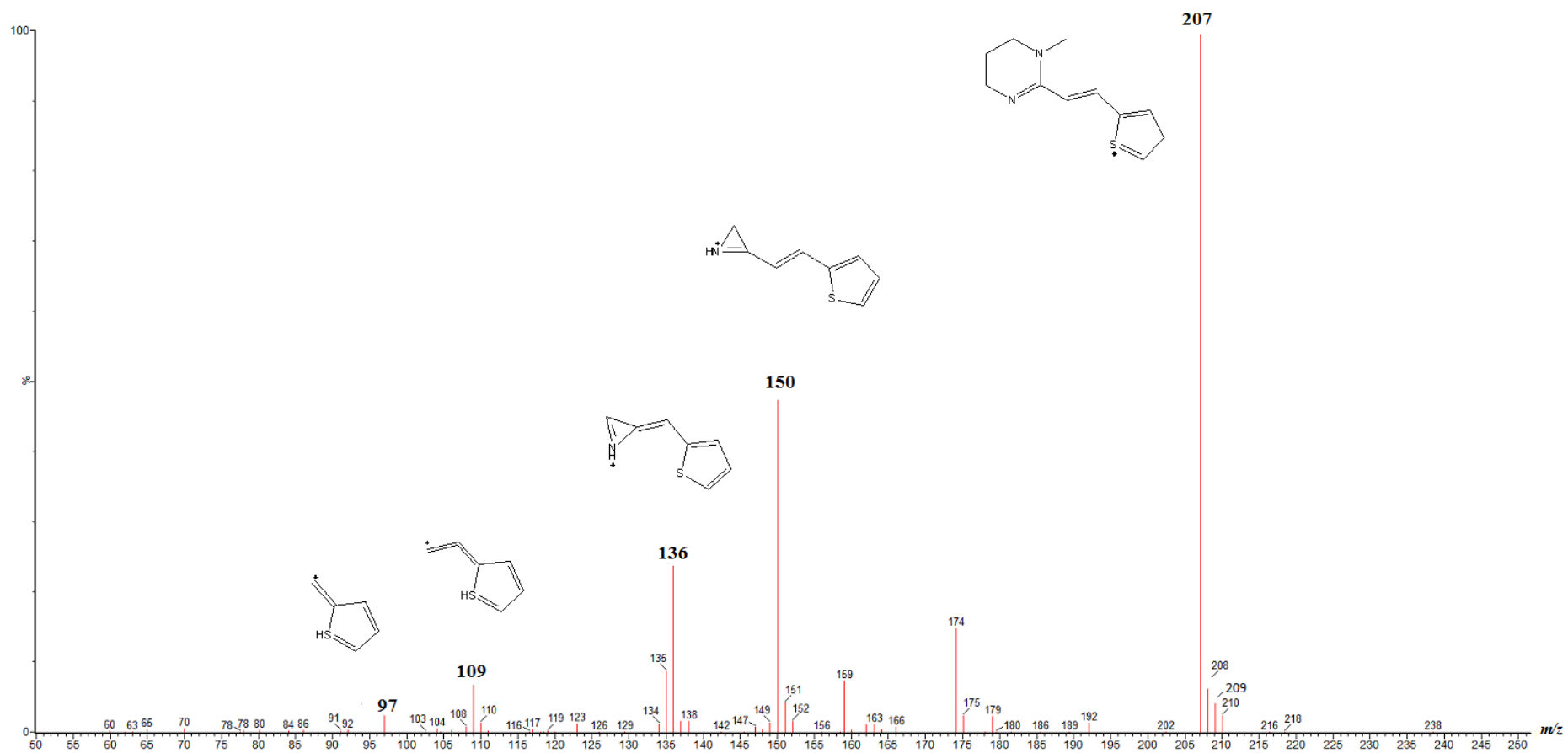


Chemical Formula:  $C_{20}H_{26}N_2O_2$   
Exact Mass: 326,20

Slika 45. PRAZ RP 1

S obzirom da je pirantel aktivna komponenta (API) samo smo njega uzeli u obzir prilikom odgonetavanja struktura onečišćenja i potencijalnih razgradnih produkata tijekom MS analiza.

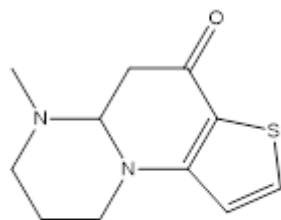
Molekulski ion pirantela,  $m/z$  207 fragmentira na 4 glavna fragmenta s  $m/z$  vrijednostima: 150; 136; 109; 97 (Slika 46.).



Slika 46. Spektar masa produktnog iona pirantela  $m/z$  207i njegovih fragmenata

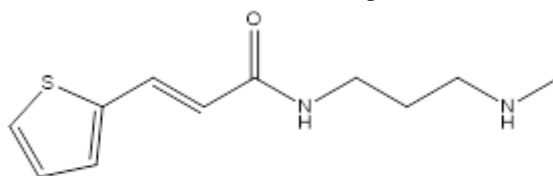
Fragmentiranjem matične molekule, a potom i razgradnih produkata pretpostavljene su njihove strukture.

MS analizom ustanovljena je prisutnost 3 moguća novonastalih produkata odnosno onečišćenja (**Slika 47.**, **48.**, **49.**). Posebno je zanimljivo što se vidi da u uzorcima u kojima je snimljen standard, odnosno API koji je pripremljen u svijetloj odmjernej tikvici nastaje fotoizomer pirantela, koji se ne pojavljuje u uzorcima koji su pripremljeni u tamnoj tikvici.



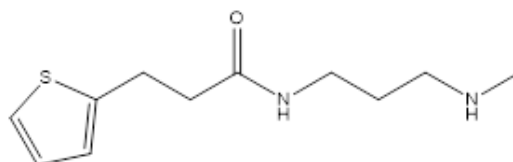
Molekulska formula:  
 $C_{11}H_{14}N_2OS$   
Izračunata masa: 222.0827

**Slika 47.** PYR Imp 1



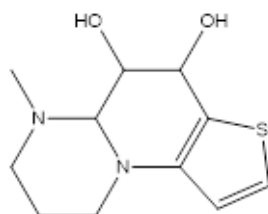
Molekulska formula:  $C_{11}H_{16}N_2OS$   
Izračunata masa: 224.0983

**Slika 48.** PYR Imp 2



Molekulska formula:  $C_{11}H_{18}N_2OS$   
Izračunata masa: 226.1140

**Slika 49.** PYR Imp 3



Molekulska formula:  $C_{11}H_{16}N_2O_2S$   
Izračunata masa: 240.0932

**Slika 50.** PYR Imp 4



U **Tablicama 12., 13. i 14. i 15.** navedeni su podaci dobiveni MS analizom standarda febantela, prazikvantela, pirantel pamoata i njihove smjese. Prilikom analize na MS-u lopatica unutar ionizatora se u određenom trenutku okreće i 10 sekundi spriječava ulazak uzorka u sustav. U tom vremenu u sustav ulazi leucin-enkefalin kao masa za umjeravanje instrumenta, tvar s točno poznatom masom u četiri decimale. Uređaj daje izmjerene mase ispitivanih analita automatski korigirane s obzirom na tu masu. Na temelju podataka o broju određenih atoma (C, N, O, S...) koji se mogu nalaziti u molekuli (polazimo od poznate molekule) software nudi točno izračunatu masu molekulskih struktura najslučajnijim eksperimentalno dobivenoj masi. Razlika između eksperimentalno dobivene i izračunate mase prikazuje se greškama izraženima u ppm te mDa. Poželjno je da su greške do 5 ppm odnosno 5 mDa. U ovom slučaju gdje su greške vrlo male, može se s velikom sigurnošću tvrditi da se radi upravo o tim molekulskim strukturama.

Za razgradne produkte navedeni su i podaci za relativno vrijeme zadržavanja (**eng. Relative Retention Time, RRT**) određeni u odnosu na vrijeme zadržavanja glavnih komponenata  $t_R$  (**eng. Retention time, RT**). Stupanj nezasićenosti (**eng. double bond equivalent, DBE**) daje nam naznaku o samoj strukturi i pomaže prilikom definiranja moguće strukture za pojedinu komponentu.

**Tablica 12.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za glavne komponente

Analit	$t_R$ (min)	Molekularna masa, $m/z$	Izračunata masa, $m/z$	mDa	Greška (ppm)	DBE	Molekulska formula
Pirantel	2,43	207,0954	207,0956	-0,2	-1	5,5	$C_{11}H_{15}N_2S$
Prazikvantel	7,4	313,1926	313,1916	1	3,2	8,5	$C_{19}H_{25}N_2O_2$
Febantel	13,27	447,1354	447,1338	1,6	3,6	11,5	$C_{20}H_{23}N_4O_6S$

**Tablica 13.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za onečišćenja i razgradne produkte febantela

RRT	$t_R$ (min)	Molekularna masa, $m/z$	Izračunata masa, $m/z$	mDa	Greška (ppm)	DBE	Molekulska formula
0,21	2,78	405,1233	405,1233	0,0	0,0	10,5	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S
0,26	3,46	317,1075	317,1072	0,3	0,9	9,5	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
0,26	3,49	316,0760	316,0756	0,4	1,3	10,5	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>3</sub> S
0,28	3,74	331,1235	331,1229	0,6	1,8	9,5	C <sub>16</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
0,30	4,00	389,1302	389,1284	1,8	4,6	10,5	C <sub>18</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S
0,36	4,74	417,0874	417,0869	0,5	1,2	12,5	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S
0,41	5,48	463,1292	463,1287	0,5	1,1	11,5	C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S
0,44	5,78	300,0808	300,0807	0,1	0,3	10,5	C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S
0,47	6,30	289,1010	289,1011	-0,1	-0,3	8,5	C <sub>15</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S
0,84	11,21	401,0910	401,0920	-1,0	-2,5	12,5	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S
0,90	12,00	343,0867	343,0865	0,2	0,6	11,5	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> S
1,14	15,11	445,1182	445,1182	0,0	0,0	12,5	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S

**Tablica 14.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za onečišćenja i razgradne produkte prazikvantela

RRT	$t_R$ (min)	Molekularna masa, $m/z$	Izračunata masa, $m/z$	mDa	Greška (ppm)	DBE	Molekulska formula
0,48	3,54	329,1869	329,1865	0,4	1,2	8,5	C <sub>19</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
0,49	3,61	331,2029	331,2022	0,7	2,1	7,5	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>
0,81	5,96	311,1751	311,1760	-0,9	-2,9	9,5	C <sub>19</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

**Tablica 15.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za onečišćenja i razgradne produkte pirantela

RRT	$t_R$ (min)	Molekularna masa, $m/z$	Izračunata masa, $m/z$	mDa	Greška (ppm)	DBE	Molekulska formula
0,42	1,03	241,1181	241,1188	-0,7	-2,9	4,5	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>
0,56	1,37	225,1063	225,1062	0,1	0,4	4,5	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OS
0,85	2,07	223,0896	223,0905	-0,9	-4,0	5,5	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> OS
0,90	2,19	207,0954	207,0956	-0,2	-1,0	5,5	C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> S
0,93	2,27	225,1053	225,1062	-0,9	-4,0	4,5	C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> OS
2,12	5,16	227,1222	227,1218	0,4	1,8	3,5	C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>2</sub> OS

Iako su provedene analize na uzorcima iz reaktora u kojima je procesu biorazgradnje podvrgnuta i smjesa farmaceutika (SP MIX i MIX) analize nisu pokazale nove razgradne produkte, tj. produkte koji se u dosadašnjim analizama nisu javili pa nije provedena identifikacija pripadajućih struktura.

### 4.3. Određivanje toksičnosti bakterijama *Vibrio fischeri*

S obzirom na učestalu uporabu na globalnoj razini, antihelmintici u okoliš dospijevaju na različite načine. Upravo zato je ključan monitoring koji uključuje određivanje njihove ekotoksičnosti. U ovom radu je ispitivana toksičnost čistih aktivnih supstanci (API) farmaceutika febantela, prazikvantela, pirantel pamoata te smjese navedenih farmaceutika. Ispitivanja čistih aktivnih supstanci provode se kako bi se lakše moglo pratiti kretanje njihovih metabolita i razgradnih produkata nakon što dopiju u otpadne vode, odnosno kako bi se moglo odrediti da li se njihova toksičnost povećala ili nije s obzirom na glavnu komponentnu. U radu je korištena metoda za određivanje akutne toksičnosti farmaceutika pomoću bakterijske kulture *Vibrio fischeri*.

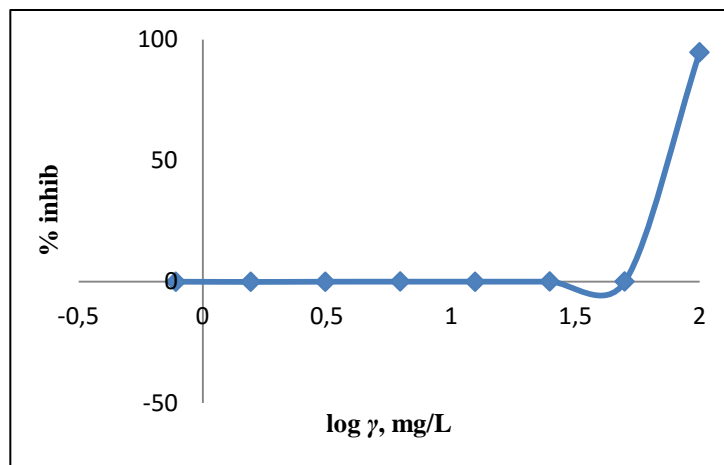
U nekoliko radova navedeni su podaci za ekotoksičnost nekih farmaceutika koji su najčešće u uporabi, kao što su antibiotici. [67] Važno je naglasiti da literaturno nije potvrđeno da postoje informacije o toksičnosti navedena tri farmaceutika. Upravo zato je provedba ekotoksikoloških istraživanja ključna.

U radu je najprije izmjerena luminiscencija bakterijskih suspenzija bez čistih aktivnih supstanci farmaceutika, a potom su se sljedeći pravilo geometrijskog niza dodavale otopine farmaceutika različitih koncentracija, počevši od najmanje do najveće. Najmanja koncentracija otopine farmaceutika je bila razrijeđena 128 puta (0,78 mg/L), a najveću koncentraciju je imala originalna otopina farmaceutika, odnosno radna otopina pripremljena u vodenom mediju.

Nakon 30 min očitavani su rezultati testa provedenog na uređaju LUMISTox 300 i na temelju rezultata crtani su grafovi toksičnosti za otopine pojedinačnih farmaceutika.

Prije početka ispitivanja toksičnosti otopina farmaceutika, bilo je provedeno mjerenje toksičnosti samog otapala metanola i to iste količine koja je prisutna i kod pripreme standardnih otopina (**Slika 51.**). [68, 69]

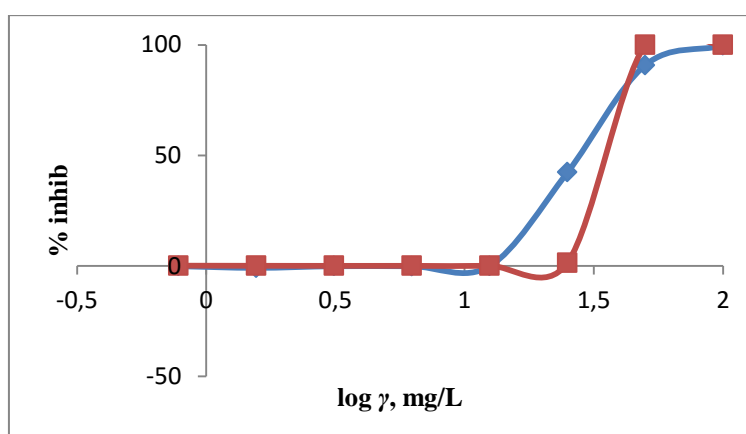
To se provelo u cilju isključivanja potencijalnog utjecaja otapala na proces provedbe toksičnosti testa izlažući bakterijsku suspenziju različitim koncentracijama otapala.



Slika 51. Graf toksičnosti metanola

Sva ispitivanja na pojedinim farmaceuticima provedena su najmanje dva puta radi provjere ponovljivosti. Uz grafove, tablično su navedene i vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za svako mjerenje koje predstavljaju koncentracije uzorka u testu koje uzorkuju 20 %, to jest 50 % inhibicije prisutnih bakterija *Vibrio fischeri*. Također, izračunata je i relativna standardna devijacija (RSD) u postocima koja ukazuje na odstupanja u mjerenjima.

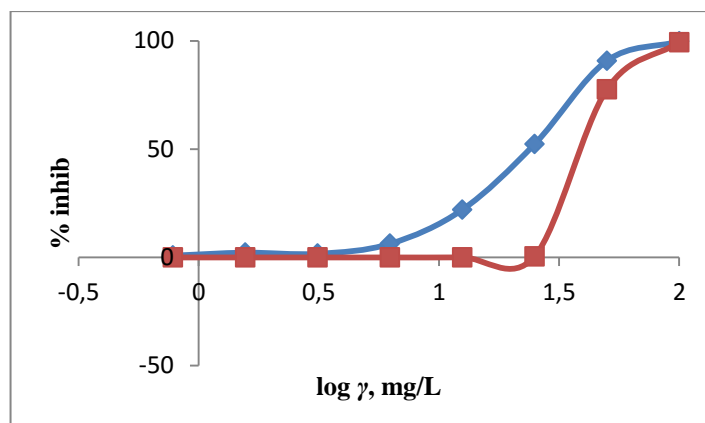
Slika 52 prikazuje graf toksičnosti otopine febantela gdje je na krivulji toksičnosti vidljivo kako veća razrjeđenja također ne utječu na inhibiciju testiranih organizama, dok veće koncentracije farmaceutika uzrokuju inhibiciju bakterijske suspenzije tako da otopina farmaceutika masene koncentracije 100 mg/L uzrokuje inhibiciju bakterijske suspenzije gotovo 100 %.



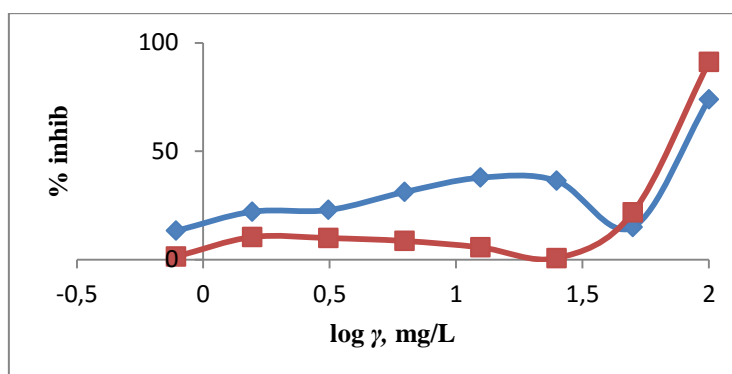
Slika 52. Graf usporedbe toksičnosti otopine febantela

Kod otopine prazikvantela krivulja toksičnosti (Slika 53.) prikazuje blaži porast s obzirom na krivulju toksičnosti otopine, ali opet je vidljivo da i jako velika razrjeđenja uzrokuju malu

inhibiciju testiranih organizama. Pri masenoj koncentraciji 31,73 mg/L prisutna je inhibicija luminiscencije od 50 %, odnosno pri 20,37 mg/L inhibicija 20 % luminiscencije.



Slika 53. Graf usporedbe toksičnosti otopine prazikvantela



Slika 54. Graf usporedbe toksičnosti otopine pirantel pamoata

Pirantel pamoat pokazuje najmanji utjecaj na inhibiciju bakterijske kulture budući da tek pri masenoj koncentraciji od 75,11 mg/L uzrokuje inhibiciju 50 % kulture ( $EC_{50}$ ). Isto tako  $EC_{20}$  iznosi 44,96 mg/L.

Jedna od prednosti primjene upravo ove metode određivanja toksičnosti jest osjetljivost metode. Zato je izračunato i relativno standardno odstupanje (RSD) koje ukazuje na ponovljivost metode određivanja toksičnosti.

Jasno je vidljivo da kako se ide prema većim koncentracijama da su i odstupanja između krivulja pojedinog mjerenja sve manja.

U **Tablici 16** navedene su srednje vrijednosti  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za sve otopine ispitivanih farmaceutika.  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  očitavani su iz krivulja toksičnosti za svako provedeno mjerenje. Ukupno se za svaki farmaceutik provelo dva mjerenja, drugo mjerenje se provodilo radi utvrđivanja ponovljivosti rezultata.

Velika relativna standardna odstupanja ukazuju na nestabilnost bakterijske kulture prilikom mjerenja kroz duže vrijeme. Iz grafova na slikama je vidljivo da su kod većih koncentracija odstupanja između krivulja pojedinog mjerenja sve manja. Međutim, da bi se dobio bolji uvid utjecaja farmaceutika na okoliš odnosno da bi se predvidjelo njihovo ponašanje u okolišu bolje je toksičnost izražavati u jedinicama toksičnosti (**eng.** *Toxicity Units*, *TU*) prema formuli:

$$TU=100(EC_{50})^{-1} \quad (4)$$

Stoga su u **Tablici 17** navedeni parametri toksičnosti za ispitivane farmaceutike, dakle uz koncentracije farmaceutika koje pokazuju 50 % inhibiciju luminiscencije bakterija *Vibrio fischeri* ( $EC_{50}$ ), prikazane su jedinice toksičnosti koje se računaju na temelju grafički očitane vrijednosti  $EC_{50}$  prema formuli (7), te su prikazane za svaki farmaceutik najniže koncentracije koje izazivaju inhibiciju luminiscencije ispitivanih bakterija (**eng.** *Lowest Observed Effect Concentration*, LOEC).

**Tablica 16.** Očitani  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za sva mjerenja toksičnosti ispitivanih farmaceutika i izračunata srednja vrijednost uz RSD vrijednost

FARMACEUTIK	$EC_{50}$ , mg/L	$EC_{20}$ , mg/L	Srednja vrijednost $EC_{50}$ , mg/L	Srednja vrijednost $EC_{20}$ , mg/L
Febantel	31,62	29,51	28,37±16,2	23,65±35,1
	25,12	17,78		
Prazikvantel	24,55	11,22	31,73±31,98	20,37±63,51
	38,9	29,51		
Pirantel pamoat	79,43	39,81	75,11±8,13	44,96±16,19
	70,79	50,11		

**Tablica 17.** Parametri toksičnosti dobiveni mjerenjima na bakterijama *Vibrio fischeri*, izraženi kao 50 % inhibicija luminiscencije ( $EC_{50}$ ), jedinice toksičnosti (*TU*), i najniža koncentracija kod koje je primijećena inhibicija luminiscencije (LOEC)

FARMACEUTIK	$EC_{50}$ , mg/L	<i>TU</i>	LOEC, mg/L
Febantel	28,37	3,5	25
Prazikvantel	31,73	3,2	12,89
Pirantel pamoat	75,11	1,3	13,28

Febantel i prazikvantel pokazuju najveći utjecaj toksičnosti jer pri nižim koncentracijama izazivaju 20 odnosno 50 %-tnu inhibiciju luminiscencije, u usporedbi s pirantel pamoatom

(**Tablica 16.**) Rezultati ukazuju na to da prazikvantel pri koncentraciji od 12,89 mg/L inhibira tek 0,7 % luminiscencije. Međutim pirantel pamoat već pri koncentraciji od 13 mg/L inhibira luminiscenciju 11 % te na taj način predstavlja isto tako opasnost za okoliš i okolišne organizme (**Tablica 17.**).

Kako bi se odredio i utjecaj ekotoksičnosti potencijalnih novonastalih razgradnih produkata tijekom procesa biorazgradnje, analizirani su i odabrani uzorci uzimani tijekom procesa biorazgradnje s naglaskom na uzorke u kojima su kromatografski utvrđeni ranije navedeni novonastali spojevi (**Tablica 18.**). Nijedan od uzoraka uzorkovanih tijekom biorazgradnje ne pokazuje potencijalnu ekotoksičnost s obzirom da iz dobivenih rezultata nije moguće definirati  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$ . Zato bi bilo dobro u budućnosti provesti i druge osjetljivije metode analize ekotoksičnosti ovako dobivenih uzoraka tijekom biorazgradnje. S obzirom na to da se radi o farmaceuticima koji su slabo topljivi u vodenom mediju te tako i vrlo slabo biodostupni, u daljnjem istraživanju svakako bi trebalo staviti naglasak na određivanju kronične toksičnosti istom metodom ili na nekim drugim organizmima. [27]

**Tablica 18.** Popis uzoraka tijekom biorazgradnje za analizu ekotoksičnosti

Naziv uzorka	Radni dan	Datum
FEB 0	0.	07.12.2016 (sri)
FEB 7	7.	14.12.2016. (sri)
FEB 14	14.	21.12.2016. (sri)
PRAZ 0	0.	07.12.2016 (sri)
PRAZ 9	9.	16.12.2016. (pet)
PRAZ 12	12.	19.12.2016. (pon)
PRAZ 14	14.	21.12.2016. (sri)
PYR PAM 0	0.	07.12.2016 (sri)
PYR PAM 6	6.	13.12.2016. (uto)
PYR PAM 12	12.	19.12.2016. (pon)
PYR PAM 14	14.	21.12.2016. (sri)
MIX 1	1.	08.12.2016. (čet)
MIX 8	8.	15.12.2016. (čet)
MIX 15	15.	22.12.2016. (sri)

## 5. ZAKLJUČAK

---

Na temelju rezultata provedenih eksperimenata razgradnje antihelmintika febantela, prazikvantela i pirantel pamoata, kao i smjese istih zastupljenih u jednakim volumnim udjelima, sa aktivnim muljem, te uspoređujući ih sa rezultatima iz dostupne literature, može se zaključiti slijedeće:

1. Rezultati fizikalno-kemijskih parametara motrenih i određenih tijekom procesa biorazgradnje pojedinačnih odabranih antihelmintika: febantela, prazikvantela i pirantel pamoata, kao i smjese istih zastupljenih u jednakim volumnim udjelima sa aktivnim muljem, pokazuju da aktivni mulj ima aktivnost za razgradnju antihelmintika i pojedinačnih i u smjesi, te da nema perioda prilagodbe aktivnog mulja na odabrane antihelmintike. Tijekom 14 dana biorazgradnje od početnog opterećenja sa organskim sastojcima izraženim kao KPK, i to 27139 mg febantel/L, 26460 mg prazikvantel/L, 26121 mg pirantel pamoat/L i 27817 mg (febantel + prazikvantel + pirantel pamoat)/L postignuto je u svim pokusima > 99 % uklanjanje KPK. Tijekom biorazgradnje ustaljene su vrijednosti pH, otopljenog kisika i temperature. Dokazana je uz razgradnju i hidroliza farmaceutika kromatografskim analizama. U razmatranju rezultata biorazgradnje antihelmintika bilo bi nužno u daljnjem istraživanju istražiti apsorpcijski potencijal pahuljice aktivnog mulja.

2. U prilog procesa biorazgradnje te hidrolize govore i rezultati kromatografskih analiza. UHPLC-DAD metodom praćena je uglavnom prisutnost glavne komponente, ali su se mogli predvidjeti i potencijalni razgradni produkti. Rezultati MS analize daju potvrdu da su u uzorcima tijekom biorazgradnje detektirani razgradni produkti i onečišćenja vezana uz pojedine komponente febantela, prazikvantela, pirantel pamoata. Njihova smjesa ne pokazuje neke dodatne novonastale razgradne produkte s obzirom na razgradnju čistih komponenti, niti prisutnost/ nastanak novih onečišćenja.

3. Provedene analize toksičnosti standardnih otopina farmaceutika ukazuju na to da febantel i prazikvantel pokazuju najveći utjecaj toksičnosti jer pri nižim koncentracijama izazivaju 20 odnosno 50 %-tnu inhibiciju luminiscencije, u usporedbi s pirantel pamoatom koji pokazuje znatno manji, no ne i beznačajan utjecaj (**Tablica 16, 17**). Provedene su i



analize toksičnosti na uzorcima koji su uzimani tijekom procesa biorazgradnje za koje su dobiveni neujednačeni rezultati za koje se sa sigurnošću ne može utvrditi ni odrediti  $EC_{20}$  ni  $EC_{50}$ . Zato je za daljnje istraživanje potrebno razmotriti druge, dugotrajnije i osjetljivije metode za određivanje akutne odnosno kronične toksičnosti.

## 6.LITERATURA

---

1. FDA na: <https://www.fda.gov/forpatients/approvals/drugs/> (Pristupljeno: 05.05.2017.)
2. Daughton, C. G., Pharmaceuticals and the Environment (PiE): Evolution and impact of the published literature revealed by bibliometric analysis, *Science of the Total Environment* **562** (2016) 391-426
3. Boxall, A. B. A., Kolpin, D. W., Sorensen, B. H., Tolls, J., Are Veterinary Medicines causing Environmental Risk? **1** (2003) 286-294
4. Kepec, S., Ekotoksikološka i mikrobiološka karakterizacija pročišćenih otpadnih voda grada Virovitice, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, doktorska disertacija, str.7
5. Pharmaceuticals in the Environment, Results of an EEA workshop, European Environmental Agency, Copenhagen, Denmark 1/2010
6. Santos, L. H. M. L. M., Araujo, A. N., Fachini, A., Pena, A., Delerue-Matos, C., Montenegro, M. C. B. S. M., Ecotoxicological aspects related to the presence of pharmaceuticals in the aquatic environments, *Journal of Hazardous Materials* **175** (2010) 45-95
7. Boxal, A. B. A., The environmental side effect of medication, **5** (2004) 1110-1116
8. Cedergreen, N., Quantifying Synergy: A Systematic Review of Mixture Toxicity Studies within Environmental Toxicology, *Chemical Synergists in Environmental Toxicology* **9** (2014) 1-11
9. Doogue., M. P., Polasek, T. M., The ABCD of clinical pharmacokinetics, *Therapeutic Advances in Drug Safety*, **4** (2013) 5-7
10. Horvat, A. J. M., Petrovic, M., Babić, S., Mutavdžić Pavlović, D., Ašperger, D., Pelko, S., Mance, A. D., Kaštelan–Macan, M. (2012) Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, *TrAC* **31**, 61–84.
11. Nikolaou, A., Meric, S., Fatta, D., Occurrence patterns of pharmaceuticals in water and wastewater environments, *Anal Bioanal Chem* **387** (2007) 1225–1234
12. Ruckebusch, Y., Toutian, P.-L., Koritz, G. D., *Veterinary Pharmacology and Toxicology*, Springer Netherlands, 1983, str. 232
13. Denžić, M., Bilandžić, N., Benzimidazolni lijekovi u hrani životinjskog porijekla, *Veterinarska stanica* **44** (2013) 371-382
14. Stuchlikova, L., Jirasko, R., Skalova, L., Pavlik, F., Szotakova, B., Holcapek, M., Vanek, T., Podlipna, R., Metabolic pathways of benzimidazole anthelmintics in harebell (*Campanula rotundifolia*), *Chemosphere* **157** (2016) 10-17
15. Radman S., Praćenje pretvorbe antihelmintika u vodenom okolišu i procjena ekotoksikološkog djelovanja, Doktorska disertacija, Prehrambeno-biotehnoški fakultet, Zagreb, (2013) 1-4.
16. Febantel na: [http://parasitipedia.net/index.php?option=com\\_content&view=article&id=2521&Itemid=2794](http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2521&Itemid=2794) (Pristupljeno: 11.05.2017.)
17. Prazikvantel na: <https://www.drugs.com/cdi/praziquantel.html> (Pristupljeno: 11.05.2017.)

18. Pirantel pamoat na:

<https://www.fda.gov/downloads/animalveterinary/products/approvedanimaldrugproducts/foiadrugsummaries/ucm061808.pdf> (Pristupljeno: 11.05.2017.)

19. Onečišćenje na: [http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013\\_06\\_80\\_1681.html](http://narodne-novine.nn.hr/clanci/sluzbeni/2013_06_80_1681.html) (Pristupljeno: 10.05.2017.)

20. Postojana organska onečišćivala na:

<http://chm.pops.int/TheConvention/Overview/TextoftheConvention/tabid/2232/Default.asp> (Pristupljeno: 20.05.2017.)

21. Cesaro, A., Naddeo, V., Belgiorno, V., Wastewater Treatment by Combination of Advanced Oxidation Processes and Conventional Biological Systems, *Bioremediation and Biodegradation* 4 (2013)

22. Carlsson, C., Johansson, A. K., Alvan, G., Bergman, K., Kuhler T., Are pharmaceuticals potent environmental pollutants? Part II: Environmental risk assessments of selected pharmaceutical excipients, *Science of the Total Environment* 364 (2005), 88-95

23. Bujas, R., Antolić, J., Medić, Đ., Prijedlog europskog zakonodavstva o dopuni liste prioritetnih i prioritetnih opasnih tvari, *Hrvatske vode* 21 (2013) 86

24. Čogelja Čajo, G., Osrečki, V., Tomić, S., Utjecaj lijekova na okoliš, *Kemija u industriji* 59 (2010) 351-354

25. Environmental Impact Assessment for Veterinary Medicinal Products, European Medicines, London, Agency, VICH GL 38 (2004)

26. Tušar, B., Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, *CROATIANKNJIGA*, Zagreb, 2004., 62-66

27. Dolar, D., Pelko, S., Košutić, K., Horvat, A. J. M., Removal of anthelmintic drugs and their photodegradation products from water with RO/NF membranes, *Process Safetx and Environmental Protection* 90 (2012) 147-152

28. Čizmić, M., Ljubas, D., Ćurković, L., Škorić, I., Babić, S., Kinetics and degradation pathway of photolytic and photocatalytic oxidation of the anthelmintic drug praziquantel, *Journal of Hazardous Materials* 323 (2017) 500-512

29. Webb, S., Ternes, T., Gibert, M., Olejniczak, K., Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water, *Toxicology Letters* 142 (2003) 157-167

30. Kummerer, K., *Pharmaceuticals in the Environment, Sources, Fate, Effects and Risk*, Springer (2004) str.8.

31. Landeka Dragičević, T., *Biotehnologija u zaštiti okoliša, PBF*, predavanje na webu (Pristupljeno: 10.05.2017.)

32. Ben, W., Qiang, Z., Yin, X., Qu, J., Pan, X., Adsorption behaviour of sulfamethazine in an activated sludge process treating swine wastewater, *Journal of Environmental Sciences* 26 (2014) 1623-1629

33. Langenhoff, A., Inderfurth, N., Veuskens, T., Schraa, G., Blokland, M., Kujawa-Roeleveld, K., Rijnaarts, H., Microbial Removal of the Pharmaceutical Compounds Ibuprofen and Diclofenac from Wastewater, *BioMed Research International*, 2013 (2013) 1-9

34. Prasad, G. S., Girisham, S., Reddy, S. M., Studies on microbial transformation of albendazole by soil fungi, *Indian Journal of Biotechnology* 8 (2009) 425-429

35. Kantiani, L., Farre, M., Ašperger, D., Rubio, F., Gonzales, S., Lopez de Alda, M. J., Petrović, M., Shelver, W. L., Barcelo, D., Triclosan and methyl-triclosan monitoring study in the northeast of Spain using a magnetic particle enzyme immunoassay and confirmatory analysis by gas chromatography-mass spectrometry, *Journal of Hydrology* **361** (2008) 1-9
36. Afonso-Olivares, C., Torres-Padron, M. E., Sosa-Ferrera, Z., Santana-Rodriguez, J. J., Assessment of the Presence of Pharmaceutical Compounds in Seawater Samples from Coastal Area of Gran Canaria Island (Spain), **2** (2013) 274-287
37. Kolpin, D., Furlong, E., Meyer, M., Thurman, M. E., Zaugg, S, Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance, *Environmental Science & Technology* **36** (2002) 1202-1211
38. Islam, M., Kist, A., Haberhauer, G. F., Cannavan, A., Multi-class determination of anthelmintics in soil and water by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Food Additives & Contaminants* **30** (2013) 1128-1137
39. Zrnčić, M., Gros, M., Babić, S., Kaštelan-Macan, M., Barcelo, D., Petrović, M., Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry, *Chemosphere* **99** (2014) 224-232
40. Hatem, S. A., Anthelmintics Resistance: How to Overcome it?, *Iranian Journal of Parasitology* **8** (2013) 18-32
41. Biološke analize utjecaja onečišćenja na okoliš u: *Analitika okoliša*, Kaštelan-Macan, M., Petrović, M., HINUS, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2013), str.305-334
42. Fent, K., Weston, A. A., Caminada, D., Ecotoxicology of human pharmaceuticals, *Aquatic Toxicology* **76** (2006) 122-159
43. Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji S., A review on advantages of implementing luminiscence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* **32** (2006) 265-268
44. Madden, D., Lidesten, B. M., Bacterial illumination, *Bioscience Explained* **1** (2001)1-7
45. Papić, S., Moderne analitičke tehnike u analizi okoliša, Toksičnost, nastavni materijali na web-u (2016) (Pristupljeno: 05.05.2017.)
46. Đurić, I., Uklanjanje veterinarskih farmaceutika naprednim oksidacijskim metodama, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.
47. Interna skripta: Laboratorijske vježbe Mikrobiologija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (2012) 1-9
48. UPLC na: [http://www.waters.com/waters/en\\_US/UPLC-UHPLC-inlet-to-MS-with-the-best-dispersion/nav.htm?cid=134613317&locale=en\\_US](http://www.waters.com/waters/en_US/UPLC-UHPLC-inlet-to-MS-with-the-best-dispersion/nav.htm?cid=134613317&locale=en_US) (Pristupljeno: 18.04. 2017.)
49. Sajjanwar, R., Bhaskaran, S., Kakati, K., Vadodara, S. K. J., *Journal of Applied Pharmaceutical Research* **11** (2014) 32-43
50. Prazinon tableta na: <http://www.genera.hr/pro/en/1620/#.WSxSp2jyjIU> (Pristupljeno: 20.05.2017.)
51. Parvez, S., Venkataraman, C., Mukherji S., A review on advantages of implementing luminiscence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals, *Environment International* **32** (2006) 265-268

# 7. DODATAK

---

## 7.1. Popis slika

**Slika 1.** Fotorazgradnja benzimidazolnih anthelmintika [12]

**Slika 2.** Shema metaboličkog puta albendazola u stanicama *Campanula rotundifolia* (u podebljanim okvirima navedeni su metaboliti koji dosad nisu zabilježeni)

**Slika 3.** Molekulska struktura febantela

**Slika 4.** Molekulska struktura prazikvantela

**Slika 5.** Molekulska struktura pirantel pamoata

**Slika 6.** Shematski prikaz mogućih reakcija razgradnje otopljenih sastojaka iz otpadne vode koje se odvijaju u pahuljici ili biofilmu aktivnog mulja [31]

**Slika 7.** Princip djelovanja luciferaze [43]

**Slika 8.** Opći izgled krivulje toksičnosti [45]

**Slika 9.** Dijagram toka eksperimentalnog dijela rada: Shema reaktora za biorazgradnju, *pH*-metar, filter za injekcije (0,22  $\mu\text{m}$ ), kiveta s reagensima za analizu KPK, UPLC, luminometar

**Slika 10.** Hranjiva podloga sa vidljivim kolonijama bakterijske kulture *Vibrio fischeri* (žute kolonije, kultura nakon 48 h inkubacije)

**Slika 11.** Analitička vaga

**Slika 12.** *pH*-metar

**Slika 13.** Kisikova elektroda

**Slika 14.** Termoreaktor

**Slika 15.** Ultrazvučna kupelj

**Slika 16.** Shematski prikaz autoklava

**Slika 17.** Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti s MS detektorom [48]

**Slika 18.** Filter za injekcije (0,22  $\mu\text{m}$ )

**Slika 19.** Uređaj za provedbu toksičnosti (LUMISTox 300)

**Slika 20.** Reaktor u kojem se vodio proces biorazgradnje

**Slika 21.** Geometrijski niz razrjeđenja

**Slika 22.** Sheme reaktori potrebni za izvedbu eksperimenta biorazgradnje farmaceutika febantela (legenda: crvena- TSO farmaceutika, zelena- aktivni mulj, žuta- čisto otapalo, plava- vodovodna voda)

**Slika 23.** Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 14 dana u reaktoru **FEB**

**Slika 24.** Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 14 dana u reaktoru **PRAZ**

**Slika 25.** Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 14 dana u reaktoru **PRAZ**

**Slika 26.** Prikaz promjene pokazatelja KPK tijekom 15 dana u reaktoru **MIX**

**Slika 27.** Kromatogram uzoraka: standard febantela te uzorci iz reaktora **FEB** za dane 0, 7, 14 redosljedom: crvena, crna, plava zelena kromatografska krivulja

**Slika 28.** Apsorpcijski spektar febantela na 240 nm u standardnoj otopini (10 mg/L)

**Slika 29.** Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora **PRAZ** za dane 0, 9, 12, 14 redosljedom: ružičasta, crna, plava zelena kromatografska krivulja

**Slika 30.** Apsorpcijski spektar prazikvantela na 195 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

**Slika 31.** Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora **PYR PAM** za dane 0, 6, 12, 14 redosljedom: ružičasta, crna, plava zelena kromatografska krivulja

**Slika 32.** Apsorpcijski spektar pirantela na 310 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

**Slika 33.** Apsorpcijski spektar pamoata na 240 nm u standardnoj otopini 10 mg/L

**Slika 34.** Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora **MIX** za dane 1, 8, 15 redosljedom: ružičasta, crna, plava zelena kromatografska krivulja (snimljen na 195 nm)

**Slika 35.** Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora **MIX** za dane 1, 8, 15 redosljedom: crvena, crna, plava zelena kromatografska krivulja (snimljen na 310 nm)

**Slika 36.** Kromatogram uzoraka: standard prazikvantela te uzorci iz reaktora **MIX** za dane 1, 8, 15 redosljedom: crna, plava, ružičasta zelena kromatografska krivulja (snimljen na 240 nm)

**Slika 37.** Kromatogram standardne otopine smjese farmaceutika pripremljene u vodovodnoj vodi

**Slika 38.** Kromatogram standardne otopine smjese farmaceutika (MiliQ voda)

**Slika 39.** Spektar masa produktnog iona febantela *m/z* 477,1333 i njegovih fragmenata

**Slika 40.** Strukture onečišćenja febantela: a) Imp 1 b) Imp 2 c) Imp 3 d) Imp 4 e) Imp 5

**Slika 41.** Strukture razgradnih produkata febantela: a) RP FEB1 b) RP FEB2 c) RP FEB3 d) RP FEB4 e) RP FEB5 f) RP FEB6

**Slika 42.** Spektar masa produktnog iona prazikvantela  $m/z$  313,1911 i njegovih fragmenata  
**Slika 43.** PRAZ Imp 1  
**Slika 44.** PRAZ Imp 2  
**Slika 45.** PRAZ RP 1  
**Slika 46.** Spektar masa produktnog iona pirantela  $m/z$  313,1911 i njegovih fragmenata  
**Slika 47.** PYR Imp 1  
**Slika 48.** PYR Imp 2  
**Slika 49.** PYR Imp 3  
**Slika 50.** PYR Imp 4  
**Slika 51.** Graf toksičnosti metanola  
**Slika 52.** Graf usporedbe toksičnosti otopine febantela  
**Slika 53.** Graf usporedbe toksičnosti otopine prazikvantela  
**Slika 54.** Graf usporedbe toksičnosti otopine pirantel pamoata

## 7.2. Popis tablica

**Tablica 1.** Kemikalije korištene u analizama  
**Tablica 2.** Popis korištenih farmaceutika  
**Tablica 3.** Sastav hranjive podloge  
**Tablica 4.** Sastav otopine za resuspenziju  
**Tablica 5.** UHPLC metoda za određivanje onečišćenja za febantel/pirantel/prazikvantel  
**Tablica 6.** Parametri MS analize (TOF)  
**Tablica 8.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **FEB**  
**Tablica 9.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **PRAZ**  
**Tablica 10.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **PYR PAM**  
**Tablica 11.** Prikaz fizikalno-kemijskih parametara za reaktor **MIX**  
**Tablica 12.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za glavne komponente  
**Tablica 13.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za onečišćenja i razgradne produkte febantela  
**Tablica 14.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za onečišćenja i razgradne produkte prazikvantela  
**Tablica 15.** UHPLC/ESI(+)-QqTOF-MS2 podaci za onečišćenja i razgradne produkte pirantela  
**Tablica 16.** Očitani  $EC_{20}$  i  $EC_{50}$  za sva mjerenja toksičnosti ispitivanih farmaceutika i izračunata srednja vrijednost uz RSD vrijednost  
**Tablica 17.** Parametri toksičnosti dobiveni mjerenjima na bakterijama *Vibrio fischeri*, izraženi kao 50 % inhibicija luminiscencije ( $EC_{50}$ ), jedinice toksičnosti (TU), i najniža koncentracija kod koje je primjećena inhibicija luminiscencije (LOEC)  
**Tablica 18.** Popis uzoraka tijekom biorazgradnje za analizu ekotoksičnosti

## 7.3. Popis kratica i simbola

Aktivna komponenta (**eng.** *Active Pharmaceutical Ingredient*, API)  
 Američka agencija za hranu i lijekove (**eng.** *Food and Drug Administration*, FDA)  
 Klasični sustav za obradu otpadne vode (**eng.** *Waste Water Treatment Plant*, WWTP's)  
 Okvirna direktiva o vodama (ODV)  
 Životni ciklus (**eng.** *Life Cycle Assessment*, LCA)  
 $pK_A$ -konstanta disocijacije kiseline  
 Postojana organska onečišćivala (**eng.** *Persistent Organic Pollutants*, POPs)  
 Ocjena rizika (**eng.** *Environmental Risk Assessment*, ERA)  
 Integrirano upravljanje okolišem (**eng.** *Integrated Environmental Management*, IEM)  
 Procjena rizika (**eng.** *Environmental Risk Assessment*, ERA)  
 Reverzna osmoza (RO)  
 Nanofiltracija (NF)  
 Koeficijent razdiobe ( $K_d$ )  
 Plinska kromatografija i spektrometrija masa (**eng.** *Gas Chromatography – Mass Spectrometry*, GC-MS)

Trostuki kvadripol (**eng.** *triple quadrupol*, QqQ)

Ionska klopka (**eng.** *ion trap*, IT)

Hibridni instrument kvadripol– brzinski s mjerenjem vremena preleta (**eng.** *quadrupole–time–of–flight*, QqTOF)

Kvadripol– linearni analizator masa s ionskom klopkom (**eng.** *quadrupole–linear ion trap*, QqLIT)

Linearna ionska klopka–ionsko–ciklotronska rezonancija s Fourierovim transformacijama (**eng.** *linear ion trap–Fourier transformation ion cyclotron resonance*, LIT–FT–ICR)

Linearna kvadripolna ionska klopka–orbitalna klopka (**eng.** *linear trap quadrupole Orbitrap*, LTQ Orbitrap)

Tekućinska kromatografija sa spregnutom (tandemskom) spektrometrijom masa (**eng.** *Ciquid chromatography tandem Mass Spectrometry*, LC–MS/MS)

Luciferin (FMNH<sub>2</sub>)

EC<sub>20</sub> – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 20 % inhibicije

EC<sub>50</sub> – koncentracija uzorka u testu koji uzrokuje 50 % inhibicije

Kemijska potrošnja kisika- *KPK*

Koncentracija ili suha tvar za aktivni mulj (**eng.** *Mixed Liquor Suspended Solids*, MLSS)

Tekućinski kromatograf ultravisoke djelotvornosti (UPLC)

MiliQ voda-pročišćena voda

Fragmentiranje iona tj. praćenje odabranih reakcija (**eng.** *selected reaction monitoring*, SRM)

Praćenje Višestrukih reakcija (**eng.** *multiple reaction monitoring*, MRM)

Ionizacija elektroraspršivanjem (**eng.** *electrosprey ionization*, ESI<sup>+</sup>)

Vrijeme preleta (**eng.** *Time of Flight*)

Analiza (**eng.** *Total Ion Chromatogram*, TIC)

Razgradni produkti (RP)

Onečišćenja (**eng.** *Impurities*, Imp)

Stupanj nezasićenosti (**eng.** *double bond equivalent*, DBE)

Relativno vrijeme zadržavanja (**eng.** *Relative Retention Time*, RRT)

Vrijeme zadržavanja-*t<sub>R</sub>* (**eng.** *Retention time*, RT)

Jedinice toksičnosti (**eng.** *Toxicity Units*, TU)

Najniže koncentracije koje izazivaju inhibiciju luminiscencije ispitivanih bakterija (**eng.** *Lowest Observed Effect Concentration*, LOEC)

Fotoelektrični detektor s diodnim nizom (**eng.** *photodiode array*, PDA)

Temeljna standardna otopina-TSO

Radna otopina-RO

