

Ekstrakcija farmaceutika iz vode

Tolić, Kristina

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:149:447645>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Kristina Tolić

EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ VODE

DIPLOMSKI RAD

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

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

doc. dr. sc. Šime Ukić

izv. prof. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, srpanj 2017.

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

Zahvaljujem se mentorici, izv. prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović sa Zavoda za analitičku kemiju na odabranoj temi, savjetima, susretljivosti te pomoći tijekom provedbe rada.

Zahvaljujem se tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić sa Zavoda za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na pruženoj pomoći tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Hvala dipl. chem. ing. Mislavu Runji, Pliva Hrvatska d.o.o., TAPI Istraživanje i razvoj RJ Analitika na uloženom vremenu, trudu, strpljenju i pomoći pri razvoju metode DryLabom i snimanju uzoraka te obradi podataka na tekućinskom kromatografu ultra visoke djelotvornosti.

Veliko hvala mojim roditeljima, bratu, Matku te ostaloj obitelji i prijateljima što su mi bili bezuvjetna podrška kroz sve godine studiranja.

SAŽETAK

EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ VODE

Zbog sve veće potrošnje i proizvodnje, farmaceutici su sveprisutniji u okolišu. Mogu dospjeti u tlo, podzemne i površinske vode te tako uvelike utjecati na organizme u ekosustavu. Bez obzira što su postojani u niskim koncentracijama, njihovo otkrivanje u okolišu izaziva veliku zabrinutost za ljudsko zdravlje.

U ovom radu razvijena je metoda za analizu trinaest farmaceutika (azitromicin, tiamulin, imatinib, febantel, torasemid, omeprazol, linezolid, prazikvantel, etodolac, sulfametazin, sulfafurazol, albendazol, levamisol) različitih fizikalno-kemijskih svojstava iz otpadnih voda. Separacija farmaceutika iz vode provodila se ekstrakcijom čvrstom fazom. Učinkovitost ekstrakcije kvantitativno je određena tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti uz spektrometar masa kao detektor. Najbolja iskorištenja dobivena su pri sljedećim uvjetima: sorbens Oasis HLB pri pH 5, otapalo za eluiranje metanol, volumen otapala za eluiranje 2 mL te volumen uzorka vode 100 mL. Nakon optimiranja ekstrakcijskih uvjeta, metoda je validirana. Za ispitivane farmaceutike granica kvantifikacije nalazi se u rasponu 0,0025-0,5 µg/L, a granica detekcije 0,001-0,1 µg/L.

Nakon validacije, prethodno razvijena metoda je primijenjena na realnim uzorcima, odnosno za određivanje navedenih farmaceutika u otpadnim vodama iz farmaceutske industrije.

Za razvoj jednostavne i brze metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti i optimiranje njenih uvjeta (pH, temperatura i sastav pokretne faze, i sl.) korišten je program DryLab.

Ključne riječi: *ekstrakcija čvrstom fazom, farmaceutici, otpadna voda, tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti povezana sa spektrometrom masa*

ABSTRACT

EXTRACTION OF PHARMACEUTICALS FROM WATER

Due to increased consumption and production, pharmaceuticals are more ubiquitous in the environment. They can reach the soil, ground water and surface water and greatly affect on organisms in the ecosystem. No matter what they are present in low concentrations, their detection in the environment causes great concern for human health.

In this paper, an analytical method for determination of thirteen pharmaceuticals (azithromycin, tiamulin, imatinib, febantel, torasemide, omeprazole, linezolid, praziquantel, etodolac, sulfamethazine, sulfafurazole, albendazole, levamisole) with different physical-chemical properties has been developed. Separation of pharmaceuticals from water was carried out by solid-phase extraction. The efficiency of the extraction was quantitatively determined by ultra high performance liquid chromatography coupled with mass spectrometry as detector. The best extraction was achieved in following conditions: Oasis HLB sorbent at pH 5, methanol as elution solvent, 2 mL as the volume of the elution solvent and 100 mL as the volume of water sample. After optimizing the extraction conditions, the method has been validated. For investigated pharmaceuticals limit of quantification are ranged from 0,0025-0,5 $\mu\text{g/L}$ and the limit of detection between 0,001-0,1 $\mu\text{g/L}$.

After validation, previously developed method was applied to real samples, for determination of listed pharmaceutical in the pharmaceutical industry wastewaters.

DryLab software was used for development of a quick and simple method of ultra high performance liquid chromatography and to determine their optimal conditions (pH, temperature and composition of the mobile phase, etc).

Key words: *solid-phase extraction, pharmaceuticals, wastewater, ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry*

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO.....	2
2.1. FARMACEUTICI.....	2
2.1.1. Antibiotici	2
2.1.2. Antihelmintici.....	7
2.1.3. Ostali farmaceutici.....	9
2.1.4. Farmaceutici u okolišu	10
2.2. MODERNE ANALITIČKE METODE U ANALIZI FARMACEUTIKA	12
2.2.1. Ekstrakcija kao metoda pripreme uzorka	13
2.2.2. Kromatografija kao instrumentalna metoda analize	17
2.3. VALIDACIJA	21
2.4. KVALITETA UGRAĐENA U DIZAJN.....	23
2.4.1. Primjena DryLab programskog paketa u razvoju HPLC metode	25
3. EKSPERIMENTALNI DIO	27
3.1. MATERIJALI	27
3.1.1. Kemikalije	27
3.1.2. Sorbensi.....	27
3.1.3. Izvorska voda.....	27
3.1.4. Farmaceutski aktivne tvari	27
3.1.4.1. <i>ALBENDAZOL (ALB)</i>	28
3.1.4.2. <i>AZITROMICIN (AZT)</i>	29
3.1.4.3. <i>ETODOLAC (ETD)</i>	30
3.1.4.4. <i>FEBANTEL (FEBA)</i>	31
3.1.4.5. <i>IMATINIB (IMT)</i>	32
3.1.4.6. <i>LEVAMISOL (LEV)</i>	33
3.1.4.7. <i>LINEZOLID (LNZ)</i>	34
3.1.4.8. <i>OMEPRAZOL (OMP)</i>	35
3.1.4.9. <i>PRAZIKVANTEL (PRAZ)</i>	36
3.1.4.10. <i>SULFAFURAZOL (SFUR)</i>	37
3.1.4.11. <i>SULFAMETAZIN (SMET)</i>	38
3.1.4.12. <i>TIAMULIN (TIA)</i>	39
3.1.4.13. <i>TORASEMID (TOR)</i>	40
3.2. INSTRUMENTI.....	41
3.2.1. Analitička vaga	41

3.2.2.	pH-metar	41
3.2.3.	Uređaj za ekstrakciju čvrstom fazom	42
3.2.4.	Rotacijski uparivač	42
3.2.5.	Tekućinski kromatograf ultra visoke učinkovitosti (UHPLC)	43
3.3.	OPIS RADA.....	43
3.3.1.	Priprema standardnih otopina farmaceutika	43
3.3.2.	Priprema uzorka vode s dodatkom farmaceutika	43
3.3.3.	Ekstrakcija farmaceutika iz uzorka vode čvrstom fazom.....	44
3.3.4.	Razvoj optimalne metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti DryLab analizom 46	
3.3.5.	Određivanje učinkovitosti ekstrakcije tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti	52
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	54
4.1.	ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE ČVRSTOM FAZOM	54
4.1.1.	Određivanje optimalnog sorbensa i optimalne pH vrijednosti uzorka vode.....	54
4.1.2.	Određivanje optimalnog otapala za eluiranje	57
4.1.3.	Određivanje optimalnog volumena otapala za eluiranje	59
4.1.4.	Određivanje optimalnog volumena uzorka vode	61
4.2.	VALIDACIJA	63
4.3.	UTJECAJ MATICE	66
4.4.	ANALIZA REALNIH UZORAKA	68
5.	ZAKLJUČAK.....	70
6.	LITERATURA	72
7.	ŽIVOTOPIS.....	75

1. UVOD

Farmaceutici se upotrebljavaju za kontrolu bolesti i održavanje zdravlja kod ljudi, životinja te vodenog uzgoja. Radi sve veće primjene farmaceutika u humanoj i veterinarskoj medicini, njihova potrošnja raste, a samim time i otpuštanje u okoliš. Pronađeni su u ispustima nakon obrade otpadnih voda, površinskim vodama te tlu i vodovodnoj vodi. Iako su te koncentracije niske, zabrinutost je sve veća zbog mogućih posljedica na zdravlje ljudi i ekosustave uslijed dugotrajne izloženosti ovim spojevima. Ponašanje i sudbina farmaceutika u okolišu, jedne od najvažnijih skupina novih zagađivala, nisu dovoljno jasni pa zato mnogi od njih nemaju propisane standarde za površinske i pitke vode. Zbog toga su 1990-ih godina u Europi i Sjedinjenim Američkim Državama pokrenuta istraživanja o spomenutim spojevima u okolišu.

Izrazito je važno i dalje razvijati nove i pouzdane analitičke metode radi detekcije farmaceutika u okolišu. Jedna od novijih metoda koja se koristi u tu svrhu je tekućinska kromatografija zajedno vezana na spektrometar masa pomoću kojeg se analiti detektiraju. Dosad su se koristile neke od analitičkih metoda za određivanje farmaceutika u okolišu, uglavnom za antibiotike, skupinu lijekova koji zbog svojeg utjecaja izazivaju najveću zabrinutost. Izazov je razviti metodu pomoću koje se mogu istovremeno analizirati razne skupine spojeva s različitim fizikalno-kemijskim svojstvima zbog otežanog optimiranja eksperimentalnih uvjeta koji ne dovode uvijek do najboljih svojstava i preformansi za svaki korišteni spoj.

Stoga je cilj ovog rada razviti osjetljivu analitičku metodu za određivanje trinaest farmaceutika iz različitih klasa u otpadnim vodama iz farmaceutske industrije. Razvoj metode uključuje pripremu uzorka pomoću ekstrakcije čvrstom fazom nakon čega slijedi separacija ultra visoko-učinkovitom tekućinskom kromatografijom uz spektrometar masa kao detektor. Nakon optimiranja ekstrakcijskih uvjeta, učinkovitost i izvedba metode ocijenjena je procjenom linearnosti, ponovljivosti, obnovljivosti i utjecajem matice. Nakon određivanja validacijskih značajki, metoda je primijenjena na realne uzorke vode.

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici ili lijekovi predstavljaju veliku i raznoliku skupinu spojeva dizajniranih za sprječavanje i liječenje bolesti te za poboljšanje i održavanje zdravlja ljudi i životinja iz uzgoja [1, 2]. Koriste se u značajnim količinama diljem svijeta. U Europskoj uniji (EU) odobreno je oko 3000 različitih farmaceutski aktivnih spojeva za upotrebu u humanoj medicini [1]. To su tvari koje se koriste zbog njihove veće ili manje specifične biološke aktivnosti. One pomažu u promicanju modernog načina života, doprinose našem zdravlju i visokom standardu življenja [3].

Farmaceutici mogu biti klasificirani prema njihovoj biološkoj aktivnosti i terapijskoj svrsi (npr. antibiotici se koriste za liječenje bakterijskih infekcija, analgetici za ublažavanje boli, antineoplastici se upotrebljavaju u antitumorskoj terapiji). Klasifikacija prema kemijskoj strukturi koristi se uglavnom za farmaceutski aktivne tvari unutar podskupine lijekova, na primjer unutar skupine antibiotika kao što su β -laktami, cefalosporini, penicilini i kinoloni. Druge podjele odnose se na način djelovanja, poput antimetabolita ili alkilirajućih agensa unutar skupine citotoksika i/ili antineoplastika. U slučaju navedene klasifikacije, kemijske strukture molekula unutar iste skupine mogu biti različite što rezultira različitim sudbinama u okolišu [3].

2.1.1. Antibiotici

Antibiotici su lijekovi koji se koriste za liječenje bakterijskih zaraznih bolesti, a otkrio ih je 1928. godine Alexander Fleming čime počinje nova era medicine. Fleming otkriva da plijesan *Penicillium notatum* uništava bakterijske kolonije te izolira aktivnu tvar penicilin zbog čega su omogućena liječenja brojnih bolesti i suzbijanje velikog broja zaraznih epidemija poput kuge i sifilisa [4]. Nisu djelotvorni kod gljivičnih i virusnih infekcija [5]. Po djelovanju mogu biti baktericidni (oni koji uništavaju bakterijske stanice) i bakteriostatski (oni koji zaustavljaju rast i razvoj bakterija). Što se tiče spektra djelovanja, razlikujemo antibiotike sa širokim (djeluju na više vrsta bakterija) i s užim spektrom djelovanja (djeluju na mali broj bakterijskih vrsta) [4]. U Tablici 2.1. je prikazana kemijska klasifikacija antibiotika.

Tablica 2.1. Kemijska klasifikacija antibiotika [6]

Grupa antibiotika	Antibiotik	Mehanizam djelovanja	Spektar djelovanja
BETA (β)-LAKTAMSKI ANTIBIOTICI	Penicilini		
	prirodni penicilini: benzilpenicilin (penicilin G), fenoksimetilpenicilin (penicilin V)	inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	djeluje na streptokoke grupe A, <i>S. pneumoniae</i> (ako nisu otporni ili smanjeno osjetljivi na penicilin), <i>N. meningitidis</i> (opisana rezistencija zbog gubitka porina), <i>N. gonorrhoeae</i> (rezistencija nastaje zbog produkcije penicilinaze), klostridije, <i>B. anthracis</i> , <i>B. fragilis</i> , <i>T. pallidum</i> , borelije, leptospire, <i>Pasteurella multocida</i>
	semisintetski penicilini penicilini otporni na penicilazu: meticilin, nafcilin, oksacilin, kloksacilin, dikloksacilin	inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	pokazuju aktivnost prema stafilokima (<i>S. aureus</i> i <i>S. epidermidis</i>) koji produciraju β-laktamazu, ukoliko se ne radi o meticilin rezistentnim sojevima, djeluju i na <i>S. pneumoniae</i> i <i>S. pyogenes</i> , ali slabije nego penicilin G
	penicilini proširenog spektra: aminopenicilini (ampicilin, amoksisicilin, karbenicilin, tikarcilin); ureidopenicilini (piperacilin)	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	ampicilin i amoksisicilin imaju sličan spektar kao penicilin G, ali pokazuju bolji učinak prema <i>Listeria monocytogenes</i> i enterokokima, djeluju i na <i>H. influenzae</i> , ali je 25% sojeva rezistentno od enterobakterija djeluju na salmonele i šigele; neki sojevi <i>E. coli</i> i <i>P. mirabilis</i> su osjetljivi na ampicilin i amoksisicilin karboksipenicilini i ureidopenicilini djeluju na enterobakterije koje su rezistentne na ampicilin ali nemaju učinka na <i>Klebsiella</i> spp.; imaju snažno djelovanje na <i>P. aeruginosa</i> ; imaju baktericidno djelovanje na <i>Haemophilus</i> spp., najserije i anaerobne bakterije.
	Kombinacija β-laktama (penicilin) i inhibitora β-laktamaze: ampicilin + sulbaktam, amoksisicilin + klavulanska kiselina, tikarcilin + klavulanska kiselina, piperacilin + tazobaktam	Inhibiraju sintezu staničnog zida; vežu β-laktamaze i sprječavaju enzimatsku inaktivaciju β-laktama	koriste se za liječenje infekcija uzrokovanih bakterijama koje proizvode plazmidne β-laktamaze: <i>E. coli</i> , <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. mirabilis</i> , <i>M. catarrhalis</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>B. fragilis</i> .
Cefalosporini	prva generacija (uskog spektra): cefazolin, cefaloridin, cefaleksin, cefradin, cefapirin	Inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	dobra aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama (stafilokoki, pneumokoki, β-hemolitički streptokoki); slabiji učinak prema gram-negativnim bakterijama, izražena rezistencija među enterobakterijama
	druga generacija (proširen spektar): cefaklor, cefuroksim	inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	dobra aktivnost prema gram-pozitivnim bakterijama (stafilokoki); bolji učinak prema gram-negativnim bakterijama u odnosu na prvu generaciju; cefoksitin ima snažnu inhibiciju aktivnosti protiv anaerobnih bakterija

Grupa antibiotika	Antibiotik	Mehanizam djelovanja	Spektar djelovanja
	<p>treća generacija (prošireni spektar): ceftazidim, cefotaksim, ceftriakson, cefoperazon, cefibuten, cefiksime, cefetamet</p> <p>četvrta generacija (široki spektar): cefpirom, cefepime, cefaciklidin</p>	<p>inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana</p> <p>inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana</p>	<p>slabiji učinak na gram-pozitivne bakterije a bolji prema gram-negativnim bakterijama; stabilni su prema β-laktamazama osim β-laktamaza proširenog spektra i metalo-β-laktamaza; ceftazidim i cefoperazon djeluju snažno protiv <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, a ceftriakson djelotvorno inhibira penicilinazu pozitivne gonokoke i meningokoke</p> <p>slabiji učinak na gram-pozitivne bakterije a bolji prema gram-negativnim bakterijama; stabilni su prema β-laktamazama; kvarterni amonijev ion koji se nalazi u strukturi cefalosporina četvrte generacije daje izrazitu stabilnost prema β-laktamazama (osim β-laktamaza proširenog spektra i metalo-β-laktamaza), pokazuju dobru penetraciju kroz vanjsku membranu gram-negativnih bakterija i visok afinitet vezanja za PBP molekule</p>
	cefamicini proširenog spektra: cefoksitin, cefotetan, moksalaktam	inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	Dobar učinak prema anaerobnim bakterijama
Monobaktami	aztreonam	inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	djeluje na gram-negativne crijevne bakterije (<i>E. coli</i> , <i>Klebsiella</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp.), <i>P. aeruginosa</i> , <i>Haemophilus</i> spp. i <i>Neisseria</i> spp. <i>Acinetobacter</i> spp., <i>Burkholderia cepacia</i> i <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> su u visokom postotku rezistentni; stabilan je prema većini kromosomalnih i plazmidnih β -laktamaza i ne inducira njihovu produkciju
Karbapenemi	imipenem, meropenem, ertapenem	inhibicija sinteze peptidoglikaza vezanjem na PBP molekule i inhibiranjem aktivnosti transpeptidaza koje vrše završnu fazu umrežavanja peptidoglikana	najširi spektar djelovanja do sada: djeluju na većinu aerobnih i anaerobnih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija (osim oksacilin-rezistentnih stafilokoka), <i>Enterococcus faecium</i> , i na gram-negativne štapićaste bakterije rezistentne na beta-laktamske antibiotike i aminoglikozide (<i>Acinetobacter</i> spp., <i>Enterobacter</i> spp., <i>Citrobacter</i> spp., i <i>Serratia</i> spp)
AMINOGLIKOZIDI	streptomycin, kanamicin, gentamicin, tobramicin, klaritromicin, netilmicin	inhibicija sinteze proteina vezanjem na 30S podjedinicu ribosoma, sprečavaju vezanje glasničke RNA na ribosom, dovode do krivog čitanja genetskog kod i do sinteze neupotrebljivih bjelančevina	stafilokoki, enterobakterije, nefermentativne bakterije, streptomycin: mikobakterije, <i>F. tularensis</i> , brucele, <i>Y. pestis</i>
AMINOCIKLITOLI	spektinomycin (strukturno slični aminoglikozidima)	inhibicija sinteze proteina vezanjem na 30S podjedinicu ribosoma, sprečavanju vezanje mRNK na ribosom	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
SULFONAMIDI	sulfonamid, trimetoprim, sulfonamid + trimetoprim	inhibiraju sintezu folne kiseline, ugrađuju se umjesto PABA kojoj su strukturno slični, djeluju po principu kompetitivne inhibicije	gram-pozitivne bakterije: stafilokoki, streptokoki (osim enterokoka), <i>B. anthracis</i> ; gram-negativne bakterije: najserije, <i>H. influenzae</i> , enterobakterije (<i>E. coli</i> , <i>Shigella</i> spp., <i>Salmonellae</i> spp., <i>Yersinia</i> spp., neki sojevi <i>Proteus</i> spp.); klamidije i nokardije, <i>P. carinii</i>

Grupa antibiotika	Antibiotik	Mehanizam djelovanja	Spektar djelovanja
TETRACIKLINI	tetraciklin doksiciklin minociklin klortetraciklin demeklocilin metaciklin oksitetraciklin	inhibicija sinteze bjelančevina vezanjem za ribosome i sprječavanje pristupa aminokiselina vezanih na transfer (t)RNK molekulu na ribozomu na kojega je vezana mRNK; ovaj mehanizam djelovanja se ostvaruje u humanim i u bakterijskim stanicama, ali su bakterijske stanice osjetljivije jer imaju aktivni transportni sistem, koji prenosi tetracikline protiv koncentracijskog gradijenta čime se postižu visoke koncentracije unutar bakterijske stanice; na taj način dobiva se selektivnost jer stanice ljudskog organizma ne posjeduju slični mehanizam za koncentraciju tetraciklina.	gram-pozitivni i gram-negativnih koki, neke vrste enterobakterija, <i>Haemophilus</i> spp., <i>Vibrio cholerae</i> , klostridije, aktinomicete, spirohete, rikecije i klamidije, <i>P. falciparum</i>
MAKROLIDI AZALIDI	eritromicin klaritromicin azitromicin	vežu se na ribosome i sprječavaju kontakt tRNK na koju je vezana aminokiselina s mRNK, te na taj način ometaju sintezu bjelančevina	stafilokoki, streptokoki, korinebakterije, legionele, bordetele, klamidije, spirohete, <i>Campylobacter</i> spp.
KLORAMFENIKOLI	kloramfenikol	inhibira sintezu bjelančevina, na taj način što onemogućava pričvršćivanje rastućeg polipeptidnog lanca na 50S jedinicu ribosoma.	<i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i> , neke vrste enterobakterija, najserije, anaerobne bakterije gram-pozitivni koki, mikoplazme, klamidije i rikecije.
LINKOZAMINI	klindamicin linkomicin	veže se na 50S podjedinicu ribosoma i inhibira sintezu bjelančevina	gram-pozitivni koki i štapići, anaerobne bakterije
KINOLONI	kinoloni uskog spektra: nalidiksična kiselina kinoloni širokog spektra: ciprofloksacin, levofloksacin, ofloksacin kinoloni proširenog spektra: gatifloksacin, grepafloksacin, moksifloksacin	inhibiraju DNA girazu (bakterijski enzim koji je neophodan za replikaciju DNK)	aktivni prema gram-negativnim štapićima; ne djeluju na gram-pozitivne bakterije široki spektar aktivnosti koji uključuje i gram-negativne i gram-pozitivne bakterije široki spektar s naglašenom aktivnošću prema gram-pozitivnim bakterijama (osobito prema streptokokima i enterokokima), aktivnost prema gram-negativnim bakterijama je komparabilna s ciprofloksacinom
GLIKOPEPTIDI	vankomicin teikoplanin	inhibiraju sintezu peptidoglikana u staničnoj stijenci bakterije stvaranjem kompleksa s D-alanil-D alaninom, koji je prekursor staničnog zida	aerobne i anaerobne gram-pozitivne bakterije: stafilokoki (uključujući i MRSA), streptokoki, enterokoki, <i>Corynebacterium</i> spp., <i>Bacillus</i> spp, <i>Lactobacillus</i> spp., <i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium</i> spp., <i>Actinomyces</i> spp
METRONIDAZOL	metronidazol	nitro grupa u kemijskoj strukturi metronidazola reducira se pod djelovanjem nitroreduktaze i nastaje visoko toksični intermedijarni produkt, koji se razlaže u slobodne radikale i oštećuje DNK	anaerobne bakterije: <i>B. fragilis</i> , <i>Fusobacterium</i> spp, <i>Clostridium</i> spp; <i>Trichomonas vaginalis</i> , <i>Giardia lamblia</i> , <i>Entamoeba histolytica</i>

Grupa antibiotika	Antibiotik	Mehanizam djelovanja	Spektar djelovanja
OKSAZOLIDINI	linezolid	veže se na 50S podjedinicu ribosoma i inhibira sintezu bjelančevina	gram-pozitivni koki (stafilokoki, streptokoki, enterokoki); umjereno aktivni prema <i>M. catarrhalis</i> i <i>Bacteroides</i> spp.
STREPTOGRAMINI	kuinupristin/dalfopristin		gram pozitivni koki: <i>S. aureus</i> (uključujući i MRSA), <i>S. pneumoniae</i> , enterokoki, (uključujući i VRE), najserije, <i>H. influenzae</i>
LIPOPEPTIDI	daptomicin	ugrađuju se u citoplazmatsku membranu gram-pozitivnih bakterija i dovode do stvaranja pora, što dovodi do efluksa važnih komponenti bakterijske stanice, posebno kalijevih iona, što rezultira u depolarizaciji citoplazmatske membrane i smrti stanice. Daptomicin ostvaruje baktericidni učinak bez lize stanica, što znači da se smanjuje rizik oslobađanja egzotoksina u cirkulaciju	gram pozitivni koki: <i>S. aureus</i> (uključujući i MRSA), <i>S. pneumoniae</i> , enterokoki, (uključujući i VRE), uključujući i multirezistentne sojeve koagulaza negativnih stafilokoka
POLIMIKSINI	bacitracin	djeluju kao detergentski ili surfaktantski, reagiraju s fosfolipidima u citoplazmatskoj membrani, povećavaju permeabilnost stanice i narušavaju osmotski integritet, dolazi do gubitka intracelularnih sastojaka i do propadanja bakterijske stanice	gram negativne bakterije, naročito <i>P. aeruginosa</i> ; <i>Proteus</i> spp., <i>Providencia</i> sp., <i>Serratia</i> spp. i <i>Neisseria</i> spp. su obično rezistentni.

Korišteni antibiotici u ovome radu su azitromicin, linezolid, sulfafurazol, sulfametazin i tiamulin.

AZITROMICIN

Azitromicin je polusintetski makrolidni antibiotik iz skupine azalida. Kao i ostali makrolidni antibiotici, azitromicin inhibira sintezu proteina kod bakterija vezanjem na 50S podjedinicu ribosoma čime inhibira aktivnost peptidil transferaze i ometa premještanje amino kiseline tijekom procesa translacije. Njegovo djelovanje može biti bakteriostatsko ili baktericidno, ovisno o organizmu i koncentraciji lijeka. Njegovo dugo vrijeme poluraspada, koje omogućuje doziranje jedanput dnevno, svojstvo je kojim se razlikuje od ostalih makrolida [7].

LINEZOLID

Linezolid je sintetski antibiotik, prvi iz oksazolidinonske klase koji se koristi za liječenje infekcija uzrokovanih s više rezistentnih bakterija uključujući *streptococcus* i MRSA. Lijek djeluje tako da inhibira inicijaciju sinteze proteina bakterije [7]. Godinama se koristio u medicini i veterini za liječenje bolesti i infekcija te kao dodatak hrani za promicanje rasta i debljanje životinja s ciljem njihove kasnije konzumacije [8].

SULFAFURAZOL

Sulfafurazol, također poznat kao i sulfisoksazol je sulfonamidni antibakterijski lijek koji ima antibiotsku aktivnost protiv širokog spektra Gram-negativnih i Gram-pozitivnih bakterija. Koristi se za liječenje teških, ponavljajućih ili dugotrajnih infekcija mokraćnog puta, meningitisa, konjuktivisa, toksoplazmoze, malarije i drugih bakterijskih infekcija [9].

SULFAMETAZIN

Sulfametazin je sulfonamid kratkog djelovanja koji se upotrebljava za liječenje raznih bakterijskih bolesti kod ljudi i drugih vrsta. U primjenu je ušao krajem 1950-ih za liječenje dišnih bolesti i kao promotor rasta životinja za proizvodnju hrane (svinje, perad, ovce, goveda) [10].

TIAMULIN

Tiamulin je polusintetski derivat diterpenskog antibiotika pleuromutilina, u kojem je hidroxiacetyl bočni lanac zamijenjen s većom dietilaminoetiltioacetyl skupinom, pružajući veću hidrofobnost. Izrazito je moćan i vrlo selektivan antibiotik, aktivan protiv mikoplazmi, Gram-pozitivnih bakterija poput streptokoka i stafilokoka, bez rezistentnosti na postojeće klase antibiotika zbog svojeg jedinstvenog načina djelovanja. Uglavnom se koristi za svinje i perad, ali ponekad se primjenjuje i za liječenje goveda, ovaca i koza. Prvi je izbor za liječenje dizenterije svinja uzrokovane bakterijama *Brachyspira hyodysentriae* i bakterijske upale pluća [11, 12].

2.1.2. Antihelmintici

Antihelmintici su antiparazitni lijekovi koji izbacuju parazitske crve (helmente) i druge unutarnje parazite iz tijela, omamljivanjem ili ubijanjem tako da ne uzrokuju značajne štete na domaćinu. Postoje dvije vrste, vermifugidi, lijekovi koji omamljuju i vermicidi, lijekovi koji ubijaju. Ovi lijekovi se koriste za liječenje helmintoze kod ljudi i kod zaraženih životinja [13].

Podjela antihelmintika prema kemijskoj strukturi [14]

- Benzimidazoli (mebendazol, albendazol, tiabendazol)
- Kinolini i izokinolini (prazikvantel)
- Piperazini (piperazin citrat, dietil karbamazin)

- Vinil pirimidini (pirantel pamoat)
- Amidi (niklozdamid)
- Imidazotiazoli (levamisol)
- Organofosfati (metrifonat)

Helminti se dijele u tri skupine: cestode, nematode i trematode. Za te tri kategorije dostupne su tri grupe lijekova. Antinematodni lijekovi protiv dječjih glista uključuju piperazin, mebendazol, tiabendazol, pirantel i dietil karbamazin. Antitrematodni lijekovi su prazikvantel, sulfoksid, metrifonat, dok u treću skupinu antihelminskih lijekova pripada anticestodni niklozamid koji se koristi protiv trakavica kao što su *Taenia* i *Echinococcus* [15].

Korišteni antihelminici u ovome radu su albendazol, febantel, levamisol i prazikvantel.

ALBENDAZOL

Albendazol je antihelminetik širokog spektra djelovanja iz grupe benzimidazola. Ometa normalan metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u njegova sva tri razvojna stupnja zbog čega dolazi do potrošnje endogenog glikogena u parazitima i smanjenog stvaranja adenozin trifosfata (ATP-a). Apsorbirani lijek se u jetri metabolizira u albendazol-sulfoksid i veže za serumske proteine. Vrijeme poluživota lijeka iznosi 8,5 sati te se izlučuje urinom [16].

FEBANTEL

Febantel je probenzimidazol koji se metabolizira u benzimidazol nakon apsorpcije. Drugim riječima, febantel je prolijek metaboliziran *in vivo* u febendazol, benzimidazolni antihelminetik. Djeluje interferirajući energetske metabolizam parazita, inhibiranjem apsorpcije te metabolizma glukoze što rezultira iscrpljivanjem energetskih rezervi i smrti gastrointestinalnih te plućnih nematoda [17].

LEVAMISOL

Levamisol, L-aktivni izomer tetramisola je antihelminetik širokog spektra koji djeluje na zrele i nezrele stadije mnogih važnih gastrointestinalnih nematoda i plućnih crva kod goveda, svinja, ovaca, peradi, golubova i slično. Odmah, nakon primjene uzrokuje neuromuskularnu paralizu parazita kojeg domaćin izbacuje u naredna 24 sata. Ne djeluje protiv trakavica (cestoda) i metilja (trematoda). Ima također i imunomodulatorno djelovanje uz fluoruracil na rak debelog crijeva [18, 19].

PRAZIKVANTEL

Prazikvantel je antihelmintik širokog spektra koji djeluje tako da povećava permeabilnost nematoda za kalcij izazivajući kontrakciju miškulature te paralizu i smrt parazita. Također povećava osjetljivost parazita na imunološki obrambeni sustav domaćina. U terapijskim dozama nema farmakološko djelovanje kod ljudi i nakon oralne primjene brzo se resorbira. Pritom većina lijeka metabolizira u neaktivne oblike pri prvom prolasku kroz jetru, a metaboliti se izlučuju urinom [16].

2.1.3. Ostali farmaceutici

Osim antibiotika i antihelmintika, među farmaceuticima prema načinu djelovanja svakako treba spomenuti antimikotike, antiseptike, analgetike, diuretike i antidiuretike, kemoterapeutike i dr. Tako su u ovom radu korišteni etodolac, imatinib, omeprazol i torasemid.

ETODOLAC

Etodolac je nesteroidni protuupalni lijek s protuupalnim, analgetskim i antipiretskim svojstvima. Inhibira sintezu prostaglandina te se koristi za ublažavanje simptoma reumatoidnog artritisa i osteoartritisa. Slično ostalim nesteroidnim protuupalnim lijekovima, protuupalni učinci etodolca proizlaze iz inhibicije enzima ciklooksigenaze (COX) čime se smanjuje sinteza perifernih prostaglandina uključenih u upale [20].

IMATINIB

Imatinib, poznat pod nazivom Glivec, je prvi inhibitor proteina kinaze koji je dokazan kao protutumorski lijek. Zbog brzog kliničkog razvoja odobren je 2001. za pacijente s Filadelfijskim kromosomom [21]. Imatinib kao antineoplastični agens zapravo inhibira Bcr-Abl fuzijski protein tirozin kinaze, abnormalni enzim proizveden kronično mijeloidnim leukemijskim stanicama koje sadrže Filadelfijski kromosom. Također, inhibira i receptor tirozin kinaze za izvedene pločaste čimbenike rasta (PDGF) i faktor matičnih stanica (SCF)/c-kit. SCF/c-kit receptor tirozin kinaze aktiviran je stromalnim tumorom želučano-probavnog trakta. Sprječava proliferaciju i izaziva apoptozu u stanicama koje prekomjerno ekspimiraju ove onkoproteine [9].

OMEPRAZOL

Omeprazol djeluje inhibirajući protonsku pumpu parijetalnim želučanim stanicama. Tim mehanizmom inhibira izlučivanje želučane kiseline. Djeluje brzo i omogućava reverzibilnu kontrolu izlučivanja želučane kiseline jednom dnevnom dozom [22]. Najvećim dijelom metabolizira se u jetri u neaktivne metabolite, a izlučuje se urinom. Nakon oralne primjene brzo se apsorbira iz gastrointestinalnog trakta. Najvišu koncentraciju u plazmi postiže za 30 minuta do 3,5 sata [23].

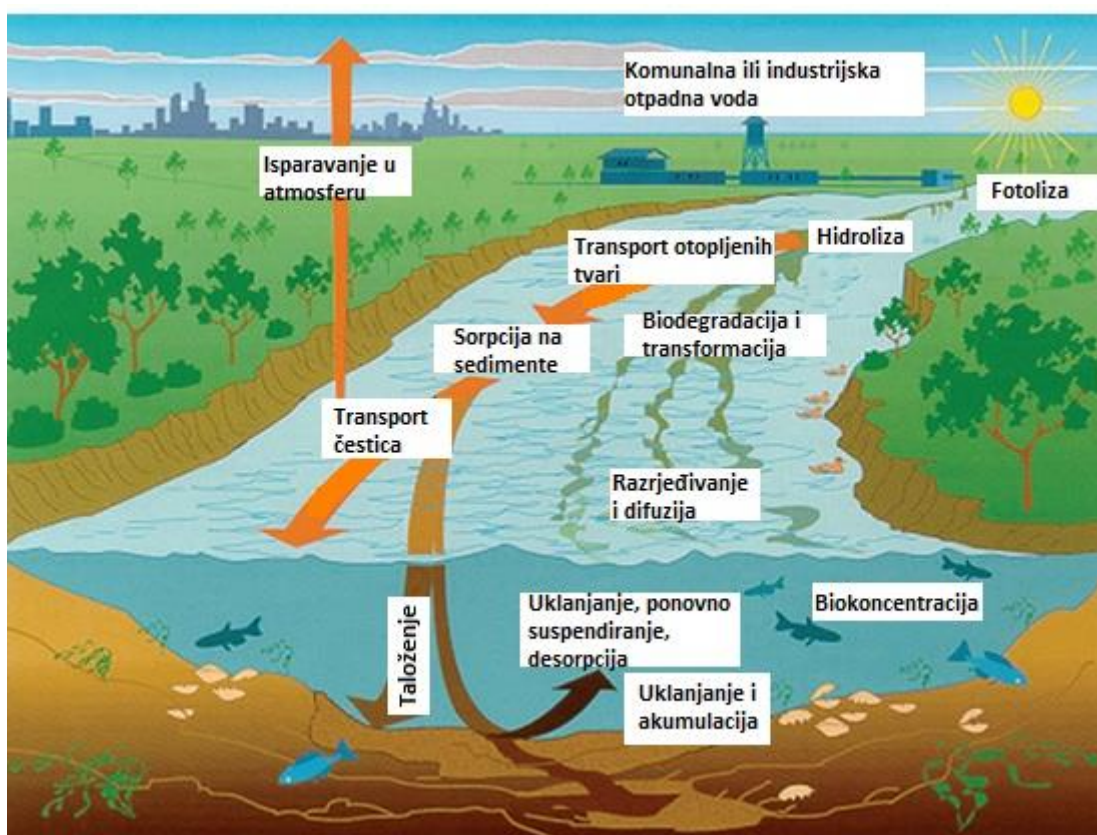
TORASEMID

Torasemid je diuretik Henleove petlje, strukturni derivat anilinopiridin sulfonil uree. Kao i drugi diuretici, inhibira reapsorpciju natrija i klora u uzlaznom, debljem kraku Henleove petlje, ograničavanjem prijenosnog sustava za Na/K/Cl. Blokira i prijelaz klorida s peritubularne površine nefrona. Poboljšava rad srca u kongestivnoj srčanoj slabosti. Lijek se nakon oralne primjene jako brzo apsorbira i postiže maksimum plazmatske koncentracije za 1 do 2 sata [23].

2.1.4. Farmaceutici u okolišu [24]

Farmaceutici pripadaju skupini novih zagađivala koja uključuje različite skupine lijekova i dodatke prehrani koji se koriste u veterinarskoj i humanoj medicini. Točnije, pripadaju skupini mikrozagađivala jer su u vodenoj sredini prisutni u mikrogramskim ili nanogramskim koncentracijama. U svijetu se prema nekim procjenama godišnje proizvede 100 000 tona farmaceutski aktivnih tvari s različitim terapijskim namjenama. Obično su to organski spojevi koji su umjereno topljivi i lipofilni radi bioraspoloživosti i biološke aktivnosti, molekulskih masa od 200 do 500 daltona. Uslijed prolaska lijeka kroz razne metaboličke procese unutar ljudskog organizma, nastaju metaboliti koji su često polarniji od polazne supstance. Zbog toga su topljivi u vodi, a time i najčešće otrovniji od početnog spoja. Konvencionalni uređaji za obradu otpadnih voda pokazali su se nedovoljno učinkovitim za uklanjanje velikog broja farmaceutika i njihovih metabolita. Ovisno o djelotvornosti obrade i kemijskom sastavu spoja, farmaceutski aktivne tvari mogu dospjeti u površinske i podzemne vode. Nakon što neki lijek ili metabolit dospije u okoliš, njegova koncentracija u određenom dijelu ekosustava ovisi o afinitetu vezanja na krute čestice te otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju. Farmaceutici koji pokazuju tendenciju sorbiranja na krute matrice akumuliraju se u tlu i

sedimentima, dok se topljivi spojevi transportiraju u površinske i podzemne vode. Važni načini ulaska farmaceutika u okoliš su bolnice, neregularna odlaganja neiskorištenih lijekova te farme na kojima se lijekovi, posebno antibiotici dodaju u životinjsku hranu radi poboljšanog rasta, bolje iskoristivosti prehrane, te zbog prevencije ili liječenja bolesti. Farmaceutici mogu završiti u tlu i gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem, produktom obrade komunalnih otpadnih voda. Antibiotici se također mogu prenijeti na poljoprivredna zemljišta upotrebom stajskog gnojiva, a njegovim ispiranjem i u podzemne vode. Izvorom zagađenja površinskih i podzemnih voda smatramo i farmaceutske industriju bez obzira što su gubici iz proizvodnih pogona relativno mali.

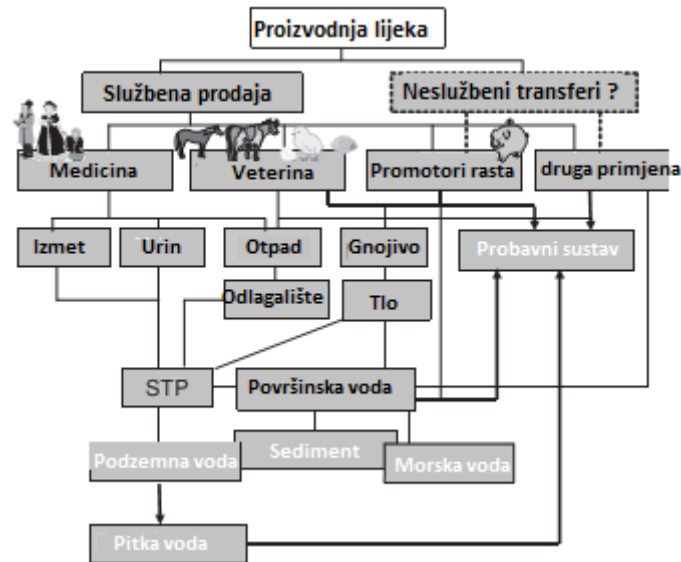


Slika 2.1. Sudbina farmaceutika kao zagađivala u vodenom okolišu [3]

Lijekovi su sve prisutniji, s obzirom da je brzina kojom se ispuštaju u okoliš mnogo veća od brzine njihove razgradnje i transformacije. Problemi koji se javljaju zbog njihove pojave u ekosustavima su poremećaji fizioloških procesa i reproduktivnih funkcija organizama, razvoj rezistentnih bakterija te povećanje toksičnosti nekih farmaceutski aktivnih tvari.

Sudbina i put njihove razgradnje u okolišu ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima spoja. Mobilnost spojeva uvelike ovisi o topljivosti u vodi, koeficijentu razdiobe oktanol/voda, K_{ov} i

o sadržaju organskog ugljika sorbensa. Na primjer, tetraciklini pokazuju najviše koeficijente sorpcije u odnosu na druge grupe antibiotika pri čemu nam takvi trendovi pomažu predvidjeti gdje se spojevi mogu naći u okolišu [1].



Slika 2.2. Putevi ulaska i distribucije farmaceutika u okolišu (STP-postrojenje za obradu otpadnih voda) [3]

2.2. MODERNE ANALITIČKE METODE U ANALIZI FARMACEUTIKA [25]

Budući da se farmaceutici u okolišu pojavljuju u niskim koncentracijama, razvijaju se nove tehnike i instrumenti koji su povećali mogućnost njihova određivanja. Uzorci iz okoliša su vrlo složeni pa se ne mogu izravno analizirati. Radi toga današnje „instrumentalne“ analize ne uključuju samo mjerenja, već obuhvaćaju i uzorkovanje, pripremu uzorka, mjerenje te procjenu mjernih rezultata [26], čime se dobiva informacija o kvalitativnom i kvantitativnom sastavu uzorka. Izbor primijenjene tehnike ovisi o karakteristikama analita, matici i volumenu uzorka, a metoda je dobra ako je dovoljno brza i precizna, te ako ima dobru ponovljivost i malu potrošnju otapala [26].

2.2.1. Ekstrakcija kao metoda pripreme uzorka [25]

U posljednjih nekoliko desetljeća došlo je do intenzivnog razvoja ekstrakcijskih tehnika. Mogu se podijeliti na metode koje mogu zadržati analit (poput ekstrakcije tekuće-tekuće i ekstrakcije čvrstom fazom) te na one koje se temelje na uspostavljanju dinamičke ravnoteže između uzorka i ekstrahirajuće tvari (mikroekstrakcija tekućom i čvrstom fazom) [26].

Sve ekstrakcijske metode koriste se principom selektivnog koncentriranja analita u jednoj fazi čija se selektivnost postiže mijenjanjem radnih uvjeta. Pri tome se analit raspodjeljuje između dvije faze sukladno konstanti raspodjele, temperaturi i relativnom volumenu faza. Njena djelotvornost ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima analita, o topljivosti, hidrofobnosti i kiselo-lužnatom karakteru, čije poznavanje pomaže u odabiru metode i optimalnih uvjeta ekstrakcije ispitivanog analita.

Ekstrakcijske se metode mogu također podijeliti i prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita pa razlikujemo ekstrakciju čvrsto-tekuće, tekuće-tekuće i plinovito-tekuće.

EKSTRAKCIJA IZ TEKUĆIH UZORAKA

Postoje razne vrste metoda ekstrakcije organskih sastojaka iz tekućih uzoraka koje se ne temelje na istom principu. Kod ekstrakcije tekuće-tekuće, tvar koja se ekstrahira prelazi iz jednog otapala u drugo [25], dok se ostale vrste temelje na odnosu čvrsto-tekuće.

1.) Ekstrakcija tekuće-tekuće (LLE)

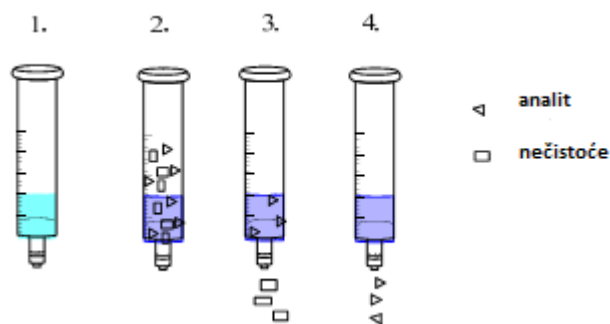
Najstarija metoda ekstrakcije analita iz tekućih uzoraka je ekstrakcija tekuće-tekuće [26]. To je brza i jednostavna metoda koja se provodi u lijevku za odjeljivanje gdje se uzorak koji sadrži analit mućka u prikladnome otapalu, 2 do 3 puta radi postizanja veće djelotvornosti. Najveći nedostatak ove metode je uporaba velikog volumena organskog otapala (100-250 mL) što dovodi do većeg troška ekstrakcije, opasnosti za zdravlje i onečišćenja okoliša [25].

2.) Ekstrakcija čvrstom fazom (SPE) [25]

Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *solid-phase extraction*) razvijena je 1970-ih te je potisnula ekstrakciju tekuće-tekuće i postala najprimjenjivija metoda pripreme uzoraka. Temelji se na raspodjeli analita između čvrste i tekuće faze. Afinitet prema čvrstoj fazi mnogo je veći, nego prema matici uzorka. Vezani analiti desorbiraju eluiranjem.

Sastoji se od 4 jednostavna koraka:

1. Kondicioniranje (solvatacija sorbensa)
2. Zadržavanje (analit se sorbira na površini sorbensa)
3. Ispiranje (uklanjanje neželjenih tvari koje su zadržane na površini sorbensa)
4. Eluiranje ili desorpcija analita sa sorbensa prikladnim otapalom.



Slika 2.3. Ekstrakcija čvrstom fazom [26]

Na tržištu postoje različite vrste sorbensa (u obliku kolonica, diskova, štrcaljki) mase između 100 i 2000 mg. U novije vrijeme proizvode se i mikrokolone pogodne za određivanje tragova analita, s količinom sorbensa između 5 i 56 mg. Izbor sorbensa ovisi o volumenu uzorka i fizikalno-kemijskim svojstvima analita, tj. o interakcijama sorbensa s funkcionalnim skupinama analita, o matici uzorka i njenim interakcijama sa sorbansom i analitom, a pravilnim izborom postiže se zahtijevana selektivnost i kapacitet [25, 26].



Slika 2.4. Vrste SPE sorbensa [26]

Sorbensi koji se rabe u navedenoj vrsti ekstrakcije različitih su svojstava u odnosu na klasične i izrazito selektivne. Klasičnim sorbensima, kao što su C8 ili C18, silikagel, polimerni sorbensi, ionoizmjenjivačke smole, ne mogu se izolirati izrazito polarni analiti iz velikog volumena uzorka. Njihov najveći nedostatak je nedovoljna selektivnost zbog čega se interferencije iz matice uzorka zajedno ekstrahiraju sa željenim analitom. Zbog poboljšanja

ekstrakcijskog postupka, razvijeni su sorbensi koji mogu selektivno ekstrahirati tragove analita, ligandi različita afiniteta poput proteina, peptida, antitijela, umjetnih bojila te polimernih sorbensa s otiskom molekule (MIP).

Ekstrakcija čvrstom fazom upotrebljava se za odvajanje raznih analita iz tekućih uzoraka te za pročišćavanje ekstrakata dobivenih iz sedimenta, tla i bioloških uzoraka drugim metodama pripreme.

3.) Mikroekstrakcija čvrstom fazom (SPME)

SPME (engl. *solid-phase microextraction*) je ekstrakcijska tehnika oslobođena korištenja otapala, temeljena na uspostavljanju ravnoteže između uzorka i ekstrahirajuće faze. U usporedbi sa SPE gdje se ekstrahira više od 90 % analita, ovdje se separira samo 2-30 % [26]. Najčešće se koristi u analizi hlapljivih i djelomično hlapljivih sastojaka. Može se provoditi izravnim uranjanjem vlakana u uzorak vode ili mjerenjem hlapljivih sastojaka u prostoru iznad površine uzorka. Glavne su joj prednosti selektivnost, jednostavnost, brzina, mali volumen uzorka i otapala te mogućnost povezivanja s plinskom i tekućinskom kromatografijom. Nedostatak joj je ograničeni vijek uporabe vlakana zbog mogućeg uništenja ili oštećenja, što dodatno poskupljuje metodu.

4.) Ekstrakcija miješalom (SBSE)

Ekstrakcija miješalom (engl. *stir-bar sorptive extraction*) razvijena je zbog poboljšanja mikroekstrakcije čvrstom fazom tako da umjesto vlakana, magnetno miješalo služi kao nosač sorbensa. Time se povećala sorpcijska površina 50 do 250 puta što dovodi do veće učinkovitosti ekstrakcije.

To je ravnotežna tehnika kod koje prijelaz iz jedne faze u drugu ovisi o koeficijentu razdiobe. Za polidimetilsiloksan, najčešće primjenjivani sorbens, predložen je matematički izraz za razdjelni koeficijent, $K_{PDMS/v}$, odnosno koeficijent razdjeljenja oktanol-voda, K_{ov} .

$$K_{OV} \approx K_{PDMS/v} = \frac{\gamma_{PDMS}}{\gamma_v} = \left(\frac{m_{PDMS}}{m_v} \right) \left(\frac{V_v}{V_{PDMS}} \right) = \beta \left(\frac{m_{PDMS}}{m_v} \right) \quad (2-1)$$

pri čemu su:

γ_{PDMS} i m_{PDMS} - masa analita u organskoj fazi/vlaknu

V_{PDMS} i V_v - volumen organske/vodene faze

γ_v i m_v -masena koncentracija, masa analita u vodenoj fazi

Što je manji omjer faza, β , djelotvornost ekstrakcije je veća.

Metoda je dobra za složene i polučvrste uzorke, te za hlapljive, poluhlapljive i nehlapljive spojeve.

EKSTRAKCIJA IZ ČVRSTIH UZORAKA

Kod ekstrakcije organskih tvari iz čvrstih uzoraka tvar se desorbira iz matice uzorka i otapa u odgovarajućem otapalu. Učinkovitost ekstrakcije ovisi o topljivosti, prijenosu mase i matici uzorka. Odabir otapala ovisi o prirodi analita i matice uzorka. Ponekad se koristi smjesa vode i organskih otapala jer nijedno čisto otapalo nije univerzalno za svaki analit. Razlikujemo klasične ekstrakcijske metode koje uključuju Soxhlet i automatizirani Soxhlet te ultrazvučnu ekstrakciju. Drugu skupinu metoda čine ekstrakcija fluidom u superkritičnim uvjetima, tlačna ekstrakcija otapalom, mikrovalna ekstrakcija otapalom i ekstrakcija pregrijanom vodom. Navedene metode, u odnosu na klasične su brže, djelotvornije te troše manje organskih otapala pa samim time i manje zagađuju okoliš [25].

1.) Soxhlet i automatizirani Soxhlet [25]

Klasična Soxhlet ekstrakcija iz čvrstih uzoraka relativno je spora metoda koja se primjenjivala do 1980-ih godina kada je počeo razvoj modernih metoda. Postupak, koji traje jako dugo (6-48 sati) sastoji se od uparavanja, kondenziranja i prolaza odgovarajućeg otapala kroz uzorak zbog čega se koriste jako velike količine organskih otapala (250-500 mL) što je i veliki nedostatak navedene metode. Razvijen je automatizirani Soxhlet, poznat pod nazivom Soxtec koji omogućuje bolji kontakt između otapala i uzorka pa je ekstrakcija brža i prijenos mase bolji. Poboljšano je i vrijeme ekstrakcije na 2 do 3 sata te je smanjen volumen otapala na 40 do 50 mL po ekstrakciji.

2.) Mikrovalna ekstrakcija (MAE) [26]

Mikrovalna ekstrakcija (engl. *microwave assisted extraction*) je proces zagrijavanja čvrstog uzorka i smjese otapala u zatvorenoj posudi pomoću mikrovalne energije pod kontrolom temperature. Premda se rjeđe koristi, ekstrakcija se može provesti i u otvorenim posudama pri atmosferskom tlaku te se onda naziva mikrovalno potpomognuta Soxhlet ekstrakcija. To je brza ekstrakcijska metoda (10-30 min) koja troši znatno manje količine otapala (20-30 mL). Međutim, MAE također ima i nedostatke. Spoj će apsorbirati mikrovalnu energiju otprilike

proporcionalno njegovoj dielektričnoj konstanti, odnosno što je veća dielektrična konstanta, veća je i količina apsorbirane energije. S obzirom da organski ekstrakti obično uključuju nepolarna otapala s malim dielektričnim konstantama koja ne apsorbiraju mikrovalno zračenje, u mikrovalnoj ekstrakciji moraju se koristiti ili čista polarna otapala ili njihove smjese s nepolarnim otapalima radi boljeg zagrijavanja smjese uzorka i otapala.

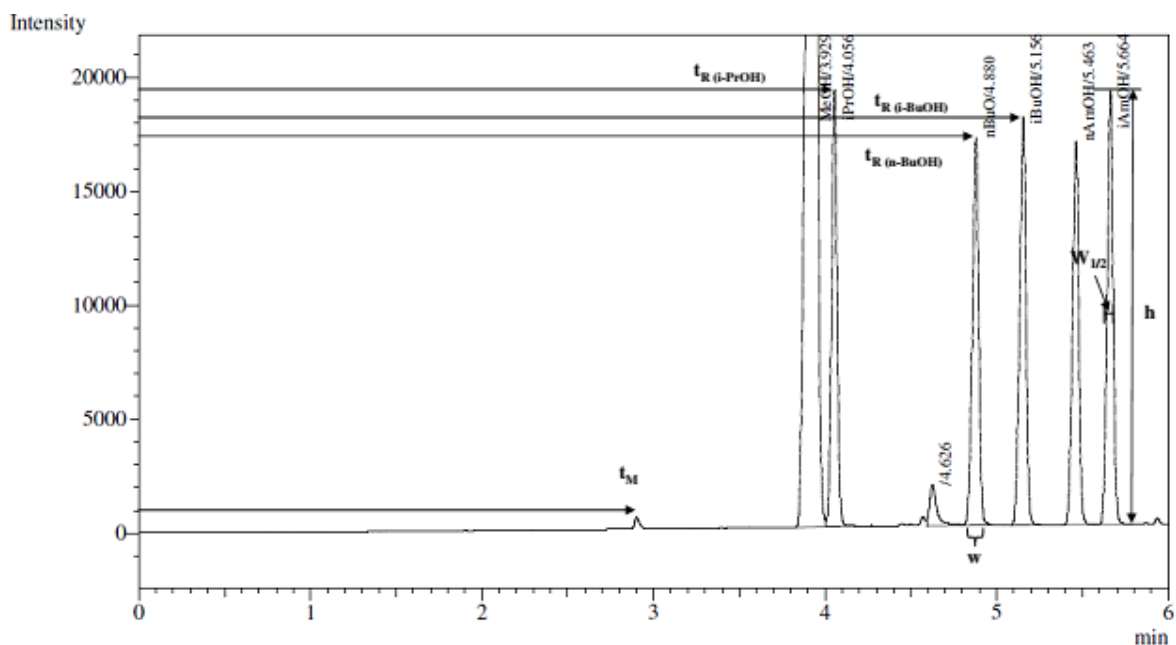
2.2.2. Kromatografija kao instrumentalna metoda analize

Kromatografija je fizikalna tehnika odjeljivanja u kojoj se sastojci raspodjeljuju između dviju faza, od kojih je jedna nepokretna, a druga, pokretna faza ili eluens se kreće u određenom smjeru [25]. Ruski botaničar Mihail Cvet smatra se začetnikom kromatografije koji je dao sadašnji naziv toj analitičkoj tehnici prema grčkim riječima *chroma* (boja) i *graphia* (pisanje). Danas, kromatografija označava široki raspon tehnika koje se primjenjuju u istraživanju i razvoju, dijagnostici, proizvodnji, osiguranju kvalitete i sl. [26]. Kromatografski sustav čine pokretna i nepokretna faza te ispitivana tvar koja se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Radi narušavanja ravnoteže, ispitivana tvar putuje s pokretnom fazom, zadržavajući se s vremenom na nepokretnoj fazi. Kako bi došlo do odjeljivanja sastojaka smjese, nepokretna faza mora selektivno i različito dugo zadržavati sastojke [25].

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na nekoliko načina. S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze poznajemo razdjelnu, adsorpcijsku, ionsko-izmjenjivačku, afinitetnu kromatografiju te kromatografiju isključenjem po veličini. Druga podjela temelji se na sastavu pokretne faze. Razlikujemo plinsku kromatografiju (GC) kod koje je pokretna faza inertni plin, kod tekućinske kromatografije (LC) to je tekućina male viskoznosti, a u fluidnoj kromatografiji pri superkričnim uvjetima (SFC) pokretna faza je fluid iznad svog kritičnog tlaka i temperature. S obzirom da nepokretna faza može biti tekuća ili čvrsta, postoji kromatografija u stupcu i plošna kromatografija koja se sastoji od tankoslojne kromatografije (TLC) i kromatografije na papiru (PC) [25].

Općenito, komponente u smjesi provode različito vrijeme na nepokretnoj fazi tijekom kromatografskog razdvajanja. To dovodi do razdvajanja svake pojedine komponente od drugih koje se detektiraju jedna za drugom. Detektor daje signal, obično proporcionalan koncentraciji svake komponente. Prikaz signala u vremenu naziva se kromatogram (slika 2.5).

Najvažniji parametri kromatograma su vrijeme zadržavanja, vrijeme od unosa uzorka do njegova maksimalnog odziva (t_R), zadržano vrijeme (mrtvo vrijeme), vrijeme putovanja molekula pokretne faze kroz kolonu (t_M), širina kromatografske krivulje na baznoj liniji (w), širina kromatografske krivulje na polovici visine ($w_{1/2}$) te visina pika (h) [26].



Slika 2.5. Kromatogram i kromatografski parametri [26]

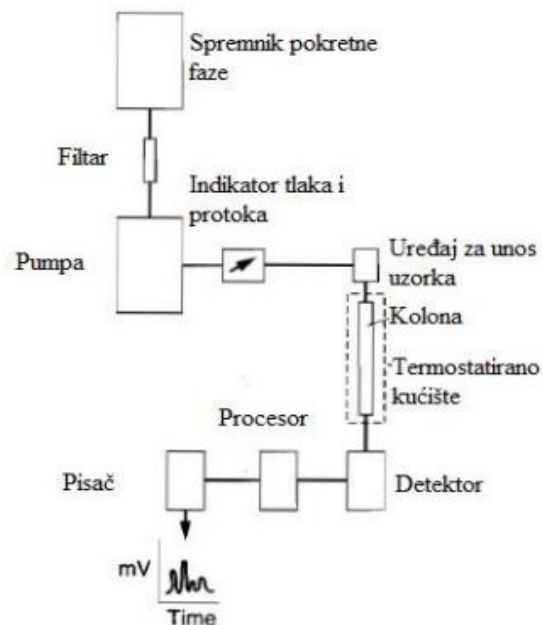
Pouzdanu kvalitativnu i kvantitativnu kromatografsku analizu treba provesti umjeravanjem, tj usporedbom s referentnim tvarima, najčešće unutarnjim i vanjskim standardom. Kvantificiranje se provodi na temelju površine ili visine kromatografske krivulje razdvojene tvari. Što je veći afinitet analita prema nepokretnoj fazi, analit će biti dulje zadržan zbog čega i dolazi do kromatografskog odjeljivanja [25].

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) [28]

HPLC (engl. *high performance liquid chromatography*) je visoko učinkovita razdjelna kromatografska metoda koja se u današnje vrijeme koristi u više od 75 % primjena kao kromatografija obrnutih faza (nepolarna nepokretna faza, polarna pokretna faza) [27]. Razvijena je tijekom kasnih 1960-ih i 1970-ih kao podvrsta tekućinske kromatografije (LC) kod koje pokretna faza prolazi kroz kolonu pod visokim tlakom radi povećanja učinkovitosti odjeljivanja. Danas je to široko prihvaćena separacijska tehnika za analizu i pročišćavanje uzoraka u raznim područjima, uključujući farmaceutsku, prehrambenu, biotehnolojsku,

ekološku i polimernu industriju. Metoda se općenito koristi za: separaciju raznih spojeva (organskih, anorganskih i bioloških spojeva, polimera, malih iona do makromolekula), analizu nečistoća, hlapljivih i nehlapljivih sastojaka, određivanje neutralnih i ionskih i molekula, izolaciju i pročišćavanje spojeva, separaciju usko povezanih spojeva, kvalitativne i kvantitativne analize.

HPLC instrumentacija sastoji se od 8 osnovnih komponenata: rezervoar otapala pokretne faze, pumpa, injektor, predkolona, kolona, detektor, spremnik za otpad, računalo, integrator ili pisač. Za injektiranje u instrument uzorak mora biti u tekućem agregatnom stanju dok je čvrste uzorke potrebno otopiti u odgovarajućem otapalu, kompatibilnim s pokretnom i nepokretnom fazom. Injektira se volumen uzorka od 1 do 100 μL , najčešće 5-10 μL što ovisi o osjetljivosti detektora. Vrijeme analize u rasponu je od 5 min do 2 h, obično 10-25 min.



Slika 2.6. Shematski prikaz HPLC uređaja

Kolona je srce HPLC instrumenta jer se u njoj odvija sam proces separacije. Obično su napravljene od nehrđajućeg čelika, otpornog na koroziju. Dimenzije su u rasponu od 10 do 25 cm duljine i unutarnjeg promjera 3 do 9 mm.



Slika 2.7. HPLC kolone različitih veličina [26]

Važna uloga HPLC detektora je praćenje otopljenih tvari koje su eluirane iz kolone. Detektor proizvodi električni signal proporcionalan određenom svojstvu pokretne faze ili otopljenih tvari [28]. Postoje razne vrste detektora koji se primjenjuju u tekućinskoj kromatografiji poput spektrometra masa, spektrofotometrijskih detektora u UV/VIS području elektromagnetskog zračenja, elektrokemijski detektori (konduktometrijski i amperometrijski), detektori na temelju molekulske fluorescencije, indeksa loma, te oni koji se temelje na raspršenju elektromagnetskog zračenja na isparenom uzorku (ELSD). U slučaju otopljene tvari prate se karakteristike otopljene tvari (apsorpcija u UV/VIS ili IR području, fluorescencija), dok kod pokretne faze detektori mjere indeks loma ili provodnost [25].

Karakteristike dobrog HPLC detektora su osjetljivost, linearnost, pouzdanost, predvidljivost u odgovoru, lakoća korištenja i mali mrtvi volumen.

U pravilu se, kao što je već spomenuto upotrebljava kromatografija obrnutih faza za rješavanje analitičkih problema. Potrebno je razlikovati izokratno od gradijentnog eluiranja. Ako izokratno eluiranje, u kojem je sastav pokretne faze stalan, ne dovodi do željene separacije primjenjuje se gradijentno eluiranje, pri čemu dolazi do promjene sastava pokretne faze. U oba slučaja cilj je u pokretnoj fazi stvoriti neutralne kemijske vrste koje dolaze u interakciju s nepolarnom nepokretnom fazom [25].

Ograničenja visoko učinkovite tekućinske kromatografije su teško postizanje razlučivosti kompleksnih spojeva, nemogućnost analize više uzoraka istovremeno, dugotrajno vrijeme analize te potrebna priprema uzoraka.

Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti (UPLC) [29]

UPLC (engl. *ultra-performance liquid chromatography*) moderna je tehnika tekućinske kromatografije koja se razvija i poboljšava u tri područja: osjetljivost, brzina i rezolucija. Načela UPLC-a jednaka su kao i kod HPLC-a, osnovna razlika je u veličini čestica kolona. UPLC kolone punjene su česticama manjim od 2 μm u promjeru, a separacija i kvantifikacija odvijaju se pri izrazito visokim tlakovima (100 MPa) što je također razlika u odnosu na HPLC koji postiže tlakove do 400 bara. Navedenim promjenama postiže se bolja razlučivost, brzina i osjetljivost u usporedbi s tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

Tablica 2.2. Prednosti i nedostaci UPLC-a

Prednosti UPLC-a	Nedostaci UPLC-a
<ul style="list-style-type: none">○ manje vrijeme izvedbe i troškovi○ veća osjetljivost○ brze analize, precizno kvantificiranje analita○ uporaba finih čestica (2 μm) za pakiranje nepokretne faze○ manja potrošnja otapala○ više se produkata analizira postojećim resursima○ veća propusnost uzorka○ osigurava kvalitetu krajnjeg proizvoda	<ul style="list-style-type: none">○ životni vijek kolone (tijekom analize se zbog veličine čestica razvijaju visoki tlakovi koji smanjuju život kolona)○ potrebno više održavanja

2.3. VALIDACIJA

Potrebno je validirati analitičke metode kako bi se osigurala točnost i pouzdanost analitičkih podataka [30]. Validacija je dokumentirani prikaz procesa dokazivanja da je analitička metoda prikladna za namijenjenu svrhu. Provodi se prije primjene nove metode, nenormirane

metode, normirane metode koja se upotrebljava izvan mjernog područja te kod proširenja, prenamjene ili modifikacije postojeće metode. Prije provedbe validacije potrebno je definirati parametre validacije i kriterije njihove prihvatljivosti. Odabir parametara validacije ovisi o vrsti i namjeni metode [31].

Validiraju se izvedbene značajke metode [32]:

- ✓ točnost
- ✓ preciznost
- ✓ linearnost
- ✓ selektivnost i specifičnost
- ✓ učinak matice uzorka, tj. interferencija
- ✓ granica dokazivanja (detekcije)
- ✓ otpornost metode (na promjene radnih uvjeta)
- ✓ radno područje
- ✓ osjetljivost metode
- ✓ iskoristivost

Kombiniranjem navedenih parametara razvija se plan validacije za pojedinu metodu.

Linearnost se definira kao mogućnost da se metodom unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita, što se određuje kalibracijskim postupcima [32].

Preciznost se određuje kao izraz slaganja između niza mjerenja izvedenih iz istog homogenog uzorka pod definiranim uvjetima. Ovisno o uvjetima u kojima se određuje razlikujemo [30]:

- preciznost pod uvjetima ponovljivosti ili ponovljivost-pri čemu uvjeti uključuju jedan laboratorij, istog analitičara, istu aparaturu, kratko vremensko razdoblje
- međupreciznost-preciznost koja se ostvaruje unutar istog laboratorija u duljem razdoblju uz promjene nekih uvjeta (različiti analitičari, instrumenti)
- preciznost pod uvjetima obnovljivosti ili obnovljivost-metoda i uzorak isti, ali promijenjeni uvjeti izvedbe (npr. mjesto, vrijeme i analitičar) [32]

Granica dokazivanja je najmanja moguća koncentracija analita koja se može detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti.

Granica kvantitativnosti je najmanja moguća koncentracija analita koja se može odrediti uz dopuštenu pogrešku.

Osjetljivost je svojstvo metode ili instrumenta da razlikuje male količine analita, a karakterizira je nagib kalibracijskog pravca [32].

2.4. KVALITETA UGRADENA U DIZAJN [33]

Kvaliteta znači zadovoljstvo kupca u pogledu usluge, proizvoda i procesa. Farmaceutska industrija ulaže milijarde novaca za otkrića i dizajniranje kvalitetnog proizvoda te njegova procesa proizvodnje s ciljem stalne isporuke proizvoda željene kakvoće. Kvaliteta ugrađena u dizajn (engl. *Quality by Design*, QbD) sistematski je pristup razvoju i dizajniranju koji započinje unaprijed definiranim ciljevima te naglašava važnost razumijevanja procesa i proizvoda te kontrolu, a temelji se na znanstvenim dokazima i upravljanju rizicima u kvaliteti [34]. Načela QbD koriste se za poboljšanje proizvoda i kvalitete procesa u svakoj industriji, a veliku važnost ima u razvoju lijekova, biofarmaceutika i analitičkih metoda. Koncept kvalitete procesa i dizajna proizvoda (QbD) prepoznat je i prvi put prihvaćen od Američke agencije za hranu i lijekove (engl. *U.S. Food and Drug Administration*, FDA) 2004. godine.

Elementi farmaceutskog razvoja koristeći QbD koncept uključuju:

1. Definiranje cilja

Ovaj korak uključuje određivanje ciljnog profila kvalitete proizvoda (engl. *Quality Target Product Profile*, QTTP) koji je osnova za dizajniranje i razvoj proizvoda. QTTP definira očekivanja konačnog proizvoda (način primjene, oblik doziranja, sustav za isporuku, jačina doze, farmakokinetička svojstva, kriteriji kvalitete lijeka poput sterilnosti, čistoće, stabilnosti i sl.). U slučaju razvoja analitičke metode naziva se ciljnim analitičkim profilom (ATP).

2. Određivanje kritičnih svojstava kvalitete

Nakon definiranja ciljnog profila kvalitete, određuju se kritična svojstva kvalitete (engl. *Critical Quality Attributes*, CQAs) kao što su kemijske, biološke, fizikalne, mikrobiološke karakteristike koje trebaju biti unutar odgovarajućeg raspona kako bi se osigurala željena

kvaliteta proizvoda. Razlikuje se za pojedinu vrstu procesa, oblik doziranja i način razvoja metode.

3. Procjena rizika

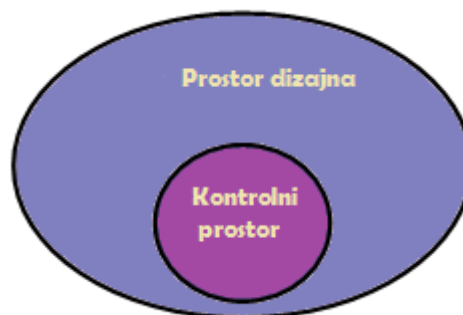
Procjena rizika pomaže u poboljšanju kvalitete metode ili procesa te je važna pri uvođenju varijabli u metodu ili proces. Pomoću procjene rizika prepoznaju se kritični atributi koji će utjecati na konačnu kvalitetu proizvoda. Korisna je za učinkovitu komunikaciju između istraživanja/razvoja i proizvodnje unutar tvrtke.

4. Razvoj dizajna eksperimenta (engl. *Design of Experiments*, DOE)

Eksperimentalni dizajn je multidimenzionalna kombinacija i interakcija ulaznih varijabli i procesnih parametara koji su pokazali da osiguravaju kvalitetu što se prikazuje prostorom dizajna (engl. *Design Space*) kojeg predlaže podnositelj zahtjeva. Rad izvan prostora dizajna smatra se promjenom i zahtjeva prijavu izmjene regulatornoj agenciji.

5. Definiranje kontrolne strategije

Kontrolna strategija potrebna je kako bi se osiguralo da su materijal i sami proces unutar očekivanih donjih i gornjih granica, odnosno daje pregled kako je osigurana kvaliteta proizvoda i u početnim koracima identificira svojstva koja mogu dati rezultate izvan raspona i time utjecati na kvalitetu. Kontinuirano se provjeravaju materijal i procesni parametri tijekom proizvodnje radi ponovljivosti. Kontrolni prostor trebao bi se nalaziti unutar prostora dizajna, ako je manji onda se smatra robusnim.



Slika 2.8. Kontrolni prostor unutar prostora dizajna

6. Kontinuirano poboljšanje tijekom cijelog životnog ciklusa proizvoda

Kvaliteta proizvoda može se poboljšati tijekom cijelog životnog ciklusa proizvoda, stoga tvrtke mogu primjenjivati razne inovativne pristupe za njegovo poboljšanje kvalitete. Kad govorimo o analitičkom QbD, kontinuirano praćenje metode (engl. *Continuous Method Monitoring*, CMM) je završni korak. Prati se i bilježi izvedba metode pomoću kontrolnih grafova u određenom periodu radi sigurnosti da je ATP zadovoljen [35].

QbD može se primijeniti kod analitičkih metoda kao što su kromatografske poput HPLC, UHPLC (za razvoj metode i određivanje nečistoće u lijekovima), spektrometrije masa, kapilarne elektroforeze i sl.

Prednosti QbD radi kojih se usvaja su :

- sigurnost pacijenta i učinkovitost proizvoda
- razumijevanje farmaceutskog procesa i metode
- dizajn proizvoda i razvoj procesa
- procjena rizika na temelju znanosti
- definiranje kritičnih parametara kvalitete i analiza njihovih utjecaja na kvaliteti konačnog proizvoda
- robusnost metode ili procesa
- prednosti u poslovanju

2.4.1. Primjena DryLab programskog paketa u razvoju HPLC metode

Za razvoj novih kromatografskih metoda, primjerice HPLC koriste se različite kolone, puferi, kiseline za podešavanje pH vrijednosti pokretne faze, otapala, itd., što zahtijeva mnogo vremena i sredstava. Radi poboljšanja učinkovitosti razvoja metode, razvijeno je nekoliko softvera među kojima se nalazi i DryLab (Molnar Institute, Berlin, Njemačka) koji je u upotrebi od 1986. godine [36]. Koristi se za eksperimentalno modeliranje i predviđanje ponašanja kromatografskog sustava u mnogo širem spektru, nego što bi ikada bilo moguće u laboratoriju. DryLabom može se brzo i jednostavno odrediti točno ponašanje razdvajanja tvari, istovremenim mijenjanjem višestrukih parametara metode kao što su pH, temperatura, koncentracija pufera, vrijeme gradijentnog eluiranja, ionska jakost i sl. Na taj način brzo se pronalaze optimalni uvjeti separacije i postižu transparentnost, razumijevanje te kontrola metode [37]. Uz to primjena ovog programa olakšava i prijenos analitičkih metoda između

laboratorija, brzo daje korisne informacije o utjecajima promjena kromatografskih faktora te ukazuje na moguće promjene koje neće utjecati na kvalitetu metode [36]. Potrebno je provesti 2-12 ulaznih eksperimenata na temelju kojih DryLab predviđa vrijeme zadržavanja i rezoluciju pojedinih kromatografskih krivulja s više od 99 % točnosti. Prvi korak pri korištenju softvera uključuje definiranje ciljanog analitičkog profila (ATP) nakon kojeg DryLab pomaže u odabiru početnih uvjeta metode [37].

Radi optimizacije metode, unose se vremena zadržavanja i površine pikova komponenti koji čine uzorak iz početnih kromatografskih analiza. Na temelju površine pikova, omogućeno je automatsko praćenje i prepoznavanje pikova komponenata u više analiza ako je volumen injektiranja uzorka konstantan tijekom izvođenja osnovnih eksperimenata. Uz navedena svojstva, potrebno je poznavati i karakteristike kolone (duljina, promjer, veličina čestica), protok, sastav i pH pokretne faze, temperatura i sl. Model kromatografskog ponašanja prikazuje se kritičnom rezolucijskom mapom (engl. *Critical Resolution Map*, CRM) koja može biti 1D gdje se vrijednost kritične vrijednost faktora rezolucije, R_s nalazi na y-osi, 2D kod koje je kritična vrijednost R_s prikazana površinom određene boje na dvodimenzionalnom grafu ovisnosti o dva ispitivana parametra te 3D kocka unutar koje se također odgovarajućom bojom predstavlja kritična R_s vrijednost. Na temelju rezolucijskih mapi određuje se i robusnost metode [36].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Tablica 3.1. Popis korištenih kemikalija tijekom eksperimenta

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
METANOL	CH ₃ OH	<i>p.a.</i>	Sigma-Aldrich
METANOL	CH ₃ OH	HPLC	Baker
ETANOL	CH ₃ CH ₂ OH	<i>p.a.</i>	Gram-mol
ACETON	CH ₃ COCH ₃	<i>p.a.</i>	Gram-mol
ETIL-ACETAT	CH ₃ -COO-CH ₂ -CH ₃	<i>p.a.</i>	Kemika
ACETONITRIL	CH ₃ CN	<i>p.a.</i>	Carlo Erba reagents

3.1.2. Sorbensi

Korištene kolone za ekstrakciju su:

- Oasis HLB 60 mg/3 mL, Waters

Oasis HLB kolone sadrže Oasis HLB hidrofilno-lipofilni sorbens koji zbog sklonosti močenja vodom ima sposobnost boljeg zadržavanja i izvrsnog oporavka. Pogodan je za ekstrakciju kiselih, neutralnih i bazičnih spojeva iz različitih matica.

- Strata C18-E 200 mg/3 mL, Phenomenex

Strata C18-E je polimerni sorbens na bazi silikagela koji je pogodan za analize hidrofobnih molekula, koje sadrže ugljikovodične lance.

3.1.3. Izvorska voda

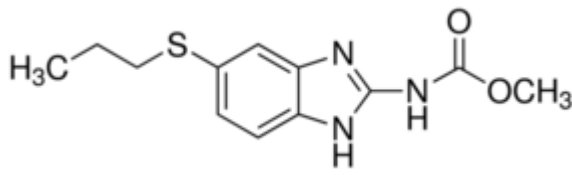
Za ekstrakciju farmaceutika iz vode radi optimizacije i validacije metode koristila se pitka izvorska voda s izvora Kraljičin zdenac, Zagreb, Hrvatska.

3.1.4. Farmaceutski aktivne tvari

U eksperimentu je korišteno 13 farmaceutika čija se fizikalno-kemijska svojstva nalaze u Tablicama 3.2.-3.14.

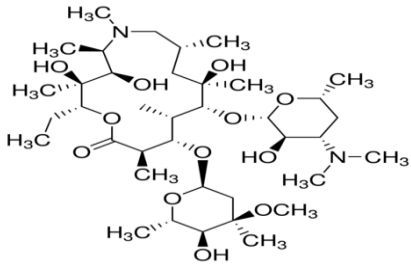
3.1.4.1. ALBENDAZOL (ALB)

Tablica 3.2. Fizikalno-kemijska svojstva albendazola [7]

KLASA FARMACEUTIKA	antihelmintik; benzimidazol
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	metil <i>N</i> -[6-(propilsulfanil)-1 <i>H</i> -1,3-benzodiazol-2-il]karbamat
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S
MOLARNA MASA [g/mol]	265,331
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	54965-21-8
SVOJSTVA [43]	bijeli do prljavo bijeli prah
KONSTANTE	log <i>K</i> _{ov} =2,7 p <i>K</i> _{k1} =10,26 p <i>K</i> _{k2} =2,80 [44]
TEMPERATURA TALJENJA	208-210 °C
TOPLJIVOST U VODI	0,023 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	8-12 h

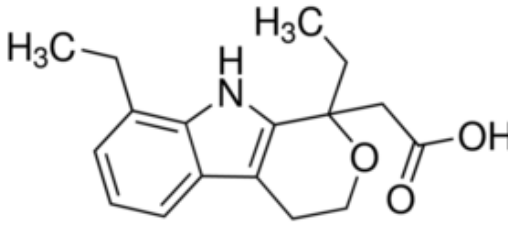
3.1.4.2. AZITROMICIN (AZT)

Tablica 3.3. Fizikalno-kemijska svojstva azitromicina [7]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik; makrolid (azalid)
PROIZVOĐAČ	Pliva d.o.o.
NAZIV PO IUPAC-U	(2R,3S,4R,5R,8R,10R,11R,12S,13S,14R)-11-[[[(2S,3R,4S,6R)-4-(dimetilamino)-3-hidroksi-6-metiloksan-2-il]oksi]-2-etil-3,4,10-trihidroksi-13-[[[(2R,4R,5S,6S)-5-hidroksi-4-metoksi-4,6-dimetiloksan-2-il]oksi]-3,5,6,8,10,12,14-heptametil-1-oksa-6-azaciklopentadekan-15-on
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$
MOLARNA MASA [g/mol]	748,9845
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	83905-01-5
SVOJSTVA [40]	bijeli kristalni prah (kao dihidrat)
KONSTANTE	$\log K_{ov}=4,02$ $pK_k=8,74$ (pri 25 °C)
TEMPERATURA TALJENJA	114 °C
TOPLJIVOST U VODI [23]	0,51 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	68 h

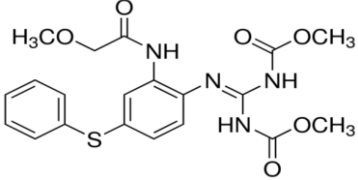
3.1.4.3. ETODOLAC (ETD)

Tablica 3.4. Fizikalno-kemijska svojstva etodolca [7]

KLASA FARMACEUTIKA	nesteroidni protuupalni lijek (NSAIDs); indol karboksilna kiselina
PROIZVOĐAČ	Pliva d.o.o.
NAZIV PO IUPAC-U	2-{1,8-dietil-1H,3H,4H,9H-pirano[3,4-b]indol-1-il}octena kiselina
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₇ H ₂₁ NO ₃
MOLARNA MASA [g/mol]	287,359
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	41340-25-4
SVOJSTVA [48]	bijela kristalna tvar
KONSTANTE	log K_{ov} =2,5 p K_k =4,65
TEMPERATURA TALJENJA [23]	145-148 °C
TOPLJIVOST U VODI [23]	0,039 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	7,3±4,0 h

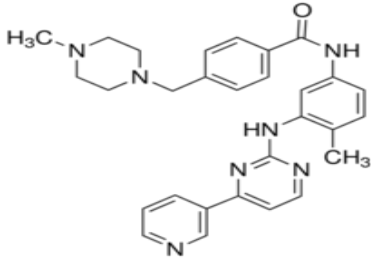
3.1.4.4. FEBANTEL (FEBA)

Tablica 3.5. Fizikalno-kemijske karakteristike febantela [45]

KLASA FARMACEUTIKA	antihelminetik; benzimidazol
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	dimetil[[2-(2-dimetiloksiacetamido)-4-(feniltio)fenil]imidokarbonil]dikarbamat
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S
MOLARNA MASA [g/mol]	446,478
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	58306-30-2
SVOJSTVA	bijeli kristali
KONSTANTE	log <i>K</i> _{ov} =2,9; 2,8; 2,6 (pH 5; 7; 9)
TEMPERATURA TALJENJA	129-130 °C
TOPLJIVOST U VODI	1-2 mg/L pri pH 5-9
VRIJEME POLUŽIVOTA	12-15 h (svinje)

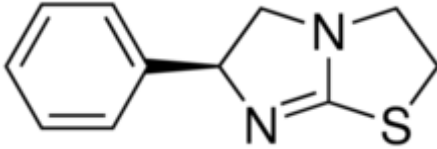
3.1.4.5. IMATINIB (IMT)

Tablica 3.6. Fizikalno-kemijske karakteristike imatiniba [7]

KLASA FARMACEUTIKA	citostatik; inhibitor tirozin kinaze
PROIZVOĐAČ	Pliva d.o.o.
NAZIV PO IUPAC-U	4-[(4-metilpiperazin-1-il)metil]- <i>N</i> -[4-metil-3-[(4-piridin-3-ilpirimidin-2-il)amino]fenil]benzamid
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₂₉ H ₃₁ N ₇ O
MOLARNA MASA [g/mol]	493,615
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	152459-95-5
SVOJSTVA [46]	kristalni prah, bijelo do blijedo žute boje
KONSTANTE	log K_{ov} =3 pK_k =8,27 [47]
TEMPERATURA TALJENJA	226 °C (mesilat)
TOPLJIVOST U VODI	jako topljiv u vodi pri pH<5,5 200 mg/mL [46]
VRIJEME POLUŽIVOTA	18 h (imatinib) 40 h (aktivni metaboliti)

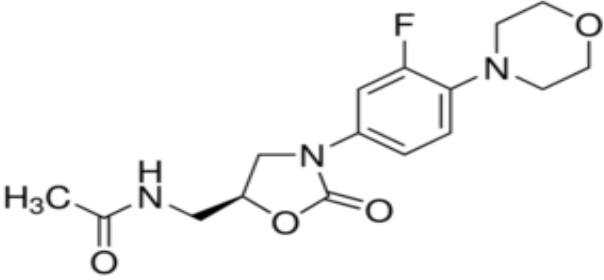
3.1.4.6. LEVAMISOL (LEV)

Tablica 3.7. Fizikalno-kemijske karakteristike levamisola [7, 9]

KLASA FARMACEUTIKA	antihelmintik; imidazotiazol
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	(6S)-6-fenil-2,3,5,6-tetrahydroimidazo[2,1-b][1,3]thiazol
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ S
MOLARNA MASA [g/mol]	204,291
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	14769-73-4
SVOJSTVA	bijeli/prljavo bijeli kristalni prah
KONSTANTE	log K_{ov} =1,84 p K_k =6,98
TEMPERATURA TALJENJA	227-227,5 °C
TOPLJIVOST U VODI	210 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	4,4-5,6 h

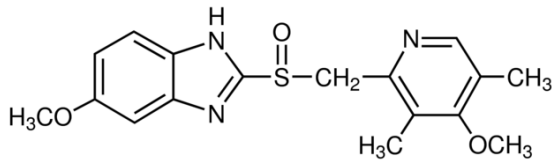
3.1.4.7. LINEZOLID (LNZ)

Tablica 3.8. Fizikalno-kemijske karakteristike linezolida [7, 9]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik; oksazolidinon
PROIZVOĐAČ	Pliva d.o.o.
NAZIV PO IUPAC-U	<i>N</i> -{[(5 <i>S</i>)-3-(3-fluor-4-morfolin-4-ilfenil)-2-okso-1,3-oksazolidin-5-il]metil}acetamid
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₆ H ₂₀ FN ₃ O ₄
MOLARNA MASA [g/mol]	337,351
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	165800-03-3
SVOJSTVA [39]	bijeli kristali
KONSTANTE	log <i>K</i> _{ov} =0,9 p <i>K</i> _k =1,8 [9]
TEMPERATURATAJENJA	181,1-182,5 °C
TOPLJIVOST U VODI	3 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	4,5-5,5 h

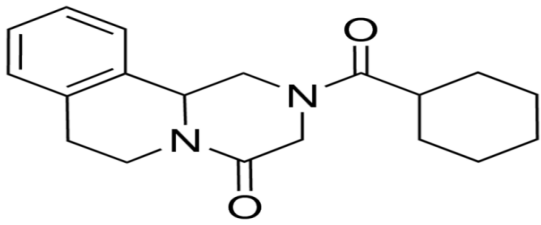
3.1.4.8. OMEPRAZOL (OMP)

Tablica 3.9. Fizikalno-kemijske karakteristike omeprazola [7, 9]

KLASA FARMACEUTIKA	inhibitor protonske pumpe (PPI); sulfinilbenzimidazol
PROIZVOĐAČ	Pliva d.o.o.
NAZIV PO IUPAC-U	6-metoksi-2-[(4-metoksi-3,5-dimetilpiridin-2-il)metansulfinil]-1H-1,3-benzodiazol
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₇ H ₁₉ N ₃ O ₃ S
MOLARNA MASA [g/mol]	345,417
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	73590-58-6
SVOJSTVA	bijeli do prljavo bijeli kristalni prah
KONSTANTE	log <i>K</i> _{ov} =2,23 p <i>K</i> _{k1} =1,2 p <i>K</i> _{k2} =7,4
TEMPERATURA TALJENJA	155 °C
TOPLJIVOST U VODI [23]	0,5 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	0,5-1 h

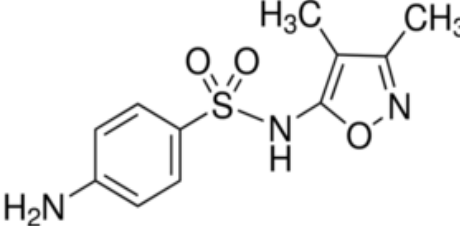
3.1.4.9. PRAZIKVANTEL (PRAZ)

Tablica 3.10. Fizikalno-kemijske karakteristike prazikvantela [7]

KLASA FARMACEUTIKA	antihelmintik; kinolon
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	2-cikloheksil-karbonil-1H,2H,3H,4H,6H,7H,11bH-piperazino[2,1-a]izokinolin-4-on
EMPIRIJSKA FORMULA	$C_{19}H_{24}N_2O_2$
MOLARNA MASA [g/mol]	312,413
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	55268-74-1
SVOJSTVA	bijeli kristalni prah, bez mirisa ili slabijeg mirisa
KONSTANTE	$\log K_{ov}=2,5$ $pK_k=19,38$
TEMPERATURA TALJENJA	136 °C
TOPLJIVOST U VODI	400 mg/L
VRIJEME POLUŽIVOTA	0,8-1,5 h (u serumu)

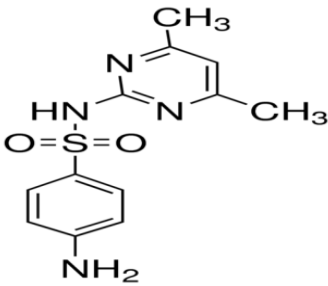
3.1.4.10. SULFAFURAZOL (SFUR)

Tablica 3.11. Fizikalno-kemijske karakteristike sulfafurazola [7, 9]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik; sulfonamid
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	4-amino- <i>N</i> -(dimetil-1,2-oksazol-5-il)benzen-1-sulfonamid
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₁ H ₁₃ N ₃ O ₃ S
MOLARNA MASA [g/mol]	267,304
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	127-69-5
SVOJSTVA	bez mirisa, žućkasto-bijeli kristalni prah
KONSTANTE	<p>log K_{ov}=1,01</p> <p>pK_{k1}=1,5</p> <p>pK_{k2}=5</p>
TEMPERATURA TALJENJA	191 °C
TOPLJIVOST	300 mg/L na 37 °C

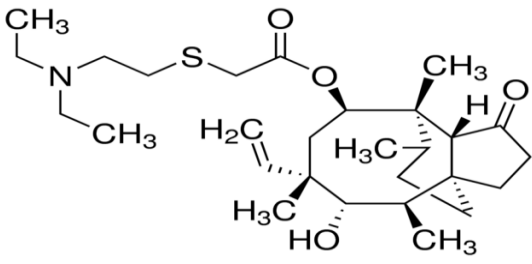
3.1.4.11. SULFAMETAZIN (SMET)

Tablica 3.12. Fizikalno-kemijske karakteristike sulfametazina [9]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik; sulfonamid
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	4-amino- <i>N</i> -(4,6-dimetilpirimidin-2-il)benzen-1-sulfonamid
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S
MOLARNA MASA [g/mol]	278,33
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	57-68-1
SVOJSTVA	bez mirisa ljepljivi, bijeli ili krem bijeli kristalni prah
KONSTANTE	$\log K_{ov}=0,89$ $pK_{k1}=2,65\pm 0,2$ $pK_{k2}=7,4\pm 0,2$ [2]
TEMPERATURA TALJENJA	198,5 °C
TOPLJIVOST U VODI	1500 mg/L pri 29 °C i pH 7
VRIJEME POLUŽIVOTA [42]	5-11,3 h (stoka)

3.1.4.12. TIAMULIN (TIA)

Tablica 3.13. Fizikalno-kemijske karakteristike tiamulina [9]

KLASA FARMACEUTIKA	antibiotik; diterpenski
PROIZVOĐAČ	Genera d.d.
NAZIV PO IUPAC-U	(4 <i>R</i> ,5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> ,8 <i>R</i> ,9 <i>aR</i> ,10 <i>R</i>)-5-hidroksi-4,6,9,10-tetrametil-1-okso-6-vinildekahidro-3 <i>a</i> ,9-propanociklopenta[8]anulen-8-il {[2-(dietilamino)etil]sulfanil}acetat
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₂₈ H ₄₇ NO ₄ S
MOLARNA MASA [g/mol]	493,747
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	55297-95-5
SVOJSTVA [11]	kristalni prah bijele ili svijetlo žute boje
KONSTANTE	log <i>K</i> _{ov} =4,75 p <i>K</i> _k =7,6
TEMPERATURA TALJENJA	147-148 °C
TOPLJIVOST U VODI [41]	dobro topljiv u vodi
VRIJEME POLUŽIVOTA	/

3.1.4.13. TORASEMID (TOR)

Tablica 3.14. Fizikalno-kemijske karakteristike torasemida [7]

KLASA FARMACEUTIKA	diuretik; piridin sulfonil urea
PROIZVOĐAČ	Pliva d.o.o.
NAZIV PO IUPAC-U	1-({4-[(3-metilfenil)amino]piridin-3-il} sulfonil)-3-(propan-2-il)urea
EMPIRIJSKA FORMULA	C ₁₆ H ₂₀ N ₄ O ₃ S
MOLARNA MASA [g/mol]	348,421
MOLEKULSKA STRUKTURA [38]	
CAS BROJ	56211-40-6
SVOJSTVA [48]	bijeli do prljavo bijeli kristalni prah
KONSTANTE	log K_{ov} =2,3 p K_k =7,1
TEMPERATURA TALJENJA	164 °C
TOPLJIVOST U VODI	0,0596 mg/mL
VRIJEME POLUŽIVOTA	3,5 h

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga koristi se za precizno određivanje mase uzoraka. Korištena je analitička vaga Mettler Toledo XA105DU (Slika 3.1.), čiji je maksimalan kapacitet 120 g, a mogućnost očitavanja 0,01g.



Slika 3.1. Mettler Toledo XA105DU analitička vaga [49]

3.2.2. pH-metar

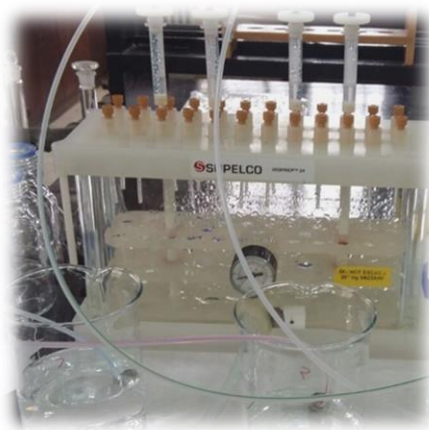
Za mjerenje pH vrijednosti korišten je pH metar Mettler Toledo, S20 SevenEasy, Švicarska prikazan na Slici 3.2. Mjerno područje pH vrijednosti je od 0 do 14, uz mogućnost očitavanja od 0,01 pH.



Slika 3.2. Mettler Toledo S20 SevenEasy pH metar [50]

3.2.3. Uređaj za ekstrakciju čvrstom fazom

Za ekstrakciju farmaceutika iz vode korištena je aparatura Supelco Visiprep 24 (Slika 3.3.). Koristeći vakuumsku pumpu, moguće je ekstrahirati do 24 uzorka paralelno kroz kolonice koje se nalaze na poklopcu posude uz mogućnost reguliranja protoka kroz ventile.



Slika 3.3. Supelco Visiprep 24 aparatura za SPE ekstrakciju

3.2.4. Rotacijski uparivač

Nakon ekstrakcije čvrstom fazom, uzorci su se uparivali na rotacijskom uparivaču Rotavapor R-114, Büchi, Švicarska prikazanom na Slici 3.4. Uređaj se sastoji od vodene kupelji, jedinice za rotaciju tikvice, povratnog hladila, tikvice za sakupljanje kondenzata te vakuum sisaljke pomoću koje se tikvica sa ekstraktom spaja na sustav.



Slika 3.4. Rotacijski uparivač Büchi R-114

3.2.5. Tekućinski kromatograf ultra visoke učinkovitosti (UHPLC)

Separacija ekstrahiranih farmaceutika iz vode provedena je na UHPLC Agilent Series 1290 uređaju koji se sastoji od vakuumnog degazera, automatskog dodavača uzorka, termostata i binarne pumpe te je spojen na detektor, spektrometar masa Agilent 6490 Triple Quad MS (Slika 3.5.). Korištena je WATERS Acquity CSH C18 kolona. Dimenzije kolone su 100×2,1 mm, a promjer čestica unutar kolone je 1,7 μm.



Slika 3.5. UHPLC Agilent Series 1290

3.3. OPIS RADA

3.3.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Standardne otopine farmaceutika pripravljene su razrjeđivanjem temeljne standardne otopine smjese 13 farmaceutika koncentracije 100 mg/L u metanolu, dobivene otapanjem točno odvagane mase u točno određenim volumenima metanola.

3.3.2. Priprema uzorka vode s dodatkom farmaceutika

Prije same provedbe ekstrakcije farmaceutika iz uzorka vode, potrebno je podesiti pH vode na odgovarajuće vrijednosti radi odabira optimalne, koja najbolje odgovara za sve korištene farmaceutike. S obzirom da se početni pH vode nalazi između 7,40 i 7,70, pH vrijednosti 2, 3,

4, 5, 6, i 7 podešene su s 0,1 M HCl, a 8 i 9 s 0,1 M NaOH. Nakon toga se u 100 mL uzorka vode ispitivanog pH dodaje 1 mL standardne otopine smjese 13 farmaceutika.

3.3.3. Ekstrakcija farmaceutika iz uzorka vode čvrstom fazom

Prvi korak u ekstrakciji čvrstom fazom je kondicioniranje kolone, odnosno sorbensa s metanolom (oko 4 mL) uz dodatak vode nakon što se propusti kroz svaku kolonicu. Metanol se ne smije propustiti kroz kolonu do suha, već mora močiti sorbens. U protivnom postupak se ponavlja. Sljedeća dva koraka u ekstrakciji su zadržavanje analita i ispiranje neželjenih tvari s površine sorbensa tako da je 100 mL uzorka vode uz dodatak 1 mL standardne otopine farmaceutika koncentracije 1 mg/L prolazilo kroz sorbens pomoću uronjenih cjevčica uz vakuum, s protokom ne većim od 4 mL/min. SPE-kolone su se nakon toga sušile upotrebom vakuuma radi uklanjanja viška vode. Zadržani analiti eluirani su s 5x 2 mL metanola i sakupljeni kroz ventile poklopca u kivete. Svaki eksperiment provodi se paralelno u 3 ponavljanja (3 uzorka vode koja sadrži farmaceutike) uz slijepu probu (voda bez dodatka farmaceutika) kako bi se uzeo u obzir i utjecaj matice uzorka vode.

Nakon ekstrakcije dobiveni se ekstrakti prebace u okrugle tikvice i uparavaju do suha na rotacijskom vakuum uparivaču pri temperaturi vodene kupelji od 40 °C. Suhi ostatak otopi se u 1 mL HPLC metanola, a zatim se sadržaj tikvice prebaci u vijalice iz kojih se injektira uzorak za UHPLC analizu.

Provedeno je niz eksperimenata, na prethodno opisan način kako bi se ispitala učinkovitost ekstrakcije smjese 13 farmaceutika iz vode i pronašli optimalni uvjeti metode.

Optimiranje uvjeta metode

1.) Odabir optimalnog pH vode i kolonice

- ispitane kolone punjene različitim sorbensima: Oasis HLB 60 mg/3 mL i Strata C18-E 200 mg/3 mL
- ispitane pH vrijednosti vode: 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9

Na temelju izračunatih iskorištenja odabrali smo kolonu Oasis HLB 60 mg/3 mL i pH vode 5 jer je pri tim uvjetima ekstrakcija najučinkovitija.

2.) Odabir otapala za eluiranje

- kolona Oasis HLB 60 mg/3 mL

- pH(vode)=5
- ispitivana otapala: metanol, etanol, aceton, acetonitril, etil-acetat

Na temelju iskorištenja, eksperimenti se provode i dalje s metanolom.

3.) Odabir volumena otapala za eluiranje

- kolona Oasis HLB 60 mg/3 mL
- pH(vode)=5
- otapalo za eluiranje: metanol
- ispitivani su sljedeći volumeni otapala za eluiranje: 1x 2 mL, 2x 2 mL, 3x 2 mL, 4x 2 mL, 5x 2 mL, 6x 2 mL

Na temelju dobivenih iskorištenja, analiti se u sljedećim eksperimentima nastavljaju eluirati s 2 mL metanola.

4.) Odabir volumena uzorka vode

- kolona Oasis HLB 60 mg/3 mL
- pH(vode)=5
- eluiranje: 2 mL metanola
- ispitivani su sljedeći volumeni uzorka vode: 50, 100, 250 i 500 mL

Najbolja učinkovitost je dobivena koristeći 100 mL uzorka vode.

Nakon što su određeni optimalni uvjeti, razvijenu metodu potrebno je validirati i ispitati primjenom realnog uzorka.

Validacija metode

Validacija se provodi opisanim ekstrakcijskim postupkom koristeći Oasis HLB kolonu, 2 mL metanola za eluiranje te 100 mL uzorka vode, tako da se odrede sljedeće izvedbene značajke:

- Granica detekcije, kvantifikacije i linearno područje pomoću različitih koncentracija standardnih otopina farmaceutika (0,5 ng/L, 1 ng/L, 2,5 ng/L, 5 ng/L, 10 ng/L, 25 ng/L, 50 ng/L, 100 ng/L, 250 ng/L, 500 ng/L, 1 µg/L, 2,5 µg/L, 5 µg/L, 0,01 mg/L, 0,05 mg/L, 0,1 mg/L, 0,5 mg/L i 1 mg/L)
- ponovljivost/obnovljivost ekstrakcijom 5 uzoraka vode s dodatkom 1 mL standardne otopine koncentracije 0,5 mg/L+ slijepi uzorak, u vremenskom intervalu od 3 dana

- učinak matice kod kojeg su se standardne otopine koncentracija 0,05; 0,1; 0,5 i 1 mg/L dodavale nakon ekstrakcije u ekstrakt te se onda uparavale do suha

Analiza realnih uzoraka

Razvijena metoda primijenila se za analizu otpadnih voda pri ekstrakcijskim uvjetima koji su prethodno optimirani i validirani. Budući da realni uzorci otpadnih voda sadrže neke od ispitivanih farmaceutika, interferencije pa čak i druge farmaceutike koji nisu bili predmet ovog istraživanja, koncentracije ispitivanih farmaceutika određene su metodom standardnog dodatka. Ekstrakcija se za svaki uzorak provodila 3 puta, jednom bez i dva puta s dodatkom 1 mL standardne otopine koncentracije 0,05 odnosno 0,1 mg/L. Prije same ekstrakcije, otpadnu vodu potrebno je tretirati finom filtracijom.

3.3.4. Razvoj optimalne metode tekućinske kromatografije ultra visoke djelotvornosti DryLab analizom

Kako bi se odredila što kraća i učinkovitija metoda za odjeljivanje smjese 13 farmaceutika (AZT/TIA/IMT/FEBA/TOR/OMP/LNZ/PRAZ/ETD/SMET/SFUR/ALB/LEV) korišten je programski paket DryLab. Optimiranje metode provodilo se na Agilent Series 1290 kromatografu ultra visoke djelotvornosti i spektrometru masa kao detektoru. Provedena su četiri preliminarna mjerenja radi određivanja uvjeta analize na UHPLC-u čiji su parametri prikazani u Tablicama 3.15.-3.18.

Tablica 3.15. Parametri prvog eksperimenta za UHPLC

Kolona i punjenje	WATERS Acquity CSH C18; 100x2,1 mm; 1,7 μ m		
Temperatura kolone	30 °C		
Eluens A	0,1 % mravlja kiselina		
Eluens B	acetonitril		
Gradijent	Vrijeme, min	eluens A, %	eluens B, %
	0	90	10
	5	10	90
	5,01	90	10
	7	90	10
Vrijeme stabilizacije	2 min		
Volumen injektiranja	1 μ L		
Protok	0,4 mL/min		
Detektor	MS/MS-MRM mode		

Tablica 3.16. Parametri drugog eksperimenta za UHPLC

Kolona i punjenje	WATERS Acquity CSH C18; 100x2,1 mm; 1,7 μ m		
Temperatura kolone	30 °C		
Eluens A	0,1 % mravlja kiselina		
Eluens B	acetonitril		
Gradijent	Vrijeme, min	eluens A, %	eluens B, %
	0	90	10
	15	10	90
	15,01	90	10
	17	90	10
Vrijeme stabilizacije	2 min		
Volumen injektiranja	1 μ L		
Protok	0,4 mL/min		
Detektor	MS/MS-MRM mode		

Tablica 3.17. Parametri trećeg eksperimenta za UHPLC

Kolona i punjenje	WATERS Acquity CSH C18; 100x2,1 mm; 1,7 μ m		
Temperatura kolone	65 °C		
Eluens A	0,1 % mravlja kiselina		
Eluens B	acetonitril		
Gradijent	Vrijeme, min	eluens A, %	eluens B, %
	0	90	10
	5	10	90
	5,01	90	10
	7	90	10
Vrijeme stabilizacije	3 min		
Volumen injektiranja	1 μ L		
Protok	0,4 mL/min		
Detektor	MS/MS-MRM mode		

Tablica 3.18. Parametri četvrtog eksperimenta za UHPLC

Kolona i punjenje	WATERS Acquity CSH C18; 100x2,1 mm; 1,7 μ m		
Temperatura kolone	65 °C		
Eluens A	0,1 % mravlja kiselina		
Eluens B	acetonitril		
Gradijent	Vrijeme, min	eluens A, %	eluens B, %
	0	90	10
	15	10	90
Vrijeme stabilizacije	3 min		
Volumen injektiranja	1 μ L		
Protok	0,4 mL/min		
Detektor	MS/MS-MRM mode		

Za razvoj optimalne metode odjeljivanja navedenih farmaceutika DryLab-om, koristili su se postavljeni uvjeti na UHPLC-u, odnosno temperature kolone iznosile su 30 i 65 °C, a vrijeme trajanja je iznosilo 5 i 15 minuta. Preliminarnim ispitivanjima određen je i protok pokretne faze koji iznosi 0,4 mL/min, a volumen zadržavanja 0,25 mL.

Tablica 3.19. Parametri kolone i instrumenta

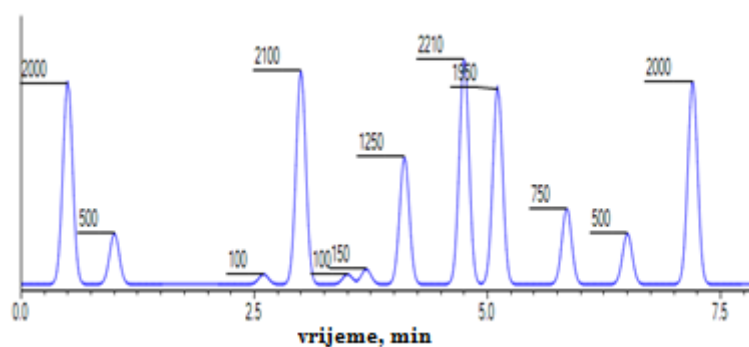
KOLONA	duljina, cm	10
	unutarnji promjer, cm	0,21
	veličina čestica, μm	1,7
VOLUMEN INJEKTIRANJA, μL		10
BRZINA PROTOKA, mL/min		0,4
VOLUMEN ZADRŽAVANJA, mL		0,25
VALNA DULJINA, nm		254

Rezultati DryLab analize

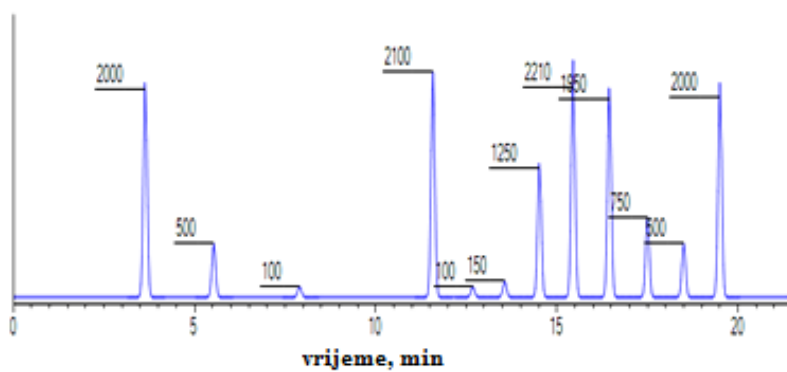
Na UHPLC-u su se provela četiri eksperimenta mijenjanjem temperature kolone i vremena trajanja analize pri čemu su dobiveni rezultati prikazani na Slikama 3.6.-3.9. U Tablici 3.20. nalaze se uvjeti provedenih četiriju eksperimenata.

Tablica 3.20. Temperature i gradijenti za provedbu četiri eksperimenata

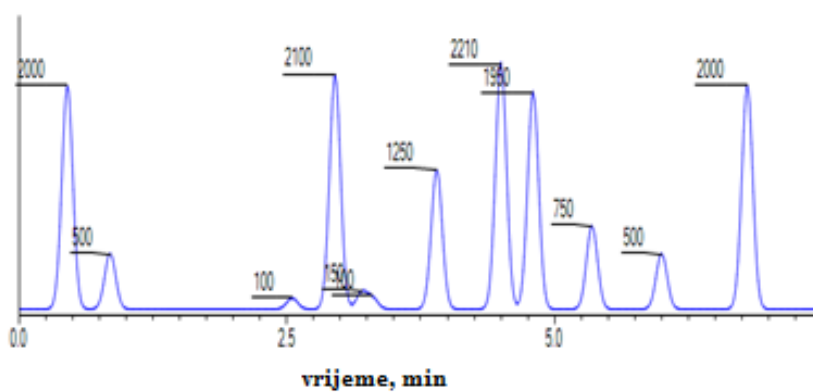
tG₁, min	5	T₁, °C	30
tG₂, min	15	T₂, °C	65



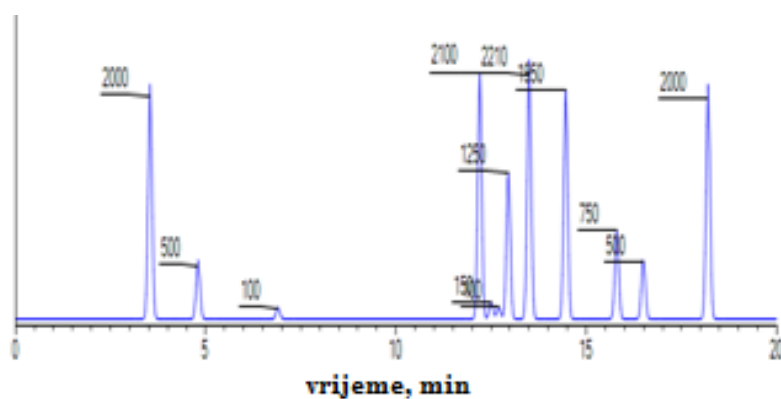
Slika 3.6. Kromatogram prvog DryLab eksperimenta, tG₁ 5; T₁ 30



Slika 3.7. Kromatogram drugog DryLab eksperimenta, t_{G_2} 15; T_1 30

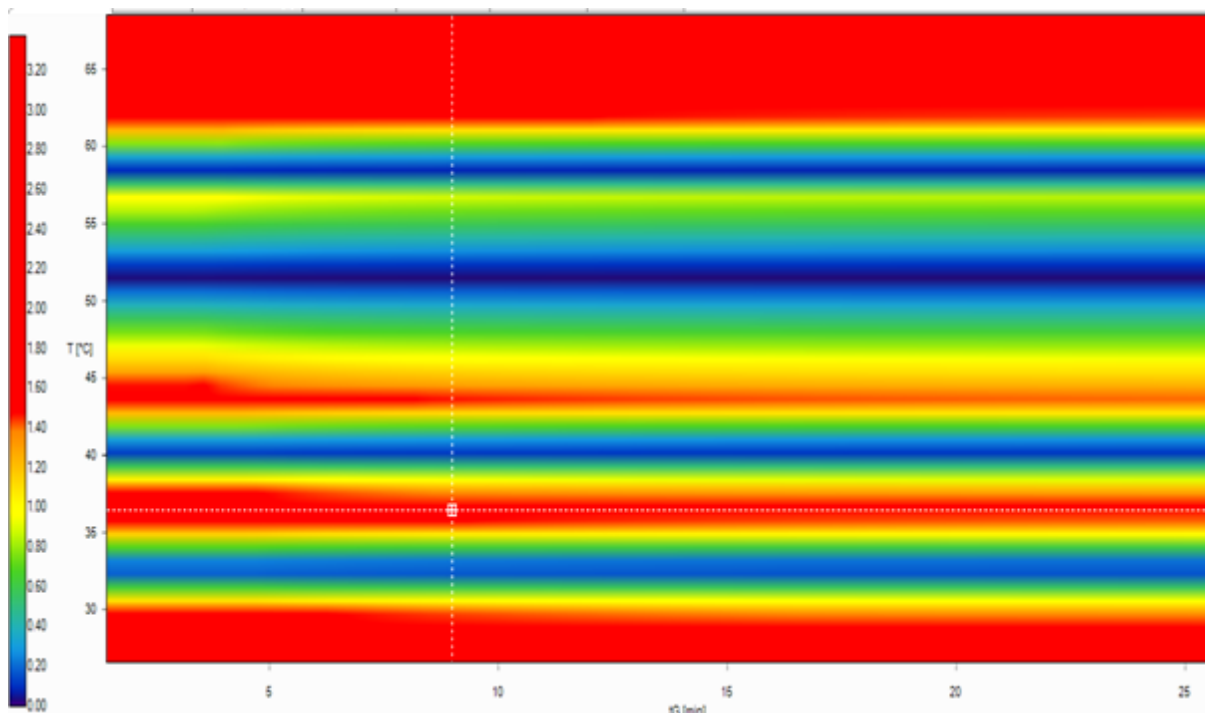


Slika 3.8. Kromatogram trećeg DryLab eksperimenta, t_{G_1} 5; T_2 65



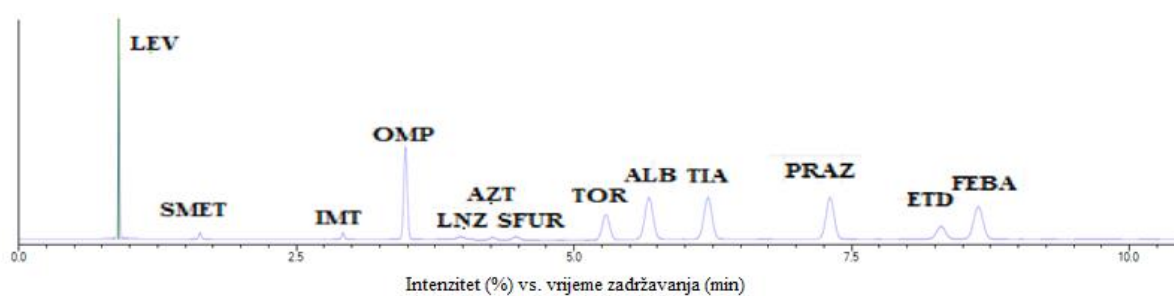
Slika 3.9. Kromatogram četvrtog DryLab eksperimenta, t_{G_2} 15; T_2 65

Na temelju unesenih podataka u program dobiven je 2D grafički prikaz (Slika 3.10.) pomoću kojeg se određuju optimalni teorijski uvjeti za najbolje razdvajanje s obzirom na temperaturu kolone i vrijeme analize.

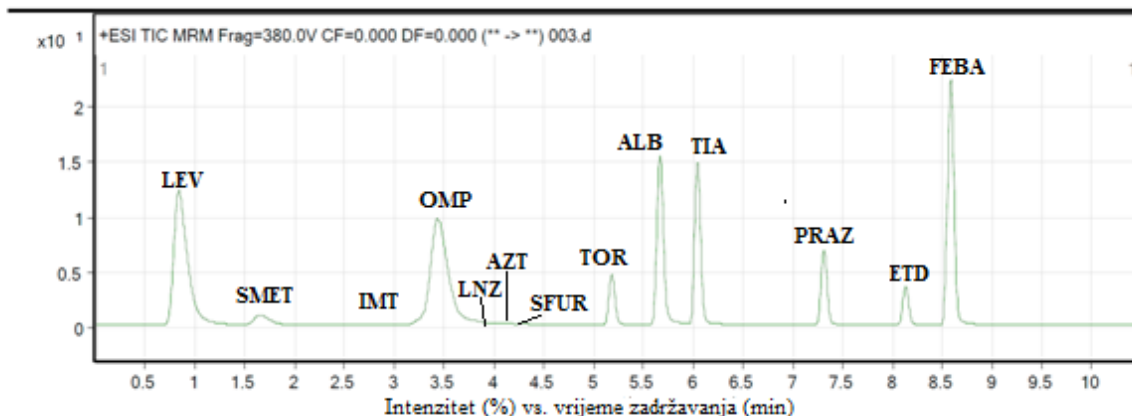


Slika 3.10. 2D grafički prikaz rezultata dobivenih DryLab metodom

Na temelju dobivene temperature i gradijenta pri kojima bi separacija bila najbolja (Slika 3.10.), snimljen je još jedan kromatogram pri istim parametrima. Slike 3.11. i 3.12. prikazuju usporedbu virtualnog (idealnog) kromatograma dobivenog u DryLabu i stvarnog, eksperimentalnog.



Slika 3.11. Teoretski kromatogram dobiven DryLab metodom



Slika 3.12. Eksperimentalni kromatogram 13 farmaceutika

3.3.5. Određivanje učinkovitosti ekstrakcije tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti

Standardne otopine farmaceutika i dobiveni ekstrakti analizirani su pomoću UHPLC-a vezanog na spektrometar masa kao detektora. Ionizacija uzorka je elektroraspršenjem u pozitivnom modu. Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlje kiseline u vodi (A) i 0,1% mravlje kiseline u acetonitrilu (B) uz gradijentno eluiranje. Gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 3.21.

Tablica 3.21. Gradijent pokretne faze korišten za separaciju UHPLC-om

Vrijeme, min	Udio otapala A/B u pokretnoj fazi, %
0	90/10
9	30/70

Prije početka same analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Nakon stabilizacije tlaka u kolonu je injektirano 5 μ L uzorka. Prije svakog injektiranja uzorka, kolonu je potrebno uravnotežiti. Protok tijekom analize iznosio je 0,35 mL/min, a temperatura kolone 35 °C.

Uvjeti izvora iona spektrometra masa pri kojima su provedene analize prikazani su u Tablici 3.22.:

Tablica 3.22. Uvjeti izvora iona spektrometra masa

Temperatura plina	250 °C
Protok plina	15 mL/min
Tlak raspršivača plina	20 psi
Napon kapilare	4500 V

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa Mass Hunter. Farmaceutici su identificirani na temelju spektara masa i vremena zadržavanja (Tablica 3.23.).

Kvantitativna analiza provodila se integriranjem kromatograma, tj. očitavanjem površina ispod kromatografskih krivulja koje odgovaraju ispitivanim farmaceuticima. Nakon očitavanja, uspoređivale su se vrijednosti površina standardnih otopina i uzoraka te se odredila učinkovitost ekstrakcije za pojedini analit.

Tablica 3.23. Uvjeti LC-ESI-MS-MS za analizu odabranih farmaceutika

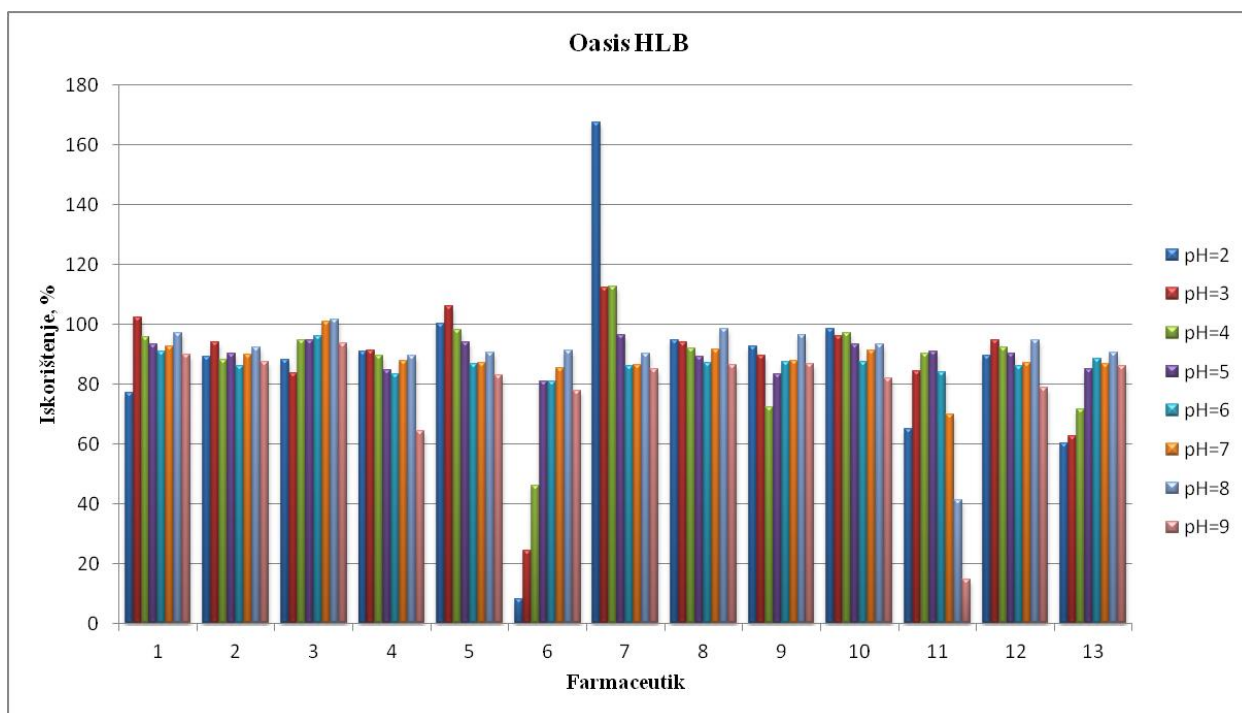
Farmaceutik	Vrijeme zadržavanja (min)	Ciljni ion (m/z)	Potvrđni ion (m/z)	Energija sudara (eV)
Azitromicin	4,3	750	591	10
Tiamulin	6,7	494	192	25
Imatinib	3,4	494	394	25
Febantel	8,6	447	415	10
Torasemid	5,2	394	264	10
Omeprazol	3,6	346	198	10
Linezolid	3,9	338	296	25
Prazikvantel	7,3	313	203	10
Etodolac	8,2	288	172	10
Sulfametazin	1,7	279	186	10
Sulfafurazol	4,4	268	156	20
Albendazol	5,7	266	234	25
Levamisol	0,8	205	178	25

4. REZULTATI I RASPRAVA

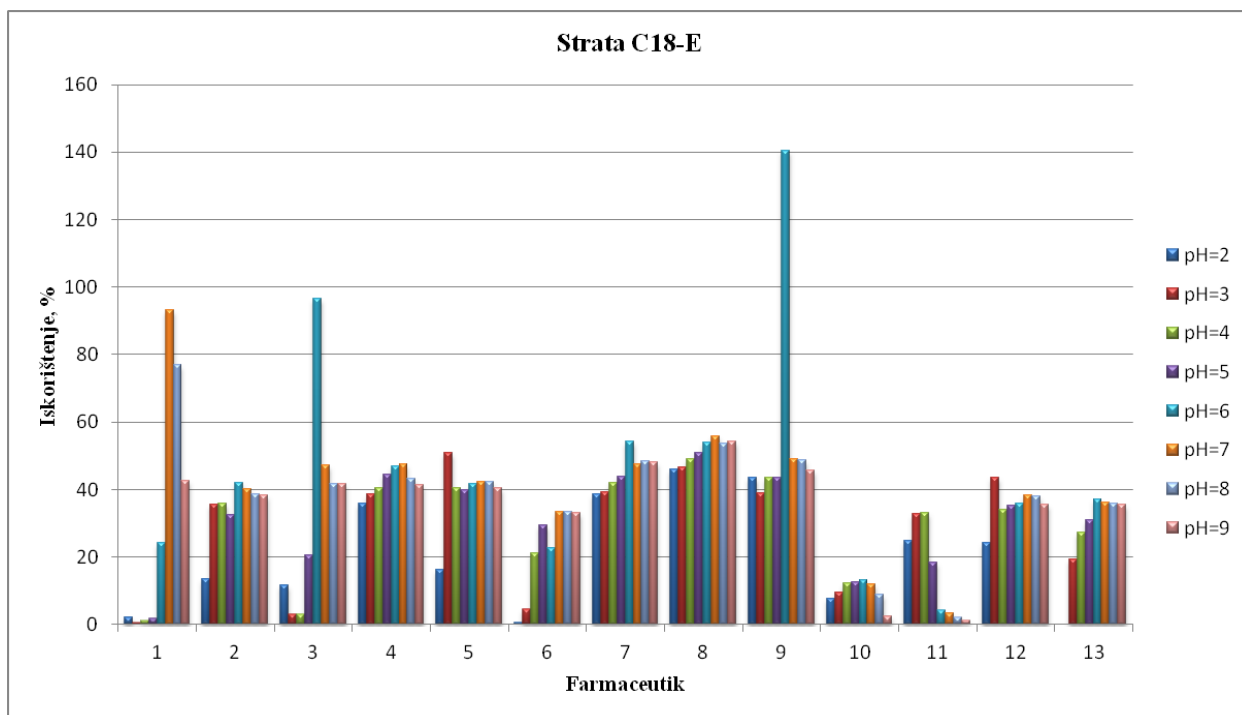
4.1. ODREĐIVANJE OPTIMALNIH UVJETA EKSTRAKCIJE ČVRSTOM FAZOM

4.1.1. Određivanje optimalnog sorbensa i optimalne pH vrijednosti uzorka vode

Kritičan korak u razvoju metode je postupak pripreme uzorka, posebno otkad većina farmaceutika ima amfoterna svojstva [51]. Kod ekstrakcije čvrstom fazom ključno je odabrati odgovarajući sorbens jer on, uz ostale parametre izrazito utječe na izvedbu metode, tj. na njen kapacitet i selektivnost. Izbor sorbensa uvelike ovisi o interesnim analitima te interakcijama između sorbensa i funkcionalnih skupina analita, ali i o matici uzorka koja korelira i sa sorbensom i analitima. Za uzorke vode koji sadrže analite različitih polarnosti, oni najpolarniji otežavaju izbor najpovoljnijeg sorbensa [1]. Kako bi se prevladali problemi oko amfoternosti farmaceutika, na tržištu se pojavljuju novi SPE-sorbensi koji odjeljuju analite prema njihovoj polarnosti i hidrofobnosti [51] zbog čega su za optimizaciju radnih uvjeta korištene Oasis HLB i Strata C18-E kolone. S obzirom da i pH vode ima značajan utjecaj, posebice za amfoterne spojeve, ispitana je učinkovitost ekstrakcije podešavanjem pH vrijednosti uzoraka vode na pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 i 9. Iskorištenja trinaest ispitivanih farmaceutika pri različitim pH vrijednostima uzoraka vode, grafički su prikazani na Slikama 4.1. za Oasis HLB i 4.2. za Strata C18-E kolonu.



Slika 4.1. Učinkovitost ekstrakcije farmaceutika iz vode koristeći Oasis HLB kolonicu (1-azitromicin, 2-tiamulin, 3-imatinib, 4-febantel, 5-torasemid, 6-omeprazol, 7-linezolid, 8-prazikvantel, 9-etodolac, 10-sulfametazin, 11-sulfafurazol, 12-albendazol, 13-levamisol)



Slika 4.2. Učinkovitost ekstrakcije farmaceutika iz vode koristeći Strata C18-E kolonicu

Rezultati su također prikazani i tablično, Tablicama 4.1. i 4.2. za sorbense Oasis HLB i Strata C18 pri podešenim pH vrijednostima uzoraka vode.

Tablica 4.1. Učinkovitost ekstrakcije farmaceutika iz vode za kolonicu Oasis HLB

pH	I, % (n=3)							
	2	3	4	5	6	7	8	9
AZT	77,05±9,89	102,4±5,76	95,74±3,04	93,23±4,36	90,75±1,75	92,55±3,78	96,95±4,47	89,94±3,86
TIA	89,26±2,70	94,09±2,79	88,01±1,30	101,8±2,31	86,19±3,44	89,98±4,298	92,27±2,94	87,54±0,41
IMT	87,96±14,7	83,77±16,1	94,78±9,15	94,49±14,2	96,18±3,63	100,9±0,67	101,7±1,69	93,46±4,17
FEBA	90,83±3,12	91,21±1,55	89,65±3,60	84,82±8,98	83,40±3,71	87,64±2,99	89,43±0,49	64,23±23,2
TOR	100,1±8,03	106,07±8,66	98,11±1,45	112,9±1,16	86,63±3,06	87,12±1,70	90,47±3,37	82,76±4,75
OMP	8,26±15,2	24,38±20,9	45,99±9,16	81,01±6,26	80,95±2,12	85,36±4,49	91,22±1,60	77,66±6,28
LNZ	167,4±8,29	112,09±1,98	112,43±11,2	95,65±4,03	85,96±2,62	86,45±3,89	90,15±0,76	84,84±3,38
PRAZ	94,78±7,93	93,86±3,32	92,00±3,74	94,84±3,29	87,13±2,799	91,48±8,01	98,52±6,29	86,41±0,63
ETD	92,43±7,22	89,59±2,19	72,19±14,7	93,20±3,66	87,48±1,22	87,86±8,04	96,24±5,20	86,81±1,88
SMET	98,53±4,98	96,11±7,29	97,05±11,7	112,0±0,43	87,28±2,02	91,35±13,9	93,29±5,05	82,02±2,45
SFUR	65,05±10,4	84,20±5,39	90,12±2,85	96,37±4,48	83,94±2,55	69,69±16,4	41,17±6,49	14,67±9,43
ALB	89,59±2,99	94,79±3,47	92,09±3,54	90,20±3,72	86,07±1,78	87,17±3,21	94,71±3,45	78,71±7,74
LEV	60,02±8,44	62,59±2,39	71,68±4,07	84,92±5,82	88,60±3,84	86,74±2,78	90,43±3,12	85,89±2,898

Tablica 4.2. Učinkovitost ekstrakcije farmaceutika iz vode za kolonicu Strata C18-E

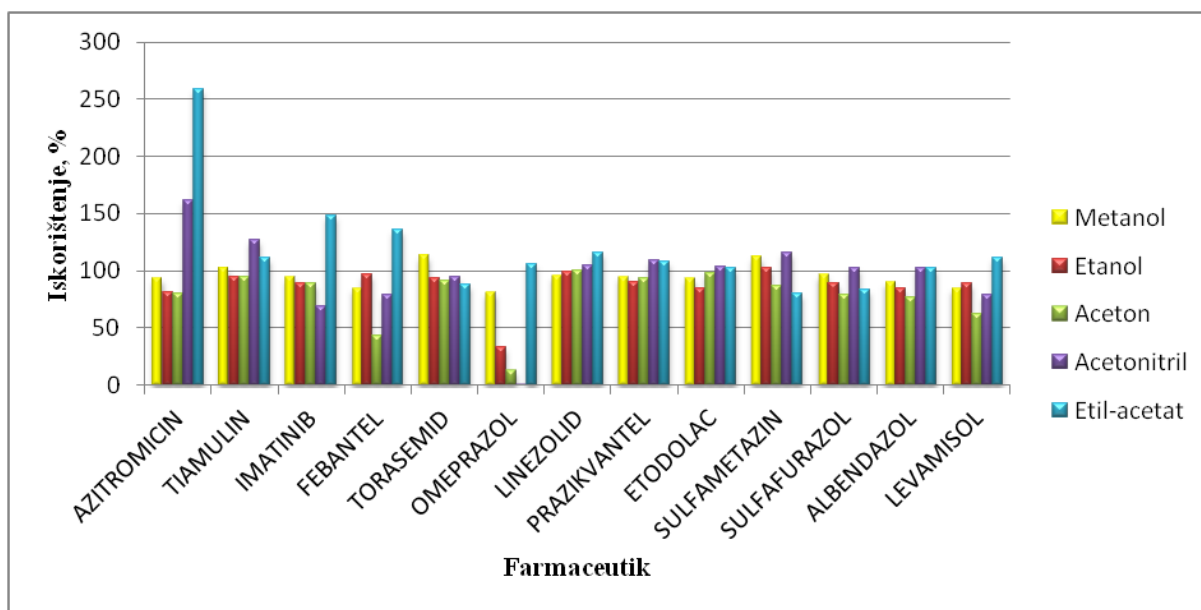
pH	I, % (n=3)							
	2	3	4	5	6	7	8	9
AZT	2,24±150,56	0,43±18,20	1,06±22,56	1,68±23,73	24,20±117,4	93,02±7,18	76,82±34,9	42,52±2,97
TIA	13,55±66,28	35,39±5,82	35,94±3,49	32,54±4,05	42,08±5,66	39,99±0,82	38,55±1,57	38,29±3,43
IMT	11,57±127,5	2,98±45,90	3,04±18,73	20,57±24,69	96,62±8,65	47,22±3,67	41,57±3,98	41,56±4,02
FEBA	35,77±16,25	38,59±4,19	40,46±2,51	44,57±1,83	46,84±2,73	47,34±1,71	43,19±0,73	41,25±2,44
TOR	16,10±84,50	50,75±0,62	40,50±8,91	39,73±0,55	41,59±3,62	42,37±2,78	42,41±3,69	40,43±2,16
OMP	0,69±80,47	4,49±16,05	21,03±6,01	29,26±0,40	22,56±60,91	33,34±2,03	33,33±1,03	33,10±0,81
LNZ	38,59±19,82	39,32±3,90	41,87±4,32	43,92±2,01	54,15±18,89	47,41±3,52	48,36±3,66	48,10±1,54
PRAZ	45,95±20,61	46,70±1,99	49,13±1,43	50,96±0,87	54,02±8,48	55,81±2,40	53,65±5,14	54,34±1,02
ETD	43,48±38,99	38,78±3,99	43,35±20,02	43,50±5,12	140,3±103,3	48,89±4,06	48,73±2,62	45,59±7,34
SMET	7,75±65,72	9,41±8,45	12,21±9,54	12,47±3,78	13,04±13,63	11,85±8,33	8,93±6,20	2,56±9,75
SFUR	24,95±46,74	32,62±3,15	33,21±9,33	18,27±8,87	4,234±15,89	3,41±15,3	2,18±7,20	1,32±12,56
ALB	24,32±57,97	43,35±4,55	34,05±5,62	35,10±1,68	35,71±10,11	38,13±1,79	38,01±2,04	35,45±2,63
LEV	9,71±57,09	19,43±6,35	27,36±22,6	30,95±2,91	37,04±11,92	36,23±0,38	35,92±4,07	35,48±3,95

Usporedbom dvaju korištenih sorbensa, ekstrakciju se odlučilo dalje provoditi pri pH(vode) 5 i uporabom Oasis HLB kolonice koja ima karakteristike lipofilno-hidrofilne ravnoteže i daje najbolje uvjete za simultano ekstrahiranje kiselih analita iz vode, zajedno s neutralnim analitima širokog raspona polariteta [52]. Pri tim uvjetima dobivaju se visoka iskorištenja za sve ispitivane farmaceutike, odnosno za azitromicin, tiamulin, imatinib, torasemid, linezolid, sulfametazin, sulfafurazol, albendazol, etodolac i prazikvantel učinkovitost ekstrakcije je veća od 90 %, a za febantel, omeprazol i levamisol veća od 81 %. Najmanja se iskorištenja za sve farmaceutike dobivaju primjenom Strata C18-E sorbensa, inače neprikladnim za ekstrakciju polarnih tvari [52], pri svim ispitivanim pH vrijednostima.

4.1.2. Određivanje optimalnog otapala za eluiranje

Uz sljedećem koraku potrebno je izabrati odgovarajuće otapalo za eluiranje zadržanih analita na sorbentu. Općenito, eluiranje se postiže primjenom otapala koja imaju najviši indeks polarosti definiran eluotropskom serijom otapala, prema korištenom sorbentu, čime se smanjuje volumen eluiranja ekstrakata i maksimizira učinak koncentracije sorbensa. Mnoga se otapala koriste kao SPE eluensi, a u rastućem poretku prema očekivanoj eluotropskoj jakosti na temelju njihove polarosti to su octena kiselina, metanol, acetonitril, aceton, etil-acetat, dietil eter, benzen, heksan. Učinkovitija otapala su polarna ili ona koja su sposobna za stvaranje vodikovih veza s adsorbiranom vodom na SPE sorbentu u odnosu na jako nepolaro otapalo kao što je heksan. Isto tako na izbor otapala utječu i interakcije između polarnih funkcionalnih skupina i sorbensa koje mogu smanjiti topljivost analita tijekom ispiranja otapalom [53].

U drugom se nizu eksperimenata provodila ekstrakcija korištenjem pet čistih organskih otapala (metanol, etanol, acetonitril, aceton, etil-acetat). Volumen za eluiranje zadržanih analita za odabir optimalnog otapala iznosio je 5x 2 mL. Grafički (Slika 4.3) i tablično (Tablica 4.3.) prikazana su iskorištenja trinaest ispitivanih farmaceutika za metanol, etanol, aceton, acetonitril i etil-acetat.



Slika 4.3. Utjecaj organskih otapala na učinkovitost ekstrakcije trinaest ispitivanih farmaceutika

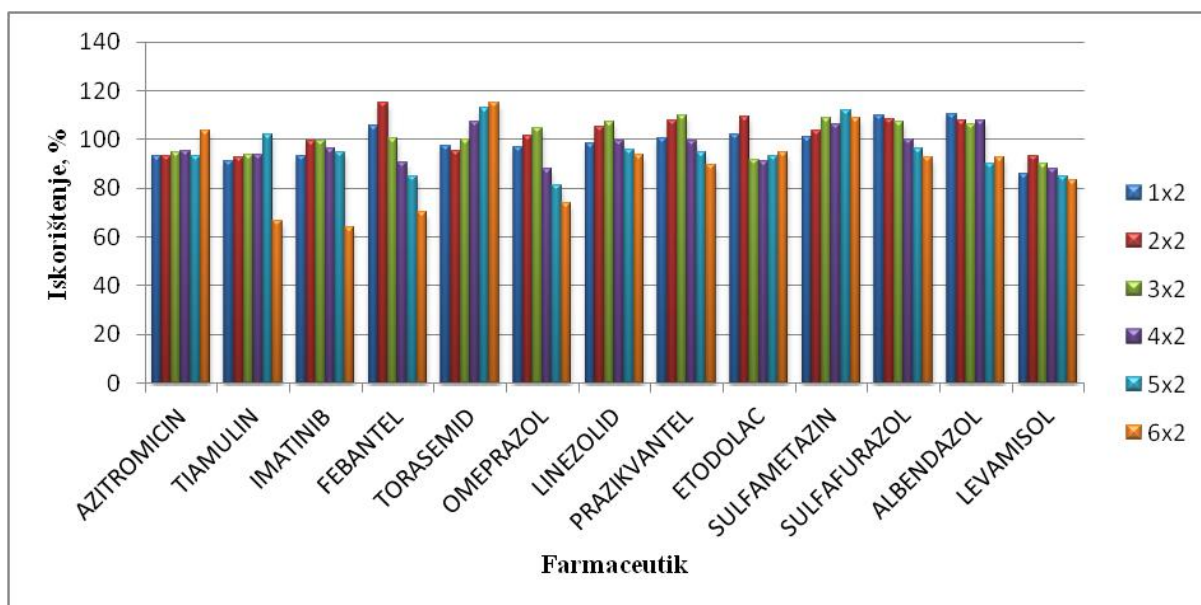
Tablica 4.3. Iskorištenja farmaceutika za korištena otapala

Otapalo	I, % (n=3)				
	METANOL	ETANOL	ACETON	ACETONITRIL	ETIL-ACETAT
AZT	93,23±4,36	80,87±9,43	79,67±11,98	161,52±68,51	258,20±5,28
TIA	101,79±2,31	94,17±5,81	94,67±1,89	126,74±3,55	111,60±5,40
IMT	94,49±14,18	88,82±8,89	88,83±17,94	68,83±42,30	147,68±14,18
FEBA	84,82±8,98	96,38±7,74	42,88±14,21	78,62±6,34	136,10±3,50
TOR	112,93±1,16	93,88±8,08	91,51±3,28	94,62±5,60	88,28±3,76
OMP	81,01±6,26	33,37±2,74	12,98±28,28	0,00745±27,52	106,00±15,10
LNZ	95,65±4,03	99,11±4,65	100,26±1,64	104,28±1,66	115,24±3,89
PRAZ	94,84±3,29	89,45±2,46	93,02±1,65	109,06±5,72	107,37±4,22
ETD	93,20±3,66	84,46±0,96	97,99±1,91	103,07±10,72	102,30±0,53
SMET	112,02±0,43	101,85±2,32	86,68±2,66	115,67±2,73	79,81±2,06
SFUR	96,37±4,48	88,94±10,83	79,14±3,51	102,71±3,90	82,80±11,25
ALB	90,20±3,72	84,52±2,52	76,07±10,58	102,26±5,32	101,98±4,58
LEV	84,92±5,82	89,18±4,95	62,30±6,22	78,74±6,25	111,33±6,02

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je najbolja učinkovitost ekstrakcije za sve farmaceutike dobivena u slučaju metanola. Upotrebom metanola, u odnosu na ostala ispitivana otapala dobivena su najbolja iskorištenja (uz najmanja relativna odstupanja) za ispitivane farmaceutike, tj. veća su od 90 %, osim za febantel, omeprazol i levamisol koji postižu učinkovitost veću od 81 %. Prema Tablici 4.3. možemo vidjeti da se korištenjem sviju otapala dobivaju relativno dobra iskorištenja izuzev etanola, acetona i acetonitrila za omeprazol te acetona za febantel. Također treba primijetiti da azitromicin eluiranjem s acetonitrilom i etil acetatom dobiva nerealna, visoka iskorištenja (161,52 i 258,20 %), isto kao i imatinib i febantel za etil acetat (147,68; 136,10 %) te tiamulin za acetonitril (126,74 %) jer je utjecaj matice očito prevelik. Najbolja iskorištenja za sva primijenjena otapala imaju linezolid, etodolac, torasemid te prazikvantel. Za febantel, linezolid i levamisol bolja iskoristivost ekstrakcije postignuta je uporabom etanola, no svrha je pronaći optimalne ekstrakcijske uvjete za svih trinaest farmaceutika pa se ekstrakcija čvrstom fazom nastavlja provoditi s metanolom.

4.1.3. Određivanje optimalnog volumena otapala za eluiranje

Nakon odabira optimalnog otapala, u sljedećem koraku potrebno je izabrati njegov volumen eluiranja. Do sada su zadržani analiti u svim eksperimentima eluirani s 5x 2 mL otapala, ali radi ispitivanja utjecaja volumena otapala na učinkovitost ekstrakcije za navedene farmaceutike, treći eksperiment provodi se upotrebom sljedećih volumena prethodno izabranog metanola: 1x 2 mL, 2x 2 mL, 3x 2 mL, 4x 2 mL, 5x 2 mL i 6x 2mL. Rezultati su prikazani na Slici 4.4. i u Tablici 4.4.



Slika 4.4. Utjecaj volumena eluiranja metanola na ekstrakciju farmaceutika iz vode

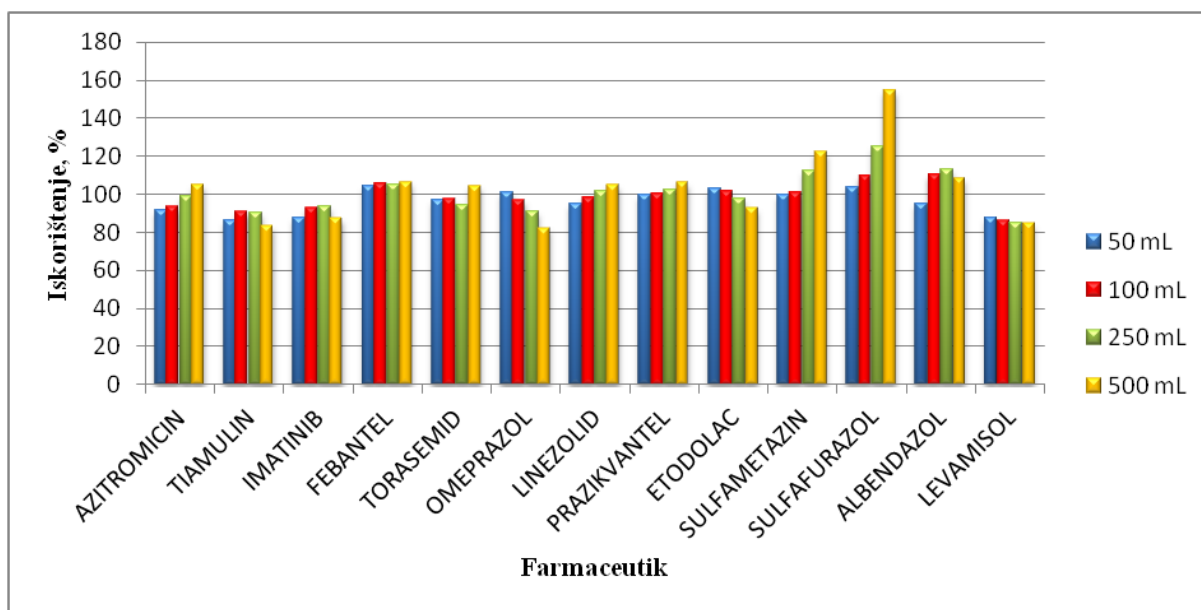
Prema Slici 4.4. vidi se da su korištenjem svih navedenih volumena za eluiranje dobivena visoka iskorištenja, veća od 90 % za većinu farmaceutika. Možemo primijetiti da volumen eluiranja nema značajan utjecaj na učinkovitost ekstrakcije korištenih trinaest farmaceutika. Azitromicin, torasemid, linezolid, prazikvantel, etodolac, sulfametazin, sulfafurazol i albendazol postižu iskorištenja veća od 90 % pri svim volumenima otapala, dok tiamulin, imatinib, febantel, omeprazol te levamisol imaju nešto lošija iskorištenja (< 85%) pri većim volumenima eluiranja, točnije za 5x 2 i 6x 2 mL metanola (Tablica 4.4.). Daljnji eksperimenti provode se sa 2 mL metanola jer su dobivena iskorištenja veća od 91 % za sve ispitivane farmaceutike osim u slučaju levamisola čija je iskoristivost 85,90 %. Uz to treba spomenuti da je jedan od ciljeva razvoja svake nove metode mala potrošnja organskih otapala zbog čega se, nakon ovog ispitivanja sorbirani farmaceutici eluiraju s 2 mL otapala.

Tablica 4.4. Iskorištenja farmaceutika za šest volumena eluiranja otapala

V	I, % (n=3)					
	1x 2 mL	2x 2 mL	3x 2 mL	4x 2 mL	5x 2 mL	6x 2 mL
AZT	93,29±7,44	93,40±4,63	94,58±5,20	95,43±1,16	93,23±4,36	103,42±6,23
TIA	91,15±3,65	92,44±1,42	93,86±12,73	93,81±10,94	101,79±2,31	66,64±7,27
IMT	92,96±7,37	99,43±1,03	99,54±5,94	96,45±7,41	94,49±14,18	63,78±2,25
FEBA	105,43±5,51	114,79±3,70	100,47±3,17	90,46±5,17	84,82±8,98	70,34±6,09
TOR	97,27±1,69	95,43±0,43	100,13±0,91	107,10±1,01	112,93±1,16	114,99±1,23
OMP	96,97±2,12	101,32±1,35	104,60±1,61	87,84±0,68	81,01±6,26	74,11±7,85
LNZ	98,41±3,85	105,02±2,33	107,48±4,79	99,47±4,61	95,66±4,03	93,66±4,93
PRAZ	100,47±6,05	107,85±1,24	109,61±5,02	99,18±2,41	94,85±3,30	89,70±2,11
ETD	101,89±4,34	109,15±1,82	91,49±3,84	91,10±6,60	93,20±3,66	94,63±1,45
SMET	100,85±4,19	103,33±5,87	109,02±4,03	105,98±7,19	112,02±0,43	108,62±1,92
SFUR	109,77±5,83	108,14±2,35	106,98±2,13	100,06±9,50	96,37±4,48	92,79±0,21
ALB	110,33±3,22	107,59±35,73	105,93±9,45	107,68±34,12	90,20±3,72	92,41±8,06
LEV	85,90±0,48	92,90±4,75	90,26±2,87	87,91±5,17	84,92±5,82	83,33±4,67

4.1.4. Određivanje optimalnog volumena uzorka vode

Zadnji korak pri optimiranju ekstrakcijskih uvjeta je odabir volumena uzorka vode. Zbog ispitivanja utjecaja volumena samog uzorka na učinkovitost ekstrakcije farmaceutika, u četvrtom eksperimentu koristili su se sljedeći volumeni izvorske vode: 50, 100, 250 i 500 mL. Ekstrakcija se nastavlja provoditi upotrebom 100 mL vode jer su kod svih farmaceutika, osim levamisola dobivena iskorištenja veća od 91 %. Za ostale volumene uzorka također je dobivena dobra učinkovitost ekstrakcije, no uspoređujući pojedine farmaceutike vidimo da ima veći broj onih s iskorištenjima manjim od 90 %. Najlošija iskorištenja ostvarena su korištenjem 500 mL izvorske vode, za tiamulin, levamisol, imatinib i omeprazol ona su manja od 87,50 %, a utjecaj matice je očito prisutan kod sulfametazina i sulfafurazola čija iskoristivost prelazi 122 %. Rezultati ovog eksperimenta prikazani su na Slici 4.5. i Tablici 4.5.



Slika 4.5. Učinkovitost ekstrakcije farmaceutika koristeći različite volumene uzorka vode

Tablica 4.5. Iskorištenja farmaceutika za različite volumene uzorka vode

V(vode)	I, % (n=3)			
	50 mL	100 mL	250 mL	500 mL
AZT	91,72±3,43	93,29±7,44	99,24±0,66	105,00±1,78
TIA	86,41±7,73	91,15±3,65	90,49±0,48	83,31±1,30
IMT	87,36±1,40	92,96±7,37	93,54±3,17	87,50±3,93
FEBA	104,49±2,98	105,43±5,51	105,23±6,67	106,45±1,35
TOR	96,76±3,91	97,27±1,69	94,42±9,34	104,54±3,82
OMP	101,35±4,03	96,97±2,12	90,71±4,86	82,41±5,75
LNZ	94,78±1,19	98,41±3,85	101,56±5,75	104,85±1,86
PRAZ	100,05±2,39	100,47±6,05	102,44±11,53	105,94±4,21
ETD	103,10±2,23	101,89±4,34	97,99±6,74	92,76±3,07
SMET	100,06±2,33	100,85±4,19	112,21±17,84	122,02±3,27
SFUR	103,84±1,70	109,77±5,83	125,43±12,00	154,54±6,63
ALB	94,74±10,17	110,33±3,23	113,09±11,25	108,57±3,28
LEV	87,35±1,40	85,90±0,48	85,10±1,93	84,50±1,23

4.2. VALIDACIJA

Na temelju prethodnih eksperimenata, određeni su optimalni uvjeti za ekstrakciju trinaest farmaceutika iz vode. Ekstrakcija čvrstom fazom provodi se iz 100 mL uzorka vode pH 5, koristeći 2 mL metanola za eluiranje analita s Oasis HLB sorbensa. Nakon toga slijedi validacija metode koju čine ekstrakcija farmaceutika iz vode i tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti vezana na spektrometar masa. Pripremljena su međurazrjeđenja standardne otopine smjese trinaest farmaceutika kako bi se odredili parametri linearnosti, granice detekcije i kvantifikacije, ponovljivosti, obnovljivosti za kvantitativne svrhe te učinak matice uzorka.

Linearnost metode procijenjena je za svaki farmaceutik u uzorku vode upotrebom deset standardnih otopina koncentracija u rasponu od 0,0025 do 10 µg/L ovisno o farmaceutiku. Nakon ekstrakcije pri optimalnim uvjetima, količina ekstrahiranih farmaceutika određena je tekućinskom kromatografijom ultra visoke djelotvornosti. Pripremljene su kalibracijske krivulje za pojedini farmaceutik crtanjem odziva površine ispod kromatografske krivulje u ovisnosti o koncentraciji analita.

Tablica 4.6. Kvantitativni validacijski parametri određivanja farmaceutika u vodi

	Linearno područje, µg/L	Funkcija ovisnosti	R ²	GD, µg/L	GK, µg/L
AZT	0,1-10	$A=103445\gamma+0,097$	0,9980	0,05	0,1
TIA	0,025-10	$A=2\times 10^6\gamma+186,26$	0,9980	0,01	0,025
IMT	0,5-10	$A=103417\gamma-21,213$	0,9970	0,1	0,5
FEBA	0,005-5	$A=4\times 10^6\gamma+820,61$	0,9936	0,0025	0,005
TOR	0,025-10	$A=4\times 10^6\gamma+650,14$	0,9988	0,01	0,025
OMP	0,025-5	$A=1\times 10^6\gamma+90,83$	0,9981	0,01	0,025
LNZ	0,5-10	$A=35256\gamma+21,362$	0,9945	0,1	0,5
PRAZ	0,0025-10	$A=1\times 10^6\gamma+21,00$	0,9950	0,001	0,0025
ETD	0,05-10	$A=2\times 10^6\gamma+589,42$	0,9923	0,025	0,05
SMET	0,005-10	$A=157941\gamma+58,96$	0,9938	0,0025	0,005
SFUR	0,5-10	$A=14747\gamma+13,05$	0,9988	0,1	0,5
ALB	0,05-5	$A=2\times 10^6\gamma+631,52$	0,9982	0,025	0,05
LEV	0,025-5	$A=4\times 10^6\gamma+415,45$	0,9997	0,01	0,025

Dobiveni rezultati, prikazani u Tablici 4.6. analizirani su metodom linearne regresije. Koeficijenti korelacije, R^2 veći su od 0,992 za sve ispitivane farmaceutike čime se potvrđuje linearnost metode u navedenom koncentracijskom području. Granica detekcije (GD) i granica kvantifikacije (GK) eksperimentalno su procijenjeni iz omjera signala i šuma (S/N) tako da se mjereni signal svakog analita uspoređuje sa signalom slijepe probe pri čemu taj omjer za GD mora biti S/N=3/1, a za GK S/N=10/1. Za ispitivane farmaceutike granice detekcije nalaze se između 0,001 i 0,1 $\mu\text{g/L}$, a granice kvantifikacije su u rasponu 0,0025-0,5 $\mu\text{g/L}$ (Tablica 4.6.).

Tablica 4.7. prikazuje iskorištenja trinaest farmaceutika za tri koncentracijska nivoa kako bi se ispitaio utjecaj koncentracije unutar linearnog područja na učinkovitost ekstrakcije analita. Pri optimalnim uvjetima, iskorištenja farmaceutika se ne bi trebala značajno mijenjati s koncentracijom što potvrđuju imatinib, febantel, linezolid, etodolac, sulfametazin i levamisol za sva tri koncentracijska nivoa. Visoka iskorištenja (veća od 117 %) za azitromicin, tiamulin, torasemid, omeprazol, prazikvantel, sulfafurazol te albendazol na nižem koncentracijskom nivou ukazuju na utjecaj matice uzorka vode. Spomenuti farmaceutici za preostale dvije koncentracije pokazuju slične vrijednosti iskorištenja, bez značajnih razlika.

Tablica 4.7. Iskorištenja trinaest farmaceutika za tri koncentracijska nivoa unutar linearnog područja metode

Farmaceutik	Koncentracija, μg/L	Iskorištenje ± RSO, % (n=3)
Azitromicin	0,1	183,33±15,75
	1	112,50±12,76
	10	107,92±9,55
Tiamulin	0,1	120,49±3,51
	1	97,47±6,14
	10	97,74±7,45
Imatinib	1	101,50±14,14
	5	102,37±8,99
	10	103,23±12,30
Febantel	0,01	80,29±1,82
	0,05	99,41±2,76
	0,5	100,58±5,65
Torasemid	0,1	124,99±4,08
	1	107,96±5,73
	10	108,09±3,77
Omeprazol	0,1	125,53±12,78
	0,5	96,14±9,23
	5	99,65±4,16
Linezolid	1	94,01±14,34
	5	94,09±15,53
	10	93,93±13,73
Prazikvantel	0,01	133,07±6,98
	0,1	119,43±14,89
	1	97,68±0,87
Etodolac	0,5	105,17±13,50
	5	103,82±8,62
	10	106,37±0,46
Sulfametazin	0,025	92,21±16,97
	0,1	100,00±1,03
	1	98,51±4,04
Sulfafurazol	1	117,02±7,71
	5	94,24±4,71
	10	91,55±1,78
Albendazol	0,1	184,61±1,27
	1	113,23 ±4,78
	5	113,30±8,29
Levamisol	0,1	82,33±3,12
	0,5	82,09±5,19
	5	86,73±4,71

Preciznost metode, izražena kao relativno standardno odstupanje (RSO) iskazuje se kao ponovljivost i obnovljivost. Ponovljivost je određena analizom uzorka vode u koji je dodana standardna otopina smjese trinaest farmaceutika koncentracije 0,5 mg/L u pet ponavljanja u istom danu. Obnovljivost se izračunala na temelju rezultata dobivenih provođenjem eksperimenta, na opisan način tijekom tri dana. Preciznost iskazana kao ponovljivost, za sve je farmaceutike niža od 5,42 %, a za obnovljivost su relativna standardna odstupanja manja od 10,69%.

Tablica 4.8. Preciznost metode iskazana kao ponovljivost i obnovljivost

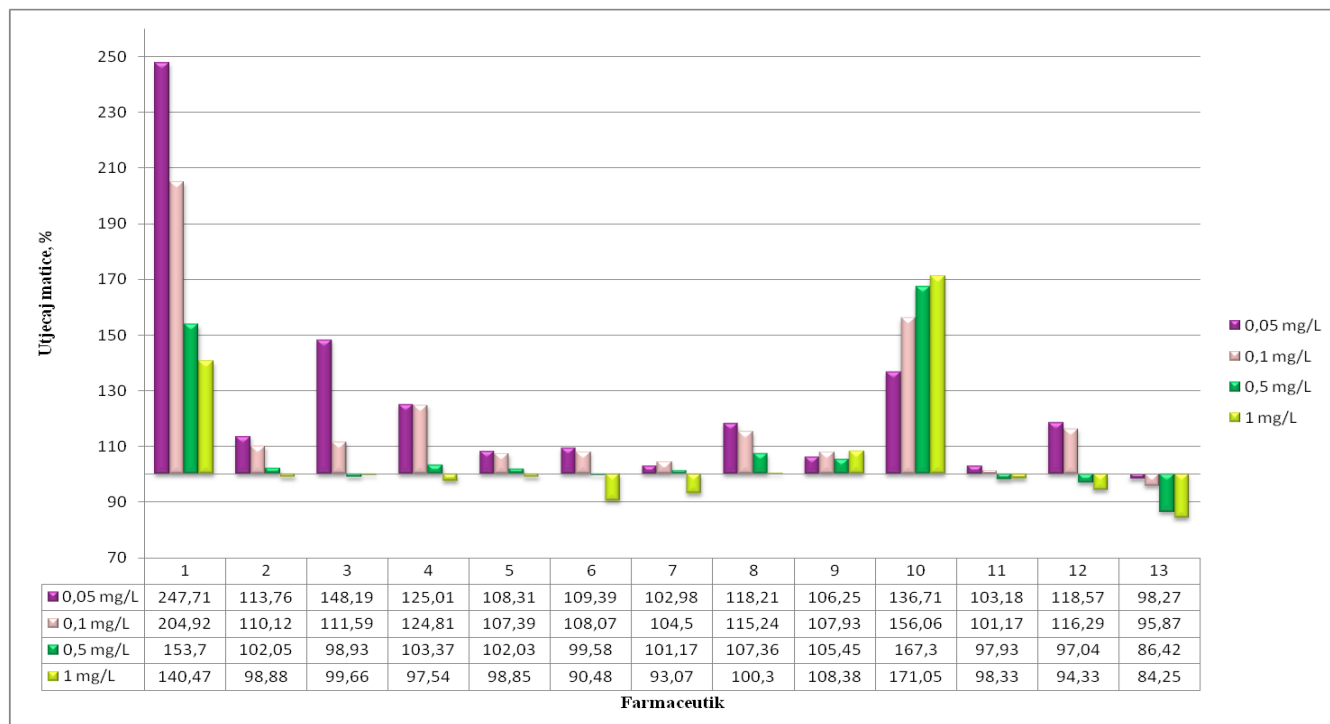
Farmaceutik	Ponovljivost	Obnovljivost
	RSO, %	RSO, %
AZITROMICIN	5,42	10,69
TIAMULIN	2,09	3,64
IMATINIB	5,75	9,79
FEBANTEL	3,49	4,60
TORASEMID	2,49	5,64
OMEPRAZOL	4,43	10,12
LINEZOLID	1,87	7,45
PRAZIKVANTEL	4,22	5,23
ETODOLAC	3,50	3,98
SULFAMETAZIN	2,66	4,71
SULFAFURAZOL	3,66	10,07
ALBENDAZOL	9,56	10,22
LEVAMISOL	3,58	5,07

4.3. UTJECAJ MATICE

Jedan od većih nedostataka ionizacije uzorka elektroraspršenjem (ESI-MS) je osjetljivost izvora ionizacije na druge spojeve u matrici uzorka što dovodi do značajnih razlika u odzivu signala standarda i uzorka. Utjecaj matrice rezultira u supresiji ili povećanju signala. Glavni izvor supresije signala su prisutnost organskih i anorganskih molekuli koje se nalaze u uzorku ili u konačnom ekstraktu. Prevelik utjecaj matrice uzorka uzrokuje nemogućnost detektiranja

prisutnog analita ili krivu procjenu njegove koncentracije koja kod supresije (smanjenja) iona dovodi do pojave lažno negativnog signala, a kod povećanja do lažno pozitivnog rezultata što u konačnici utječe na točnost i preciznost metode [54].

Kako bi se ocijenio utjecaj matice na kvantifikaciju korištenih farmaceutika, uspoređivali su se signali analita iz vode sa signalima analita iz otapala za četiri standardne otopine smjese trinaest farmaceutika koncentracija 0,05, 0,1, 0,5 i 1 mg/L. Rezultati su prikazani na Slici 4.6.



Slika 4.6. Grafički prikaz utjecaja matice

(1-azitromicin, 2-tiamulin, 3-imatinib, 4-febantel, 5-torasemid, 6-omeprazol, 7-linezolid, 8-prazikvantel, 9-etodolac, 10-sulfametazin, 11-sulfafurazol, 12-albendazol, 13-levamisol)

Iz grafičkog prikaza vidljivo je da se utjecaj matice smanjuje povećanjem koncentracije za sve ispitivane farmaceutike, osim za sulfametazin kod kojeg vrijedi obrnuto. Utjecaj matice je u potpunosti zanemariv kod tiamulina, torasemida, omeprazola, linezolida, etodolca i sulfafurazola jer se njihova iskorištenja nalaze u intervalu 100 ± 10 %. Imatinib, febantel, prazikvantel, albendazol te levamisol ne pokazuju značajan utjecaj matice, ali samo pri dvjema višim koncentracijama (koncentracija standardne otopine 0,5 i 1 mg/L, odnosno koncentracija farmaceutika u uzorku vode 5 i 10 $\mu\text{g/L}$). Matica ima najveći učinak na azitromicin i sulfametazin pri čemu dolazi do povećanja signala. Kod levamisola dolazi do supresije signala (84,25 i 86,42 %).

4.4. ANALIZA REALNIH UZORAKA

Prethodno optimirana i validirana metoda primijenjena je za otkrivanje ispitivanih farmaceutika u pet uzoraka otpadnih voda (OV) iz farmaceutske industrije. Realni uzorci analizirani su na opisan način bez standardnog dodatka u jednoj seriji te s dodatkom standardne otopine smjese farmaceutika koncentracije 0,05 mg/L i 0,1 mg/L. Dobivene koncentracije za pojedini farmaceutik uspoređene su sa vrijednostima GD i GK određene validacijom (Tablica 4.9.).

Tablica 4.9. Koncentracija ispitivanih farmaceutika u uzorcima otpadnih voda

	Koncentracija farmaceutika u realnom uzorku vode						
Farmaceutik	GD, µg/L	GK, µg/L	OV1	OV2	OV3	OV4	OV5
Azitromicin	0,05	0,1	< GD	0,15	0,22	n.d.	n.d.
Tiamulin	0,01	0,025	n.d.	n.d.	0,28	n.d.	n.d.
Imatinib	0,1	0,5	n.d.	0,56	n.d.	43,57	5,26
Febantel	0,0025	0,005	0,013	n.d.	0,49	n.d.	n.d.
Torasemid	0,01	0,025	n.d.	0,05	n.d.	428,57	n.d.
Omeprazol	0,01	0,025	< GD	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Linezolid	0,1	0,5	< GD	n.d.	n.d.	2,09	n.d.
Prazikvantel	0,001	0,0025	n.d.	n.d.	0,5	n.d.	n.d.
Etodolac	0,025	0,05	0,18	n.d.	n.d.	171,82	n.d.
Sulfametazin	0,0025	0,005	0,11	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Sulfafurazol	0,1	0,5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Albendazol	0,025	0,05	0,11	n.d.	0,42	n.d.	n.d.
Levamisol	0,01	0,025	n.d.	n.d.	0,089	9,01	1,38

(n.d.-nije detektiran)

Rezultati prikazani u Tablici 4.9. pokazuju da nijedan farmaceutik nije prisutan u svih pet uzoraka otpadnih voda. Sulfafurazol nije detektiran niti u jednom realnom uzorku. Koncentracije omeprazola također su izrazito nisko pa se nalaze za uzorak OV1 ispod GD, a za preostala četiri realna uzorka nisu niti detektirane. Najviše ispitivanih farmaceutika, točnije njih šest kvantificirano je u otpadnoj vodi OV3 čije se koncentracije nalaze u rasponu od 0,089 do 0,49 µg/L. Imatinib i levamisol su jedini farmaceutici prisutni u tri realna uzorka vode. Imatinib je kvantificiran u uzorcima OV2, OV4 i OV5 u rasponu koncentracija 0,53-43,57 µg/L, a levamisol u OV3, OV4 i OV5 koncentracija unutar intervala 0,089-9,01 µg/L.

Najveća koncentracija farmaceutika kvantificirana je u otpadnoj vodi OV4 za torasemid te iznosi 428,57 $\mu\text{g/L}$. Za uzorke otpadnih voda OV1, OV2 te OV4 kvantificirana su redom četiri, tri i pet farmaceutika dok je za uzorak OV5 detektirano najmanje analita, odnosno kvantificirani su samo imatinib i levamisol.

Koncentracije farmaceutika u uzorcima analiziranih proizvodnih otpadnih voda variraju ovisno o trenutačnoj proizvodnji farmaceutskih pripravaka s obzirom da se stvaraju kao posljedica pranja proizvodnih pogona. Vode iz nekoliko proizvodnih pogona se međusobno miješaju u zajedničkom bazenu. Posljedica toga je da su neki farmaceutici prisutni u većem broju uzoraka otpadnih voda.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu razvijena je nova metoda za paralelno određivanje trinaest farmaceutika različitih fizikalno-kemijskih svojstava u uzorcima vode. Farmaceutici su izolirani iz uzorka vode pomoću ekstrakcije čvrstom fazom te analizirani i kvantificirani UHPLC-MS metodom. Radi što bolje učinkovitosti ekstrakcije, odabrani su sljedeći optimalni uvjeti pri kojima su dobivena najbolja iskorištenja uz najmanja relativna odstupanja i utjecaje matice: Oasis HLB kolonica pri pH 5, metanol kao otapalo za eluiranje, 2 mL volumena otapala za eluiranje te 100 mL volumena uzorka vode.

Vrijednosti regresijskog koeficijenta, R^2 veće su od 0,9923 što potvrđuje linearnost ove metode. Granice detekcije za ispitivane farmaceutike nalaze se između 0,001 i 0,1 $\mu\text{g/L}$ dok su granice kvantifikacije u rasponu od 0,0025 do 0,5 $\mu\text{g/L}$. Preciznost metode koja se iskazala kao ponovljivost i obnovljivost je prihvatljiva. Najmanje relativno standardno odstupanje za ponovljivost ima linezolid i iznosi 1,87 %, a za obnovljivost tiamulin (3,64 %). Za ponovljivost su dobivena relativna standardna odstupanja između 1,87 i 9,56 %, a za obnovljivost se nalaze u rasponu 3,64-10,69 %. Učinkovitost ekstrakcije je približno jednaka kod sva tri koncentracijska nivoa za etodolac, febantel, imatinib, linezolid, levamisol te sulfametazin dok ima i onih farmaceutika kod kojih to nije slučaj kao npr. za azitromicin, albendazol, omeprazol, prazikvantel, sulfafurazol, tiamulin i torasemid.

Uz validacijske značajke ispitan je i utjecaj matice. Prisutan je trend smanjenja utjecaja matice povećanjem koncentracije kod svih ispitivanih farmaceutika. Iznimka je sulfametazin kod kojeg vrijedi obratno. Utjecaj matice je zanemariv kod etodolca, linezolida, omeprazola, sulfafurazola, tiamulina i torasemida jer su njihova iskorištenja unutar intervala 90-110 %. Najveći učinak matice prisutan je kod azitromicina i sulfametazina koji se očituje u povećanju signala, dok kod levamisola dolazi do supresije, tj. smanjenja (< 90 %).

Optimirana i validirana SPE-UHPLC-MS metoda uspješno je primijenjena za analizu pet uzoraka otpadnih voda prikupljenih iz farmaceutske industrije. Nijedan farmaceutik nije kvantificiran u svim realnim uzorcima vode. Najviše ih je kvantificirano u uzorku otpadne vode OV3, a najmanje u uzorku OV5. Najveća vrijednost koncentracije farmaceutika kvantificirana je u realnom uzorku OV4 za torasemid te iznosi 428,57 $\mu\text{g/L}$. Također, u spomenutom uzorku vode postižu se općenito najviše koncentracije ispitivanih farmaceutika unatoč tome što ih je kvantificirano manje (pet) nego u otpadnoj vodi OV3.

Može se zaključiti da je razvijena metoda jednostavan, pristupačan i učinkovit alat kojeg je moguće primjenjivati za detekciju i kvantifikaciju ispitivanih farmaceutika iz realnih uzoraka

vode. Ipak, radi postizanja što boljih iskorištenja i selektivnosti metode potrebno je i dalje ispitivati utjecaje složenih matica uzoraka koji sprječavaju točno i precizno određivanje prisutnih analita.

6. LITERATURA

- [1] D. Mutavdžić Pavlović, T. Pinušić, M. Periša, S. Babić, Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments, *Journal of Chromatography A*, **1258** (2012) 1–15.
- [2] W. Lertpaitoonpan, Sorption, degradation, and transport of sulfamethazine in soils and manure-amended soils, disertacija, Iowa State University, Ames, Iowa, 2008.
- [3] K. Kummerer: Pharmaceuticals in the Environment, *Annual Review of Environment and Resources*, **35** (2010) 57-75.
- [4] Sve o antibioticima
<https://www.farmacia.hr/farmacia-savjetuje/clanci/57/sve-o-antibioticima/> (ožujak 2017.)
- [5] Antibiotici
<https://www.romanadekic.com/antibiotici.php> (ožujak 2017.)
- [6] S. Uzunović Kamberović, *Medicinska mikrobiologija*, Štamparija Fojnica d.o.o, Zenica 2009., str. 237-240.
- [7] <https://www.drugbank.ca/> (ožujak 2017.)
- [8] R. Kulkarni, M. S. Hanagadakar, H. S. Biswal, S. T Nandibewoor, R. S Malladi, M. S Gudaganatti, Transformation of linezolid during water treatment with chlorine-A kinetic study, *Indian Journal of Chemical Technology*, **21** (2014) 38-43.
- [9] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (ožujak 2017.)
- [10] IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans, IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans, Some Thyrotropic Agents, International Agency for Research on Cancer; Lyon, **79** (2001), str. 344.
- [11] D. Krasucka, A. Mitura, W. Cybulski, K. Kos, W. Pietro, Tiamulin hydrogen fumarate-veterinary uses and HPLC method of determination in premixes and medicated feeding stuffs, *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, **67** (6) (2010) 682-685.
- [12] K. M. S. Islam, U. Klein, D. G. S. Burch, The activity and compatibility of the antibiotic tiamulin with other drugs in poultry medicine-A review, *Poultry Science* **88** (2009) 2353-2359.
- [13] <https://en.wikipedia.org/wiki/Anthelmintic> (ožujak 2017.)
- [14] D. Sriram, P. Yogeewari, *Medicinal Chemistry*, Second Edition, Paerson, 2010., str. 546.
- [15] M. Bahmani, M. Rafieian-Kopaei, H. Hassanzadazar, K. Saki, S. A. Karamati, B. Delfan, A review on most important herbal and synthetic antihelmintic drugs, *Asian Pac J Trop Med* **7** (1) (2014) 29-33.
- [16] <http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm> (ožujak 2017.)
- [17] <http://www.agrovetmarket.com/Files/fad0f5be-eacf-47e2-962e-f7ba855a5e73.pdf> (ožujak 2017.)

- [18] <http://www.genera.hr/pro/en/1617/#.WN0VwFXyjDc> (ožujak 2017.)
- [19] <http://www.chemicaland21.com/lifescience/phar/LEVAMISOLE%20HYDROCHLORIDE.htm> (ožujak 2017.)
- [20] <http://www.hmdb.ca/metabolites/HMDB14887> (travanj 2017.)
- [21] C. Avendano, J. C. Menendez, Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs, 2nd Edition, Elsevier Science, 2015., str. 8.
- [22] <http://www.almp.hr/upl/lijekovi/PIL/UP-I-530-09-04-02-98.pdf> (ožujak 2017.)
- [23] <https://www.zdravstvo.com/lijeci/> (ožujak 2017.)
- [24] S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, pregledni članak, Hrvatske vode, **24** (96) (2016) 119-136.
- [25] grupa autora, Analitika okoliša, ur. M. Kaštelan-Macan i M. Petrović, HINUS i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013., str. 140, 142, 144-148, 155-156, 206-209, 212-213.
- [26] I. Bak, Modern analytical techniques in the pharmaceutical and bioanalysis, Faculty of Pharmacy, Debrecen, 2011., str. 23, 25-29, 41-42, 58.
- [27] S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2011., str. 222.
- [28] F. Settle, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997. str. 147-152, 650.
- [29] M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, A. Hafeez, Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC)-A Review, Austin J Anal Pharm Chem., **2** (6) (2015) 1056.
- [30] K. Lazarić, Validacija analitičkih metoda-osnovna načela, Laboratoriji, 2012., str. 61-62.
- [31] R. Marinčić, A. Barišić, Sadržaj teških metala, goriva i maziva, **47** (5) (2008) 398-413.
- [32] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 74-75.
- [33] J. N. Sangshetti, M. Deshpande, Z. Zaheer, D. B. Shinde, R. Arote, Quality by design approach: Regulatory need, Review, Arabian Journal of Chemistry, **10** (2017) 3412-3425.
- [34] ICH Expert Working Group, ICH Harmonized Tripartite Guideline, Pharmaceutical Development Q8 (R2), The International Conference on the Harmonization of Technical Requirements for the Registration of Pharmaceuticals for Human Use, 2009.
- [35] B. Jayagopal, M. Shivashankar, Analytical Quality by Design-A Legitimate Paradigm for Pharmaceutical Analytical Method Development and Validation, Mechanics, Materials Science and Engineering, **9** (2017), ISSN 2412-5954.
- [36] J. Terzić, I. Popović, B. Jančić-Stojanović, Aspekti primene DryLab softvera u optimizaciji i proceni robusnosti hromatografskih metoda, Arh.farm. **64** (2014) 205-219.

- [37] <http://molnar-institute.com/drylab/#drylab> (svibanj 2017.)
- [38] <https://www.sigmaaldrich.com/canada-english.html> (ožujak, travanj 2017.)
- [39] http://halmed.hr//upl/lijekovi/SPC/UP-I-530-09-13-01-62_.pdf (ožujak 2017.)
- [40] <https://aidsinfo.nih.gov/drugs/104/azithromycin/51/professional> (ožujak 2017.)
- [41] http://library.njucm.edu.cn/yaodian/ep/EP5.0/16_monographs/monographs_q-z/Tiamulin%20hydrogen%20fumarate%20for%20veterinary%20use.pdf (ožujak 2017.)
- [42] <http://c.ymcdn.com/sites/www.aavpt.org/resource/resmgr/imported/sulfonamides.pdf> (ožujak 2017.)
- [43] http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2009/020666s005s006lbl.pdf (ožujak 2017.)
- [44] H. Jung, L. Medinat, L. Garcia, I. Fuentes, R. Moreno-Esparza, Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and Its Metabolite Albendazole Sulphoxide, *J. Pharm. Pharmacol.*, **50** (1998) 43-48.
- [45] http://www.fao.org/fileadmin/user_upload/vetdrug/docs/41-4-febantel.pdf (ožujak 2017.)
- [46] <https://media.cellsignal.com/pdf/9084.pdf> (ožujak 2017.)
- [47] <http://www.drugfuture.com/chemdata/imatinib.htm> (ožujak 2017.)
- [48] <https://www.drugs.com/> (ožujak 2017.)
- [49] http://www.mt.com/gb/en/home/phased_out_products/Laboratory_Weighing_Solutions/Analytical/AB-S/AB104-S.html (svibanj 2017.)
- [50] http://www.mt.com/us/en/home/phased_out_products/PhaseOut_Ana/S20_pH_US.html (svibanj 2017.)
- [51] S. Babić, D. Ašperger, D. Mutavdžić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Solid phase extraction and HPLC determination of veterinary pharmaceuticals in wastewater, *Talanta* **70** (2006) 732–738.
- [52] D. Mutavdžić Pavlović, S. Babić, D. Dolar, K. Košutić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC diode array detection, *Research Article, J. Sep. Sci.*, **33** (2010) 258–267.
- [53] N. J. K. Simpson, *Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 2000., str.117.
- [54] S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, M. Periša, M. Zrnčić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS), *Anal Bioanal Chem* **398** (2010) 1185–1194.

7. ŽIVOTOPIS

Kristina Tolić [REDACTED] Godine 2008. završava Osnovnu školu Augusta Šenoae i upisuje Gimnaziju Tituša Brezovačkog u Zagrebu. Upisuje Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, studij Primijenjena kemija 2012. godine. 2015. godine upisuje diplomski studij na istoimenom fakultetu, studij Primijenjena kemija, modul Primijenjena organska kemija. Sudjelovala je na 14. Festivalu znanosti u Tehničkom muzeju 2016. godine te na Danima otvorenih vrata Zavoda za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u veljači 2016. i 2017. Dobitnica je Dekanove nagrade za zapažen znanstveni rad 2016. godine. Od stranih jezika koristi se engleskim govorno i pismeno te osnovama talijanskog jezika. U računalnom radu koristi Microsoft Excel, Word, PowerPoint te je upoznata s osnovama programa Matlab i Visual Minteq.