

# Određivanje farmaceutika u aktivnom mulju

---

Čović, Antonela

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:149:417435>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-28**



Repository / Repozitorij:

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



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

Antonela Čović

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, srpanj 2017.

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

Antonela Čović

**Određivanje farmaceutika u aktivnom mulju**

**DIPLOMSKI RAD**

**Voditelj rada:** izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

**Članovi ispitnog povjerenstva:** izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger  
dr. sc. Mirta Čizmić, asistent  
izv. prof. dr. sc. Marijana Hranjec

Zagreb, srpanj 2017.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na predloženoj temi, uloženom vremenu, strpljenju, velikoj pomoći i stručnom vodstvu pri izradi ovog diplomskog rada.*

*Zahvaljujem se asistentici dr. sc. Mirti Čizmić na velikoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog rada i obrade rezultata.*

*Također se zahvaljujem tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na pruženoj pomoći prilikom izrade eksperimentalnog dijela ovog diplomskog rada.*

*Posebno zahvaljujem svojoj obitelji, mami, baki i sestri koji su mi bili velika podrška prilikom studiranja i omogućili mi studiranje. Hvala mojim prijateljima koji su mi također bili velika podrška u studiranju.*

## SAŽETAK

### ODREĐIVANJE FARMACEUTIKA U AKTIVNOM MULJU

Farmaceutici su kemijske tvari koje se koriste u liječenju i spriječavanju bolesti. Smatraju se novim onečišćivalima jer za njih nema propisana zakonska doza prilikom ispuštanja obrađenih otpadnih voda u okoliš. Zbog povećane potrošnje farmaceutika oni su sve više prisutni u okolišu, vodama, tlu i sedimentu. Razlog tomu je što se male molekule farmaceutika ne mogu ukloniti u potpunosti klasičnim metodama obrade otpadnih voda farmaceutskih industrija, a zadržavaju se koncentrirane i u aktivnom mulju sustava za obradu otpadnih voda. Stoga je potrebno uvesti zakonski propisane maksimalno dopuštene koncentracije farmaceutika u okolišu, ali i pratiti koncentracije farmaceutika prije i nakon obrade otpadnih voda farmaceutske industrije kao i u aktivnom mulju kojeg treba u konačnici na adekvatan način zbrinuti. U tu svrhu potrebno je prvo razviti analitičke metode ekstrakcije farmaceutika iz realnih uzoraka i kvantitativno i kvalitativno odrediti farmaceutike odgovarajućim tehnikama. Farmaceutici određivani u ovom radu su: antihelmintici (albendazol, febantel, prazikvantel), antibiotici (azitromicin, cefdinir, eritromicin, klaritromicin, nitrofurantoin), kemoterapeutici (hidroksiklorokin) i antiemetik (metoklopramid). Cilj rada je odrediti optimalne uvjete ekstrakcije farmaceutika metodom mućkanja iz aktivnog mulja. Parametri koji su optimirani su vrsta i volumen otapala, vrijeme ekstrakcije, omjer mase uzorka i otapala, te utjecaj pH-vrijednosti. Kvantitativna i kvalitativna analiza farmaceutika provedena je vezanim kromatografskim sustavima: tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti sa spektrometrom masa (HPLC-MS/MS). Najbolji rezultati su postignuti sa sustavima otapala metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda i metanol:heksan s 0,5 g uzorka uz volumen otapala od 3 mL. Međutim, generalno, ova metoda nije dala zadovoljavajuća iskorištenja, sva su bila maksimalno do 30 % te se metoda kao takva nije niti validirala niti se preporuča za rutinsku primjenu unatoč jednostavnosti i niskoj cijeni metode ekstrakcije.

#### **Ključne riječi:**

*aktivni mulj, farmaceutici, metoda mućkanja, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa spektrometrom masa*

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF PHARMACEUTICALS IN ACTIVATED SLUDGE

Pharmaceuticals are chemical substances used in the treatment and prevention of diseases. They are considered as new pollutants because they do not have defined a regulatory legal dose for releasing treated wastewater into the environment. Due to increased pharmaceutical consumption they are present in the water, soil, sediment and in the environment. The reason is that small molecules of pharmaceuticals can not be completely removed by the classical wastewater treatment methods of the pharmaceutical industry and they are retained in the active sludge of wastewater treatment. Therefore, it is necessary to introduce legally prescribed maximum concentration of pharmaceuticals in the environment but it is also necessary to monitor the concentrations of the pharmaceuticals before and after wastewater treatment of the pharmaceutical industry. The concentration of pharmaceuticals in active sludge should be monitored and the sludge should be disposed in adequate procedure after the usage. For this purpose it is necessary to develop analytical methods for extraction of pharmaceuticals from real samples and quantitatively and qualitatively determine the pharmaceuticals by appropriate techniques. The pharmaceuticals used in this paper are: antihelminitics (albendazole, febantel, praziquantel), antibiotics (azitromycine, eritromycine, cefdinir, claritromycine, nitrofurantoin), chemoterapeutic agent (hydroxychloroquine) and antiemetic (metoclopramide).

The aim of this paper is to determine the optimum conditions for extraction of the pharmaceuticals by the method of agitation from the active sludge. Optimized parameters are type and volume of solvent, time of extraction, sample and solvent ratio and pH value. The quantitative and qualitative analysis of the pharmaceuticals was performed by tandem chromatographic systems: high performance liquid chromatography with diode array detectors (HPLC-DAD) and high performance liquid chromatography with mass spectrometry (HPLC-MS/MS).

The best results were achieved with solvent systems: methanol:acetonitrile, methanol:acetone, methanol:water and methanol:hexane with 0,5 g of sample with a solvent volume of 3 mL. However, with this method the achieved efficiencies were up to 30 % which is not satisfactory. The method as such was neither validated nor recommended for routine use despite the simplicity and low cost of the extraction method.

#### **Key words:**

*activated sludge, pharmaceuticals, extraction by agitation, high performance liquid chromatography (HPLC-DAD), high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS)*

## Sadržaj:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1. Aktivni mulj.....	3
2.2. Farmaceutici.....	6
2.1.1. Antihelmintici.....	6
2.1.1.1. Albendazol.....	7
2.1.1.2. Febantel.....	7
2.1.1.3. Prazikvantel.....	8
2.1.2. Antibiotici.....	9
2.1.2.1. Azitromicin.....	10
2.1.2.2. Cefdinir.....	11
2.1.2.3. Eritromicin.....	11
2.1.2.4. Klaritromicin.....	12
2.1.2.5. Nitrofurantoin.....	13
2.1.3. Kemoterapeutici.....	13
2.1.3.1. Hidroksiklorokin.....	13
2.1.4. Antiemetici.....	14
2.1.4.1. Metoklopramid.....	14
2.3. Priprava uzoraka za analizu.....	15
2.3.1. Klasične metode ekstrakcije.....	17
2.3.1.1. Ekstrakcija čvrsto – tekuće.....	17
2.3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija.....	18
2.3.1.3. Soxhlet ekstrakcija.....	18
2.3.2. Moderne metode ekstrakcije.....	19
2.3.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija.....	19
2.3.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidom.....	19
2.3.2.3. Mikrovalna ekstrakcija.....	21
2.3.2.4. Poboľšana ekstrakcija otapalom.....	22
2.4. Kromatografska analiza farmaceutika.....	22
2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	24

2.4.2. Spektrometar masa .....	26
2.4.3. Pregled literature za istraživane farmaceutike .....	27
3. EKSPERIMENTALNI DIO .....	38
3.1. Materijali .....	38
3.1.1. Aktivni mulj.....	38
3.1.2. Kemikalije .....	38
3.1.3. Farmaceutici .....	39
3.2. Instrumenti, uređaji i pribor .....	39
3.2.1. Analitička vaga .....	39
3.2.2. pH metar .....	40
3.2.3. Mućkalica .....	41
3.2.4. Filtriranje .....	41
3.2.5. Uparavanje (rotavapor).....	42
3.2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	42
3.2.7. HPLC MS/MS .....	43
3.3. Metode rada.....	44
3.3.1. Priprava standardnih otopina farmaceutika .....	44
3.3.2. Priprava špikanog aktivnog mulja .....	44
3.3.3. Ekstrakcija mućkanjem.....	45
3.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti .....	45
4. REZULTATI I RASPRAVA .....	48
5. ZAKLJUČAK .....	61
6. LITERATURA .....	62
7. DODATAK.....	73
7.1. Popis slika .....	73
7.2. Popis tablica .....	74
8. ŽIVOTOPIS .....	75





## 1. UVOD

Lijekovi koji se koriste za liječenje ljudi i životinja sve se češće nalaze u okolišu kao rezultat proizvodnih procesa, odlaganjem neupotrebljenih farmaceutika, ispuštanjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda čime ugrožavaju život biljnog i životinjskog svijeta, a kod ljudi mogu dovesti do pojave simptoma nekih bolesti. Zbog zakonskih nereguliranih dopuštenih vrijednosti farmaceutika u okolišu smatraju se novim onečišćivalima jer se ne zna puno o njihovom utjecaju na okoliš. Jedina prednost farmaceutskih otpadnih voda je poznat njen sastav zbog čega možemo primijeniti odgovarajuću metodu njihovog uklanjanja.

U ovom radu izabran je aktivni mulj koji se javlja nakon obrade komunalnih i industrijskih otpadnih voda, sadrži većinom organske tvari. Problem se javlja kada prilikom obrade otpadnih voda na postrojenju dolazi određena količina industrijskih otpadnih voda koja zbog nereguliranih zakonskih vrijednosti farmaceutika predstavlja opasnost za okoliš i zdravlje ljudi jer nakon obrade dolazi u kontakt s gradskom pitkom vodom. Odabrani farmaceutici (albendazol, azitromicin, cefdinir, eritromicin, febantel, hidrosiklorokin, klaritromicin, metoklopramid, nitrofurantoin i prazikvanel) nalaze se na listi *Okvirne direktive o vodama* izdane od Europske komisije.

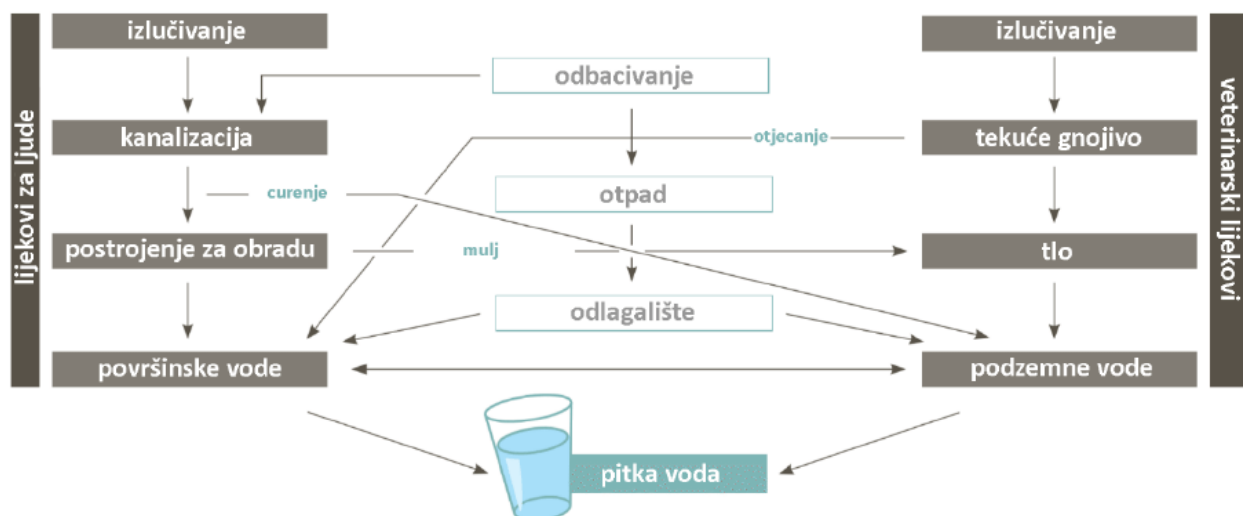
Svaki analitički proces sastoji se od pet koraka: uzorkovanje, priprava uzoraka, separacija, detekcija i analiza rezultata. Svaki korak utječe na kvalitetu rezultata. Za pripravu uzoraka koriste se moderne metode koje se zasnivaju na ekstrakciji i pružaju bržu i jednostavniju ekstrakciju s manje otapala.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kombinirana s detektorom s nizom dioda i spektrometrom masa pokazala se kao važna analitička metoda u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi farmaceutika, jedna je od najčešće primjenjivanih i najučestalijih metoda kojima se može odijeliti velik broj farmaceutika. Cilj ovog rada je optimirati metodu ekstrakcije mućkanjem s otapalima kao vrlo jednostavna metoda pripreme uzorka radi određivanja farmaceutika u aktivnom mulju kromatografskom metodom.

## 2. TEORIJSKI DIO

Ljudi su od davnina ispuštali štetne tvari u okoliš nadajući se da će se prirodno razgraditi razrjeđenjem ili djelovanjem bakterija. Porastom stanovništva i razvojem tehnologije povećala se količina ispuštenih komunalnih i industrijskih otpadnih voda, a time je zagađenje postalo veće što predstavlja glavni problem u današnjem svijetu. Posljedica toga je narušavanje prirodnog hranidbenog lanca i vodenih ekosustava.<sup>1</sup> Najveći izvori zagađenja okoliša su postrojenja za obradu otpadnih voda, industrijska postrojenja za farmaceutsku proizvodnju, odlagališta, životinjske farme. Učinkovitost uklanjanja farmaceutika ovisi o postupku obrade voda. Neadekvatnom obradom otpadnih voda farmaceutici mogu dospjeti u vodene tokove kao i preko aktivnog mulja.<sup>2</sup>

Farmaceutici obuhvaćaju terapijske lijekove za životinje i ljude te dodatke prehrani. To su prirodne ili sintetski aktivne tvari<sup>3</sup> koje zbog zakonski nereguliranih graničnih vrijednosti i nedovoljnog poznavanja njihovog štetnog utjecaja na okoliš nazivaju se *novim onečišćivalima*. Tako iz farmaceutskih otpadnih voda uslijed neprikladne obrade u okoliš mogu dospjeti katalizatori, organska otapala, aditivi, aktivne farmaceutske tvari.<sup>2</sup> Farmaceutici su nađeni u površinskim vodama, tlu, nakon procesa obrade industrijskih voda, vodovodnoj vodi. Iako su prisutne u malim koncentracijama veliki problem predstavlja dugoročna izloženost ljudi i živih organizama tim spojevima. Farmaceutici nakon prolaska kroz ljudski metabolizam mogu stvoriti metabolite koju su polarniji od polaznog spoja. Nakon izlučivanja dospijevaju u komunalne otpadne vode, pri čemu su se dosadašnji uređaji za obradu tih voda pokazali nedovoljno učinkovitima. Farmaceutici koji pokazuju afinitet sorbiranja na krute čestice akumuliraju se u sedimentu i tlu, dok se topljive tvari akumuliraju u podzemne i površinske vode. Način ulaska farmaceutske aktivne tvari u okoliš su neadekvatno odlaganje neiskorištenih lijekova, bolnice, farme (antibiotici koji se koriste u terapijske svrhe). Upotrebom stajskog gnojiva antibiotici se prenose na zemljišne površine, a ispiranjem dospijevaju u podzemne vode. Također mogu dospjeti i gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem koji je proizvod obrade komunalnih otpadnih voda.<sup>4</sup>



**Slika 1.** Kako farmaceutici dopijevaju u okoliš<sup>5</sup>

Iz **Slike 1** može se vidjeti da farmaceutici dopijevaju u okoliš putem životinjskih i ljudskih fekalija koje završavaju u otpadnim vodama, gubitcima iz kanalizacijskog sustava, industrijskog i medicinskog otpada iz veterinarskih i zdravstvenih ustanova, muljem dobivenim obradom otpadnih voda. Farmaceutici tako mogu dospjeti u podzemne vode koje se crpe i koriste kao voda za piće.

## 2.1. Aktivni mulj

Aktivni mulj nastaje povezivanjem kvasaca, algi, metazoa i protozoa sa suspendiranim česticama u veće nakupine, flokule. Prilikom biološke obrade otpadne vode mogu postojati mikrobne zajednice aerobnog ili anaerobnog aktivnog mulja ovisno o koncentraciji otopljenog kisika. Proces aktivnog mulja primjenjuje se za biološku obradu komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Proces se sastoji od 3 procesa u seriji:

- bioreaktor sa suspendiranom biomasom za biorazgradnju otpadnih voda,
- separacija tekuće-kruto koja se osniva na sedimentaciji,
- recikliranje aktivnog mulja prenoseći biološku krutu tvar natrag u bioreaktor.

Aktivni mulj može biti prikladan ako je potrebno uklanjanje organskog onečišćenja, gdje su dostupna sredstva i stručno osoblje za rad i održavanje, a zemljište je skupo i oskudno. Aktivni mulj zahtijeva stalni rad muljevitih pumpi i puhaljki kisika pa je stalna opskrba energijom bitna. Sustav treba predobradu kao što je primarna sedimentacija.

#### **Prednosti:**

- učinkovito uklanjanje hranjivih tvari kad je pravilno dizajniran i vođen prema lokalnim zahtjevima,
- fleksibilnost i modifikacija kako bi se prilagodili određenim zahtjevima (uklanjanje dušika),
- najčešći je korišteni oblik sekundarne obrade otpadnih voda.

#### **Nedostaci:**

- skupo,
- stalna opskrba energijom,
- ograničenost dostupnih rezervnih dijelova i kemikalija,
- zahtijeva obučenu struku koja može pratiti sustav i reagirati na promjenu.<sup>6</sup>

Mulj koji dolazi s postrojenja za obradu onečišćene vode mora se prikladno zbrinuti kako ne bi predstavljao opasnost za okoliš. Postupak obrade i odlaganja mulja u okoliš ovisi o podrijetlu, količini i osnovnim značajakama. Javlja se nakon obrade komunalnih, industrijskih ili otpadnih voda, sadrže organske tvari (70 %) i podvrgnut je biološkim postupcima. U velikim gradovima javlja se problem kada u uređaje za pročišćavanje otpadne vode dolazi veliki udio industrijskih otpadnih voda zbog neodgovornog pročišćavanja prije priključenja na gradski odvodni sustav. Tada se javljaju problemi prilikom zbrinjavanja, postupaka obrade otpadne vode i korištenja mulja. Mulj je posebna vrsta otpada koju svrstavamo u opasni otpad. Mulj nakon obrade otpadnih voda se sastoji od disperzne smjese u kojoj su raspršene čestice krute tvari.

Količina mulja ovisi o kvaliteti vode koja se pročišćava, postupku pročišćavanja jer što je postupak bolji, veće su količine mulja. Volumen svježeg mulja koji se stvara na uređaju za pročišćavanje mulja je manji od volumena vode koja se pročišćava. Na **Slici 2** prikazan je primjer aktivnog mulja u postrojenju za obradu voda.

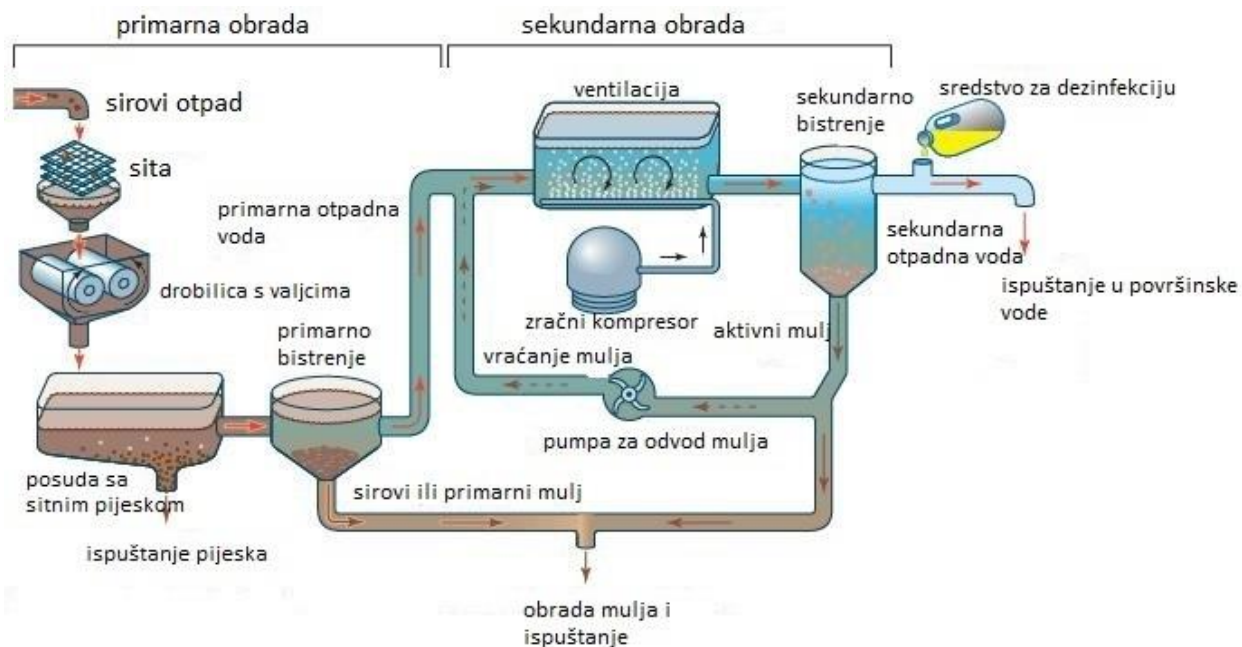


**Slika 2.** Aktivni mulj<sup>7</sup>

Vrste mulja:

- primarni mulj (anorganske i organske tvari, živi organizmi),
- biološki mulj (živa masa bakterija),
- tercijarni mulj (ostatci reakcija dodatnih kemikalija s otpadnom vodom, alge),
- kombinacije muljeva različitog podrijetla.

Vrijednost pH svježeg mulja je oko 7, a u procesu raspadanja iznosi oko 6. Količina suhe tvari obuhvaća količinu anorganskih i organskih tvari poslije sušenja na 105 °C. Odlaganje svježeg mulja mora biti u skladu sa zakonskim propisima i javnost mora biti obaviještena o tome. Nasipanje i odlaganje mora biti pod trajnom kontrolom, uz zaštitu podzemnih i površinskih voda. Mora se osigurati prikladan transport kako bi se spriječilo širenje neugodnog mirisa.<sup>8</sup> Na **Slici 3** prikazan je jedan od načina obrade mulja.



Slika 3. Obrada aktivnog mulja<sup>9</sup>

## 2.2. Farmaceutici

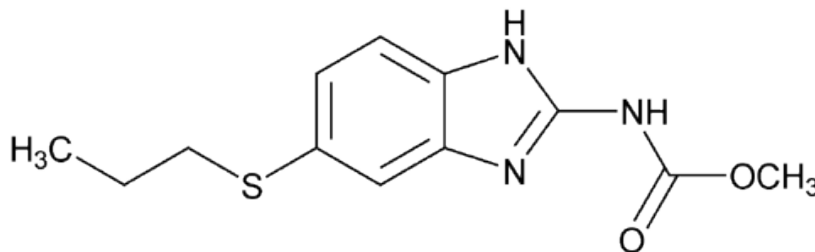
Farmaceutici su kemijske tvari namijenjene u liječenju, medicinskoj dijagnostici ili sprječavanju bolesti. Mogu se podijeliti s obzirom na kemijski sastav, terapijskom učinku, načinu primjene i s obzirom na koji biološki sustav utječu.<sup>10</sup>

### 2.1.1. Antihelmintici

Antiparazitski lijekovi koji se koriste u liječenju ljudi i životinja od nametnika kao što su crvi i trakavice koji ubijaju nametnika, ali ne štete domaćinu (čovjek ili životinja). Koristi se u kombinaciji s lijekovima za pražnjenje crijeva kako bi se što lakše uklonili iz tijela domaćina. Kriteriji pri odabiru odgovarajućeg antihelmintika su: spektar djelovanja, djelotvornost, tip i podnošljivost parazitizma.<sup>11</sup> Antihelmintike svrstavamo u sedam skupina s obzirom na njihovu otpornost na parazite: benzimidazoli, imidazotiazoli, difenilsulfidi, makrociklički laktoni, heksahidropirazini, salicilanilidi, tetrahidropirimidini. Najvažnija skupina za liječenje endoparazitskih bolesti životinja su benzimidazoli. Njihova sudbina o opstanku u okolišu najviše ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima.<sup>12</sup> Antihelmintici koji su se koristili u ovom radu su: albendazol, febantel i prazikvantel.

### 2.1.1.1. Albendazol

Antihelmintik širokog spektra iz grupe benzimidazola.<sup>11</sup> Otkriven je 1961. godine.<sup>13</sup> Sprječava ugradnju glukoze u tri razvojna stupnja parazita tako što ometa normalni metabolizam parazita. Nema neželjenih efekata na organizam.<sup>11</sup> To je novi benzimidazol karbamat koji se koristi za liječenje tkivnih i crijevnih nametnika, ali i protiv ličinki. Ima slabu topljivost u vodi, a albendazol se brzo apsorbira nakon oralne primjene. Albendazol stvara neke nusprodukte nakon dugotrajne terapije crijevne helminitiazije. Može uzorkovati povremene glavobolje, mučnine, vrtoglavice i kratkotrajne bolove u donjem dijelu trbuha. Što se tiče životinja on je toksičan za embrije i teratogen. Benzimidazoli imaju malu interakciju s ostalim lijekovima.<sup>13</sup> Na **Slici 4** je prikazana njegova molekulska struktura.

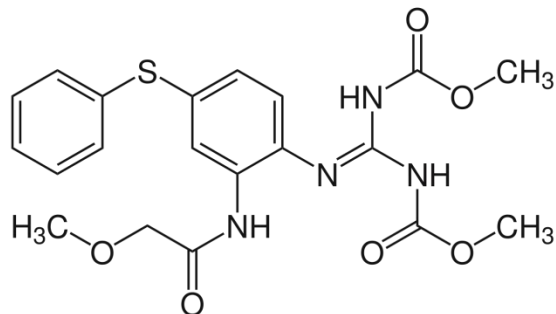


**Slika 4.** Struktura albendazola<sup>14</sup>

### 2.1.1.2. Febantel

Antihelmintik širokog spektra zbog širokog ranga antiparazitske aktivnosti, rabi se u liječenju crijevnih preživača i nametnika kod svinja, ovaca i goveda.<sup>15</sup> U organizmu ovce može dovesti do stvaranja kristalnih produkata. Na Tajvanu febantel se smatra antiparazitskim lijekom koji se koristi za liječenje životinje od nametnika. Opasnost za ljude može predstavljati ako ljudi konzumiraju životinjske proizvode koji sadrže ostatke veterinarskih lijekova.<sup>16</sup> Pripada grupi benzimidazola. Ima visoki stupanj učinkovitosti, raznovrsnu primjenu i dobru granicu sigurnosti. Primjenjuje se oralno u obliku tableta, suspenzije, paste ili kao medicinska hrana.<sup>15</sup> Na **Slici 5** prikazana je njegova molekulska struktura.

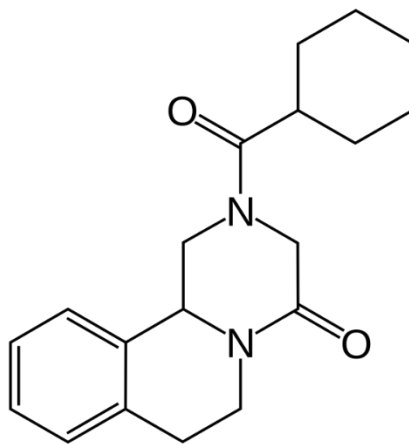




**Slika 5.** Struktura febantela<sup>17</sup>

### 2.1.1.3. Prazikvantel

Efektivan termatocid i cestocid, koristi se u liječenju ljudi i životinja. Nakon oralne upotrebe se brzo apsorbira, posjeduje široki terapijski indeks, a njegove nuspojave vidljive su nakon velikih doza.<sup>18</sup> Antihelmintik širokog spektra, njegovo djelovanje može se opisati povećanjem permeabilnosti nametnika za kalcij, dolazi do kontrakcije mišića i tako uzrokuje paralizu ili smrt parazita.<sup>11</sup> Uzrokuje vrlo malo nuspojava, ali neki od ovih mogu se javiti: povremena bol i mučnina, urtikarija, vrućica, osipi.<sup>13</sup> Na **Slici 6** prikazana je njegova molekulska struktura.



**Slika 6.** Struktura prazikvantela<sup>19</sup>

## 2.1.2. Antibiotici

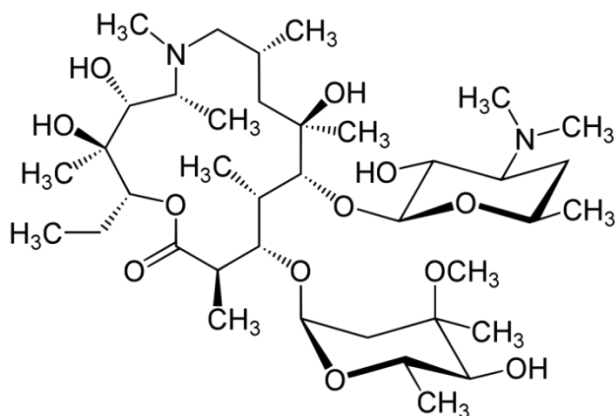
Antibiotici su antimikrobni lijekovi koji se koriste u liječenju infekcija kada se procijeni da je organizam domaćina nemoćan za liječenje infekcije.<sup>20</sup> Antibiotici se većinom koriste za liječenje životinja i ljudi bilo u svrhu liječenja neke bolesti. U Kini se svake godine proizvede 10 000 tona antibiotika od čega 90 % se koristi u nekim djelatnostima (48 % u poljoprivredi, 42 % u medicini), a 10 % se izvozi.<sup>21</sup> Antibiotici djeluju na strukturu i rast bakterije. Uništavanjem ili spriječavanjem razmnožavanja bakterije potiču imunološki sustav organizma na obranu od infekcije.<sup>22</sup> Primjena antibiotika u veterinarskoj medicini sastoji se u tome da antibiotici inhibiraju ili ubijaju mikroorganizme kao što su gljive, bakterije ili protozoe. Na ponašanje antibiotika u okolišu utječu fizikalna i kemijska svojstva spojeva (molekulski oblik, topljivost, veličina, hidrofobnost), ali i svojstva tla (pH).<sup>23</sup> U posebnu skupinu antibiotika pripadaju makrolidi koji spriječavaju razvoj bakterije, ali su otporni na mnoge gram – pozitivne bakterije. Koriste se u liječenju slabih infekcija i uzimaju se oralno. Danas je poznato pet makrolida: azitromicin, eritromicin, fidaksomicin, klaritromicin i telitromicin. Eritromicin je izoliran 1952. godine iz bakterije *Streptomyces erythreus*. Ostali makrolidni antibiotici su polusintetički derivati eritromicina. Makrolidi su biostatični protiv mnogo sojeva stafilokoka, streptokoka, listerije, klostridije. Azitromicin i klaritromicin su učinkovitiji od eritromicina protiv nekih gram-negativnih bakterija kako što su *Mycoplasma pneumonia*, *Toxoplasma gondii*, *Helicobacter pylori*. Fidaksomicin se ne koristi oralno i koristi se za liječenje proljeva povezan s *Clostridium difficile*. Makrolidni antibiotici djeluju tako da inhibiraju sintezu bakterija vezanjem 50 S ribosomatskog elementa.<sup>24</sup> Makrolidni antibiotici su tako nazvani jer sadrže mnogobrojni laktonski prsten (14-membranski prsten za eritromicin i klaritromicin i 15-membranski prsten za azitromicin) za koji je prihvaćen jedan ili više dioksija za šećer. Klaritromicin se razlikuje od eritromicina za metiliranje hidroksilne grupe na položaju 6, a azitromicin se razlikuje dodatkom metil-supstituiranog atoma dušika u laktonski prsten. Otpornost se javlja pomoću tri mehanizma:

1. izbacivanje lijeka mehanizmom aktivne pumpe (kodiran *mrsA*, *mefA*, *mefE* u stafilokokima ili *S. pneumoniae*),
2. inducibilna ili konstitutivna proizvodnja enzima metilaze koja modificira ribosomski cilj, što smanjuje vezivanje lijeka,
3. hidroliza makrolida esterazama koje proizvodi bakterija *Enterobacteriaceae*.<sup>13</sup>

Makrolidi i njihovi metaboliti se najviše izlučuju preko žuči (više od 60 %), a urinom manje od 10 %. Netoksični su, a nuspojave su rijetke. Kod velikih doza makrolida mogu se javiti proljev i povraćanje, posebno su osjetljivi konji, a mogu izazvati i toksična oštećenja jetre. Primjenjuju se u obliku tableta, praška i injekcijske otopine.<sup>25</sup> U ovom radu ispitivani su azitromicin, eritromicin i klaritromicin.

### 2.1.2.1. Azitromicin

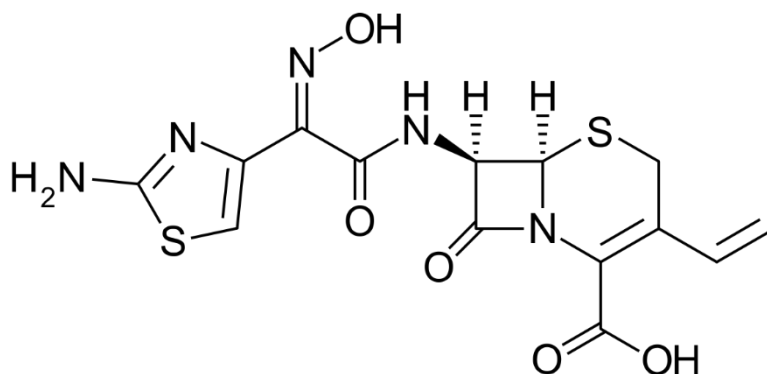
Jedan od najprodavanijih i najčešće korištenih antibiotika u svijetu. Bijeli kristalni prah, koristi se za liječenje upale pluća, bronhitisa, kožnih infekcija, upala grla. Pokazao se izvrsnim za liječenje *Chlamydie trachomatis*.<sup>26</sup> Koristi se za liječenje sinusitisa, bronhitisa i upalne bolesti zdjelice. Dolazi u obliku praška, tableta i otopine. Mogu se javiti nuspojave poput mučine, proljeva, vrtoglavice, osipa i bolova u trbuhu.<sup>27</sup> Na **Slici 7** je prikazana njegova molekulska struktura.



**Slika 7.** Struktura azitromicina<sup>28</sup>

### 2.1.2.2. Cefdinir

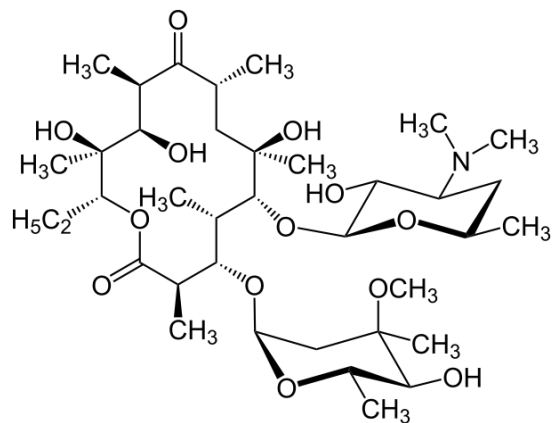
Antibiotik širokog spektra, uzima se oralno, cefalosporin treće generacije, sintetiziran 1988.<sup>29</sup> Ima široki spektar aktivnosti, visoka cijena i odličan terapijski učinak protiv osjetljivih bakterija.<sup>30</sup> Koristi se za liječenje infekcije dišnih puteva, infekcije mekih tkiva i liječenje upale srednjeg uha. Učinkovit je protiv mnogih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija.<sup>31</sup> Na **Slici 8** je prikazana njegova molekulska struktura.



**Slika 8.** Struktura cefdinira<sup>32</sup>

### 2.1.2.3. Eritromicin

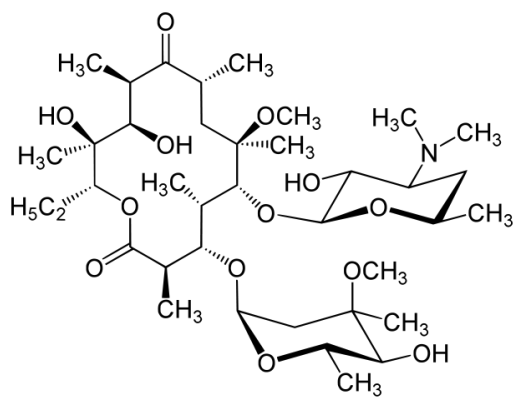
Makrolidni antibiotik koji se je koristio u liječenju od 1950.-ih protiv blagih i umjerenih infekcija izazvane osjetljivim agensima. Odobren je u SAD-u 1967. godine i čini godišnje 1,5 milijuna recepata. Specifične indikacije uključuju blage do umjerene infekcije gornjih i donjih dišnih puteva, upalnu bolest zdjelice, infekcija klamidijom, legionarnu bolest, crijevnu amebiju. Koristi se u obliku tableta i kapsula. Uobičajena doza za odrasle je 1 do 4 g tijekom 7 ili 21 dan. Mogu se javiti mučnina, bolovi u trbuhu i proljev, ali jači simptomi su vrlo rijetki.<sup>33</sup> Na **Slici 9** prikazana je njegova molekulska struktura.



**Slika 9.** Struktura eritromicina<sup>34</sup>

#### 2.1.2.4. Klaritromicin

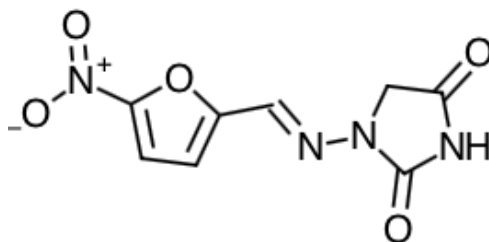
U SAD-u čini 3 milijuna receptata godišnje. Koristi se za liječenje respiratornih infekcija, bronhitisa, infekcije tkiva i kože. Dostupan je u obliku tableta. Daje se u situacijama kao što je profilaksa protiv kompleksa mikobakterija avium kod bolesnika s HIV-om. Može izazvati nuspojave poput osipa, vrtoglavice, mučnine, proljeva.<sup>35</sup> Na **Slici 10** je prikazana njegova molekulska struktura.



**Slika 10.** Struktura klaritromicina<sup>36</sup>

### 2.1.2.5. Nitrofurantoin

Nitrofurantoin je sintetički nitrofuran koji se koristi za liječenje i prevenciju infekcije mokraćnih puteva. Bakterije smanjuju djelovanje nitrofurantoina brže nego stanice sisavaca i predstavlja selektivnu antimikrobnu aktivnost spoja. Bakterije osjetljive na lijek rijetko postaju otporne tijekom terapije. Aktivan je protiv mnogih sojeva enterokoka i *E.coli*. Spriječava razvoj bakterija za mnoge mikroorganizme pri koncentraciji od 32 µg/mL. Antibakterijska aktivnost je veća u kiselom urinu. Poluživot u plazmi je od 0,3 do 1 sat. Oko 40 % nitrofurantoina izlučuje se nepromjenjeno putem urina. Ne preporučuje se za liječenje upale prostate i pijelonefritisa.<sup>13</sup> Mogu se koristiti u obliku oralnih suspenzija koje sadrže mikrokristale ili u obliku tableta te kapsula koji sadrže makrocikličke sastojke. Uzorkuje oštećenja jetre i pluća kod dugotrajnog korištenja.<sup>37</sup> Na **Slici 11** je prikazana njegova molekulska struktura.



**Slika 11.** Struktura nitrofurantoina<sup>38</sup>

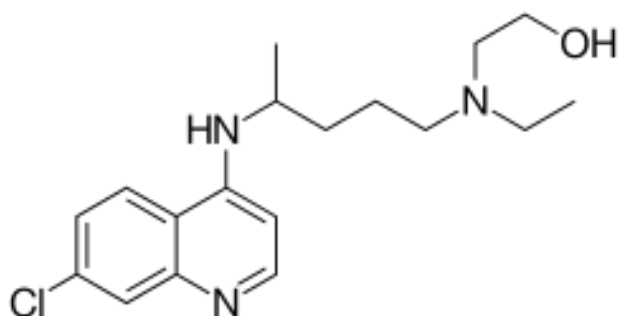
### 2.1.3. Kemoterapeutici

Obuhvaćaju skupinu lijekova za liječenje raka koji su selektivno destruktivni za maligna tkiva i stanice. Također mogu predstavljati lijekove koji su selektivno toksični za virus ili bakteriju.<sup>39</sup> Dijele se na: alkilirajuća sredstva, protutumorski antibiotici, antimetaboli, antimitotički agensi, antimetaboliti, imunosupresivna sredstva.<sup>40</sup> Kemoterapeutici su izrazito toksični, mučnine mogu biti jake i čak trajati tjednima. Zato mnogi pacijenti odustaju od ove vrste terapije karcinoma.<sup>41</sup>

#### 2.1.3.1. Hidroksiklorokin

Sintetički lijek koji se koristi zbog svojih antimalarijskih svojstava, aktivnost je proporcionalna klorokinu, ali je manje toksičan za oči. Koristi se za liječenje kroničnih autoimunih bolesti (reumatoidni i sistemski eritematozni lupus)<sup>42</sup> i smatra se potencijalnim lijekom za liječenje

tumora dojke i limfoma. Mehanizam djelovanja hidroksiklorokina temelji se na njegovoj sposobnosti vezivanja i mijenjanja DNK-a. Nakuplja se u bijelim krvnim stanicama, stabilizira lizosomalne membrane i inhibira aktivnost enzima.<sup>43</sup> Na **Slici 12** je prikazana njegova molekulska struktura.



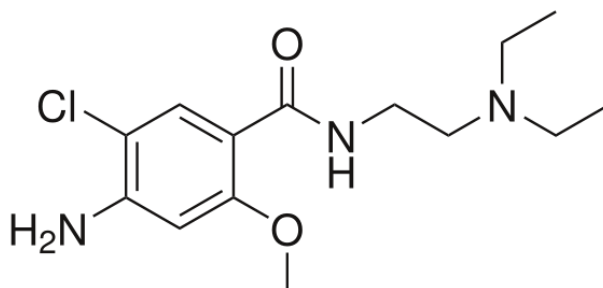
**Slika 12.** Struktura hidroksiklorokina<sup>44</sup>

#### 2.1.4. Antiemetici

Lijekovi za spriječavanje povraćanja i liječenje njegovih posljedica.<sup>45</sup> Djeluju na centar za povraćanje, neovisno o uzroku povraćanja. Biramo ih prema tipu i uzroku simptoma, a kako bi se prikladno liječili potrebna je njihova kombinacija. Primjena antiemetika je opravdana kad nije moguće drugačije zaustaviti povraćanje.<sup>46</sup>

##### 2.1.4.1. Metoklopramid

Antagonist dopaminskih receptora u kemoreptorskoj zoni, povisuje prag podražljivosti i osjetljivosti te pripada prvoj grupi antiemetika. Djeluje na glatke mišićne stanice i povećava tonus donjeg ezofagealnog sfinktera, relaksira antrum, pilorus i bulbus duodenuma, povećava peristaltiku. Kod većih doza izaziva agitiranost pacijenta. Nuspojave su epilepsija, potpuna crijevna opstrukcija i perforacija probavnog sustava.<sup>46</sup> Metoklopramid je jedno od najstarijih prokinetičkih sredstava. Njegova primjena uzrokuje koordinirane kontrakcije koje poboljšavaju tranzit. Njegovi učinci odnose se na gornji probavni trakt. Brzo se apsorbira nakon oralnog uzimanja, izlučuje se urinom s poluživotom od 4 do 6 sati.<sup>13</sup> Koristi se za liječenje sporog pražnjenja želuca kod osoba koje boluju od dijabetesa što uzrokuje mučninu, žgaravicu, povraćanje, gubitak apetita.<sup>47</sup> Na **Slici 13** je prikazana njegova molekulska struktura.



Slika 13. Struktura metoklopramida<sup>48</sup>

### 2.3. Priprava uzoraka za analizu

Analiza realnih uzoraka iz okoliša ili iz industrije (voda, sediment, tlo, aktivni mulj, biološki materijal) sastoji se od pet koraka:

- uzorkovanje,
- priprava uzorka,
- odjeljivanje analita,
- detekciju,
- procjena mjernih podataka pomoću kojih dobivamo informacije o identifikaciji uzorka i kvantitivnom sastavu.

Kako bi proveli pravilnu pripravu uzorka potrebno je prevesti realni uzorak u uzorak pogodan za analizu, pri čemu treba izbjeći interakcije sastojaka uzorka s okolinom. One ovise o kemijskim i fizikalnim svojstvima matice i analita uzorka pa mogu utjecati na djelotvornost, primjenjivost i ponovljivost postupaka pripreme uzorka.

Priprava uzoraka mora biti uklađena s ciljem analize, uzimajući u obzir instrumente kojima se analiziraju. Pritom se nastoji:

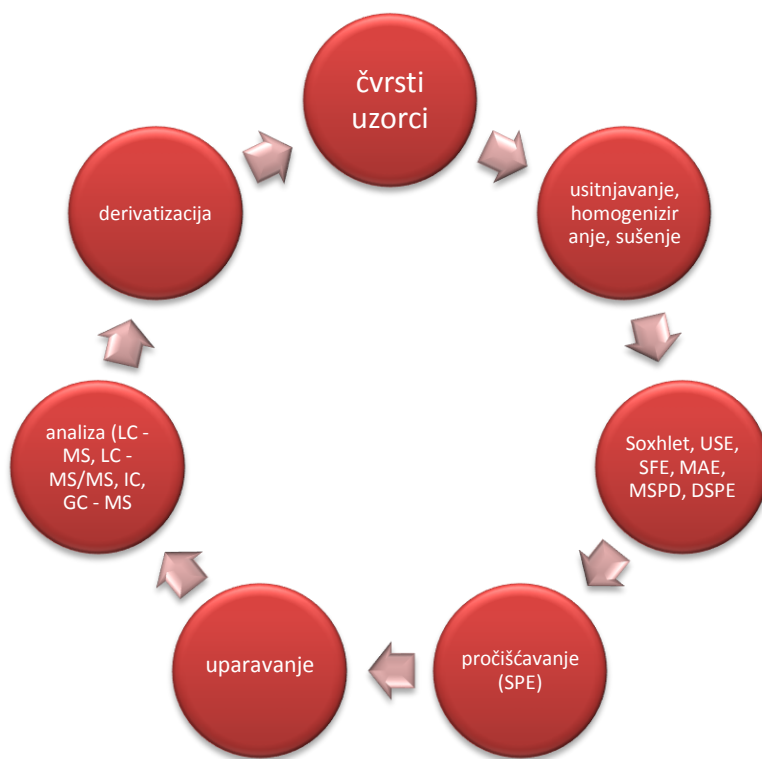
- povećati koncentraciju analita da se dostigne granica detekcije ili kvantifikacije uzorka,
- povećati selektivnost metode uklanjanjem interferencija iz matice uzorka,
- osigurati otpornost i ponovljivost metode kako bi bila neovisna o promjeni matičnog uzorka,
- prevesti analit u najbolji mogući oblik za određivanje i odjeljivanje.



Razvoj novih metoda pripreme uzorka razvijene su zbog:

- veće selektivnosti postupka,
- upotrebe manje količine organskih otapala,
- upotrebe manje početne količine uzorka,
- povećavanju mogućnosti automatizacije ili izravnog povezivanja s mjernom metodom, čime se smanjuje utjecaj sustavne pogreške.<sup>49</sup>

U ovom radu provedena je priprema čvrstih uzoraka aktivnog mulja za kromatografsku analizu farmaceutika. Na **Slici 14** je prikazan postupak pripreme uzoraka s obzirom na agregacijsko stanje.



**Slika 14.** Prikaz mogućih postupaka pripreme uzorka s obzirom na agregacijsko stanje<sup>49</sup>

Čvrsti uzorci nisu homogeni što zahtijeva složeniji i individualniji pristup pripremi uzorka jer se oni prije otapanja moraju usitnuti i homogenizirati.

### **2.3.1. Klasične metode ekstrakcije**

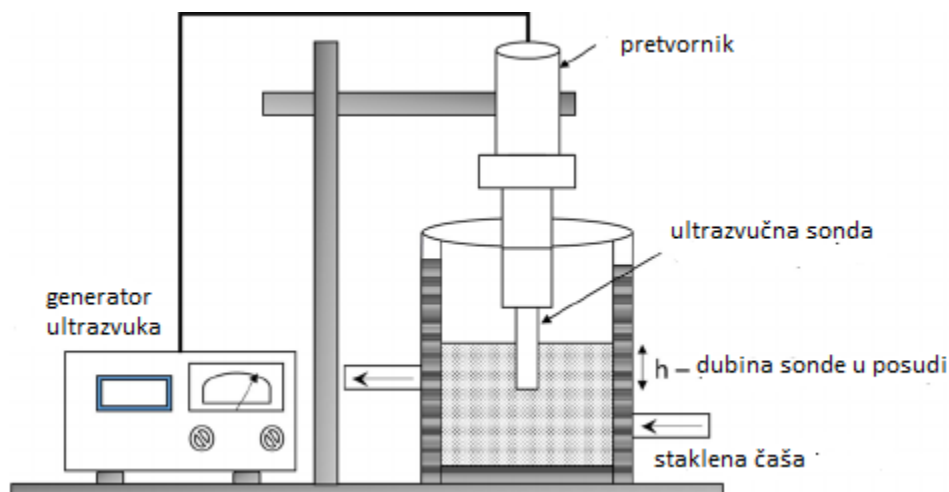
Ekstrakcija analita iz matice uzorka zahtijeva pravi omjer metode i otapala. Većina metoda prisutne su već stotinu godina, testirane i prihvaćene od mnogih znanstvenika. Većina metoda koristi organska otapala, nekad i u ogromnim količinama, iako se nastoji prilagoditi ove sustave kako bi se smanjila potreba za otapalom i uzorcima.<sup>49</sup> Djelotvornost ekstrakcije ovisi o tri čimbenika: matici uzorka, topljivosti i prijenosu mase. Matica uzorka može djelovati na djelotvornost ekstrakcije i ekstrakciju analita. Topljivost analita ovisi o temperaturi, tlaku i vrsti otapala prilikom prijenosa analita iz uzorka u otapalo. To uključuje prodiranje otapala u maticu uzorka i uklanjanje analita s adsorbirane površine, što ovisi o veličini čestice uzorka, strukturi matice i koeficijentu difuzije. Prijenosu analita pogoduju visoki tlak i temperatura, mala veličina čestica i niska viskoznost otapala. Izbor otapala ovisi o matici uzorka i prirodi analita. Klasične metode uključuju Soxhlet ekstrakciju, ultrazvučnu ekstrakciju. Postupak se provodi pri atmosferskom tlaku i temperaturi, uz djelovanje ultrazvuka ili grijanje pri čemu se troši velika količina otapala i ekstrakcija dugo traje. Ekstrakti tla, mulja i otpada potrebno je prethodno pročistiti kako bi se uklonili sastojci koji mogu uzrokovati sustavnu pogrešku određivanja, uništenje opreme, onečišćenje i pogoršanje kromatografskog razlučivanja.

#### ***2.3.1.1. Ekstrakcija čvrsto-tekuće***

Ekstrakcija čvrsto-tekuće provodi se na različite načine (sonizacija, metoda mućkanjem, Soxhlet ekstrakcija). Metoda mućkanja je metoda ekstrakcije koja se koristi u ovom radu. Metoda mućkanjem uključuje dodatak otapala (razrijeđena kiselina ili baza za anorganske komponente i organska otapala za organske komponente) uzorku, mućkanje dozvoljava analitu da se otopi u tekućini koja ga okružuje sve dok je to moguće. Ova metoda je valjana dok je analit topljiv u otapalu za ekstrakciju i dok je uzorak porozan. Kako bi se postigao bolji kontakt čvrsto-tekuće, uzorci moraju biti dobro usitnjeni. Refluksiranje ili zagrijavanje uzorka u vrućem otapalu koristi se kako bi se ubrzao proces ekstrakcije. Metoda mućkanja može se provoditi u serijama čime se povećava ukupna propusnost uzorka. Kad se analiti uklone, netopljiv sadržaj se uklanja centrifugiranjem ili filtriranjem.

### 2.3.1.2. Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija se koristi kako bi se dobila potpuna i brža ekstrakcija. Ultrazvuk pruža bolji kontakt između čvrste i tekuće faze, blago grijanje rezultat je ultrazvuka doprinosi procesu ekstrakcije.<sup>50</sup> Uzorak se kratko izlaže velikoj količini energije pri čemu se povisuje tlak. Frekvencija ultrazvuka koji se primjenjuje u ekstrakciji je 20-100 kHz što dovodi do kavitacije (stvaranje, rast i snažan raspad šupljina u tekućini). Ultrazvučnom ekstrakcijom se smanjuje volumen otapala (do 100 mL) i vrijeme ekstrakcije (10-45 min). Omogućuje ekstrahiranje velike mase uzorka (2-30 g). Metoda je brza i jednostavna, ali se postiže niža djelotvornost ekstrakcije nego s ostalim metodama. Nakon ekstrakcije, ekstrakti se filtriraju, upare i pročiste. Djelotvorna je u analizi ostataka antibiotika i sastojaka hrane, određivanje lipida pri cvjetanju mora, određivanje pesticida i dioksina u uzorcima sedimenta i tla.<sup>49</sup> Na **Slici 15** je prikazana shema rada ultrasonične ekstrakcije.



**Slika 15.** Prikaz rada ultrasonične ekstrakcije<sup>51</sup>

### 2.3.1.3. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija je spora metoda pripreve uzorka koja se primjenjivala do 1980.-ih godina kada su je zamijenile moderne metode. Temelji se na kontinuiranom uparavanju, kondenziranju, prolazu pogodnog otapala kroz uzorak, postupak traje od 6 do 48 h, zahtijeva upotrebu velikog

volumena organskog otapala i velike količine uzorka. Zato nakon ekstrakcije otapalo treba upariti radi koncentriranja analita, neposredno prije pročišćavanja dobivenih ekstrakata i analize.

### **2.3.2. Moderne metode ekstrakcije**

Iako su analitičari bili zadovoljni dosadašnjim metodama ekstrakcije, no kako bi se povećala produktivnost i provela automatizacija te ubrzala analiza razvijene su nove moderne metode ekstrakcije. Neke metode su automatizirale klasične metode i tako ih ubrzale te olakšale njihovo korištenje. Iako su novije metode skuplje pri početnoj kupnji, jeftinije su što se tiče troškova po jednom uzorku.<sup>50</sup>

#### ***2.3.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija***

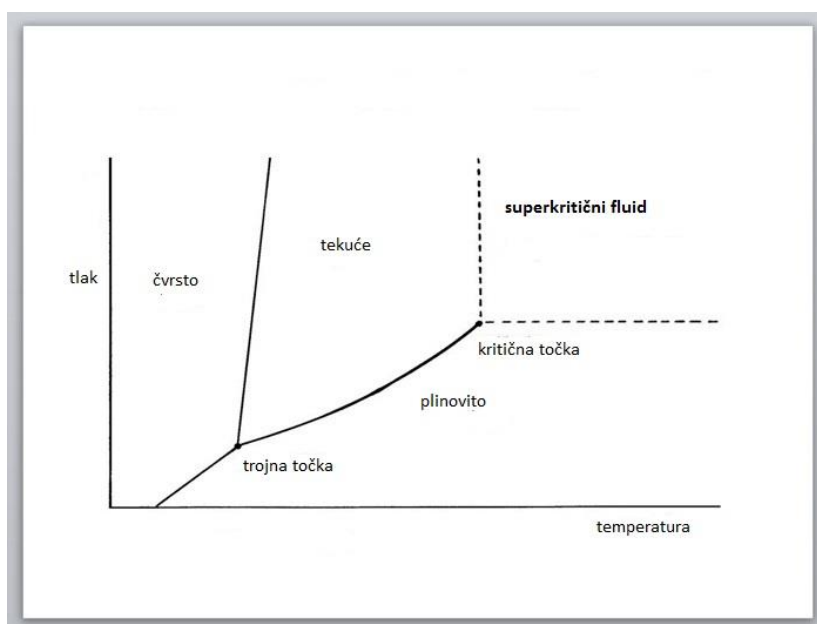
Automatizirana Soxhlet ekstrakcija smanjila je volumen otapala, a povećala brzinu ekstrakcije. Kod ove ekstrakcije uzorak se uranja u vruće otapalo. Temperatura ovog otapala je niža od temperature vrelišta otapala i zato je potrebno duže vrijeme ekstrakcije. Primjenjuje se za ekstrakciju masti u mesu, polikloriranih bifenila, aditiva u plastici i gumi, pesticida u zobenoj kaši, masti u čipsu, masnoća i ulja u tlu.<sup>50</sup> Ova ekstrakcija poznata je i pod nazivom Soxtec. Ova ekstrakcija je brža zbog boljeg kontakta između uzorka i otapala pa je i prijenos mase bolji. Primjenom ove ekstrakcije vrijeme ekstrakcije je smanjeno na 2-3 sata, a volumen otapala s 250-500 mL na 40-50 mL po ekstrakciji. Moguća je ekstrakcija više uzoraka.<sup>49</sup>

#### ***2.3.2.2. Ekstrakcija superkritičnim fluidom***

Superkritični fluid je bilo koja tvar iznad svog kritičnog tlaka i kritične temperature. Ima jedinstvena svojstva koja se razlikuju od tekućina i plinova. Ima svojstvo tekućine da otapa materijale i svojstvo plina da prodire u svaku poru. Topljivost raste porastom gustoće.<sup>52</sup> Omogućuje određivanje organskih sastojaka u uzorcima tla, vode i sedimenta. Prednosti su:

- promjenom temperature i tlaka može se utjecati na jakost otapala što je korisno za ekstrakciju složenih uzoraka,
- imaju nižu viskoznost i više difuzijske koeficijente od tekućih otapala što dovodi do brže kinetike i bolje topljivosti analita,
- dotok svježeg fluida je kontinuiran čime se omogućuje kvalitativnost ekstrakcije.

Dodatne prednosti su kraće trajanje ekstrakcije (30-75 min), smanjenje volumena opasnih otapala (5-10 mL) zbog primjene fluida koji nisu zapaljivi i otrovni, manja masa uzorka (2-20 g) i mogućnost povezivanja s plinskim i tekućinskim kromatografom. Dobivene ekstrakte ne treba filtrirati jer već sadrže poroznu keramičku pločicu. Kao superkritični fluidi koriste se  $N_2O$ ,  $C_2H_6$ ,  $CO_2$ ,  $C_3H_8$ ,  $NH_3$ ,  $n-C_5H_{12}$ ,  $CHF_3$ ,  $SF_6$ , voda i  $CHClF_2$ . Najčešće se koristi  $CO_2$  jer superkritične uvjete postiže vrlo brzo, nezapaljiv, nisko toksičan, pristupačna cijena, visoka čistoća. Nedostatak je ograničena primjena za ekstrakciju nepolarnih i umjereno polarnih analita. Za polarne analite bolji su izbor  $N_2O$  i  $CHClF_2$ , ali su štetni za okoliš. Na jakost otapanja  $CO_2$  i drugih fluida može se utjecati dodatkom malih količina (1-10 %) metanola, acetonitrila i etanola. Temperaturu i tlak treba podesiti da smjesa bude jednofazna. Velika prednost ekstrakcije superkritičnim fluidom što je većina fluida pri sobnoj temperaturi plinovita, pa analiti prelaze u otopinu uvođenjem male količine otapala ili sniženjem tlaka.<sup>49</sup> Na **Slici 16** je prikazan fazni dijagram  $CO_2$  kao superkritičnog fluida.



**Slika 16.** Fazni dijagram  $CO_2$ <sup>53</sup>

### 2.3.2.3. Mikrovalna ekstrakcija

Ekstrakcija mikrovalovima je alternativna klasičnim metodama ekstrakcije otapalom. Kemijski spojevi apsorbiraju mikrovalno zračenje proporcionalno njihovim dielektričnim konstantama. Što je veća dielektrična konstanta veća je apsorpcija mikrovalne energije. Postoje dva granična pristupa ekstrakciji mikrovalovima: primjena otapala koja ne apsorbira mikrovalove i ima malu dielektričnu konstantu i primjena otapala koja apsorbira mikrovalove i ima veliku dielektričnu konstantu. Otapalo i uzorak smješteni su zajedno u zatvorenu posudu kod primjene otapala koje apsorbira mikrovalove. Pod mikrovalnim zračenjem otapalo se zagrije iznad točke vrenja i omogućuje brzu ekstrakciju analita pod umjerenim tlakom. Ovakva ekstrakcija koristi se za ekstrakciju pesticida, polimernih aditiva, polikloriranih bifenila iz sedimenta i tla te vitamina iz hrane. Kod primjene otapala koja ne apsorbiraju mikrovalove uzorak i otapalo smješteni su u otvorenu posudu. Otapalo ne postaje vruće jer ne apsorbira mikrovalove. Uzorak, koji sadrži vodu ili neku drugu komponentu s velikom dielektričnom konstantom, apsorbira mikrovalove i mogu otpustiti zagrijane analite u otapalo koje je hladno i koje je odabrano tako da su oni topivi u njemu. Provodi se pod atmosferskim ili niskim tlakovima. Koristi se za ekstrakciju eteričnih ulja iz biljaka (menta, cedar, komponente sa sumporom iz češnjaka), organokloropesticidi iz sedimenta, lipidi iz riba.<sup>50</sup> Temperatura ekstrakcije je 50-150 °C, tlak 1-5 MPa. Može se ekstrahirati više uzoraka odjednom, traje kratko (10-20 min) i troši malo otapala (10-30 mL). Smanjenje djelotvornosti ekstrakcije uzrokuju toplinski labilni sastojci koji se porastom vremena i temperature razgrađuju. Nedostatak mikrovalne ekstrakcije je nemogućnost uporabe otapala koja nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima. Drugi nedostatak je manja selektivnost u odnosu na ekstrakciju sa superkritičnim fluidom, pa je zbog koekstrakcije interferirajućih sastojaka ekstrakti se moraju dodatno pročišćavati prije analize.<sup>49</sup> Na **Slici 17** je prikazan uređaj za mikrovalnu ekstrakciju.



**Slika 17.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju<sup>54</sup>

#### ***2.3.2.4. Poboljšana ekstrakcija otapalom***

Ubrzana ekstrakcija otapalom, koristi organska otapala pod tlakom pri visokom temperaturi. Aparatura se sastoji od: ekstrakcijske posude koja ima automatski sustav zatvaranja kako bi izdržala stvoren tlak, pumpe koja pumpa otapalo, pećnice koja zagrijava uzorak i vijalice u kojoj se skupljaju ekstrakti. Proces se sastoji od: 1) punjenje ćelije za uzorke, 2) dodatak otapala i održavanje tlaka, 3) zagrijavanje ćelije s uzorkom (pod stalnim tlakom), 4) statična ekstrakcija, 5) prijenos ekstrakta u vijalu s novim izljevom čvrstog uzorka, 6) čišćenje ćelije dušikom, 7) dodatak novog uzorka. Jednom kad se uzorak stavi u ekstrakcijsku ćeliju proces je vremenski programiran i automatiziran. Mogu se istovremeno provesti 24 uzorka. Ekstrakcija koristi vrlo malo otapala (10-20 mL) i traje kratko (10-20 min).<sup>50</sup>

## **2.4. Kromatografska analiza farmaceutika**

Začetnik kromatografije je M. Cvet koji je dao naziv toj tehnici koja se počela primjenjivati 1930.-ih godina. Plinsku kromatografiju uveli su 1951. godine A. J. P. Martin i A. T. James, a tankoslojnu 1958. godine E. Stahl. Instrumentalna tekućinska kromatografija počela se razvijati nakon 1965. godine. Kromatografija je jedna od najraširenijih i najvažnijih analitičkih metoda čija se načela primjenjuju u rutinskim analizama uzoraka iz okoliša, znanstvenim istraživanjima, biomedicinskim ispitivanjima, praćenju produkata organske sinteze, ispitivanju čistoće lijekova, forenzičkoj analizi. Kromatografski sustav čini pokretna i nepokretna faza te ispitivana tvar koja

tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Ispitivana tvar putuje s pokretnom fazom, zadržavajući se s vremenom na vrijeme u nepokretnoj fazi. Da bi došlo do razdvajanja sastojaka smjese nepokretna faza mora različito dugo i selektivno zadržavati sastojke smjese.

Kromatografske tehnike s obzirom na prirodu ravnoteže između nepokretne i pokretne faze mogu se podijeliti na:

- *razdjelnu kromatografiju* – kada se ravnoteža uspostavlja između pokretne faze (tekućina ili superkritični fluid) i tekuće nepokretne faze vezane na inertni čvrsti nosač,
- *ionsko-izmjenjivačka kromatografija* – izmjena iona analiziranog spoja s ionima nepokretne faze,
- *adsorpcijska kromatografija* – ravnoteža između plina ili tekućine u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa,
- *afinitetna kromatografija* – do vezivanja dolazi zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze,
- *kromatografija isključenjem po veličini* – nepokretna faza je materijal s porama sa slabim adsorpcijskim svojstvom i porama definiranih dimenzija, a odjeljivanje molekula zbiva se zbog razlike u volumenu i molekulskoj masi.

U ovom radu koristila se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa spektrometrom masa (HPLC-MS/MS). Pokretna faza u tekućinskog kromatografiji je tekućina male viskoznosti. U tekućinsku kromatografiju ubrajamo tankoslojnu kromatografiju, tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti, kromatografiju ultravisoke djelotvornosti, ionsku kromatografiju i kromatografiju isključenjem po veličini.



### 2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Može se provoditi u otvorenom ili zatvorenom sustavu tj. u stupcu ili na kromatografskoj ploči. Osnovni dijelovi su spremnici za otapala pokretne faze, pretkolona, kolona, crpka i detektor.

Crpka ubacuje pokretnu fazu u stupac pod visokim tlakom stalnom brzinom (0,1-10 mL/min), a uzorak se automatskim dodavanjem unosi u sustav za injektiranje u kojoj se održava stalan tlak. Otapalo prolazi kroz injektor te nosi uzorak u kolonu u kojoj je obično cijev od nehrđajućeg čelika, duljine 50-250 mm, unutarnjeg promjera 2-4,6 mm, punjena česticama veličine 1,7-5  $\mu\text{m}$ . Za dulje trajanje kolone trebalo bi koristiti pretkolonu.<sup>49</sup>

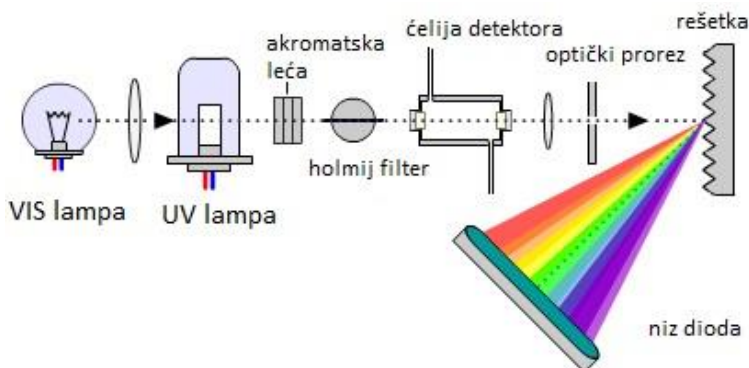
Uloga detektora je dati točnu informaciju na izlazu iz kolone. Iako postoje različite vrste detektora zajedničko im je električni signal koji daju, a koji je proporcionalan nekom svojstvu analita. Odziv detektora proporcionalan je svojstvu analita. Karakteristike dobrog detektora: mali unutarnji volumen da se smanji širenje vrpce, osjetljivost, široki linearni raspon odziva, stabilnost i reproducibilnost, neosjetljivost na promjene temperature i tlaka, visoka pouzdanost i jednostavnost za korištenje.<sup>55</sup>

Važni detektori su spektrometar masa, detektori na osnovi molekulske fluorescencije, indeksa loma, spektrofotometrijski detektori u UV/VID području elektromagnetskog spektra, elektrokemijski detektori. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari. U prvom se slučaju mjeri provodnost ili indeks loma pa se otopljeni analit dokazuje neizravno iz promjene tih veličina. U drugom slučaju se prate karakteristike otopljene tvari (struja na elektrodi, fluorescencija, apsorpcija u UV/VID ili IR području).<sup>49</sup> Postoje tri vrste detektora: s promjenjivom valnom duljinom, s fiksnom valnom duljinom i s nizom dioda (DAD).<sup>50</sup> Princip rada detektora s nizom dioda: svjetlost iz deutrijeve svjetiljke usmjerena je s prozirnóm lećom tako da cijeli snop svjetla prolazi kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Na taj način se uzorak podvrgava svjetlu svih valnih duljina koje generira svjetiljka. Raspršena svjetlost iz rešetke usmjerena je na niz dioda. Niz može sadržavati stotine dioda i izlaz iz svake diode je računalo, a podaci su spremljeni na tvrdi disk. Spektar otopljene tvari može se dobiti tako da se otvori iz memorije izlaz za svaku diodu odnosno da dobijemo krivulju koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Nedostatak ovog tipa detektora je ograničenost broja dioda u nizu dioda.<sup>56</sup>

Kromatografija je tehnika u kojoj otopljene tvari se rastapaju u pokretnoj fazi pri različitim brzinama kako prolaze kroz kromatografsku kolonu. Njihovo razdvajanje se zasniva na raspodjeli između nepokretne i pokretne faze. Kako bi tekućinska kromatografija bila uspješna potrebna je prava kombinacija iz različitih radnih uvjeta kao što su duljina i promjer kolone, temperatura kolone i količina uzorka, vrsta punjenja kolone i pokretne faze, protok pokretne faze.<sup>50</sup> Na **Slici 18** su prikazani dijelovi sustava kromatografije visoke djelotvornosti, a na **Slici 19** način djelovanja detektora s nizom dioda.



**Slika 18.** Dijelovi sustava kromatografije visoke djelotvornosti<sup>55</sup>

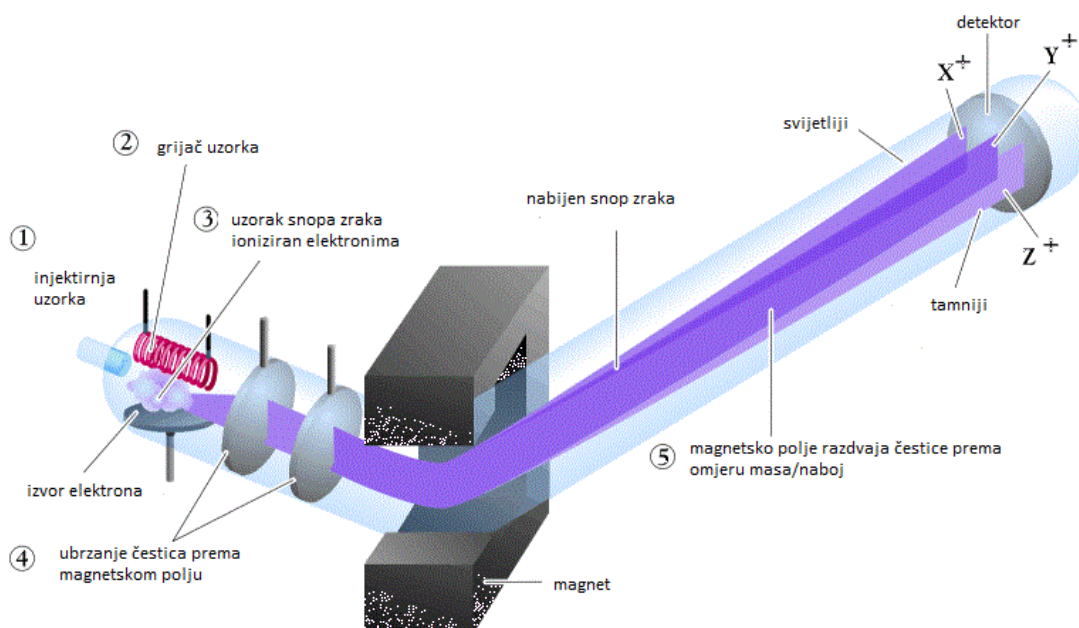


**Slika 19.** Detektor s nizom dioda<sup>57</sup>

## 2.4.2. Spektrometar masa

Jedan je od važnijih HPLC detektora jer generira informacije o molekulskoj i strukturnoj masi u eluiranim otopinama. Kombinacijom HPLC i MS-a omogućuje se odvajanje i identifikaciju u istom koraku. Brzina protoka u HPLC-u je reda veličine 1 mL/min što je dvije do tri reda veličine veće od brzine protoka kod konvencionalnih MS.<sup>50</sup>

Spektrometrija masa pruža kvantitativnu i kvalitativnu informaciju o anorganskom i organskom materijalu, uključujući molekulsku strukturu, elementarni sastav, sastav smjesa. Koristi se u različitim granama znanosti kao što su biologija, medicina, kemija (organska, analitička, fizikalna i anorganska) i znanost o materijalima. Spektrometar masa pretvara neutralne molekule u nabijene čestice, negativnog ili pozitivnog naboja, i razvrstava ih prema njihovom omjeru mase i naboja ( $m/z$ ). Tehnika je osjetljiva i specifična za identificiranje ili detekciju nepoznatih komponenti. Svaki spektrometar ima vakuumski sustav koji obuhvaća većinu sustava ovisno o načinu unošenja uzorka. Tu se još nalazi ionski izvor, sustav za unošenje uzorka, jedan ili više analizatora, detektor, računalo. Računalo služi za prikupljanje, obradu podataka i njihov prikaz te upravljanje uvjetima na instrumentu.<sup>55</sup>



Slika 20. Spektrometar masa<sup>58</sup>

### 2.4.3. Pregled literature za istraživane farmaceutike

Prije nego se krenulo na eksperimentalni dio proučena je literatura unatrag 25 godine sa svrhom da se prouči koji su sve uvjeti pripreme uzoraka i metode određivanja ispitivanih farmaceutika primjenjivani do sada. Iz literature je vidljivo da ispitivana smjesa farmaceutika do sada nije istraživana nit u jednom radu, pri čemu na uzorcima aktivnog mulja moglo se naći radove samo za azitromicin (**Tablica 1.**).

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina

Albendazol (antihelmintik)						
Uzorak	Priprema uzorka	Detektor	Kolona	Pokretna faza	Godina	Ref.
<i>Mišja plazma</i>	100 µL plazme preneseno u 15 mL PP epruvetu, plazmi je dodan ALB, zatim reagens (10 mL 4 M K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 11), 50 mL DMSO, 40 mL natrijev metabisulfit (4 mg/mL), and 1 mL etilacetat, miješani 30 s, centrifugiranje 15 min, 1,70 mL alikvota suši se pod strujom dušika u vodenoj kupki pri 50 °C, uzorci su otopljeni u 100 µL pokretne faze miješani 30 s, centrifuga 5 min; 25 µL injektiran u HPLC; m= 2-25 mg, V= 10-25 mL (razrjeđen s 9:1 acetonitril: DMSO)	fluorescentna dioda (290-330 nm), UV detektor 290 nm	Phenomenex C18,(2) Luna, 5 µm, 150 × 4,6 mm (Phenomenex, Torrance, CA, USA)	amonij acetat (50 mM, pH 5); ACN: metanol (55:30:15)	2011.	59
<i>Kravlje mlijeko</i>	1 L mlijeka pomiješana sa sorbensom (Lichrosorb RP18), ispran s 3 mL pufera (0,005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 2,3) eluiranje s 5 mL heksana, 2 mL acetonitril:pufer 75:25 v:v, 0,005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 2,3) ; 2.75 mL pufera (0,005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 3,5) dodano uzorku, centrifugiranje (10 min, 4000 okr/min), 100 µL injektirano st. otopina: 2,5 mg komponente u 25 mL pufer/acetonitril 80/20 v/v	UV: 290 nm granica detekcije(10 ng/mL mlijeka)	µ-Bondapak C-18 (3,9 × 300 mm) Waters, Milford, USA	pufer (0,005 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 3,5): ACN: metanol (770/170/6 v/v/v) 1 mL/min	1998.	60
<i>Voda (bolnice, domaćinstva, rijeka, more)</i>	100 mL uzoraka vode špakano s 40 ng (Na <sub>2</sub> EDTA-2H <sub>2</sub> O) i 20 µL st. ot. (sulfatiazol-d <sub>4</sub> i <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -ibuprofen; 10 ng/L), SPE kartuše prekondicionirani s MTBE-om, MeOH i H <sub>2</sub> O, sušenje 20 min, sušene kartuše eluirai s 10 % MeOH/MTBE/MeOH	LC/MS/MS	-	-	2013.	61

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak I)

<b>Albendazol (antihelmintik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref</b>
<i>Fekalije</i>	SPE kartuše hidrirane s fosfatnim puferom (2 mL), 13 test kartuša dodano alikvot (400 µL) ot. API (50 mg/L, clofibrate, diklofenak, oksitetraciklin), eluirano dvaput fosfatni puferom (2 mL), preneseno u vijale za HPLC	Agilent 1100 (HPLC sustav), UV detektor (200 – 350 nm)	Gemini C18 (Phenomenex, Macclesfield, UK) 150 mm × 4 mm, 3 µm, 40 °C, 0,7 mL/min	fosfatni pufer 0,01 M, pH 3): ACN (90:10) s postupnim povećanjem ACN od 10 do 70 % kroz 10 min	2014.	62
<i>Veterinarski farmaceutici</i>	temeljna otopina ALB i PZK dobivena otapanjem 13,3 i 15,6 mg i razrijeđena do 50 mL HCl ( $6 \times 10^{-3}$ mol/L) u otopini metanola	UV-1603 spektrofotometar (190-350 nm)	-	-	2010.	63
<i>Plazma jajnika ovce</i>	fosfatni pufer degaziran 15 min u UV kupki, temeljna ot. pripremljene u metanol pri konc. od 0,1 mg/mL, spremljene u hladnjak pri 4 °C, st. ot. pripremljena razrjeđenjem 5 mL temeljne ot. s mješavinom metanol: voda 50:50, uzorci plazme centrifugirani pri 3900 okr/min, 10 min, alikvot 0,5 mL	Dynamax UV-1, UV vidljivi detektor	LiChroCart kolona(125 × 4 mm) pretkolona (4 × 4 mm) Gilson 715 HPLC kontrolor sustava	ACN: fosfatni pufer (pH 6) 10:50,1 % (12,30 min) 50.1:66,9 1,70 min, 35 °C, 1 mL/min, 295 nm	2000.	64
<i>Dudov svilac</i>	uzorci homogenizirani prije ekstrakcije (etil acetat : ACN 1:5) centrifugiranje 10 000 okr/min, 4 °C, 5 min	UFLC-MS/MS; UFLC (SHIMADZU) ,API 4000 MS	Agilent ZORBAX C18 (4,6 × 100 mm, 3,5 µm), 40 °C, 0,2 mL/min	ACN: 0,005 mol/L mravlja kis 85 %/15 %, injektirano 10 µL	2014.	65
<i>Mineralno organsko gnojivo</i>	-	UVD 340 U, 292 nm	RP-18, pretkolona RP-18 Hypersil Gold	fosfatni pufer:ACN (50:50) (15 mmol K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 3,8)	2013.	66
<i>Voda, kravlje mlijeko, med, urin</i>	otapala: 1-dodekanol, 2-undekanol, 1-dekanol; uzorci vode filtrirani kroz 0,45 µm filtre, pH 8 (fosfatni pufer), uzorci urina: otopljeni na sobnu temp, centrifuga (15 min, 5000 okr/min), filtrirani; uzorci mlijeka: 5 mL mlijeka miješano s 4 mL 3 % ACS u 15 mL vijali, miješano 15 min, centrifuga 4000 okr/min, 10 min; uzorci meda: 1g uzorka razrj. do 10 mL s 0,5 mL fosfatnog pufera (pH 8) i vodom HPLC čistoće, miješano 4 s	Knauer HPLC sustav, RF-10AXL (Shimadzu Japan), 290-330 nm	Nucleosil C18 (250 mm × 4,6 mm, 5 µm), 0,9 mL/min, 40 °C	metanol:voda (80:20)	2016.	67

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak II)

<b>Febantel (antihelmintik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Otpadna voda, farmaceutska industrija</i>	poboljšani solvent: 5 mL metanola, 5 mL vode; elution solvent: 2 × 5 mL metanola; sorbent: StrataX (500 mg, 3 mL) pH 4 (0,1 M HCl)	ESI(+)-MS/MS	Synergy Fusion (150 × 2 mm, 4 μm)	0,01 % mravlje kiseline tekuće stanje, ACN, gradient	2011.	12
<i>Sediment</i>	sediment 1 i 5 g, 1 mL standardne otopine farmaceutika i 3 mL metanola (ishlapi preko noći), 15 mL otapala (etanol, metanol, voda, acetonitril), kombiniranje metanola s dioksanom i acetonotrilom, ultrazvuk, filtriranje	DAD=210 nm	Sinergy Fusion C18 kolona (150 × 2 mm, 4 μm)	0,01 % mravlja kiseline u MilliQ vodi i 0,01 % mravlja kiseline u acetonotrilu 0,2 mL/min	2012.	68
<i>Sediment</i>	1 mL standardne otopine i 3 mL metanola (hlapi preko noći), 15 mL otapala (voda, etanol, metanol, aceton), kombiniranje metanola s acetonotrilom i dioksanom, ultrazvuk, filtriranje	DAD=210 nm	Inter Sustain C18 (250 × 4,6 mm, 5 μm), Synergy Fusion RP80A (150 × 2,0 mm, 4 μm), LiChrospher 100 (125 × 4 mm, 5 μm), Inter Sustain C18 (2,1 × 50 mm, 2 μm)	0,01 % mravlje kiseline u MilliQ vodi; 0,01 % mravlje kiseline u acetonotrilu, 0,7 mL/min	2012.	69
<i>Svinjetina, govedo, janjetina, govede i kozje mlijeko</i>	otapala: ACN, etil acetat, metanol, n – heksan, diklorometan uzorci (meso, jetra 1g, mlijeko 1 mL) → dodano 10 μL st. ot. (50 μg/mL) → usitnjavanje prenošenje u filtracijsku kolonu → isprano s n – heksanom (2 × 4 mL) → eluirano s CH <sub>3</sub> CN (4 mL × 2) → uparivano do suha → ostaci (otopljeni u 0,5 mL CH <sub>3</sub> CN / 0,01 M NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (1:1), filtrirano kroz 0,2 μm membrane	PDA (200-400 nm) i UV(298 nm)	Cosmosil 5C18 MS-II (5 μm, 4,6 mm × 250 mm), 1 mL/min	ACN:0,01 M amonijum dihidrogen fosfat (30:70, 70:30)	2004.	16
<b>Prazikvantel (antihelmintik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Otpadna voda</i>	-	HPLC: 217 nm; UHPLC-MS	Supelco Discovery HS C18 (100 × 4,6 mm, 5 μm); Acquity BEH C18 (50 × 2,1 mm, 1,7 μm)	acetonitril : voda 40:60 v:v, 1,5 mL/min; acetonitril (5 %) i voda. 0,3 mL/min	2015.	70
<i>Pseća plazma</i>	metanol: voda 1:1 0,5 mL plazme, alikvot 0,015 mL (10 μg/mL) st. otopine, 0,5 mL vode i 0,05 mL (0,1 M NaOH) otopine je dodano, miješanje i centrifugiranje (10 800 okr/min, 4 min), supernatant dodan na SPE kartuše kondicionirane s 1 mL MeOH i 1 mL vode, analiti eluirani s 2 × 1 mL MeOH, uparivani do suha pod strujom dušika pri 40 °C, ostaci otopljeni u pokretnom fazi (70 % A i 30 % B), miješani 1 min	Shimadzu LC-20 Prominence HPLC sistem	Gemini C6-Phenyl, 150 × 3mm	A: 50 mM (pH 3 s mravljom kiselinom) NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> B: metanol, 35 °C, 0,5 mL/min	2015.	71

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak III)

<b>Prazikvantel (antihelminetik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Pseća krv</i>	-	HPLC; GC/MS (250 °C, 6 psi, 1 mL/min)	Waters Spherisorb C18 ODS2, 5 µm, (25 cm × 4,6 mm); Mega® OV-1 kapilarna (15m × 0,18 mm, 0,1mm tankog filma), 250 °C	-	2002.	18
<i>Ljudska plazma</i>	uzorci proteina, krvi i plazme pomiješali smo s 700 µL ACN, vrtili u termomikseru 20 min pri 25 °C, 18 400 okr/min. ekstrakti su preneseni na 96 ploča (2 µm PVDF membrane), centrifugiranje (25 °C, 1500 okr/min, 10 min)	HPLC; LC-MS/MS	HALO C-18, 4,6 × 5 mm; Lux Cellulose-2 (150 × 4,6 mm, 3 µm)	10 mM amonijev acetat, 0,15 % mravlja kiselina, 0,3 mL/min; A = 20 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> u vodi, B = čisti ACN, 1,5 mL/min	2015.	72
<b>Azitromicin (makrolid)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzoraka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Aktivni mulj</i>	otapala: aceton, etil acetat; PLE ekstrakcija, ot. za ekstrakciju: MeOH:H <sub>2</sub> O (50:50), uzorak filtriran kroz filtre sa staklenim vlaknima, spremljeni na -25 °C; 500 mg mulja estrahirano s 4 i 2 mL MeOH i dva puta s 2 mL acetona, emulazije ultrasonirane 5 min, TLI špikan mulj prije prve ekstrakcije metanolom, centrifuga 3000 okr/min, 5 min	<b>USE:</b> LC/MS, TSQ Quantum Discovery (3500 V, 350 °C); <b>PSE:</b> API 4000 (5000 V, 750 °C)	<b>USE:</b> YMC Pro C18 (120 Å, 3 µm); <b>PSE:</b> Chromolith Performance RP-18e (100mm × 4,6mm), 400 µL/min, 100 °C, 100 bar;	<b>PSE:</b> voda:metanol:mravlja kis (1 % v:v); <b>USE:</b> A:voda koja sadrži 10 % ACN i amonijev acetat (10 mM) B: smjesa 80 % ACN i 20 % smjesa A	2005.	73
<i>Životinjski mišić (krava, kokoš, svinja)</i>	otapala: ACN, metanol, mravlja kis. svaki standard otopljen u metanolu da se pripremi temeljna otopina 1000 mg/L 2 g mišića špakani otopinom 10 makrolida, inkubirani 30 min na sobnoj temp, 5 mL otopine pufera natrijevog borata i 5 mL etil acetata za ekstrakciju, miješani 30 min, centrifugiranje (9000 okr/min, 5 min, 4 °C), supernatanti uparivani do suha, ostaci otopljeni u 2 mL 20 % ACN u vodi; ekstrakcija: SPE (MIP)	Agilent 1200 HPLC system, API 4000	Agilent Zorbax SB-Aq C18 (150 mm × 2,1 mm, 3,5 µm) 35 °C, 0,25 µL/min	ACN i 0,1 % mravlja kis u MilliQ vodi (0-5 min: 10-60 % A, 5-7 min: 60-45 % A, 7-7,01 min: 45-10 % A, 7,01-15 min: 10 % A)	2016.	74
<i>Otpadna voda</i>	st. otopina metanol/voda 50:50; uzorci s terene stavljeni su u prenosiv hladnjak i miješan kako bi dao otprilike 500 mL uzorka, dodan je natrij azid (0,5 g/L uzorka), centrifuga (10 000 okr/min, 10 min, 4 °C); SPE Oasis HLB kartuše (6 cc <sup>3</sup> , 200 mg; Waters Corp., Milford, SAD), uzorci su estrahirani ultrasoničnom ekstrakcijom, očišćeni SPE-om	Agilent 1200 LC; Agilent 6410 MS	ZORBAX Eclipse Plus C18 (4,6 × 150 mm, 3,5 µm) i C-18 pretkolona (3 × 2 mm, 3 µm), 0,25 mL/min	-	2013.	75

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak IV)

<b>Azitromicin (makrolidi)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzoraka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Inekcije, kapsule, tablete</i>	temeljna ot. (55,24 mg AZI, 50 mL pokretne faze), miješano 15 min, epruveta napunjena do kraja pokretnom fazom), uzorci lijekova otopljeni u mobilnoj fazi kako bi zadržali st. koncentraciju (0,25 mg/mL)	Agilent 1200 HPLC; ELSD	Boston pHlex ODS (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), 40 °C, 0,8 mL/min; Model 300s (SofTA Corporation) 60 °C, 50 psi	amonijev acetat(0,05 M, pH 8) :ACN (60:40)	2013.	76
<i>Tablete</i>	st. ot. AZI (razrj. ot. fosfatnog pufera pH 6), tableta je stavljena u 6 različitih posuda s 900 mL ot., stavljene u aparat 45 min, pred kraj isteka 45 min, povući 10 mL ot. na sredini između površine medija i vrha, najmanje 1 cm od zida posude, filtrirati kroz najlonski filter (0,45 μm), odbaciti prvih 5 mL filtrata i iskoristiti ostatak	HPLC; UV	RP18 (50 mm x 4,6 mm), 5 μm, 50 °C, 2 mL/min; 210 nm	fosfatni pufer (pH 7,5): metanol (35:65);	2010.	77
<i>Tablete</i>	otapala: trietilamin; metoda: USP 1161,3 mg tableta razrjedene u solventu, miješane 5 min, filtrirane kroz najlonski filter	HPLC 1100; UV	Phenomenex Synergi† MAX-RP (4 μm, 250 × 460 mm), 50 °C 1,2 mL/min; 210 nm	A: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7, 10 mM); B: metanol:ACN (1:1)	2003.	78
<i>Tablete</i>	st ot: 50 mg AZI (50 mL epruveta), dodano 30 mL razrj. ot, miješano, filtrirano kroz filter (0,45 μm); 50 mg AZM (10 tableta) zdrobljene, 100 mg preneseno u 100 mL epruvetu, sadržaj otopljen treskanjem	RP-HPLC (Spectra sistem 2004, Spectro sistem UV 2000)	C-8, 250mm × 4,6mm, 5μm, 1,2 mL/min, 45 °C, 210 nm	0,0335 M fosfatni pufer (pH 7,5): metanol (20:80)	2013.	79
<i>Plazma i urin</i>	ekstrakcija: LLLME; otapala: metanol, ACN, n – nonanol, heptanol, oktanol, dekanol, oktan st. ot. (1000 μg/mL), prije ekstrakcije plazma i urin otopljeni u ultračistoj vodi (1:4, 1:1)	K-2501 UV detektor, 210 nm	Shim-Pack CLC-C18 analitička kolona (250 mm × 4,6 mm, 5 μm), Shimadzu (Kyoto, Japan)	0,01 mol/L KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> fosfatni pufer:ACN (58:42), pH 7,5, 0,1 mL/min	2010.	80
<b>Eritromicin (makrolidi)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Otpadna voda</i>	otapala: etanol, <i>tert</i> butil alkohol, st. otopina 100 μg/L, ekstrakcija: SPE, ERI špikan je drugom vrstom otpadne vode sa st. ot. da se postigne 100 μg/L, pokus se izvodio na fotokemijskoj aparaturi, koja se sastoji od 9 W živine lampe; SPE provodi se s HLB kartušama poboljšane s 5 mL MeOH, 5 mL ultračiste vode (pH 3), 1 mL/min, konačni vol 8 mL MeOH pri 1 mL/min	ACQUITY TQD UPLC-MS <sup>2</sup> ;	BEH Shield RP18 (1,7 mm; 2,1 × 50 mm), 40 °C, 0,3 mL/min;	A: voda i 0,1 % mravlja kis; B: metanol	2015.	81



**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak V)

<b>Eritromicin (makrolidi)</b>						
Uzorak	Priprava uzorka	Detektor	Kolona	Pokretna faza	Godina	Ref.
Otpadna voda	otapala: metanol, ACN, trietilamin SPE kartuše kondicionirane s 2 mL metanola, 2 mL Milli-Q vode i 2 mL Na <sub>2</sub> EDTA (10 mmol/L, pH 3), SPE kartuše napunjene koristeći Na <sub>2</sub> EDTA pri 10 mL/min; ERI ekstrakti uparivani laganim strujanjem dušika do volumena 20 µL, ponovno otopljen u 1 mL ACN za HPLC	Agilent 1100 Series HPLC sistem; LC-ESI-MS	Hypersil-ODS C18 (2,1 × 150 mm, unutrašnji promjer 5 µm); 4500 V, 300 °C, kapilarni napon 1500 V, tlak plina omotača 337,8 kPa, tlak sporednog plina 68,95 kPa (dušik u oba)	100 % metanol (faza A), 0,06 % mravlja kis u MilliQ vodi (faza B), 0,3 mL/min	2017.	82
Med	otapala: klorobenzene, diklorometan, kloroform, karbon tetraklorid, tetrakloroetilen, heksan; ekstrakcija: LLME; st otopine (50 µg/mL) dobivene otapanjem određenog standarda u metanolu; 5 uzoraka meda (10 g svaki); 100 g/L tekuće otopine meda špakano različitim konc. miješanih standarda ot., ravnoteža traje 5 min, uzorci meda otopljeni u 5 mL vode, preneseni u 15 mL PP kivetu (ravnoteža 10 min), 150 µL CHCl <sub>3</sub> injektirani u uzorke i miješani 30 s, centrifugiranje (2500 okr/min, 4 min)	Agilent 1200 series HPLC sistem; Agilent 6495 MS	Eclipse plus-C18 (3,5 µm, 2,1 mm × 100 mm), 0,3 mL/min, 30 °C; temp plina 325 °C, 7 L/min, tlak raspršivača 45 psi, Vcap napon 3500 v, plinski omotač (350 °C, 9 L/min); 200 µL metanol/voda (1:1, v/v)	0,1 % mravlja kis. u metanol/voda (45:55, v/v, %)	2017.	83
Oksimi	uzorci otopljeni u st. ot.	Shimadzu LC-10AT (HPLC sustav), Shimadzu SPD-10A (UV detector) 215 nm	C18 ODS (5 µm, 4,6 × 150 mm, 35 °C, 1 mL/min)	ot. fosfatnog pufera (0,02 M, pH 6,5):ACN (40:60)	2013.	84
Tablete	HPLC metoda: 20 tableta usitnjeno, 500 mg ERI ekstrahirano i otopljeno u 15 mL metanola, dodano 65 mL dikalijeve kis. fosfatnog pufera (pH 8); spektrofotometar metoda: 38 mg ERI ekstrahirano metanolom (3 × 20 mL), filtrirano u 100 mL epruvetu	HPLC (Merck Hitachi) ;Shimadzu UV-1650 PC	Symmetry Waters C18 (150 × 4,6 mm, 5 µm)	kalijev dihidrogen fosfat pufer (pH 9): ACN: H <sub>2</sub> O (25:100:50), 1,6 mL/min, 210 nm	2011.	85
Tkivo lososa	5 g tkiva lososa vagano u 50 mL PP epruvetu, ekstrahirano s 10 mL (10 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> oko 1 min), centrifugirano 1100 okr/min, 10 min. Ekstrakt lososa dodan je u 3 cm <sup>3</sup> HLB kartuše pomoću vakuuma, brzina eluiranja je podešena na 2 mL/min. Elucija od 20 mL vodenog ekstrakta HLB kartuša isprana s 2 mL vode, zatim 3 mL MeOH/voda. Alikvot od 100 mL 100% MeOH eluiran pri 1 mL/min pod blagim tlakom u 12 mL lijevka za odijeljivanje (2% vodenog NH <sub>4</sub> OH, pH 10,5). Vodeni ekstrakt razdijeljen s 1 mL MeCl <sub>2</sub> tri puta. Slojevi MeCl <sub>2</sub> bili su osušeni kroz Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> kolonu i skupljani u staklenu bočicu. Nakon kombinacije MeCl <sub>2</sub> frakcija bočica zatvorena i ohlađena na +4 °C do uparavanja s N <sub>2</sub> . Ostatci osušenog lososa otope se u 200 µL mobilne faze za daljne analize	LC-ED, LC-ESI/MS	LC-ED: Shimadzu LC600, Polaris C18-A (250 × 4,6 mm); LC-ESI/MS: Phenomenex Prodigy ODS (250 × 2,0 mm)	<b>LC-ED:</b> 45:55 MeCN:10 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> , 1 mL/min <b>LC-ESI/MS:</b> (20:80, 80:20) MeCN:H <sub>2</sub> O; 0,2 mL/min	2003.	86

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina  
(nastavak VI)

<b>Klatritromicin (makrolidi)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprava uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Otpadna voda</i>	100 mL uzorka vode je filtrirano, protok vode za uzorkovanje 10 mL/min prekondicioniran s 3 mL metanola i 3 mL čiste vode, aspiriran, dehidriran i eluiran s 6 mL metanola, eluat koncentriran i uparivan do suha strujom dušika. Čvrsti oblik otopljen u 1 mL ot. (0,5 % ot. mravlje kiseline i ACN u omjeru od 3 do 7)	LC/MS/MS (1,2 do 29 ng/L i 46 do 93 %); Agilent 1100 i API4000 za HPLC i MS/MS	LUNA C8(Phenomenex, 2,0 ×150 mm), 40 °C, volumen injektiranja 5 µL	0,5 % mravlja kiselina i ACN miješani u omjeru od 3 do 7	2006.	87
<i>Životinjski mišići (svinja, kokoš, krava)</i>	otapala: ACN, mravlja kis, metanol, etil acetat, aceton, amonijak; ekstrakcija: SPE radne otopine 10 makrolida (100 mg/L) dobivene razrjeđivanjem temeljnih ot. ACN; uzorci životinjskih mišića iz supermarketa homogenizirani, čuvani na -20 °C, špakani u 3 konc. ranga (1,5,20 µg/kg), 2 g mišića špakani otopinom 10 makrolida, inkubirani 30 min na sobnoj temp. 5 mL otopine pufera natrijevog borata i 5 mL etil acetata za ekstrakciju, miješani 30 min, centrifugiranje (9000 okr/min, 5 min, 4 °C); svaki standard otopljen u metanolu da se pripremi temeljna otopina 1000 mg/L	Agilent 1200 HPLC sistem	Agilent Zorbax SB-Aq C18 (150 mm × 2,1 mm, 3,5 µm) 35 °C, 0,25 µL/min	ACN i 0,1 % mravlja kis u MilliQ vodi	2016.	74
<i>Danio rerio, Daphnia magna, Desmodemus subspicatus (zelena alga), Anabaena flosaquae (cijanobakterija)</i>	otapala: voda, metanol, mravlja kis uzorak otpadne vode (990 µL), ekstrakcija: SPE uzorci otpadne vode špikan standardima (10 µL), centrifuga (20 min, 3000 okr/min)	LC/MS (Jasco X-LC, 450 °C 4,5 kV, 172 kPa);	Synergi Polar-RP 80 Å (150 ×2 mm, veličina čestica 4 µm), 30 °C, 0,3 mL/min	A: 0,5 g/L mravlja kiseline, B: 0,5 g/L mravlja kis i metanol	2014.	88
<i>Tablete</i>	temeljna ot.: 125 mg KLM otopljeno u 5 mL mobilne faze, st ot.: 125 mg KLM otopljeno u 5 mL metanola;	RP-HPLC (Shimadzu-LC 20AT)	C18 (Kromasil ODS, 5 µm, 250 × 4,6 mm), 25 °C	fosfatni pufer (0,05 M):ACN (50:50), 1 mL/min, 205 nm	2013.	89
<i>Ljudska plazma</i>	otapala: trietilamin, fosforna kis., tert butil metil eter, ACN; ekstrakcija: LE st. ot. i temeljna ot. KLM pripremljene su u metanolu (100 µg/mL), 50 µL ot. dodano 200 µL uzorku plazme, dodano 4 µL tert-butil metil etera, miješano 1 min, centrifugirano 6000 okr/min, 10 min, 25 °C. Gornji sloj prebačen u novu epruvetu, uparivano do suha pod strujom dušika pri 40 °C	LC-MS/MS (Waters Alliance HPLC 2695)	Atlantis dC18 (2,1 × 100 mm, 3 µm), pretkolona (Symmetry C18 (3,9 × 20 mm, 5 µm))	0,05 % trietilamin (pH 4): ACN (65:35), 0,25 mL/min	2016.	90

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak VII)

<b>Cefdinir (antibiotik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Ljudska plazma</i>	ekstrakcija: SPE; otapala: o-fosforna kis., mravlja kis., trifluorooctena kis., EtOH, HCl, H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ; plazma odvojena od krvi (centrifugiranje 2500 okr/min, 10 min, 4 °C), za ekstrakciju cefdinira od plazme 50 µL interne ot.(CEF otopljen u ot. ACN:MeOH 50:50) pomiješano s 200 µL plazme prije tretiranja s 600 µL ACN, metanol, etanol. Uzorci su tretirani s 500 µL n-heksanom, miješano 2 min, centrifuga (2500 okr/min, 10 min, 4 °C) gornji organski sloj je injektiran u HPLC	LC sistem konc rang (0,004-5,0 µg/mL); UV-VID (285 nm)	Supelco Discovery HS C18 (150 mm × 4,6 mm, 5 µm), pretkolona Perkin Elmer RP18 (30 mm × 4,6 mm, 10 µm)	etanol / ACN (50/50, v/v):0,05 % trifluorooctena kis (19:81, v/v), 50 °C, 2 mL/min	2011.	26
<i>Pseća plazma</i>	ekstrakcija: LLE; 100 µL plazme dodano je na 96 pripremljenih ploča, špikano 75 µL (6% perklorne kis.) i 25 µL (5 µg/mL interne ot. CEF u 40 % metanolu), ploče su zatvorene, miješane 5 min, centrifugiranje (12 000 okr/min, 10 min, 4 °C), 100 µL uzorka stavlja se u HPLC	HPLC; UV detektor (286 nm)	centralna kolona(Lichrospher C18 4,6 mm × 37 mm, 25 µm), analitička kolona(UltimateTMX B-C18, 4,6 mm × 50 mm, 5 µm)	metanol– ACN – 20 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> podešen pH 3,0, 11.25:6.75:82, v/v/v, 1,5 mL/min	2012.	91
<i>Ljudska plazma</i>	otapala: metanol, octena kis, amonij acetat, triklorooctena kis. 100 µL plazme dodano 10 µL st. ot. (10,6 mg cefaklor u 10 mL 10 mM ot. pufera amonijeva acetata), smjesa deprotonizirana 40 µL 10 % TCA miješano 1 min pri sobnoj temp., centrifugiranje (10 min, 10 000 okr/min), alikvot 5 µL	LC-MS/MS	RP <sub>18</sub> Waters SymmetryShield ( 5 µm, 50 mm × 2,1 mm)	metanol: voda: octena kis ( 25: 75: 0,075, v:v:v), 0,2 mL/min	2006.	92
<i>Površina proizvodne opreme</i>	površine (10 × 10 cm) od nehrđajućeg čelika, očišćene i osušene, posprejane 300 µL st. ot. (10 mg CEF otopljeno u ot. za razrjeđivanje)	Agilent 1100 LC sustav Waters (SAD) Symmetry; UV detektor 254 nm	C18 (250 mm × 4,6 mm × 5 µm), 25 °C, 1 mL/min, volumen injektiranja 20 µL	ACN : pH 7 pufer (85:15)	2013.	93

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina  
(nastavak VIII)

<b>Nitrofurantoin (antibiotik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Škamp</i>	ekstrakcija: LLE; 5 g škampi je usitnjeno i stavljeno u PP kivetu (50 mL), dodana je ot. za ekstrakciju (10 mL 0,05 M HCl/ metanol 3:7 v:v), miješana, dispergirana pod ultrazvukom 40 min kako bi povećali hidrolizu kis., dodaje se KCl (0,5 g) koji se dodaje smjesi i stavlja u ultrazvučnu kupelj 20 min. Nakon centrifugiranja (7200 okr/min, 15 °C, 20 min) supernatant se ukloni, a doda se sredstvo za derivatizaciju (200 µL 25 mM ot. u CH <sub>3</sub> OH) smjesa stavljena u struju dušika (60 °C). Organska faza je uparivana do suha u struji dušika pri 40 °C, suhi ostatak je ponovno otopljen u ACN/ destilirana voda (1 mL, 8:2 v/v) otapala: metanol, ACN, etil acetat, mravlja kis	HPLC-FLD (395-463 nm); LC-MS/MS	YMC-Pack Polymer C18 (250 mm × 4,6 mm i 6 µm), 40 °C, 20 µL injektirano u HPLC; XTerra®MS C18 (150 mm × 4,6 mm i 3,5 µm)	A: pH 10,4 s 10 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> - NaOH ot. pufera, B: 9,4 s 10 mM H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> - NaOH i ACN (1:1, v:v), 1 mL/min; A: ACN, B: 0,1 % otopine mravlje kis koja sadrži 0,5 mM NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> , 0,3 mL/min	2013.	94
<i>Mijeko</i>	ekstrakcija: SLE; 50 mL alikvota mlijeka je deprotonizirano s 25 mL 20 % trikloroacetne kis. Nakon 15 min uzorci su filtrirani, isprani vodom, alikvoti su pušteni kroz C18 kartuše da se izolira nitrofurantoin i analiti se eluiraju s 2,5 mL pokretne faze otapala: ACN, NaClO <sub>4</sub> , ledena octena kis	kulometrija ( Coulochem II)	Nova-Pak C column (150 × 3,9 mm)	ACN - 0,1 M otopina natrijevog perklorata (28:72) s 0,5 % ledenom octenom kiselinom, 1 mL/min	1996.	95
<i>Meso</i>	ekstrakcija: SPE; 5 g preneseno u 50 mL PP kivetu, dodana HCl (25 mL), miješanje, stavljeno u vodenu kupelj pri 37 °C, hlađenje, kondicioniranje s etil - acetatom (15 mL) dodano emulziji, ručno miješano 2 min, centrifugiranje (3600 okr/min, 10 min, sobna temp.), organska faza prikupljena u 15 mL epruvetu, uparivano do suha pod strujom dušika (40 °C), tekući ekstrakt ispran heksanom	LC-MS/MS	C18 SymmetryShield LC kolona (15 cm × 2,1 mM, 3,5 µm) opremljena s Symmetry Shield RP18 predkolonom (1 cm × 2,1mm, 3,5 µm)	A: voda s octenom kiselinom 0,025 % (v/v); B: ACN, 0,3 mL/min	2005.	96
<i>Jetra svinje</i>	otapala: dimetilsulfooksid, octena kis., natrijev hidroksid, HCl, NBA, SEM, AOZ ; ekstrakcija: SPE SPE MAX kartuše, kondicioniranje s 3 mL metanola, 3 mL vode, 3 mL TRIS pufera (pH 6,3), uzorci isprani s 2 % - nim amonijakom u vodi (3 mL) i eluirani s etanolom (3 mL), vrtloženje 5 s, uparavanje do suha pri 40 °C pod strujom dušika, ostatak otopljen u vodi (3 mL) i miješani 30 s; HLB kartuše, kondicionirani s 3 mL metanola i 3 mL vode, isprani s 2 % octene kiseline u 50 % - tnom metanolu (3 mL) i eluirani s 2 % amonijaka u 50 % - tnom metanolu (3 mL), miješani 5 s, uparivani do suha (40 °C) pod strujom dušika, ostatak otopljen u 300 µL vode i 150 µL ACN, miješani 30 s i filtrirani kroz 0,45 µm filtere 5 g jetre je isprano u metanolu (10 mL), 1,5 mL redestilirane vode, miješani na tresilici (180 okr/min) i centrifugirani (1400 okr/min, 4 °C, 10 min)	LC-UV; LC-MS/MS	Luna C18 (5 µM, 250 × 4,6 mm), µBondapak C18 (predkolona), 25 °C, 275 nm; Symmetry C18, 40 °C, 20 µL injektirano	metanol:ACN: 0,01 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (2.5 :37,5: 60 (v/v/v)), pH 7,4,0,8 mL/min, 100 µL injektirano; 1 mM pufer amonijevog acetata (pH 3,5); ACN (90/10 do 20/80), 0,4 mL/min	2002.	97

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak IX)

<b>Hidroksiklorokin (kemoterapeutik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Enantiomer</i>	2 mL supernatanta je preneseno u drugu cijev gdje je dodano 1 mL 0,1 M NaOH i 8 mL otopine za ekstrakciju, miješano 30 s, centrifugiranje (15 min, 3000 okr/min) organski sloj prebačem u treću cijev i upareno do suha pri 35-40 °C pod laganim strujanjem zraka, ostatak je stavljen u 250 µL metanola, vrtloženje 30 s. Uzorci su prebačeni u platične HPLC bočice i injektirano (10-100 µL) u kolonu otapala: K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Hewlett Packard model 1090 HPLC, Hewlett Packard model 1046A fluorescentni detektor (230-385 nm)	Chiral-AGP (100 x 4 mm, 5 µm)	94 % pH 7 (0,05M NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,005M diheksilamin) puffer , 5 % izopropanol i 1 % ACN, 1 mL/min, 35 °C	1994.	98
<i>Limfno tkivo kuniča</i>	1 mL krvi ili limfnog tkiva dodano je 2 mL (0,4 M NaOH), miješano 2 min, dodano 8 mL kloroforma miješano 1 min, centrifugirano, organska faza prenesena u kivetu i dodano 1 mL (0,1 M fosfatnog pufera, pH 5); usitnjeno tkivo homogenizirano s 1 mL (0,1 M fosfatnim puferom, pH 2,5), pohranjeni na -20 °C; ekstrakcija: LE	HPLC	Symmetry C18 (5 m, 4,6 x 150 mm), 0,5 mL/min	ACN: 0,1 M puffer natrij dihidrogen fosfata (pH 3) 14:86 (v/v)	2015.	33
<i>Krvi i urin</i>	uzorku dodano 125 µL klorokinona, 100 µL (2 M NaOH), miješanje 5 s, dodan dietileter (5 mL), miješano 1 min, centrifuga (1800 okr/min, 5 min), enantiomeri HCQ-na dodano 200 µL 0,01 M trikloroacetatne kis. u diklorometanu, 100 µL 0,25 M DATAAN u diklorometanu, miješano 10 s, stavljeno u pećnicu na 45 °C, nakon 30 min dodan 1 mL MeOH, miješano 5 s, uparivano do suha otapala: metanol, voda, dietileter, diklorometan, trikloroacetatna kis, trietilamin, ledena octena kiselina	UV detektor (343 nm)	C8 kolona (250 mm x 4,6 mm I.D.; 5 µm veličina čestica)	0,05 M KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 3); metanol:etanol: trietilamin (78: 22: 1: 0,08)	1992.	99
<i>Serum</i>	1 mL smjese proteinskog taloga koji sadrži hidroksiklorokinon dodan je 100 µL špikanom serumu, miješanje, centrifugiranje (13400 okr/min, 5 min) otapala: metanol, voda, mravlja kis, NH <sub>4</sub> HPO <sub>4</sub>	TFLC-MS/MS	HypersilGold C8 (50 x 2,1 mm, 5 µm), 70 °C	A: voda s 0,1 % octene kiseline i 10 mmol/L NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> ; B: metanol s 0,1 % octene kiseline i 10 mmol/L NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub>	2013.	100
<i>Jetra miševa i štakora</i>	jetra tretirana s natrijevim kloridom 0,9%, isprano kalijev kloridom 0,154 mol/L (pH 7,4), centrifuga 100 000 okr/min, 60 min, 4 °C, ostaci tretirani s tris- HCl 0,15 mol/L (pH 7,6), tretirano puferom 1,25 mmol/L u KCl-u spremljeno na -70 °C otapala: tris (hidroksimetil)-aminometan, hidroksipropil β-CD; ekstrakcija: LLE	HPLC; SPECTRONI C 20 GENESYST M	Chiralpak AD-RH	heksan: izopropanol (92:8) s 0,1 % dietilamin, 343 nm	2009.	101

**Tablica 1.** Pregled literature za ispitivane farmaceutike u vremenskom periodu od 25 godina (nastavak X)

<b>Hidroksiklorokin (kemoterapeutik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Ljudska krv</i>	temeljna otopina 50 % metanola u vodi, 50 $\mu$ L krvi injektirano u epruvetu u kojoj se nalazilo 10 $\mu$ L temeljne ot. (HCQ u 50 % MeOH u vodi), 10 $\mu$ L st. ot., 60 $\mu$ L MILIQ vode, miješano 30 s, centrifuga 30 000 okr/min, 20 min, 4 °C, 50 $\mu$ L uzorka vakumirano 30 min, 60 °C, injektirano 10 $\mu$ L otapala: metanol, mravlja kis, ACN	LC-MS/MS	Agilent ZORBAX Eclipse XDB-C8(50 mm $\times$ 2,1 mm, 5 $\mu$ m); API 4000 MS	0,1 % mravlja kis.: ACN (94:6), 0,5 mL/min, 25 °C	2011.	102
<i>Krv</i>	Ekstrakcija: LLE 200 $\mu$ L krvi stavljeno u epruvetu od 1 mL, dodano 20 $\mu$ L st. ot., miješano 5 s, špikano 400 $\mu$ L hladnog metanola (- 20 °C), 50 $\mu$ L bakrenog sulfata, miješanje 2 min, centrifuga 10 min, 14 000 okr/min, injektirano 50 $\mu$ L	LC-MS/MS Agilent 1200 HPLC; 320-380 nm	XTerra phenyl <sup>®</sup> (250 $\times$ 4,6 mm, 5 $\mu$ m; Waters, 50 °C, 1,2 mL/min	mješavina glicinskog pufera/natrijev klorid (pH 9,7, 100 mM) (46/54)		103
<b>Metoklopramid (antiemetik)</b>						
<b>Uzorak</b>	<b>Priprema uzorka</b>	<b>Detektor</b>	<b>Kolona</b>	<b>Pokretna faza</b>	<b>Godina</b>	<b>Ref.</b>
<i>Ljudska plazma</i>	ekstrakcija: LLE 50 $\mu$ L plazme miješa se s 5 $\mu$ L levosurpiridom i 1000 $\mu$ L diklorometana u 1,5 mL PP kivete, centrifugiranje ( 10 000 okr/min, 5 min); gornji organski sloj je prenesen u drugu kivetu, uparivan do suha (20 min, 30 °C), ostatci su otopljeni u 400 $\mu$ L (85 % ACN u vodi), ultrazvuk ( 3 min), centrifugiranje otapala: ACN, diklorometan	HILIC/MS/MS	Atlantis HILIC silikat (3 $\mu$ m, 3,0mm $\times$ 50 mm), 56 °C	ACN: NH <sub>4</sub> HCO <sub>2</sub> (100 mM, pH 6,5) (85:15, v:v), 0,5 mL/min	2009.	104
<i>Ljudska plazma</i>	uzorak plazme (0,4 mL) dodano je 50 $\mu$ L prazosina, miješano, dodano 100 $\mu$ L NaOH, miješanje 30 s, ekstrahirano 1 mL etil acetata, miješano 3 min, centrifuga (14000 okr/min, 5 min), organski sloj uparen do suha pod strujom dušika (45 °C), ostatak otopljen u 50 $\mu$ L pokretne faze, 5 $\mu$ L injektirano	LC-MS	Thermo Hypersil-Hypurity C18 (150mm $\times$ 2,1mm, 5 $\mu$ m), 45 °C; LCMS-2010	40 mM amonij acetat (pH 3,5): metanol: ACN (75:5:20), 0,24 mL/min; <i>m/z</i> 300, 200-250 °C, 4,5 kV, -30 V, 25V, 150 V, 1,7 kV, 1,5 - 10 mL/min	2010.	105
<i>Govedo</i>	otapala: metilen klorid, kloroform	HPLC; spektrofotometar 254 nm; GC/MS	-	-	1993.	106

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1. Materijali

##### 3.1.1. Aktivni mulj

Ekstrakcija farmaceutika metodom mućkanja provedena je na aktivnom mulju dopremljenom iz tvrtke Jamnica d.o.o. Određivanjem slijepe probe dokazano je da aktivni mulj iz Jamnice ne sadrži farmaceutike koji bi smetali kod određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije farmaceutika metodom mućkanja, te je kao takav korišten kao modalni aktivni mulj kojeg se je namjerno onečišćivalo odnosno špikalo poznatom koncentracijom farmaceutika.

##### 3.1.2. Kemikalije

U **Tablici 2** su navedene kemikalije koje su korištene tijekom eksperimenta.

**Tablica 2.** Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
1–propanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	Kemika, Zagreb
2–propanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	Kemika, Zagreb
Aceton	CH <sub>3</sub> COCH <sub>3</sub>	p.a.	Gram – mol, HR
Acetonitril	CH <sub>3</sub> CN	HPLC	Fisher Chemical, UK
Etanol	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> OH	p.a.	Gram – mol, HR
Etil acetat	C <sub>4</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	p.a.	Merck, Njemačka
Heksan	C <sub>6</sub> H <sub>18</sub>	p.a.	Sigma – Aldrich, SAD
Kloroform	CHCl <sub>3</sub>	aRG	Mallinkrodt Chemical
Kloridna kiselina	HCl	p.a.	Sigma – Aldrich, SAD
Metanol	CH <sub>3</sub> OH	HPLC	JT Baker, Nizozemska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Gram – mol, HR
Voda	H <sub>2</sub> O	MiliQ	FKIT

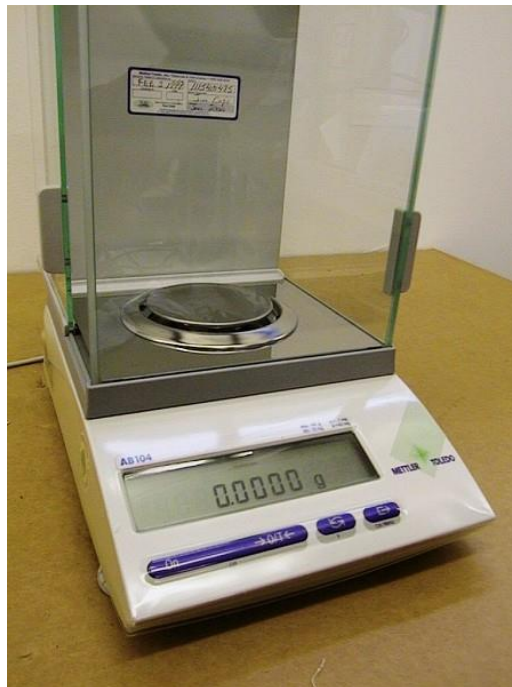
### 3.1.3. Farmaceutici

Ispitivanja su provedena na 10 farmaceutika iz grupe antihelmintika (albendazol, febantel, prazikvantel), antibiotika (azitromicin, eritromicin, cefdinir, klaritromicin, nitrofurantoin), kemoterapeutika (hidroksiklorokin), antiemetika (metoklopramid).

## 3.2. Instrumenti, uređaji i pribor

### 3.2.1. Analitička vaga

Za vaganje aktivnog mulja korištena je analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska prikazana na **Slici 21**, a za vaganje farmaceutika Mettler Toledo, XA105 na **Slici 22**.



**Slika 21.** Analitička vaga Mettler Toledo AB104





**Slika 22.** Analitička vaga Mettler Toledo, XA105<sup>107</sup>

### 3.2.2. pH metar

Za podešavanje pH-vrijednosti korišten je pH metar Mettler Toledo, S20, SevenEasy, Švicarska prikazan na **Slici 23.**



**Slika 23.** pH metar<sup>108</sup>

### 3.2.3. Mućkalica

Za ekstrakciju farmaceutika korištena je mućkalica IKA KS 3000i control prikazana na **Slici 24**. Mućkalica se može programirati ovisno o broju okretaja, temperaturi i vremenu mućkanja. Temperaturno područje rada je od 5 °C do 80 °C. Brzina mućkanja je od 10 do 500 okr/min.<sup>109</sup>



**Slika 24.** Mućkalica IKA KS 3000i control

### 3.2.4. Filtriranje

Nakon mućkanja potrebno je uzorke profiltrirati kako bi dobili ekstrakte koji se analiziraju na kromatografu visoke djelotvornosti. Filter papir korišten za filtriranje je *FilterBio NY Syringe Filter*, veličina pora 0,45 µm. Na **Slici 25** prikazan je pribor za filtriranje.



**Slika 25.** Pribor za filtriranje

### 3.2.5. Uparavanje (rotavapor)

Uparavanje ekstrakata provedeno je na uparivaču Büchi Waterbath B – 480, Švicarska i Büchi Rotavapor R-114 pri 40 °C, a uređaj je prikazan na **Slici 26**.



**Slika 26.** Büchi Waterbath B – 480

### 3.2.6. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Nakon ekstrakcije ekstrakti su se analizirali tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti Varian ProStar, SAD prikazan na **Slici 27**. Sastoji se od automatskog uzorkivača 410, pumpe 230, detektorom s nizom dioda 330, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala kojim se upravlja preko računalnog programa, pomoću kojeg se očitavaju rezultati nakon analize. Za analizu je korištena InterSustain™ C18 (GLSciencis INC. Japan). Dimenzije kolone su 250 mm × 4,6 mm, a veličine zrnaca su 5 µm.



**Slika 27.** Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti ProStar

### 3.2.7. HPLC MS/MS

Za kromatografsku analizu azitromicina, eritromicina i klaritromicina korišten je Agilent (Santa Clara, CA, SAD) Series 1200 s HPLC sustav s detektorima DAD i spektrometrom masa Agilent 6410 QqQ prikazan na **Slici 28**. Ispitivanja su provedena ionizacijom elektroraspršenjem pri pozitivnoj ionizaciji pri čemu nastaje molekularni ion  $[M+H]^+$ . Korištena kolona je Synergi Polar ( $100 \times 2$  mm), a veličine zrnaca  $2,5 \mu\text{m}$ . Obrada podataka provedena je pomoću računalnog programskog paketa Agilent Masshunter 2003-2007 Data Acquisition for Triple Quad B.01.04 (B84).



**Slika 28.** Agilent kromatografski sustav Series 1200 sa spektrometrom masa 6410 QqQ<sup>55</sup>

### **3.3. Metode rada**

#### **3.3.1. Priprava standardnih otopina farmaceutika**

Standardna otopina farmaceutika pripremljena je vaganjem 5 mg pojedinog farmaceutika i otopljena u metanolu HPLC čistoće u tikvici od 100 mL. Masena koncentracija pojedinog farmaceutika je 50 mg/L. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku pri 4 °C. Također pripremljene su i standardne otopine pojedinog farmaceutika u koncentraciji od 50 mg/L i čuvane u hladnjaku na 4 °C.

#### **3.3.2. Priprava špikanog aktivnog mulja**

Dobiveni aktivni mulj se dekantirao i izlio na filter papir te sušio tjedan dana na suncu. Osušeni mulj se usitnio u tarioniku, zatim sušio u sušioniku na 105 °C kako bi se uklonila vlaga te se je čuvao u eksikatoru. U posudicu za vaganje vagano je 5 g aktivnog mulja. Dodano je 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika i 7 mL metanola te se promiješalo laganim pokretima u obliku osmice kako bi se lakše homogeniziralo. Dobivena smjesa ostavi se jedan dan na zraku da metanol ishlapi.

### 3.3.3. Ekstrakcija mućkanjem

U staklene bočice s čepom (3 paralelne probe) vagano je 0,3 g špikanog aktivnog mulja i jedna bočica s aktivnim muljem koji nije špikan farmaceuticima i koji je služio kao slijepa proba. Dodano je 3 mL otapala i mućkano na mućkalici (30 min, 200 okr/min i 30 °C). Nakon mućkanja provedeno je filtriranje ekstrakata. Ekstrakti se uparavaju do suha na rotavaporu pri temperaturi od 40 °C. Suhi ostatak se otapa u 1 mL metanola i dobiveni ekstrakti se analiziraju na HPLC-DAD odnosno HPLC-MS/MS kromatografskim sustavima.

### 3.3.4. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kvantifikacija i identifikacija farmaceutika u ekstraktima provodila se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Volumen injektiranja je 30 µL, tlak je 20-25 atmosfera, temperatura 20-25 °C. Analizira se standardna otopina farmaceutika, slijepa proba (ekstrahiran je aktivni mulj koji nije špikan standardnom smjesom farmaceutika) i ekstrakti. Standardna smjesa farmaceutika injektirana je tri puta, a slijepa proba i ekstrakti jedanput. Prije i nakon analize uzoraka kolona se pere 65 %-tnim acetonitrilom jedan sat protokom od 0,5 mL/min. Volumen injektiranja acetonitrila je 10 µL. Pokretna faza sastoji se od eluensa A (0,01 % mravlje kiseline u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu). Sastav pokretne faze tijekom snimanja kromatograma na HPLC-DAD kromatografskom sustavu prikazan je u **Tablici 3**. Brzina protoka pokretne faze je 0,5 mL/min.

Kromatogrami na HPLC-DAD kromatografskom sustavu su snimani na dvije valne duljine, 210 i 370 nm. Iz snimljenih kromatograma očitavaju se površine farmaceutika iz standardne otopine i uzoraka dobivenih špikanjem aktivnog mulja. Na temelju očitanih površina možemo izračunati iskorištenje ekstrakcije koja se računa kao omjer površine kromatografske krivulje analita u ekstraktu ( $A_i, E$ ) i površine kromatografske krivulje analita u standardu ( $A_i, STD$ ) kako je prikazano izrazom (1):

$$I / \% = (A_{i,E} / A_{i,STD}) * 100 \quad (1)$$

**Tablica 3.** Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-DAD analizama

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

Nakon provedene analize na HPLC-DAD kromatografskom sustavu uzorci su analizirani zajedno sa standardnom otopinom smjese farmaceutika na HPLC-MS/MS kromatografskom sustavu. Svaki uzorak injektiran je jedanput, a smjesa tri puta. Volumen injektiranja je 5  $\mu$ L, temperatura plina 350 °C, protok 0,2 mL/min (ako je protok prevelik otapalo ne isparava dovoljno brzo u ionskom izvoru te se spojevi ne ioniziraju u potpunosti), tlak raspršivača 35 psi i napon na kapilari 4 kV. Pokretna faza je ista kao i kod HPLC-DAD-a. Iz dobivenih kromatograma očitane su površine farmaceutika dobivenih špikanjem aktivnog mulja (azitromicin, eritromicin i klaritromicin) i uspoređivane s površinom farmaceutika iz standardne otopine. Na temelju dobivenih površina računamo iskorištenje ekstrakcije po formuli iz izraza (1). U **Tablici 4** prikazani su gradijenti pokretne faze korišteni prilikom analize na HPLC-MS/MS-u.

**Tablica 4.** Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-MS/MS analizama

<b><math>t_r</math>, min</b>	<b>protok, mL/min</b>	<b>A, %</b>	<b>B, %</b>
0,00	0,2	92	8
3	0,2	92	8
13	0,2	60	40
15	0,2	40	60
18	0,2	25	75
20	0,2	5	95
23	0,2	5	95
23,01	0,2	100	0
35	0,2	100	0



## 4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je ekstrakcija farmaceutika iz aktivnog mulja. Postoje razne vrste ekstrakcija, ali za ovaj rad odabrana je ekstrakcija mućkanjem. Ispitivan je utjecaj otapala na iskorištenje ekstrakcije, utjecaj promjene volumena i mase uzorka te promjena pH vrijednosti na iskorištenje ekstrakcije.

### 4.1. Kromatografsko određivanje farmaceutika

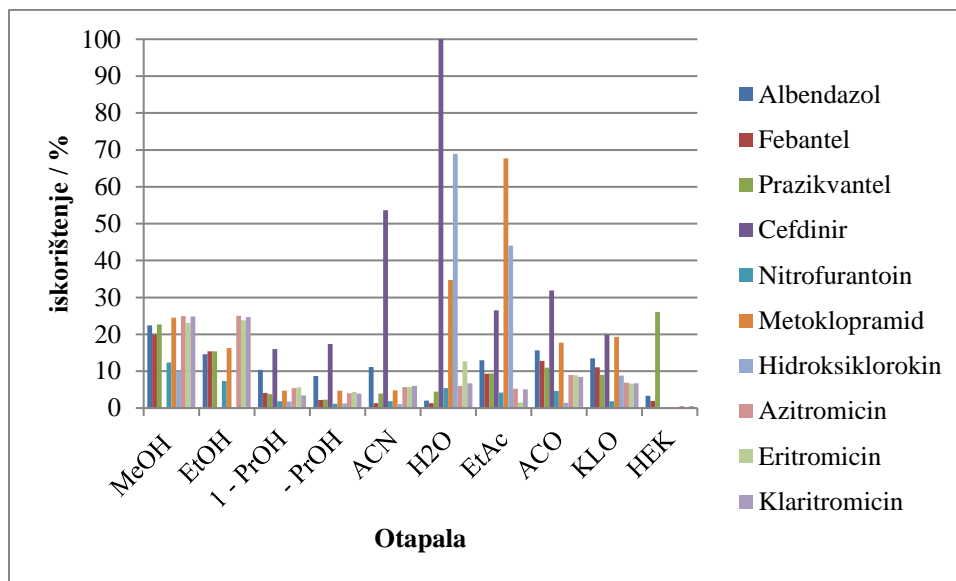
Preliminarnim istraživanjima određena je metoda kojom su se analizirali dobiveni ekstrakti farmaceutika iz aktivnog mulja tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD). Valna duljina na kojima su snimani kromatogrami svih farmaceutika je 210 nm, osim za nitrofurantoin čiji su kromatogrami snimani na 370 nm. Pri detekciji farmaceutika uz apsorpcijske spektre korištena su vremena zadržavanja. Vrijeme zadržavanja otopljene komponente označava vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu komponentu. Makrolidne antibiotike nije bilo moguće detektirati detektorom s nizom dioda pa su isti uzorci snimani na HPLC-MS/MS kromatografskom sustavu na kojem su kao kvalitativni parametri za detekciju korišteni i vrijeme zadržavanja i spektri masa. Kromatogrami dobiveni bilo na HPLC-DAD bilo na HPLC-MS/MS kromatografskom sustavu korišteni su za određivanje učinkovitosti ekstrakcije farmaceutika metodom mućkanja očitavanjem površine kromatografske krivulje dobivene za standardnu otopinu smjese farmaceutika i uspoređivana je sa površinom kromatografske krivulje dobivene nakon provedene ekstrakcije mućkanjem odgovarajućim otapalom prema izrazu (1).

### 4.2. Optimizacija ekstrakcije mućkanjem

Optimizacija ekstrakcije mućkanjem podrazumijevala je određivanje vrste otapala za ekstrakciju, volumen otapala, izbor omjera mase uzorka i volumena otapala, određivanje utjecaja pH-vrijednosti i vremena trajanja ekstrakcije.

Prvi eksperimenti su podrazumjevali ispitivanje utjecaja čistih otapala na ekstrakciju farmaceutika iz aktivnog mulja, a prema pretraženoj literaturi (**Tablica 1.**) odabrana su otapala: metanol (MeOH), etanol (EtOH), 1–propanol (1-PrOH), 2–propanol (2-PrOH),

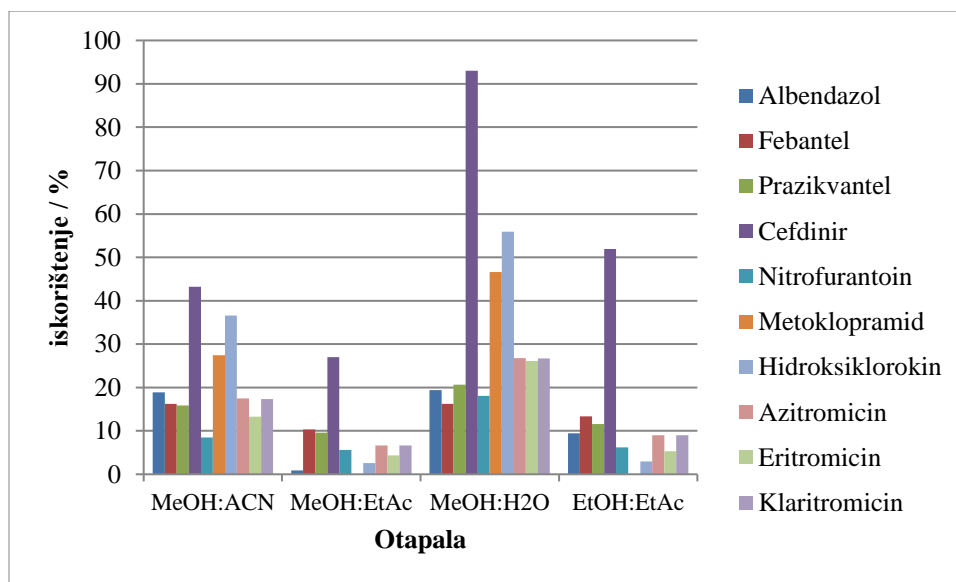
acetonitril (ACN), voda (H<sub>2</sub>O), etil acetat (EtAc), aceton (ACO), kloroform (KLO), heksan (HEK).



**Slika 29.** Iskorištenja ekstrakcije s čistim otapalima

U eksperimentu je špikano 5 g aktivnog mulja s 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika te 7 mL metanola radi bolje homogenizacije. Ekstrakcija mućkanjem napravljena je pri 30 °C, 30 minuta i 200 okr/min. Iz grafa na **Slici 29** vidljivo je da su dobri rezultati dobiveni za metanol jer su detektirani svi farmaceutici osim cefdinira. Etanol je isto pokazao dobro iskorištenje, ali nisu detektirani cefdinir i hidroksiklorokin. Kod 1–propanola i 2–propanola dobro je ekstrahirani cefdinir dok ostali nešto slabije. Acetonitril je dobar za cefdinir, ali je loš za sve ostale. Voda je pokazala dobro iskorištenje za metoklopramid i hidroksiklorokin, ali je velik utjecaj matice na cefdinir jer je iskorištenje veće od 700 %. Kod etil acetata detektirani su svi farmaceutici, ali je slabije iskorištenje albendazola, febantela, prazikvantela i nitrofurantoina. Aceton pokazuje dobra iskorištenja za sve farmaceutike, malo lošije za metoklopramid i hidroksiklorokin. Kod kloroforma su ekstrahirani svi farmaceutici, ali znatno manje nego kod ostalih otapala. Što se tiče makrolida (azitromicin, eritromicin i klaritromicin) najboljim otapalima su se pokazali metanol i etanol s iskorištenjima oko 24 %.

Na temelju rezultata prvog eksperimenta odabrani su dvokomponentni sustavi otapala koji su dali najbolje rezultate, a to su: metanol:etil acetat (1:1), metanol:acetonitril (1:1), metanol:voda (1:1) i etanol:etil acetat (1:1), čija su iskorištenja prikazana na **Slici 30**.

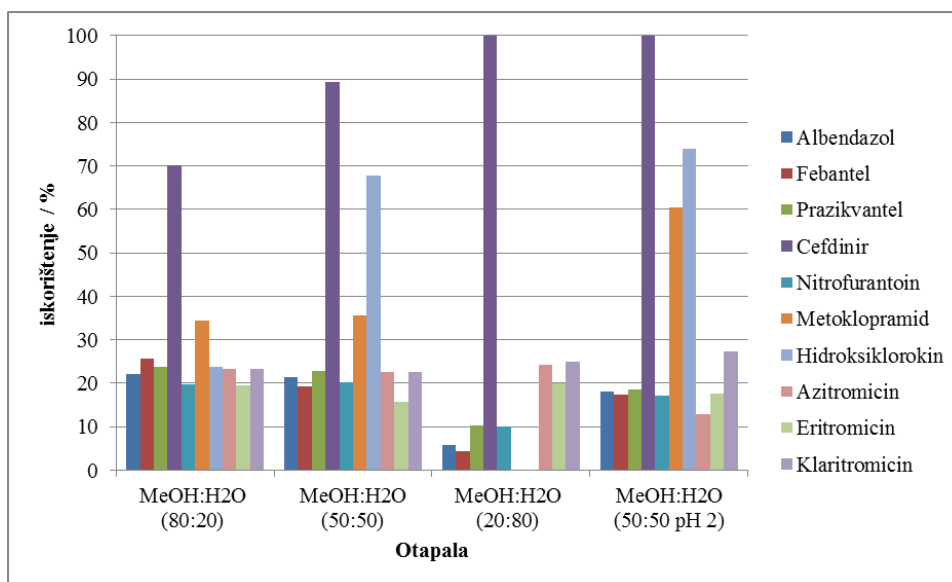


**Slika 30.** Iskorištenja ekstrakcije za sustav otapala metanol:acetonitril, metanol:etil acetat, metanol:voda i etanol:etil acetat

Iz prikazanog grafa na **Slici 30** vidljivo je da se većina farmaceutika detektira u sva četiri sustava otapala (metoklopramid nije vidljiv u sustavu s etil acetatom). Kod cefdinira u sustavu s vodom opet vidimo utjecaj matice jer je veliko iskorištenje cefdinira. Nešto bolja su iskorištenja u sustavima metanol:acetonitril i metanol:voda. Najveća iskorištenja za makrolide postiglo se sa sustavom metanol:voda gdje iskorištenje iznosi oko 27 %. Makrolidi su detektirani u svim sustavima.

Nakon ovog eksperimenta najboljima se pokazao metanol i voda, te se je u trećem eksperimentu ispitivao utjecaj udjela metanola odnosno vode na ekstrakciju farmaceutika iz aktivnog mulja te su napravljeni eksperimenti s različitim omjerima metanola i vode: 80:20, 50:50, 20:80. Prema literaturi osobito za cefdinir ispitivao se je sustav metanola i vode, ali tako da je pH-vrijednost vode namještena na 2. Kad god su se provodili eksperimenti s vodom koristila se je dvostruko

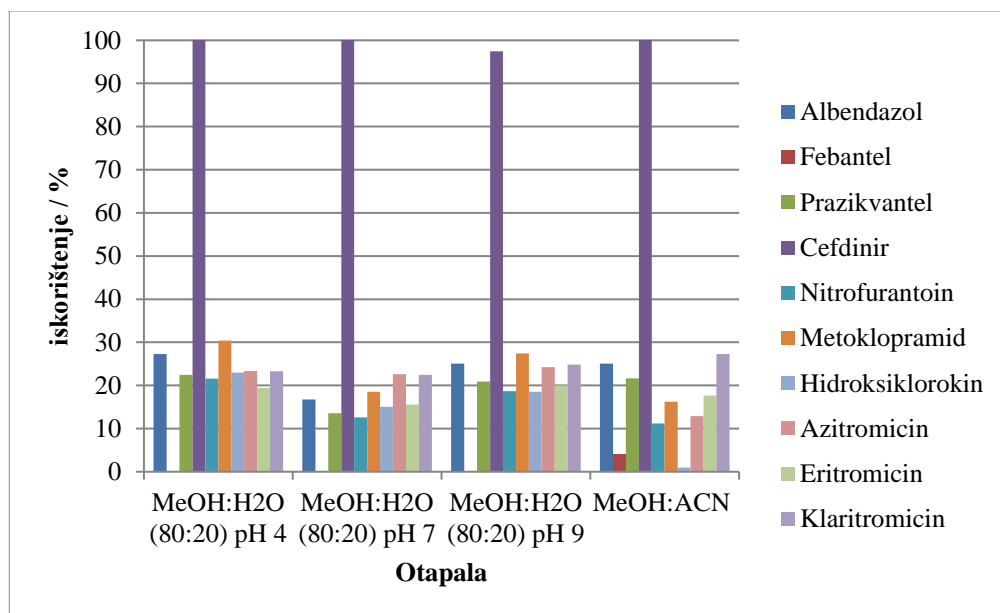
deionizirana voda, takozvana MiliQ voda iz sustava Milipore tvrtke Merck čiji je početni pH bio 4,01. Za namještanje pH-vrijednosti na 2 korištena je 1 M klorovodična kiselina.



**Slika 31.** Iskorištenje ekstrakcije mućkanjem u sustavima metanol:voda (80:20, 50:50, 20:80) i u sustavu metanol:voda (50:50, pH 2)

Iz prikazanog grafa na **Slici 31** podjednako su dobra iskorištenja za sustave metanol:voda (80:20) i metanol:voda (50:50). Sustav u kojemu je više vode (metanol:voda 20:80) pokazuje manja iskorištenja, a također je vidljiv utjecaj matice za cefdinir jer je iskorištenje veće od 100 % kao što je bilo vidljivo i kod čistih otopala gdje su u sustavu sa čistom vodom iskorištenja bila manja za sve farmaceutike nego u ostalima sustavima. U sustavu metanol:voda (80:20) najbolje iskorištenje pokazuje azitromicin (29,95 %), a najmanje eritromicin (23,35 %) dok su sustavu metanol:voda (50:50) eritromicin ima najbolje iskorištenje (28,63 %). Najmanja iskorištenja su u sustavu metanol:voda (20:80).

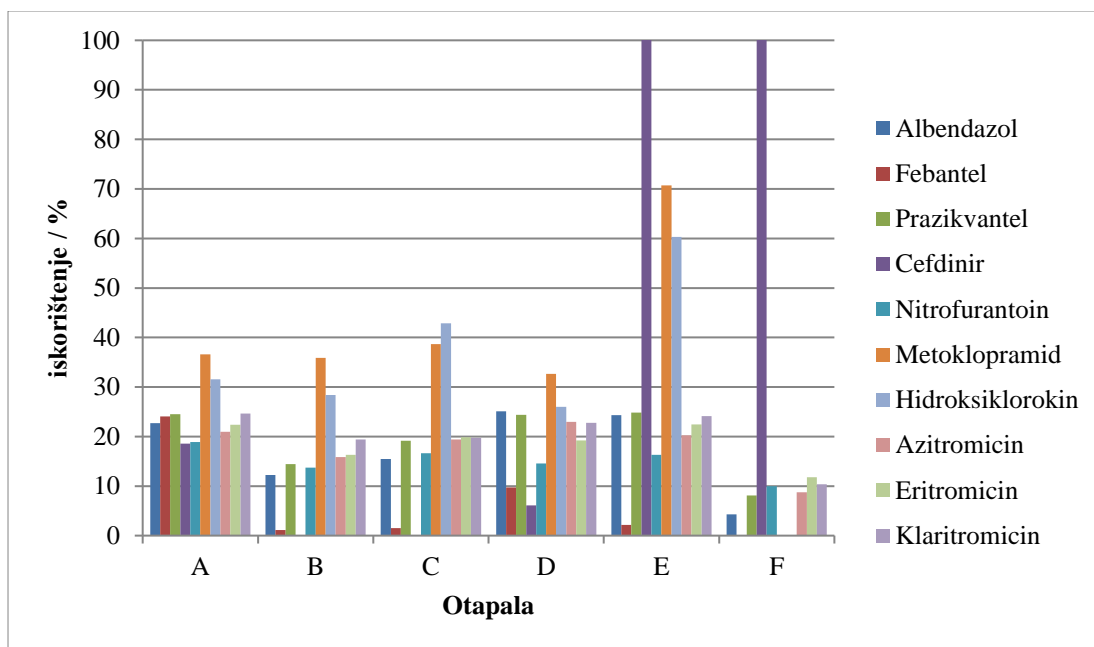
U četvrtom eksperimentu ponovljen je prvi sustav iz prethodnog eksperimenta (metanol:voda 80:20 pri pH 4). Dodana su još tri sustava: metanol:voda (80:20, pH 7), metanol:voda (80:20, pH 9) i metanol:acetonitril (4:1), pri čemu supH-vrijednosti 7 i 9 namještanje s 1 M otopinom natrijeve lužine.



**Slika 32.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol:voda (80:20, pH 4), metanol:voda (80:20, pH 7), metanol:voda (80:20, pH 9) i metanol:acetonitril

Iz prikazanog grafa na **Slici 32** je vidljivo da se febantel detektira samo u sustavu metanol:acetonitril. Ostali su ekstrahirani u svim sustavima. Kod cefdinira u svim sustavima vidljiv je utjecaj matice zato njegovo iskorištenje prelazi 100 %, osim u sustavu metanol:voda pri pH 9 gdje je nešto manji od 100 %. Najveće iskorištenje makrolida u ovom eksperimentu bilo je u sustavu metanol:acetonitril koji iznosi 27,28 %, dok je općenito dobra iskorištenja svih makrolida u sustavu metanol:voda pri pH 9.

U petom eksperimentu napravljeno je šest manjih eksperimenata koji uključuju sustave: metanol:voda (50:50, pH 4), metanol:voda (50:50, pH 7), metanol:voda (50:50, pH 9), aceton:voda (80:20), aceton:voda (50:50) i aceton:voda (20:80), čime se je htio utvrditi utjecaj pH-vrijednosti na ekstrakciju farmaceutika kao i utjecaj organske faze u sustavu otapala.

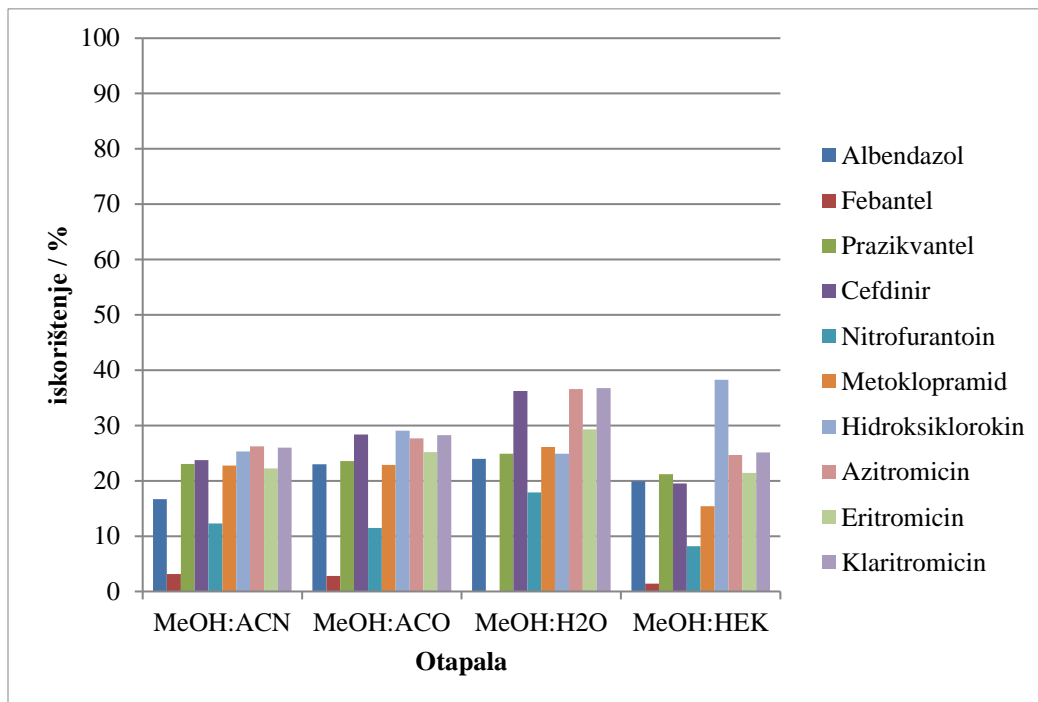


**Slika 33.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima:

(A) metanol:voda (50:50, pH 4), (B) metanol:voda (50:50 pH 7), (C) metanol:voda (50:50, pH 9), (D) aceton:voda (80:20), (E) aceton:voda (50:50) i (F) aceton:voda (20:80)

Iz prikazanog grafa na **Slici 33** sa sustavom metanol:voda (50:50) pri pH 4 ekstrahirani su svi farmaceutici, kod pH 7 nije detektiran cefdinir, a za febantel je dobiveno jako nisko iskorištenje u usporedbi sa sustavom kod pH 4. Kod sustava aceton:voda (80:20) ekstrahirani su svi farmaceutici, aceton:voda (50:50) veliki je utjecaj matice pa cefdinir ima iskorištenje preko 100 %, dok kod sustava aceton:voda (20:80) kao i u drugim eksperimentima gdje je veći udio vode nešto su niža iskorištenja u usporedbi s drugim omjerima, a neki farmaceutici nisu niti ekstrahirani (febantel, metoklopramid i hidroksiklorokin). Za makrolide podjednako su slična iskorištenja u sustavima metanol:voda (50:50, pH 4) (A) i aceton:voda (50:50) (E). Ujedno su to i najveća iskorištenja za makrolide pri čemu najveće iskorištenje ima klaritromicin s 24 % u oba sustava.

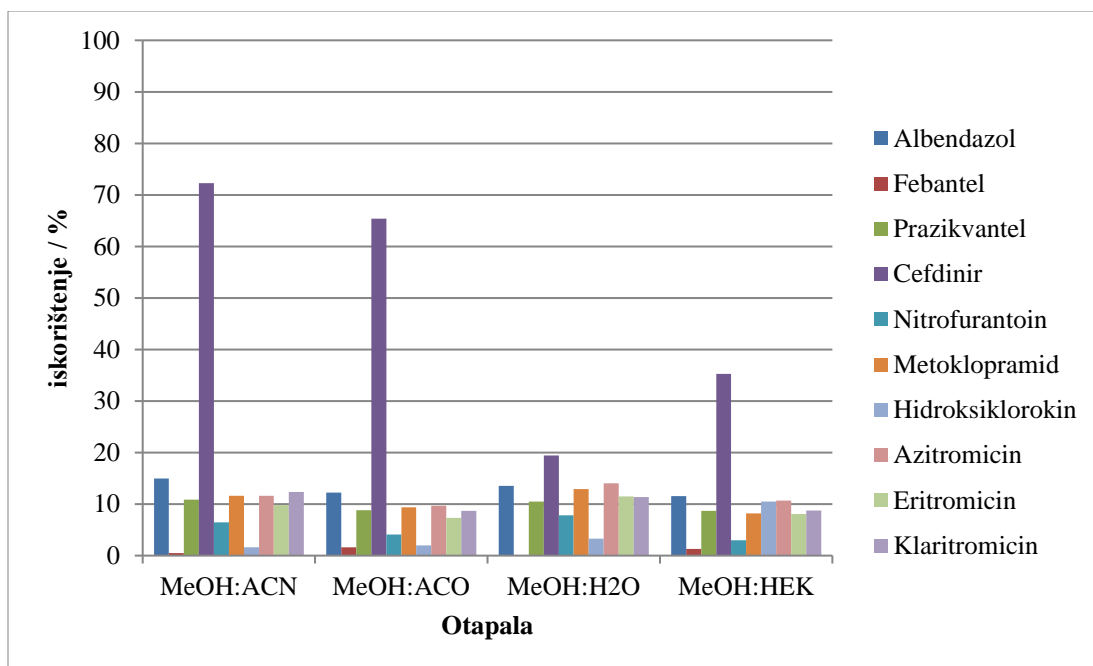
U šestom eksperimentu odabrani su sustavi: metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda, metanol:heksan svi u omjeru 4:1 prema literaturi iz **Tablice 1**. U svim do sada navedenim eksperimentima uzimano je 0,3 g špikanog aktivnog mulja i 3 mL smjese otapala za ekstrakciju kod 30 °C i 200 okretaja u minuti.



**Slika 34.** Iskorištenja ekstrakcije u sustavima metanol:acetonitril (4:1), metanol:aceton (4:1), metanol:voda (4:1) i metanol: heksan (4:1) s 0,3 g uzorka aktivnog mulja i 3 mL otapala

Iz grafa na **Slici 34** je vidljivo da su skoro svi farmaceutici detektirani u svim sustavima, osim febantela koji se ne detektira u sustavu s vodom. Sva iskorištenja iznose do oko 30 % dok kod makrolida, azitromicin i klaritromicin daju iskorištenje oko 37 % u sustavu metanol:voda.

Sljedeći sedmi eksperiment je bio s 0,1 g uzorka jer se je želio ispitati utjecaj omjera mase uzorka i volumena otapala za ekstrakciju. Ekstrakcija je provedena vaganjem 2 g aktivnog mulja, špikano s 2 mL standardne otopine smjese farmaceutika i 4 mL metanola. Uvjeti ekstrakcije su isti (30 minuta, 30 °C i 200 okr/min). I u ovom sedmom eksperiment korišteni su svi isti sustavi otapala u omjerima 4:1 kao i u šestom eksperimentu.

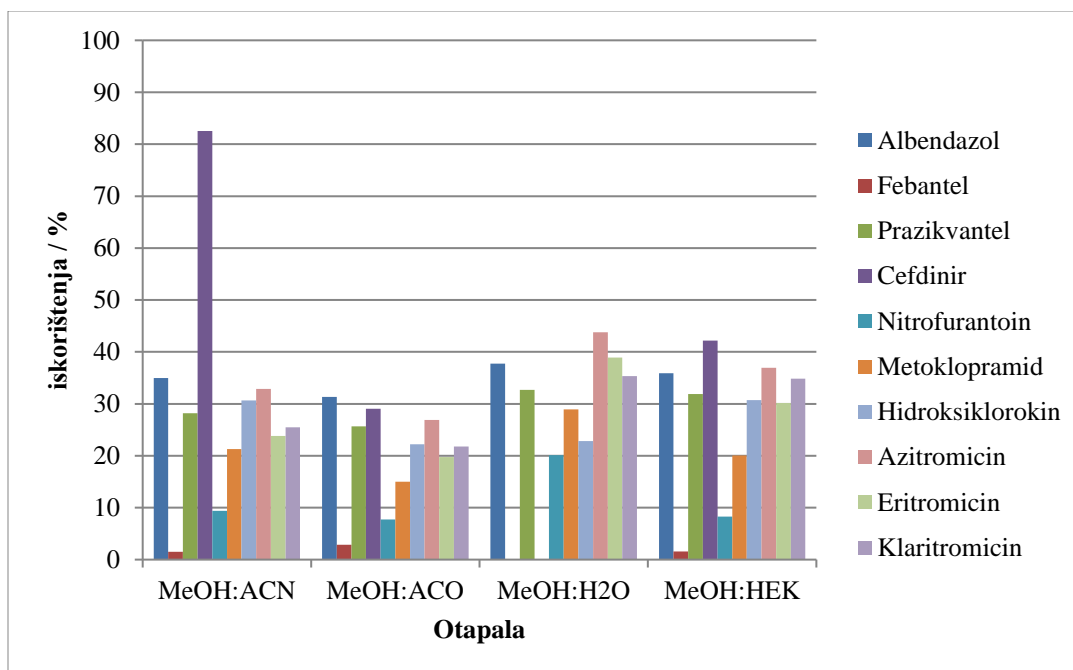


**Slika 35.** Iskorištenje ekstrakcije s 0,1 g uzorka za sustave metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda, metanol:heksan

Iz grafa na **Slici 35** vidljivo je da su gotovo svi farmaceutici ekstrahirani (osim febantela koji nije ekstrahiran sustavom metanol: voda). Međutim, i ovim eksperimentom nisu dobivena željena iskorištenja iznad 50 %, odnosno sva iskorištenja su do 20 %. Cefdinir ima nešto veća iskorištenja u sustavima s acetonitrilom i acetonom. Najveće iskorištenje makrolida daje azitromicin u sustavu metanol:voda i iznosi 14 %. U usporedbi s 0,3 g nešto su manja iskorištenja u svim sustavima.

U sljedećem osmom eksperimentu uzimalo se je 0,5 g uzorka aktivnog mulja. Sustavi otapala su bili isti u omjerima 4:1 kao i u sedmom i u šestom eksperimentu. Eksperiment je proveden vaganjem 7 g aktivnog mulja, špikan sa 7 mL standardne otopine smjese farmaceutika i 9 mL metanola. Eksperimentalni uvjeti mućkanja ostali su isti.

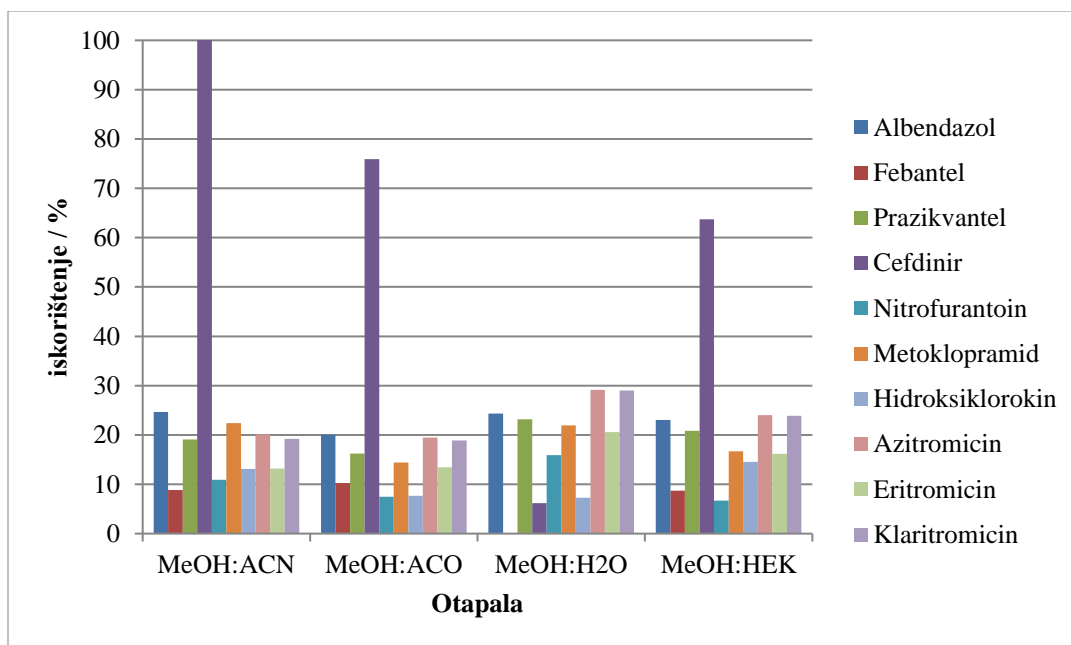




**Slika 36.** Iskorištenja ekstrakcije mućkanja s 0,5 g uzorka u sustavima metanol:acetonitril, metanol:acetone, metanol:voda, metanol:heksan u omjerima 4:1

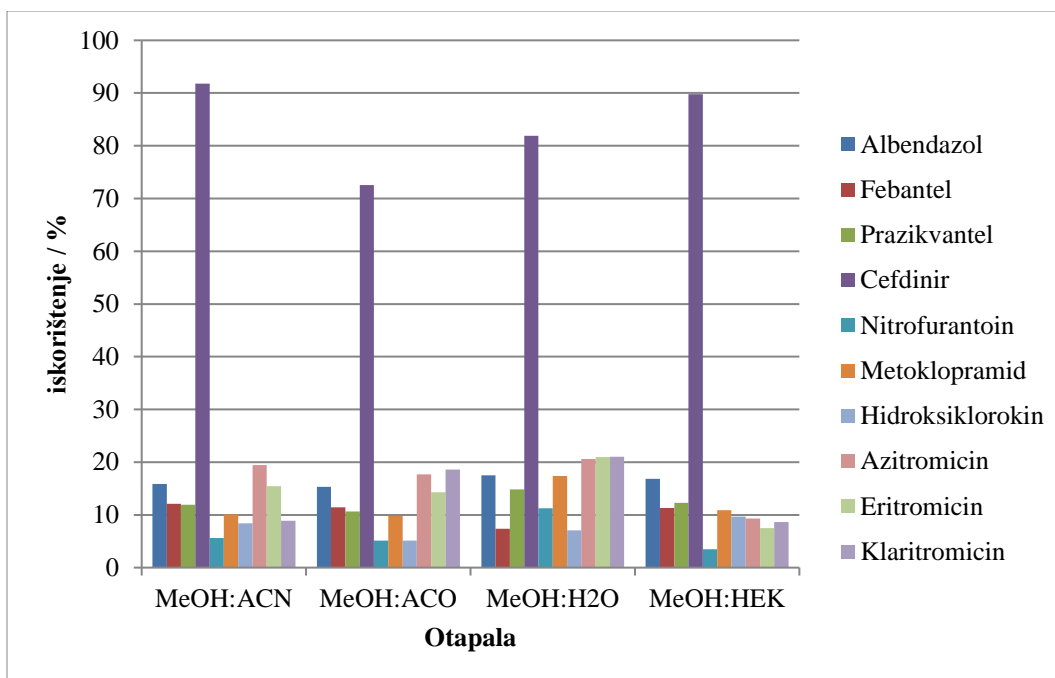
Vidljivo je iz grafa na **Slici 36** da se febantel i cefdinir ne detektiraju u sustavu metanol:voda. Iskorištenja ekstrakcije ostalih farmaceutika su u rasponu do čak 44 %, što su do sada najbolja iskorištenja dobivena za ekstrakciju ispitivanih farmaceutika iz aktivnog mulja. Ta činjenica ukazuje na utjecaj omjera mase uzorka i volumena otapala na učinkovitost ekstrakcije. Cefdinir u sustavu metanol:acetonitril daje najveće iskorištenje iznad 80 %. U usporedbi s 0,1 i 0,3 g uzorka ovaj eksperiment s 0,5 g pokazao se najboljim.

Sljedeći deveti eksperiment bio je proveden s ciljem da se ispita utjecaj volumena otapala na učinkovitost ekstrakcije. Stoga je na masu uzorka aktivnog mulja dodavano 1 mL, 3 mL i 5 mL sustava otapala za ekstrakciju kod istih uvjeta ekstrakcije kao i kod prethodnih eksperimenata: 30 minuta, 30 °C i 200 okr/min. Eksperimenti su provedeni vaganjem 5 g aktivnog mulja, koji je špikan s 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika i 7 mL metanola, ujedno je ponovljen isti postupak, ali s 1 mL otapala.



**Slika 37.** Iskorištenja ekstrakcije s 5 mL otapala za sustave metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda, metanol:heksan u omjeru 4:1

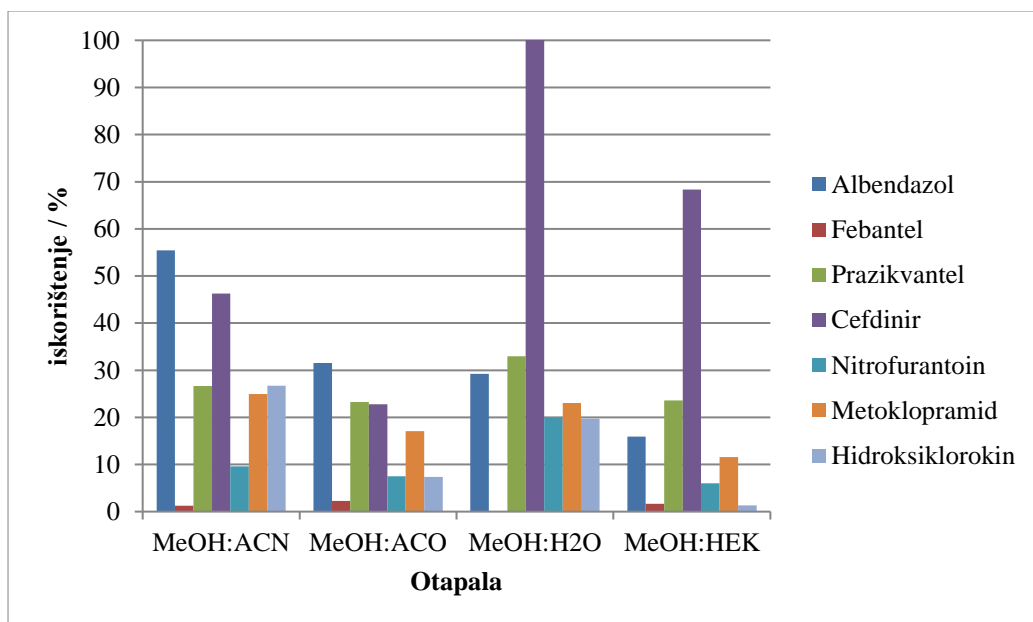
Iz grafa na **Slici 37** je vidljivo da se febantel opet ne detektira u sustavu metanol: voda. Ostali farmaceutici su ekstrahirani. Nešto su manja iskorištenja nego u sustavima s 3 mL otapala (**Slika 33.**). Sva iskorištenja su do 29 % koji ima azitromicin u sustavu metanol:voda, a koji je i ujedino najveće iskorištenje ekstrakcije mućkanjem u ovom eksperimentu.



**Slika 38.** Iskorištenja ekstrakcije s 1 mL otapala za sustave metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda, metanol:heksan u omjeru 4:1

Kod eksperimenta s 1 mL (**Slika 38.**) otapala iskorištenja su još manja, do oko 20 %. Cefdinir ponovo pokazuje najveća iskorištenja u odnosu na ostale farmaceutike. Što se tiče makrolida i oni su detektirani u svim sustavima pri čemu najveća iskorištenja imaju u sustavu metanol:voda i to klaritromicin (21 %). Svi farmaceutici su ekstrahirani u svim sustavima.

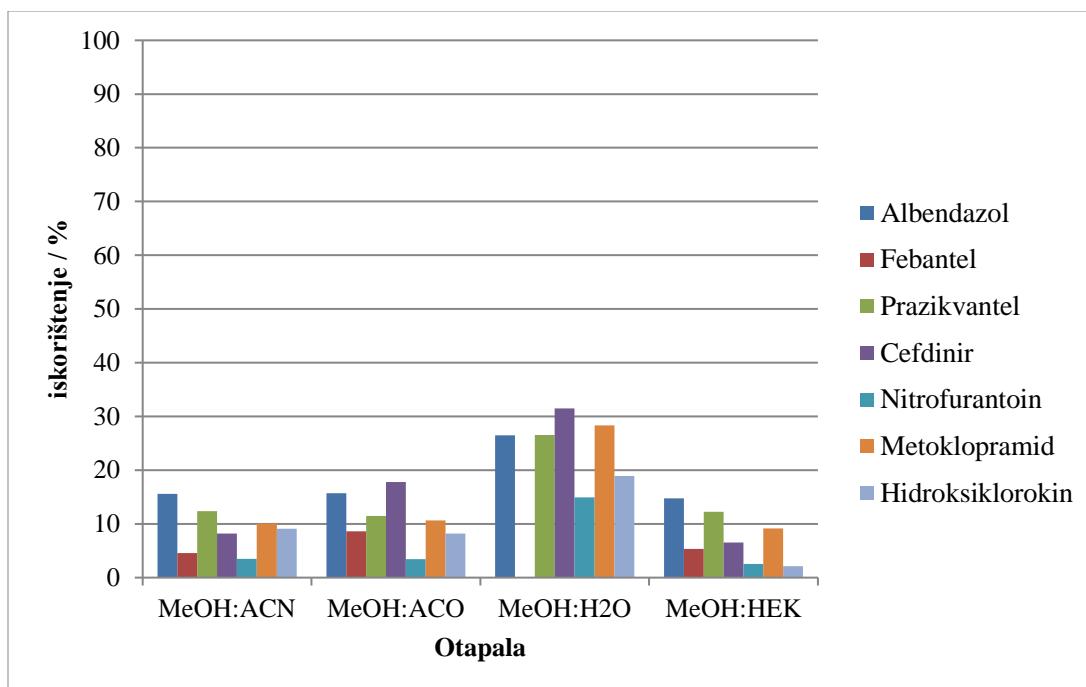
Nakon ovih provedenih eksperimenata koji unatoč promjeni mase i volumena nisu pokazali prevelike promjene u iskorištenju ekstrakcije u idućem desetom eksperimentu ispitivan je utjecaj vremena trajanja ekstrakcije, tako da je vrijeme ekstrakcije trajalo 60 minuta pri 30 °C i 200 okr/min u istim sustavima otapala u omjerima 4:1.



**Slika 39.** Iskorištenja ekstrakcije pri 60 minuta mućkanja za sustave metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda i metanol:heksan

Iz grafa na **Slici 39** vidljivo je da povećanjem vremena ekstrakcije mućkanjem veća su iskorištenja za albendazol i prazikvantel, febantel se ne detektira u sustavu metanol:voda i općenito ima mala iskorištenja. Cefdinir pokazuje utjecaj matice u sustavu metanol:voda jer iskorištenje ekstrakcije prelazi 100 %. Makrolidi nisu uspješno analizirani na HPLC-MS/MS-u tako da za njih nema podataka o iskorištenju.

Zadnji, dvanaesti eksperiment proveden je na ultrazvučnoj kupelji, obzirom da ekstrakcija mućkanjem ne daje dobra iskorištenja farmaceutika. Ekstrakcija ultrazvukom provedena je pri 30 °C, 600 W i 30 minuta. Eksperiment je proveden vaganjem 5 g aktivnog mulja, špikan 5 mL standardne otopine smjese farmaceutika i 7 mL metanola.



**Slika 40.** Iskorištenja ekstrakcije ultrazvukom za sustave metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda, metanol:heksan u omjerima 4:1 pri uvjetima ultrazvučne ekstrakcije 30 minuta, 30 °C i 600 W

Iz grafa na **Slici 40** je vidljivo da su veća iskorištenja u sustavu metanol:voda. U tom sustavu jedino febantel nije detektiran. Tu su iskorištenja oko 30 %. Također kao i u prethodnom eksperimentu makrolidi nisu uspješno analizirani na HPLC-MS/MS-u tako da za njih nema iskorištenja. Kao što je poznato iz literature [49] iako je ultrazvučna ekstrakcija brža i koristi manje otapala manja je djelotvornost ekstrakcije, a time i iskorištenje. Kako ni ovom ekstrakcijom nije postignuto ciljanih 50 % iskorištenja, potrebno je primijeniti alternativne metode ekstrakcije farmaceutika poput ekstrakcije mikrovalovima ili ekstrakciju farmaceutika raspršenjem kroz maticu (MSPD) kojima bi se smanjio utjecaj matice uzorka.

## 5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog rada je bio optimirati postupak ekstrakcije mućkanja otapalima deset farmaceutika iz aktivnog mulja dopremljenog iz Jamnice koji je špikan ispitivanim farmaceuticima. Ispitan je utjecaj vrste i volumena otapala, omjera mase uzorka i volumena otapala za ekstrakciju, vremena trajanja ekstrakcije i pH-vrijednosti. Cilj je bio postići iskorištenja 50 % i više. Nakon provedenih eksperimenata može se zaključiti:

- pregledom literature (**Tablica 1.**) odabrani su uvjeti ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja izborom vrste i volumena otapala, najbolji rezultati postignuti su sustavom metanol:voda, no sva iskorištenja su manja od 30 %,
- nakon toga ispitali smo utjecaj promjene mase i volumena na iskorištenje ekstrakcije na 4 odabrana sustava: metanol:acetonitril, metanol:aceton, metanol:voda i metanol:heksan
- ispitali smo utjecaj svih željenih parametara i najbolje rezultate dali su odabrani sustavi s 0,5 g odvage i 3 mL otapala,
- utjecaj promjene volumena, vremena trajanja ekstrakcije, pa i primjena ultrazvuka nisu pokazali veća iskorištenja farmaceutika od 30 % te stoga nije provedena validacija metode,
- metoda ekstrakcije mućkanjem nije pogodna za ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja jer su dobivena iskorištenja mala. Trebalo bi pokušati s alternativnim metodama ekstrakcije poput ekstrakcije potpomognute mikrovalovima ili ekstrakcija raspršenjem matice kroz čvrstu fazu.

## 6. LITERATURA

[1.] **M. Kaštelan Macan, M. Petrović:**

*Analitika okoliša*, HINUS i FKIT, (2013), Zagreb, str. 52

[2.] **M. Šabić, M. Vuković Domanovac, Z. Findrik Blaževića, E. Meštrović:**

*Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrijske otpadne vode*, *Kemija u industriji*, **64(5-6)** (2015) 229-236

[3.] **World Health Organisation:**

*Pharmaceuticals in drinking-water*, WHO, (2012), 2,

[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/publications/2012/pharmaceuticals/en/](http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2012/pharmaceuticals/en/) (preuzeto: 4.7.2017.)

[4.] **S. Zrnčević:**

*Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije*, *Hrvatske vode*, **24** (2016) 119-136

[5.] **FARMACEUTICI U OKOLIŠU:**

<http://www.environment-assured.com/wp-content/uploads/Screenshot-2014-07-10-14.22.05.png> (preuzeto:3.7.2017.)

[6.] **AKTIVNI MULJ:**

<http://water.worldbank.org/shw-resource-guide/infrastructure/menu-technical-options/activated-sludge> (preuzeto: 9.3.2017.)

[7.] **AKTIVNI MULJ:**

[https://en.wikipedia.org/wiki/Activated\\_sludge](https://en.wikipedia.org/wiki/Activated_sludge) (preuzeto19.3.2017.)

[8.] **B. Tušar:**

*Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode*, CROATIA KNJIGA, Zagreb, (2004) 79-88

[9.] **OBRADA AKTIVNOG MULJA:**

<https://media1.britannica.com/eb-media/55/23955-004-2C395C6A.jpg> (preuzeto 19.6.2017.)

[10.] **FARMACEUTICI:**

[https://en.wikipedia.org/wiki/Pharmaceutical\\_drug](https://en.wikipedia.org/wiki/Pharmaceutical_drug) (preuzeto: 2.6.2017.)

[11.] **ANTIHELMINTICI:**

<http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> (preuzeto: 26.2.2017.)

[12.] **A. J. M. Horvat, M. Petrović, S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko, A. D. Mance, M. Kaštelan-Macan:**

*Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment*, *Trends in Analytical Chemistry*, **1** (2012) 61-82

[13.] **Goodman&Gilman's:**

*The Pharmacological Basis Of Therapeutics*, 10<sup>th</sup> Edition, The McGraw-HillCompanies, Inc. (2001) 1125-1251

[14.] **ALBENDAZOL:**

<http://www.drugfuture.com/pharmacopoeia/usp32/pub/data/images/v32270/cas-54965-21-8.gif> (preuzeto: 19.6.2017.)

[15.] **G. Dusi, V. Gamba, E. Faggionato:**

*Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **38** (2005) 375-379

[16.] **S. C. Su, H. H. Chou, P. C. Chang, C. H. Liu, H. S. Chou:**

*Simultaneous determination of febantel, fenbendazole, oxfendazole and oxfendazolesulfone in livestock by matrix solid phase dispersion extraction technique and HPLC*, Journal of Food and Drug Analysis, **3** (2004) 244-253

[17.] **FEBANTEL:**

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/7/7a/Febantel.svg/1280px-Febantel.svg.png> (preuzeto: 19.6.2017.)

[18.] **M. Giorgi, V. Meucci, E. Vaccaro, G. Mengozzi, M. Giusiani, G. Soldani:**

*Effects of liquid and freeze-dried grapefruit juice on the pharmacokinetics of praziquantel and its metabolite 4-hydroxy praziquantel in beagle dogs*, Pharmacological Research, **47** (2003) 87-92

[19.] **PRAZIKVANTEL:**

[http://www.worldofchemicals.com/woclite/tmp/chem/b/bb62e19f3278d734f5caac32982debc6\\_b302f68a847d1a26acff7b6f2b48b759.png](http://www.worldofchemicals.com/woclite/tmp/chem/b/bb62e19f3278d734f5caac32982debc6_b302f68a847d1a26acff7b6f2b48b759.png) (preuzeto: 19.6.2017.)

[20.] **I. Miletić, S. Šegović, I. Anić:**

*Antibiotici u ednodonciji*, Stomatološki fakultet Zagreb

[https://www.sfzg.unizg.hr/download/repository/Antibiotici\\_u\\_endodonciji.pdf](https://www.sfzg.unizg.hr/download/repository/Antibiotici_u_endodonciji.pdf) (preuzeto: 3.7.2017.)

[21.] **L. J. Zhou, G. G. Ying, S. Liu, J. L. Zhao, B. Yang, Z. F. Chen, H. J. Lai:**

*Occurrence and fate of eleven classes of antibiotics in two typical wastewater treatment plants in South China*, Science of the Total Environment, **452-453** (2013) 365-376

[22.] **ANTIBIOTICI:**

<http://ordinacija.vecernji.hr/zdravlje/preventiva/sve-sto-trebate-znati-o-antibioticima/> (preuzeto:19.5.2017.)

[23.] **ANTIBIOTICI:**

<https://www.intechopen.com/books/emerging-pollutants-in-the-environment-current-and-further-implications/veterinary-antibiotics-in-the-environment> (preuzeto: 14.5.2017.)



[24.] **MAKROLIDI:**

<https://livertox.nih.gov/MacrolideAntibiotics.htm> (preuzeto: 9.3.2017.)

[25.] **D. Sakar:**

*Makrolidi i linkozamidi*, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, <http://www.jelena-suran.com/predavanja/Makrolidi.pdf> (preuzeto: 3.7.2017.)

[26.] **AZITROMICIN:**

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502016000100002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502016000100002) preuzeto: 29.4.2017.)

[27.] **AZITROMICIN:**

<https://livertox.nih.gov/Azithromycin.htm> (preuzeto: 9.3.2017.)

[28.] **AZITROMICIN STRUKTURA:**

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/33/Azithromycin\\_structure.svg/220px-Azithromycin\\_structure.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/3/33/Azithromycin_structure.svg/220px-Azithromycin_structure.svg.png) (preuzeto: 19.6.2017.)

[29.] **Z. J. Chen, J. Zhang, J. C. Yu, G. Y. Cao, X. Wu, Y. Shi:**

*Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, **834** (2006) 163-169

[30.] **CEFDINIR:**

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010040422010000700009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422010000700009) (preuzeto: 7.5.2017.)

[31.] **A. Khan, Z. Iqbal, M. I. Khan, K. Javed, L. Ahmad, Y. Shah, F. Nasir:**

*Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma by RP-HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study*, Journal of Chromatography B, **879** (2011) 2423-2429

[32.] **CEFDINIR STRUKUTRA:**

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/e/eb/Cefdinir.svg/1200px-Cefdinir.svg.png> (preuzeto: 24.6.2017.)

[33.] **ERITROMICIN:**

<https://livertox.nih.gov/Erythromycin.htm> (preuzeto: 9.3.2017.)

[34.] **ERITROMICIN STRUKTURA:**

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/65/Erythromycin\\_A.svg/1200px-Erythromycin\\_A.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/65/Erythromycin_A.svg/1200px-Erythromycin_A.svg.png) (preuzeto: 19.6.2017.)

[35.] **KLARITROMICIN:**

<https://livertox.nih.gov/Clarithromycin.htm> (preuzeto: 9.3.2017.)

[36.] **KLARITROMICIN STRUKTURA:**

[https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/12/Clarithromycin\\_structure.svg/250px-Clarithromycin\\_structure.svg.png](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/1/12/Clarithromycin_structure.svg/250px-Clarithromycin_structure.svg.png) (preuzeto: 19.6.2017.)

[37.] **V. Arancibia, M. Valderrama, A. Madariaga, M. C. Zuniga, R. Segura:** *Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection*, *Talanta*, **61** (2003) 377-383

[38.] **NITROFURANTOIN:**

[https://fthmb.tqn.com/WROMNCMLdAoKPHiVLPQNIbN3YxY=/768x0/filters:no\\_upscale\(\)/about/Nitrofurantoin-58b5ee4f5f9b5860461bc187.jpg](https://fthmb.tqn.com/WROMNCMLdAoKPHiVLPQNIbN3YxY=/768x0/filters:no_upscale()/about/Nitrofurantoin-58b5ee4f5f9b5860461bc187.jpg) (preuzeto:19.6.2017.)

[39.] **KEMOTERAPEUTICI:**

<http://www.thefreedictionary.com/Chemotherapeutics> (preuzeto:19.5.2017.)

[40.] **M. Starčević:**

*Sinteza novih derivata 7-hidroksikumarina i njihovi biološki učinci na rast ljudskih stanica in vitro*, Magistarski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, (2011) 20

[41.] **H. Neziri:**

*Primjena marihuane u terapijske svrhe*—pro i contra, Farmaceutsko–biokemijski fakultet, Zagreb, (2015), 38

[42.] **I. González-Hernández, L. Aguirre-Cruz, J. Sotelo, R. López-Arellano, A. Morales-Hipólito, H. Jung-Cook:**

*Distribution of hydroxychloroquine in lymphoid tissue in a rabbit model for HIV infection*, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58** (2014) 584-586

[43.] **M. Soichot, B. Mégarbane, P. Houzé, L. Chevillard, J. Fonsart, F. J. Baud, O. Laprévotte, E. Bourgonne:**

*Development, validation and clinical application of a LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of hydroxychloroquine and its active metabolites in human whole blood*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **100** (2014) 131-137

[44.] **HIDROSIKLOROKIN:**

<https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/a/a6/Hydroxychloroquine.svg/250px-Hydroxychloroquine.svg.png> (preuzeto: 24.6.2017.)

[45.] **ANTIEMETIK:**

<http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=2999> (preuzeto: 19.5.2017.)

[46.] **J. Čerkez Habek:**

*Liječenje gastrointestinalnih simptoma u palijativnoj skrbi*, *Klinika za unutrašnje bolesti, Klinička bolnica "Sveti Duh"*, Zagreb, Hrvatska, *Acta Med Croatica*, **67** (2013) 241-249

[47.] **METOKLOPRAMID:**

<https://www.drugs.com/metoclopramide.html> (preuzeto: 9.3.2017.)

[48.] **METOKLOPRAMID STRUKTURA:**

<https://en.wikipedia.org/wiki/Metoclopramide#/media/File:Metoclopramide.svg> (preuzeto: 24.6.2017.)

[49.] **D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger:**

*Priprava uzoraka za analizu*, u: M. Kaštelan–Macan, M. Petrović: *Analitika okoliša*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, (2012), 140-165

[50.] **F. Settle:**

*Hanbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry*, Prentice Hall PTR, New Jersey, (1997) 28-29, 30-33, 147-153

[51.] **ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA:**

[https://www.researchgate.net/profile/Shekhar\\_Kadam3/publication/236601532/figure/fig1/AS:299399545671689@1448393822944/Figure-1-Schematic-diagram-of-ultrasound-assisted-extraction-UAE.png](https://www.researchgate.net/profile/Shekhar_Kadam3/publication/236601532/figure/fig1/AS:299399545671689@1448393822944/Figure-1-Schematic-diagram-of-ultrasound-assisted-extraction-UAE.png) (preuzeto: 19.6.2017.)

[52.] **SUPERKRITIČNI FLUID:**

<http://glossary.periodni.com/glosar.php?hr=superkriti%C4%8Dni+fluid> (preuzeto: 22.5.2017.)

[53.] **FAZNI DIJAGRAM CO<sub>2</sub>:**

<http://www.supercriticalfluids.com/wp-content/uploads/phase-diagram.jpg> (preuzeto: 19.6.2017.)

[54.] **MIKROVALNA EKSTRAKCIJA:**

<http://production-oms.s3.amazonaws.com/static/Image/ONLINE%2038177%20LLAS2.jpg> (preuzeto: 19.6.2017.)

[55.] **M. Zrnčić:**

*Razvoj i optimizacija analitičkih postupaka za određivanje farmaceutika u otpadnim vodama*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, (2013), 41-42; 74-75, 82-84

[56.] **ANALITIČKE METODE:**

<https://www.scribd.com/document/57998471/Tandem-Techniques-R-P-W-Scott> (preuzeto: 22.5.2017.)

[57.] **HPLC-DAD:**

<http://www.crawfordscientific.com/images/Diode-Array-Detector-Settings01.jpg> (preuzeto: 19.6.2017.)

[58.] **SPEKTROMETAR MASA:**

<http://www.mhhe.com/physsci/chemistry/carey/student/olc/graphics/carey04oc/ch13/figures/1334.gif> (preuzeto: 24.6.2017.)

[59.] **N. Rummel, I. Chung, B. Shaikh:**

*Determination of albendazole, fenbendazole and their metabolites in mouse plasma by high performance liquid chromatography using fluorescence and ultraviolet detection*, Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, **34** (2011) 2211-2223

[60.] **Zs. Romvöri, J. Fekete, S. Kemény, G. Pokol, I. Gebefügi, A. Kettrup:**

*Determination of two metabolites of albendazole, albendazole-sulfoxide and albendazole-sulfone in cow's milk using an HPLC method*; Chromatographia, **48** (1998) 777-778

[61.] **W. J. Sim, H. Y. Kim, S. D. Choi, J. H. Kwon, J. E. Oh:**

*Evaluation of pharmaceuticals and personal care products with emphasis on anthelmintics in human sanitary waste, sewage, hospital wastewater, livestock wastewater and receiving water*, Journal of Hazardous Materials, **248-249** (2013) 219-227

[62.] **L. Berthod, G. Roberts, D. C. Whitley, A. Sharpe, G. A. Mills:**

*A solid-phase extraction method for rapidly determining the adsorption coefficient of pharmaceuticals in sewage sludge*, Water Research, **67** (2014) 292-298

[63.] **C. Soto, D. Contreras, S. Orellana, J. Yanez, M. I. Toral:**

*Simultaneous determination of albendazole and praziquantel by second derivative spectrophotometry and multivariate calibration methods in veterinary pharmaceutical formulation*, Analytical Sciences, **26**, (2010), 891-896

[64.] **P. Chiap, B. Evrard, M. A. Bimazubute, P. de Tullio, P. Hubert, L. Delattre, J. Crommen:**

*Determination of albendazole and its main metabolites in ovine plasma by liquid chromatography with dialysis as an integrated sample preparation technique*, Journal of Chromatography A, **870** (2000) 121-134

[65.] **L. L. D. X. Xing, Q. R. Li, Y. Xiao, M. Q. Ye, Q. Yang:**

*Determination of albendazole and metabolites in silkworm Bombyx mori Hemolymph by ultrafast liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry*, (2014)

<http://journals.plos.org/sci-hub.io/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0105637> (preuzeto: 29.4.2017.)

[66.] **D. Marciocha, J. Kalka, J. Turek-Szytow, J. Surmacz-Górska:**

*A pretreatment method for analysing albendazole by HPLC in plant material*, Water Air Soil Pollution, **224(1646)** (2013) 1-8

[67.] **M. Asadi, S. Dadfarnia, A. M. H. Shabani:**

*Simultaneous extraction and determination of albendazole and triclabendazole by a novel syringe to syringe dispersive liquid phase microextraction-solidified floating organic drop combined with high performance liquid chromatography*, *Analytica Chimica Acta*, (2016) 1-8

[68.] **M. Ferenčak:**

*Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta mućkanjem*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu Zagreb, (2012) 30

[69.] **I. Kaselj:**

*Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom*, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, (2012) 38-39

[70.] **L. Havlíková, D. Satínský, P. Solich:**

*Aspects of decontamination of ivermectin and praziquantel from environmental waters using advanced oxidation technology*, *Chemosphere*, **144** (2016) 21-28

[71.] **G. Klausz, É. Keller, Z. Sára, P. Székely-Körmöczy, P. Laczay, K. Ary, P. Sótonyi, K. Róna:**

*Simultaneous determination of praziquantel, pyrantel embonate, febantel and its active metabolites, oxfendazole and fenbendazole, in dog plasma by liquid chromatography/mass spectrometry*, *Biomedical Chromatography*, **29** (2015) 1859-1865

[72.] **I. Meister, A. Leonidova, J. Kovač, U. Duthaler, J. Keiser, J. Huwyler:**

*Development and validation of an enantioselective LC-MS/MS method for the analysis of the anthelmintic drug praziquantel and its main metabolite in human plasma, blood and dried blood spots*, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **118** (2016) 81-88

[73.] **A. Göbel, A. Thomsen, C. S. McArdell, A. C. Alder, W. Giger, N. Theiß, D. Löffler, T. A. Ternes:**

*Extraction and determination of sulfonamides, macrolides, and trimethoprim in sewage sludge*, *Journal of Chromatography A*, **1085** (2005) 179-189

[74.] **X. Song, T. Zhou, Q. Liu, M. Zhang, C. Meng, J. Li, L. He:**

*Molecularly imprinted solid-phase extraction for the determination of ten macrolide drugs residues in animal muscles by liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, *Food Chemistry*, **208** (2016) 169-176

[75.] **Q. Yan, X. Gao, Y.P. Chen, X. Peng, Y. Zhang, X. Gan, C. Zi, J. Guo:**

*Occurrence, fate and ecotoxicological assessment of pharmaceutically active compounds in wastewater and sludge from wastewater treatment plants in Chongqing, the Three Gorges Reservoir Area*, *Science of the Total Environment*, **470-471** (2014) 618-630

[76.] **A. Zeng, X. Liu, S. Zhang, Y. Zheng, P. Huang, K. Du, Q. Fu:**  
*Determination of azithromycin in raw materials and pharmaceutical formulations by HPLC coupled with an evaporative light scattering detector*, Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, **30** (2014) 1-10

[77.] **H. K. Trivedi, M. C. Patel:**  
*Development and validation of a precise LC method for the determination of drug release during dissolution profile in pharmaceutical formulation*, International Journal of Chemical Technology Research, **2** (2010) 912-919

[78.] **L. Miguel, C. Barbas:**  
*LC determination of impurities in azithromycin tablets*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **33** (2003) 211-217

[79.] **S. N. Waghule, N. P. Jain, C. J. Patani, A. C. Patani:**  
*Method development and validation of HPLC method for determination of azithromycin*, Der Pharma Chemica, **5(4)** (2013) 166-172

[80.] **H. Ebrahimzadeh, Y. Yamini, K. M. Ara, F. Kamarei, F. Khalighi-Sigaroodi:**  
*Determination of azithromycin in biological samples by LLLME combined with LC*, Chromatographia, **72** (2010) 731-735

[81.] **I. Michael-Kordatou, M. Iacovou, Z. Frontistis, E. Hapeshi, D. D. Dionysiou, D. Fatta-Kassinos:**  
*Erythromycin oxidation and ERY-resistant Escherichia coli inactivation in urban wastewater by sulfate radical-based oxidation process under UV-C irradiation*, Water Research, **85** (2015) 346-358

[82.] **L. Wei, K. Qin, N. Zhao, D. R. Noguera, W. Qiu, Q. Zhao, X. Kong, W. Zhang, F. Tetteh Kabutey:**  
*Transformation of erythromycin during secondary effluent soil aquifer recharging: Removal contribution and degradation path*, Journal of Environmental Sciences, **51** (2017) 173-180

[83.] **L. Zhao, W. Cao, X. Xue, M. Wang, L. Wu, L. Yu:**  
*Occurrence of erythromycin and its degradation products/residues in honey. Validation of an analytical method*, Journal of Separation Science, **40(6)** (2017) 1353-1360

[84.] **Z. Cao, B. Liu, W. Liu, Y. Su, W. Bo, G. Yao Jianguo:**  
*A validated RP-LC method for the determination of erythromycin anoxime and related substances*, Advance Journal of Food Science and Technology, **5(1)** (2013) 68-71

[85.] **S. T. Hassib, A. E. Farag, E. F. Elkady:**  
*Liquid chromatographic and spectrophotometric methods for the determination of erythromycin stearate and trimethoprim in tablets*, Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University, **49** (2011) 81-89

- [86.] **S. M. Billedeau, T. M. Heinze, P. H. Siitonen:**  
*Liquid chromatography analysis of erythromycin A in salmon tissue by electrochemical detection with confirmation by electrospray ionization mass spectrometry*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, **51** (2003) 1534-1538
- [87.] **M. Yasojima, N. Nakada, K. Komori, Y. Suzuki, H. Tanaka:**  
*Occurrence of levofloxacin, clarithromycin and azithromycin in wastewater treatment plant in Japan*, Water Science & Technology, **53(11)** (2006) 227-233
- [88.] **M. Baumann, K. Weiss, D. Maletzki, W. Schüssler, D. Schudoma, W. Kopf, U. Kühnen:** *Aquatic toxicity of the macrolide antibiotic clarithromycin and its metabolites*, Chemosphere, **120** (2015) 192-198
- [89.] **S. Gangishetty, S. Verma:**  
*RP-HPLC method development and validation for simultaneous estimation of clarithromycin and paracetamol*, Hindawi Publishing Corporation, **2013** (2013)  
<https://www.hindawi.com/journals/isrn/2013/948547/> (preuzeto: 3.7.2017.)
- [90.] **S. N. Alvi, S. Al Dgither, M. M. Hammami:**  
*Rapid determination of clarithromycin in human plasma by LCMS/MS assay*, Pharmaceutical Analytical Chemistry, (2016) <https://www.omicsonline.org/open-access/rapid-determination-of-clarithromycin-in-human-plasma-by-lcmsms-assay-2471-2698-1000110.pdf> (preuzeto: 3.7.2017.)
- [91.] **J. Li, L. Wang, Z. Chen, R. Xie, Y. Li, T. Hang, G. Fan:**  
*Development and validation of a rapid HPLC method for the determination of cefdinir in beagle dog plasma integrated with an automatic on-line solid-phase extraction following protein precipitation in the 96-well plate format*, Journal of Chromatography B, **895-896** (2012) 83-88
- [92.] **Z. Chen, J. Zhang, J. Yu, G. Cao, X. Wu, Y. Shi:**  
*Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, **834** (2006) 163-169
- [93.] **M. A. Akl, M. A. Ahmed, A. Ramadan:**  
*Development and validation of a liquid chromatographic method for the determination of cefdinir residues on manufacturing equipment surfaces*, Journal of Chromatography & Separation Techniques, **4** (2013) <https://www.omicsonline.org/development-and-validation-of-a-liquid-chromatographic-method-for-the-determination-of-cefdinir-residues-on-manufacturing-equipment-surfaces-2157-7064.1000177.pdf> (preuzeto: 3.7.2017.)
- [94.] **Na. Du, M. Chen, L. Sheng, S. Chen, H. Xu, Z. Liu, C. Song, R. Qiao:**  
*Determination of nitrofurantoin metabolites in shrimp by high performance liquid chromatography with fluorescence detection and liquid chromatography–tandem mass spectrometry using a new derivatization reagent*, Journal of Chromatography A, **1327** (2014) 90-96

- [95.] **T. G. Diaz, A. G. Cabanillas, M. I. A. Valenzuela, C.A. Correa , F. Salinas:**  
*Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection*, Journal of Chromatography A, **764** (1997) 243–248
- [96.] **P. Mottier, S. P. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, T. Goldmann, P. A. Guy:**  
*Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography-electrospray ionisation-tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography A, **1067** (2005) 85-91
- [97.] **A. Conneely, A. Nugent, M. O’Keeffe, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn, L. Kovacsics, A. Fodor, R. J. McCracken, D. G. Kennedy:**  
*Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection*, Analytica Chimica Acta, **483** (2003) 91-98
- [98.] **Y. Wei, G. Nygard, S. K. W. Khalil:**  
*A HPLC method for the separation and quantification of the enantiomers of hydroxychloroquine and its three major metabolites*, Journal of Liquid Chromatography, **17(16)** (1994) 3479-3490
- [99.] **D. R. Brocks, F. M. Pasutto, F. Jamali:**  
*Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatographic separation and assay of hydroxychloroquine enantiomers*, Journal of Chromatography, **581** (1992) 83-92
- [100.] **A. K. Füzéry, A. R. Breaud, N. Emezienna, S. Schools, W. A. Clarke:**  
*A rapid and reliable method for the quantitation of hydroxychloroquine in serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry*, Clinica Chimica Acta, **421** (2013) 79-84
- [101.] **C. D. Cardoso, P. S. Bonato:**  
*Enantioselective metabolism of hydroxychloroquine employing rats and mice hepatic microsomes*, Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, **45** (2009)  
[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-82502009000400008](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-82502009000400008) (preuzeto: 3.7.2017.)
- [102.] **L. Z. Wang, R. Ong, T. M. Chin, W. L. Thuya, S. C. Wan, A. L. A. Wong, S. Y. Chan, P. C. Ho, B. C. Goh:**  
*Method development and validation for rapid quantification of hydroxychloroquine in human blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **61** (2012) 86-92
- [103.] **Y. Qu, G. Noe, A. R. Breaud, M. Vidal, W. A. Clarke, N. Zahr, T. Dervieux, N. Costedoat-Chalumeau, B. Blanchet:**  
*Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood* Future Science OA, **1(3)** (2015)  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5137978/> (preuzeto: 3.7.2017.)



[104.] **H. W. Lee, H. Y. Ji, H. Y. Kim, E. S. Park, K. C. Lee, H. S. Lee:**

*Determination of metoclopramide in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry*, Journal of Chromatography B, **877** (2009) 1716-1720

[105.] **M. Yan, H. D. Li, B. M. Chen, X. L. Liu, Y. G. Zhu:**

*Determination of metoclopramide in human plasma by LC-ESI-MS and its application to bioequivalence studies*, Journal of Chromatography B, **878** (2010) 883-887

[106.] **R. D. Jones, J. C. Price, J. A. Stuedemann, J. M. Bowen:**

*In vitro and in vivo release of metoclopramide from a subdermal diffusion matrix with potential in preventing fescue toxicosis in cattle*, Journal of Controlled Release, **30** (1994) 35-44

[107.] **ANALITIČKA VAGA:**

<http://images.images-hcs.com/images/big/XA204DR.jpg> (pristupljeno: 19.6.2017.)

[108.] **pH - METAR:**

<http://media.biocompare.com/m/37/product/2669520-400x300.jpg> (pristupljeno: 19.6.2017.)

[109.] **MUČKALICA:**

[http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product\\_detail?iProduct=3940000&iProductgroup=&iSubgroup=&iCS=1&iAcc=2&iCon=](http://www.ika.com/owa/ika/catalog.product_detail?iProduct=3940000&iProductgroup=&iSubgroup=&iCS=1&iAcc=2&iCon=) (pristupljeno: 31.5.2017.)

## 7. DODATAK

### 7.1. Popis slika

- Slika 1.** Kako farmaceutici dopijevaju u okoliš [5]
- Slika 2.** Aktivni mulj [7]
- Slika 3.** Obrada aktivnog mulja [9]
- Slika 4.** Struktura albendazola [14]
- Slika 5.** Struktura febantela [17]
- Slika 6.** Struktura prazikvantela [19]
- Slika 7.** Struktura azitromicina [28,27]
- Slika 8.** Struktura cefdinira [32]
- Slika 9.** Struktura eritromicina [34]
- Slika 10.** Struktura klaritromicina [36]
- Slika 11.** Struktura nitrofurantoin [38]
- Slika 12.** Struktura hidrosiklorokin [44]
- Slika 13.** Struktura metoklopramida [48]
- Slika 14.** Prikaz mogućih postupaka pripreme uzorka s obzirom na agregacijsko stanje [49]
- Slika 15.** Prikaz rada ultrasonične ekstrakcije [51]
- Slika 16.** Fazni dijagram CO<sub>2</sub> [53]
- Slika 17.** Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju [54]
- Slika 18.** Dijelovi sustava kromatografije visoke djelotvornosti [55]
- Slika 19.** Detektor s nizom dioda [57]
- Slika 20.** Maseni spektrometar [58]
- Slika 21.** Analitička vaga Mettler Toledo AB104
- Slika 22.** Analitička vaga Mettler Toledo, XA105 [109]
- Slika 23.** pH metar [110]
- Slika 24.** Mućkalica IKA KS 3000i control
- Slika 25.** Pribor za filtriranje
- Slika 26.** Büchi Waterbath B – 480
- Slika 27.** Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti ProStar
- Slika 28.** Agilent kromatografski sustav Series 1200 sa spektrometrom masa 6410 QqQ [55]
- Slika 29.** Iskorištenja ekstrakcije s čistim otapalima
- Slika 30.** Iskorištenja ekstrakcije za sustav otapala metanol:acetonitri, metanol:etil acetat, metanol:voda i etanol:etil acetat
- Slika 31.** Iskorištenje ekstrakcije mućkanjem u sustavima metanol:voda (80:20, 50:50, 20:80) i u sustavu metanol:voda (50:50, pH 2)
- Slika 32.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol: voda (80:20, pH 4), metanol: voda (80:20, pH 7), metanol: voda (80:20, pH 9) i metanol:acetonitril
- Slika 33.** Iskorištenje ekstrakcije u sustavima metanol: voda (50:50, pH 4), metanol: voda (50:50, pH 7), metanol: voda (50:50, pH 9), aceton: voda (80:20), aceton: voda (50:50) i aceton: voda (20:80)
- Slika 34.** Iskorištenja ekstrakcije u sustavima metanol:acetonitril (4:1), metanol:aceton (4:1), metanol:voda (4:1) i metanol: heksan (4:1) s 0,3 g uzorka
- Slika 35.** Iskorištenje ekstrakcije s 0,1 g uzorka za sustave metanol: acetonitril, metanol:aceton, metanol: voda, metanol: heksan

**Slika 36.** Iskorištenja ekstrakcije mućkanja s 0,5 g uzorka u sustavima metanol:acetonitril, metanol: aceton, metanol: voda, metanol: heksan u omjerima 4:1

**Slika 37.** Iskorištenja ekstrakcije s 5 mL otapala za sustave metanol: acetonitril, metanol: aceton, metanol: voda, metanol: heksan u omjeru 4:1

**Slika 38.** Iskorištenja ekstrakcije s 1 mL otapala za sustave metanol: acetonitril, metanol:aceton, metanol: voda, metanol: heksan u omjeru 4:1

**Slika 39.** Iskorištenja ekstrakcije pri 60 minuta mućkanja za sustave metanol: acetonitril, metanol: aceton, metanol: voda i metanol:heksan

**Slika 40.** Iskorištenja ekstrakcije ultrazvukom za sustave metanol: acetonitril, metanol: aceton, metanol: voda, metanol: heksan u omjerima 4:1 pri uvjetima ekstrakcije (30 minuta, 30 °C i 600 W)

## 7.2. Popis tablica

**Tablica 1.** Pregled literature kojom su se određivala otapala i valne duljine za snimanje farmaceutika

**Tablica 2.** Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

**Tablica 3.** Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-DAD analizama

**Tablica 4.** Gradijent pokretne faze korišten u HPLC-MS/MS analizama

## 8. ŽIVOTOPIS

Antonela Čović [REDACTED]. Završila je opću gimnaziju u Petrinji 2011. godine. Iste godine upisala je preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Za vrijeme studija odradila je stručnu praksu u *Rafineriji nafte Sisak* u odjelu Kontrola kvalitete. Završni rad s temom *Prilagodba postrojenja NPK-2 za proizvodnju amonijevog sulfata* izradila je na Zavodu za reakcijsko inženjerstvo i katalizu pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ljubice Matijašević te ga je 18.9.2015. godine obranila i time stekla akademski naziv prvostupnice Kemijskog inženjerstva. Iste godine upisala je diplomski studij Kemijsko inženjerstvo, modul Kemijske tehnologije i proizvodi.