

Razumijevanje međudnosa UV filtri - farmaceutski aktivne tvari tijekom fotolitičkih procesa

Čižmek, Ana-Marija

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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:358724>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-23**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Ana-Marija Čižmek

Razumijevanje međuodnosa UV filtri - farmaceutski aktivne tvari
tijekom fotolitičkih procesa

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Marko Rožman

Zagreb, rujan 2017.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Laboratoriju za spektrometriju masa Instituta Ruđer Bošković uz financijsku potporu Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 „Sudbina farmaceutika u okolišu i tijekom naprednih postupaka obrade vode“



Iskrene zahvale mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić koja je imala najveći utjecaj na moj razvoj tijekom cjelokupnog studiranja. Hvala Vam na razumijevanju i stalnoj podršci koju ste mi pružili. Hvala Vam na iznimnoj časti koju ste mi pružili omogućivši izradu ovog rada pod svojim vodstvom. Zahvaljujem se tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić na ustupljenim kemikalijama i priboru te na ugodnoj atmosferi koju neprestano stvaraju u laboratoriju. Htjela bih se zahvaliti dr. sc. Marku Rožmanu na suradnji, pomoći i razumijevanju tijekom izrade ovog rada.

Želim se zahvaliti svojoj obitelji, posebno roditeljima koji su me tijekom dosadašnjeg školovanja podupirali i poticali moju težnju k ostvarivanju sve viših ciljeva. Zahvaljujem im se na strpljenju, moralnoj podršci i najbitnije na ukazanom povjerenju tijekom studiranja. Hvala Vam za sve što ste me naučili i što sam vašim usmjerenjima postala osoba kakva danas jesam. Zasluge pripisujem i mojoj baki i djedu koji su uljepšali cijeli tijek mog školovanja i svojim savjetima doprinijeli mojem razvoju.

Želim se zahvaliti svojoj sestri Zrinki na svim savjetima, na svemu što me naučila i što nikada nije sumnjala u mene. Hvala na svakom razgovoru, lijepoj riječi i osmjehu koji su mi neizmjerljivo značili i u teškim i u sretnim trenucima. Ti si Sunce koje obasjava moj život i neprestano čini moj život sretnijim.

Na kraju, posebno se zahvaljujem Ivanu Pavleku, mojoj srodnoj duši, koji me uvijek stoički ohrabrivao, uvijek vjerno i bez imalo sumnje u mene, pružao mi samopouzdanje koje sam, nekada, putem izgubila. Veliko hvala na ljubavi, podršci i bezuvjetnoj vjeri u moj uspjeh. Tvoja hrabrost učinila me hrabrijom, tvoja snaga učinila me jačom i tvoja ljubav učinila me boljom osobom. Hvala što si mi pomogao da sanjam veliko, da dosegnem veliko, da ne pristajem na manje i da ostavim sve svoje snove.

Ovaj rad posvećujem svojoj obitelji, Damiru i Mirjani Čižmek, koji su mi beskompromisno omogućili sve što sam poželjela i uvijek bili najveći uzori izvrsnosti u životu.

SAŽETAK

Farmaceutici i UV-filtri sastavni su dio smjese onečišćivača u slatkovodnim sustavima. Zahvaljujući fotostabilnosti i apsorpcijskim svojstvima UV-filtri mogu inhibirati utjecaj UV-zračenja te na taj način potencijalno utjecati na fotolitičku razgradnju farmaceutika. U ovom radu ispitana je fotolitička razgradnja farmaceutika iz sedam skupina antibiotika: enrofloksacin, eritromicin, trimetoprim, oksitetraciklin, sulfametoksazol, vankomicin i amoksicilin. Fotolitička razgradnja pod utjecajem umjetnog Sunčevog zračenja praćena je u tri vodene matrice (ultračista, izvorska te sintetska otpadna voda, s ili bez prisutnosti UV-filtara. Rezultati ukazuju da fotolitička razgradnja predstavlja važan proces razgradnje amoksicilina, enrofloksacina, eritromicina, oksitetraciklina, sulfametoksazola i vankomicina, dok trimetoprim nije podložan fotolitičkoj razgradnji. Opažen je statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotorazgradnje većine proučavanih antibiotika. Utvrđeno je da prisutnost UV-filtara smanjuje brzinu ili zaustavlja fotolitičku razgradnju proučavanih antibiotika u odnosu na otopine u koje nisu dodani filtri. Navedeno ukazuje na međuodnose unutar smjese onečišćivača koji mijenjaju sudbinu istih, te produžuju vrijeme njihovog zadržavanja u okolišu.

Ključne riječi: farmaceutici, antibiotici, UV-filtri, fotolitička razgradnja, UV zračenje

SUMMARY

Pharmaceuticals and UV-filters are ubiquitous members of pollutant mixture in environmental waters. Due to photostability and absorption properties, UV-filters can inhibit the impact of UV irradiation thus potentially affecting photolytic degradation of pharmaceuticals. In this work the photolytic degradation of pharmaceuticals from seven groups of antibiotics (enrofloxacin, erythromycin, trimethoprim, oxytetracycline, sulfamethoxazole, vancomycin and amoxicillin) was investigated. The photolysis of these antibiotics as well as their interactions with UV filters under artificial solar light was studied within three aqueous matrices (ultra-pure, spring and synthetic wastewater). The results indicate photolytic degradation as an important degradation process for amoxicillin, enrofloxacin, erythromycin, oxytetracycline, sulfamethoxazole and vancomycin while trimethoprim was not susceptible to photodegradation. A statistically significant effect of the matrix on the photodegradation rate of the antibiotics was observed. Furthermore, it was found that the presence of UV filters can reduce or even stop the photolysis rate. Thus, the environmental fate of particular contaminant can be influenced by the presence of other chemicals from the mixture i.e. contaminants may persist longer in the environment.

Key words: pharmaceuticals, antibiotics, UV-filters, photolytic degradation, UV irradiation

Sadržaj:

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. FARMACEUTICI	2
2.2. ANTIBIOTICI	3
2.2.1. Sulfonamidi i trimetoprim	4
2.2.2. Makrolidi	5
2.2.3. Tetraciklini	6
2.2.4. Fluorokinoloni	7
2.2.5. β -laktami	8
2.2.6. Glikopeptidni antibiotici	9
2.3. METABOLIZAM FARMACEUTIKA	10
2.4. FARMACEUTICI U OKOLIŠU	11
2.4.1. Sudbina farmaceutika u okolišu	13
2.5. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA FARMACEUTIKA	14
2.6. KINETIKA FOTOLITIČKE RAZGRADNJE	17
2.7. UV-FILTRI	18
2.7.1. Benzofenoni	20
2.7.2. Cinamati	21
2.8. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA	22
2.8.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	23
2.8.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti	28
2.9. SPEKTROMETRIJA MASA	31
2.9.1. Ionski izvori	32
2.9.1.1. Ionizacija elektroraspršenjem	32
2.9.2. Analizatori masa	34
3. EKSPERIMENTALNI DIO	37

3.1. MATERIJALI.....	37
3.1.1. Kemikalije.....	37
3.1.2. Farmaceutici.....	37
3.1.3. UV–filtri.....	39
3.1.4. Uzorci vode.....	39
3.2. INSTRUMENTI.....	40
3.2.1. Analitička vaga.....	40
3.2.2. pH–metar.....	41
3.3.3. Spektrofotometar.....	42
3.3.4. Uređaj za filtraciju.....	42
3.3.5. "Milipore" sustav.....	43
3.3.6. Suntest CPS+.....	43
3.3.7. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa.....	44
3.2. METODA RADA.....	45
3.2.1. Priprema standardnih otopina.....	45
3.2.2. Fotolitička razgradnja farmaceutika.....	46
3.2.2.1. Priprava otopina za fotolitičku razgradnju.....	46
3.2.2.2. Osvjetljivanje otopina umjetnim Sunčevim zračenjem.....	47
3.2.3. Analiza spregnutim sustavom tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti - spektrometar masa (UHPLC-MS).....	47
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	50
4.1. OPTIMIZACIJA KROMATOGRFSKIH UVJETA.....	51
4.2. OPTIMIZACIJA UVJETA RADA NA SPEKTROMETRU MASA.....	53
4.3. VALIDACIJA.....	54
4.3.1. Linearnost.....	54
4.3.2. Granice kvantifikacije.....	55
4.4. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA.....	56

4.4.1. Amoksicilin.....	60
4.4.2. Enrofloksacin	62
4.4.3. Eritromicin	65
4.4.4. Oksitetraciklin.....	66
4.4.5. Sulfametoksazol.....	68
4.4.6. Trimetoprim	70
4.4.7. Vankomicin.....	71
5. ZAKLJUČAK.....	73
6. LITERATURA	73
7. PRILOZI.....	84
8. ŽIVOTOPIS.....	105

1. UVOD

Proizvodi farmaceutske industrije prisutni su svugdje i koriste se u svakodnevnom životu. Nakon primjene, farmaceutik se izlučuje iz tijela kao osnovna molekula ili smjesa osnovne molekule i metabolita te kao takav dolazi u okoliš. Farmaceutici se kontinuirano unose u okoliš direktnim ispuštanjem, ispuštanjem obrađenih ili neobrađenih komunalnih i industrijskih otpadnih voda te odlaganjem neiskorištenih farmaceutskih proizvoda.

Farmaceutski aktivni spojevi nazivno nisu postojani u okolišu jer se razgrađuju putem raznih biotičkih i abiotičkih procesa. Međutim, svakodnevna upotreba (često i nekontrolirana) te njihova fizikalno-kemijska svojstva (prolaze kroz postrojenja za obradu otpadnih voda) razlog su konstantne koncentracije farmaceutika u okolišu te ih smatramo „pseudo-postojanima“. Zbog „do sada“ nepoznatog utjecaja na okoliš, farmaceutici se svrstavaju u skupinu „novih zagađivala“ za koje, do danas, nije zakonom propisana maksimalno dopuštena granica koncentracije u okolišu [1-3].

Posljednjih nekoliko desetljeća povećala se svijest o negativnom djelovanju UV–zračenja, što je rezultiralo povećanoj proizvodnji i upotrebi UV–filtara. UV–filtri su ključni sastojci krema za sunčanje i drugih proizvoda za osobnu njegu budući da apsorbiraju, reflektiraju i/ili raspršuju UV–zračenje. Detektirani su u kanalizacijskim vodama, mulju, sedimentima te su jedan od sastojaka smjese onečišćivača u vodenim sustavima. Zahvaljujući fotostabilnosti i apsorpcijskim svojstvima UV–filtri mogu inhibirati utjecaj UV–zračenja u otpadnim vodama, te samim time utjecati na fotolitičku razgradnju značajanog dijela smjese onečišćivača kojima je fotorazgradnja jedan od putova abiotičke razgradnje [1–7, 8-10].

Cilj ovog rada je istražiti fotolitičku razgradnju sedam antibiotika u uvjetima relevantim za okoliš, u tri različite matrice (ultračista voda, sintetska otpadna voda te izvorska voda) pod utjecajem umjetnog Sunčevog zračenja. Također, budući da postoji malo podataka o utjecaju UV-filtara na fotolitičku razgradnju antibiotika, ispitan je njihov utjecaj na izabrane analite. Nadalje, određena je kinetika fotolitičke razgradnje antibiotika u svim ispitivanim matricama sa i bez dodatka UV–filtara.

2. OPĆI DIO

2.1. FARMACEUTICI

Farmaceutici su spojevi koji se sastoje od jednog ili više aktivnih farmaceutskih sastojaka, pomoćnih tvari, aditiva, kao i anorganskih soli ili drugih organskih kemikalija (šećeri, mirisi, bojila). To su složene organske molekule koje predstavljaju veliku grupu spojeva dizajniranih za liječenje i sprječavanje bolesti kod ljudi i životinja [1]. Farmaceutici, kao proizvodi koji se ponajviše koriste radi svoje biološke aktivnosti, razlikuju se prema molekularnoj masi, području djelovanja, funkcionalnim skupinama i kemijskoj strukturi. Farmakološki su aktivni, mogu biti otporni na razgradnju i imati dugi vijek trajanja u vodenom okolišu [2, 11]. Prema kemijskim svojstvima, načinu primjene te prema terapijskom učinku, farmaceutici se mogu podijeliti na [12, 13]: analgetike i protuupalne lijekove, antihistaminike, diuretike, antidepressive, antibiotike, antiepileptike, regulatore masnoća u krvi, regulatore tlaka, hormone, steroide, antitumorske lijekove te β -blokatore [1-7, 11-15].

Proizvodi farmaceutičke industrije prisutni su svugdje i koriste se u svakodnevnom životu. Do nedavno, smatralo se da nisu štetni i nije im pridodan veliki značaj, ali njihova primjena, kao i sama prekomjerna proizvodnja, može izazvati zagađenje i onečišćenje okoliša, a samim time i ozbiljne zdravstvene posljedice. Stoga se, danas, farmaceutici ubrajaju u „nova zagađivala“. Taj pojam obuhvaća sve proizvode i spojeve koji su do sada bili zanemarivani kao zagađivala, a koji se u sve većim količinama ispuštaju u okoliš, čije djelovanje može dovesti do ozbiljnog narušavanja hranidbenog lanca i ekosustava. Važno je naglasiti da ponašanje farmaceutika nije u potpunosti istraženo. Zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš nije propisana, iako se u Europskoj uniji koristi oko 3000 različitih farmaceutski aktivnih spojeva. Daljnji porast njihove potrošnje očekuje se zbog širenja tržišta, dužeg životnog vijeka čovječanstva, povećanja proizvodnje i sve češćeg korištenja nepropisanih farmaceutika. Osim niske koncentracije, karakterizira ih ionska priroda i topljivost u vodi. Farmaceutski aktivne tvari imaju široku primjenu u ljudskoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, biotehnologiji te kozmetici.

U ovaj rad uključeni su farmaceutici iz sedam skupina antibiotika (enrofloksacin, eritromicin, trimetoprim, oksitetraciklin, sulfametoksazol, vankomicin i amoksicilin).

2.2. ANTIBIOTICI

Antibiotici su antimikrobni lijekovi koji se primjenjuju za liječenje bakterijskih zaraznih bolesti te se klasificiraju na temelju svoje jačine. Baktericidni antibiotici u potpunosti uništavaju bakterije, dok bakteriostatski antibiotici samo zaustavljaju rast bakterija i njihovo razmnožavanje [4, 16, 17]. Osim prirodnih (mikrobna biosinteza), postoje sintetski i polusintetski antibiotici (kemijski spojevi nastali kemijskom modifikacijom prirodnih antibiotika), koji se mogu podijeliti prema mehanizmu, spektru djelovanja i prema strukturi na: β -laktame, kinolone, tetracikline, makrolide, sulfonamide, glikopeptide, aminoglikozide, cefalosporine, peniciline te ostali antibiotici [13, 18]. U Europi, dvije trećine svih antibiotika koristi se u ljudskoj medicini, a jedna trećina u veterinarske svrhe [6, 19]. Djeluju na strukturu i rast bakterije što dovodi do inhibicije rasta i stanične diobe ili do njene smrti. Postoji nekoliko osnovnih mehanizama kojima antibiotici utječu na procese u stanicama mikroorganizama [13, 16, 17] :

- inhibicija sinteze staničnog zida bakterije (*npr. penicilini*)
- inhibicija sinteze proteina (*antibiotici širokog spektra djelovanja npr. tetraciklini i makrolidi*)
- inhibicija sinteze nukleinskih kiselina (*antitumorski antibiotici npr. sulfonamidi i kinoloni*).

Kontinuiranom upotrebom antibiotika dolazi do stvaranje otpornosti (rezistencije) mikroorganizama na postojeće antibiotike čime se ograničava mogućnost njihove primjene u liječenju zaraznih bolesti kod čovjeka i infekcija kod životinja [13, 20]. Mehanizam rezistencije različitih bakterija ovisi o strukturi antibiotika, njegovom ciljnom mjestu djelovanja i genetičkim promjenama unutar bakterijske stanice [20, 21]. Smatra se da je najviše rezistentnosti stvoreno prema penicilinima, posebice ampicilinu, zatim tetraciklinima i makrolidima kao što je eritromicin [7]. Sve veći naponi ulažu se u stvaranje novih antibiotika, ali se do njih vrlo teško dolazi budući da su mogućnosti djelovanja na bakterijsku stanicu već uvelike iskorištene. Da bi se stvorio novi antibiotik, potrebno je 10 do 15 godina proučavanja i oko 802 milijuna dolara [13, 17, 22]! Na globalnoj razini koristi se oko 100 000 – 200 000 tona antibiotika godišnje. Prekomjerna upotreba antibiotika povećala je broj istraživanja o njihovom utjecaju na okoliš te se smatraju najvećom prijetnjom za kvalitetu vodenog okoliša jer nisu biorazgradivi [7, 23].

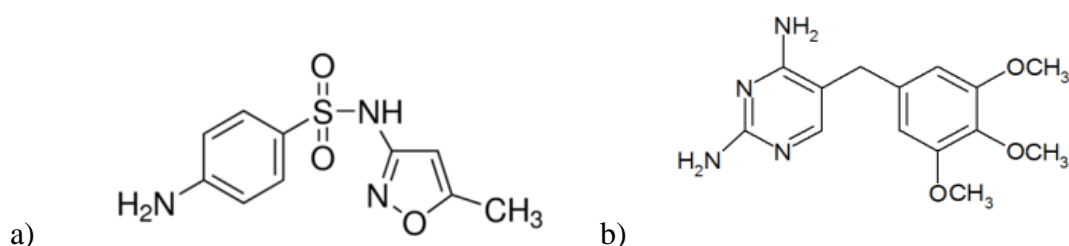
Zabrinutost oko antibiotika raste zbog njihovog neprestanog ispuštanja u okoliš. Dosadašnja istraživanja pokazala su prisutnost antibiotika u površinskim vodama, tlu, sedimentu i u vodovodnoj vodi, čak i nakon obrade. Najčešće detektirani antibiotici u prirodi su fluorokinoloni, sulfonamidi, makrolidi (eritromicin) i tetraciklini. Iako su u okolišu detektirani u niskim koncentracijama, ne znači da ne predstavljaju značajan rizik [24]. Osim pojave rezistentosti, drugi problem koji može uzrokovati prisutstvo antibiotika u vodi jesu kemijske reakcije antibiotika sa sredstvima za obradu voda, najčešće s klorom koji se dodaje otpadnoj ili pitkoj vodi kako bi se uklonile štetne tvari. Zbog reakcija s klorom, antibiotici se u vodi pregrađuju u spojeve koji mogu biti čak toksičniji od početnog farmaceutskog spoja [23]. Utjecaji nekih humanih i veterinarskih antibiotika na okoliš prikazani su u **tablici P.1**. Također, zabrinutost raste zbog mogućeg dugoročnog utjecaja na zdravlje ljudi te kopnene i vodene ekosustave uslijed trajne izloženosti ovim spojevima [7]. Koncentracija antibiotika ovisi o intenzitetu primjene. Na ponašanje antibiotika u okolišu utječu njihova fizikalna i kemijska svojstva (molekulski oblik, topljivost, veličina, hidrofobnost), ali i svojstva okoliša (pH, temperatura, intenzitet Sunčevog zračenja) [16].

Do sada su definirane dopuštene koncentracije antibiotika u hrani, ali još uvijek ne postoji regulativa za dopuštene koncentracije u okolišu. Međutim, dosadašnja istraživanja rezultirala su uvođenjem 3 farmaceutika (nesteroidnog protuupalnog lijeka diklofenaka, prirodnog hormona 17β -estradiola i sintetskog hormona 17α -etinilestradiola) na tzv. „*watch*“ listu EU direktive 2013/39/EU, tj. uvršteni su među spojeve koji će se pratiti na reprezentativnim monitoring postajama svake države članice kako bi se odredio njihov utjecaj na ekosustave i zdravlje ljudi. „*Watch*“ lista uspostavljena 2013. godine EU direktivnom 39/2013/EU proširena je donošenjem nove direktive 2015/495/EU uvođenjem novih spojeva, među ostalima makrolidnih antibiotika (azitromicina, klaritromicina i eritromicina) i UV-filtara (2-etilheksil-4-metoksicinamata).

2.2.1. Sulfonamidi i trimetoprim

Sulfonamidi su derivati *p*-aminobenzen sulfonske kiseline te su prvi antibiotici primijenjeni za liječenje infektivnih bolesti u ljudskoj i veterinarskoj medicini. Struktura sulfonamida vrlo je slična strukturi para-aminobenzojeve kiseline (PABA), a ona je metabolički prethodnik folne kiseline (potrebna za rast bakterija). Mehanizam djelovanja sulfonamida je temeljen na ometanju metabolizma folne kiseline. Strukturu sulfonamida karakterizira sulfanilamidna

skupina koja je nosilac antimikrobnog djelovanja, što je potaknulo sintezu i primjenu velikog broja sulfonamida. Njihova primjena je u kontinuiranom padu zbog smanjene osjetljivosti mikroorganizama i negativnih nuspojava koje se javljaju prilikom upotrebe. Ali, pronađeno je rješenje. Kombinacija sulfonamida, najčešće *sulfametoksazola* (SMX) i *trimetoprima* (TMP) (**slika 1**) pokazala se vrlo učinkovita i sa slabijom pojavom rezistencije, osobito kod bolesti mokraćnog i dišnog sustava. *Trimetoprim* je sintetski antibiotik koji u kombinaciji sa sulfonamidima ima baktericidno djelovanje. Sulfonamidi ometaju pretvaranje PABA u dihidrofolnu kiselinu, dok trimetoprim zaustavlja sljedeću fazu, a to je konverzija folne u tetrahidrofolnu kiselinu. Ova inhibicija pretvara dva bakteriostatska antibiotika u baktericidnu kombinaciju [13, 17, 25].



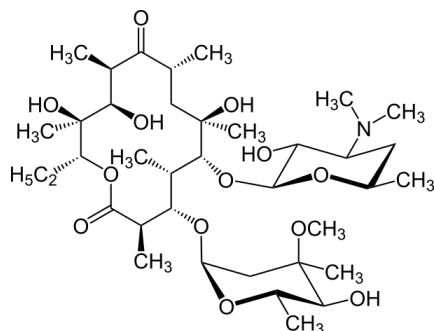
Slika 1. Strukturne formule sulfametoksazola (a) i trimetoprima (b)

Oko 50 - 70 % doze TMP i 10 – 30 % doze SMX se izlučuje u nepromijenjenom obliku putem urina [26]. Istraživanja su pokazala da koncentracija SMX-a u kanalizacijskim vodama iznosi 0,01 – 2 µg/L u Španjolskoj, Italiji, Švedskoj i Njemačkoj [27]. Također, i SMX i TMP pronađeni su u površinskim vodama, gdje je koncentracija TMP iznosila 17 ng/L, a SMX-a u rasponu od 0,03 – 0,48 µg/L [28, 29]. SMX je detektiran i u vodi za piće, u koncentraciji od 3,0 – 3,4 ng/L [30]. SMX/THP se nalazi na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization's List of Essential Medicines), koja daje popis najznačajnijih lijekova u temeljnom zdravstvenom sustavu. Cijena ovog lijeka nije velika te u SAD-u iznosi 0,40 dolara po dozi.

2.2.2. Makrolidi

Makrolidi su antibiotici širokog spektra djelovanja. Struktura se sastoji od 12 – 16 C atoma te laktonskog prstena na koji su vezani šećeri, najčešće kladinoza i desozamin. Makrolidi su lipofilne molekule koje pokazuju bakteriostatsko i baktericidno djelovanje, ovisno o koncentraciji. Makrolidi pokazuju antimikrobno djelovanje ulaskom u bakterijsku stanicu gdje sprječavaju sintezu proteina na bakterijskoj 50S podjedinici ribosoma. U ovom radu, kao

predstavnik makrolida, izabran je *eritromicin* (**slika 2**). Odobren je u SAD-u 1967. god. i godišnje se prepisuje na 1,5 milijuna receptata u cijelom svijetu. Izlučuje se prvenstveno putem žuči. Nakon primjene svega se 2 - 5 % izlučuje urinom u nepromijenjenom obliku. Preliminarna istraživanja pokazala su prisutnost eritromicina u vodi za piće u koncentraciji od 1,4 – 4,9 ng/L. U površinskim vodama pronađen je u koncentracijama i do 6 µg/L [31]. Nalazi se na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije te cijena po tableti iznosi 0,03 – 0,06 dolara, u zemljama razvijenog svijeta [17, 25, 30, 32-34].

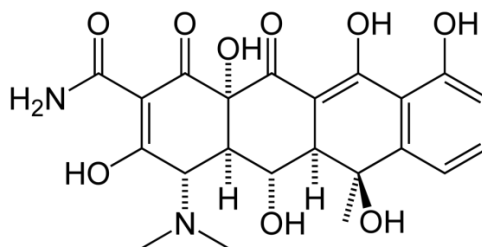


Slika 2. Strukturna formula eritromicina

2.2.3. Tetraciklini

Tetraciklinski antibiotici (TC) pripadaju skupini aromatskih poliketidnih antibiotika sa širokim spektrom djelovanja. Zbog niske toksičnosti pronalaze široku primjenu u ljudskoj medicini, ali se najviše koriste za veterinarske svrhe. Ostatci tetraciklina detektirani su u mlijeku i hrani, što može voditi k otrovnim i alergijskim reakcijama kod nekih pojedinaca. Da bi se ostvarila sigurnost ljudske hrane, EU je postavila granicu tolerancije tih antibiotika u životinjskim proizvodima. Maksimalna količina ostataka TC u mlijeku i mišićima životinja iznosi 100 µg/kg, a u bubrezima i jetri 300 – 600 µg/kg [35]. Tetraciklini su kristalne strukture, žute boje, dobro topljivi u vodi (5 mg/mL pri pH=2 i 20 °C), fotoosjetljivi, stabilni u otopinama pH 2 - 9. Mehanizam djelovanja tetraciklina započinje inhibicijom sinteze proteina tako da se vežu na 30S podjedinicu ribosoma. U ovom radu, kao predstavnik tetraciklina, izabran je *oksitetraciklin*. Oksitetraciklin (OTC) je otkriven 1950. godine te se vrlo često primjenjuje u veterinarskoj medicini (**slika 3**). Oksitetraciklin pokazuje bakteriostatsko i baktericidno djelovanje [17, 19, 20, 25]. Djelomično se razgrađuje, a najveći dio se izlučuje mokraćom (60 %), ostatak putem žuči i bubrega [36]. Istraživanje koje su proveli P. Dzomba i suradnici 2014. [37] potvrdilo je prisutnost OTC-a u površinskim

vodama u koncentraciji ($0,61413 \pm 14,90$) $\mu\text{g/L}$ [17, 19, 20, 25, 35-37]. Tetraciklini se nalaze na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije te cijena iznosi 0,35 – 1,78 dolara po tijeku liječenja.



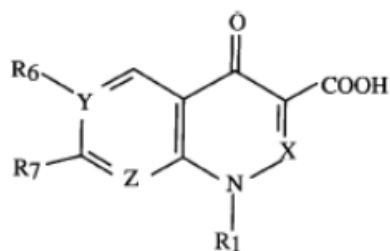
Slika 3. Struktura oksitetraciklina

2.2.4. Fluorokinoloni

Fluorokinoloni su sintetski antibiotici koji pripadaju drugoj generaciji kinolona. Posjeduju antibakterijsko djelovanje koje uvelike ovisi o pH [13, 38]:

- niske pH – vrijednosti – kationski oblik
- visoke pH – vrijednosti – anionski oblik
- neutralni pH – oblik dvojnih iona.

Djeluju baktericidno, a mehanizam djelovanja fluorkinolona usmjeren je na blokiranje DNA–giraze, bakterijski enzim neophodan za replikaciju DNA. Razlika fluorokinolona od prijašnjih kinolona jest prisutnost fluora na šestoj poziciji bazičnog kinolonskog prstena. Na sedmoj poziciji kinolonske jezgre nalazi se piperazinska skupina. Takva struktura povećava antibakterijsku aktivnost te se zbog toga ne primjenjuju samo u ljudskoj medicini, već i u ribogojilištima, akvakulturi i u veterinarskoj medicini. Od fluorokinolona najviše se koriste enrofloksacin, ciprofloksacin i norfloksacin (**slika 4**). Prvi fluorokinoloni odobreni za medicinsku upotrebu su norfloksacin i ciprofloksacin, a za upotrebu na životinjama enrofloksacin. U ovom radu, kao predstavnik fluorokinolona, izabran je *enrofloksacin*. Enrofloksacin ima širok spektar djelovanja u daleko manjim koncentracijama u odnosu na tradicionalne antibiotike, kao što su penicilini, tetraciklini, makrolidi te sulfonamidi. Izlučuje se iz organizma putem žuči (70 %) i bubrega (30 %). Enrofloksacin je detektiran u otpadnim vodama u koncentraciji od 10,0 – 18,8 $\mu\text{g/L}$, a u vodi za piće u koncentraciji od 1,2 – 4,0 ng/L [6, 19, 30, 38–41].



	R ₁	X	Y	R ₆	R ₇	Z
norfloksacin	-C ₂ H ₅	CH	C	F		CH
ciprofloksacin		CH	C	F		CH
enrofloksacin		CH	C	F		CH

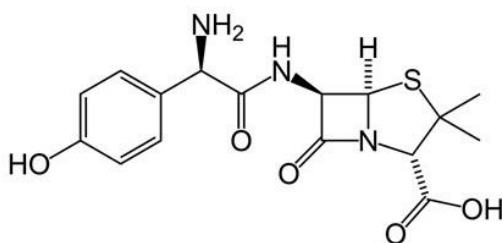
Slika 4. Opća strukturna formula fluorokinolona

2.2.5. β -laktami

β -laktami su najraširenija skupina antimikrobnih lijekova koji se dijele u tri skupine [42] :

- peniciline (benzilpenicilin, penicilin V, oksacilin, amoksisilin, ampicilin, kloksacilin),
- cefalosporine (cefaleksin, cefazolin, ceftiofur, cefapirin, cefuroksim, cefoperazon i
- monobaktame.

Sastavni dio njihove strukture je jedinstveni četveročlani β -laktamski prsten koji je osnova antibakterijskih svojstava. Mehanizam djelovanja zasniva se na inhibiciji sinteze bakterijskog staničnog zida. Najvažnija skupina β -laktamskih antibiotika su penicilini te je i u ovom radu izabran *amoksisilin* kao predstavnik. Amoksisilin jest polusintetski antibiotik, proširenog spektra djelovanja (**slika 5**).

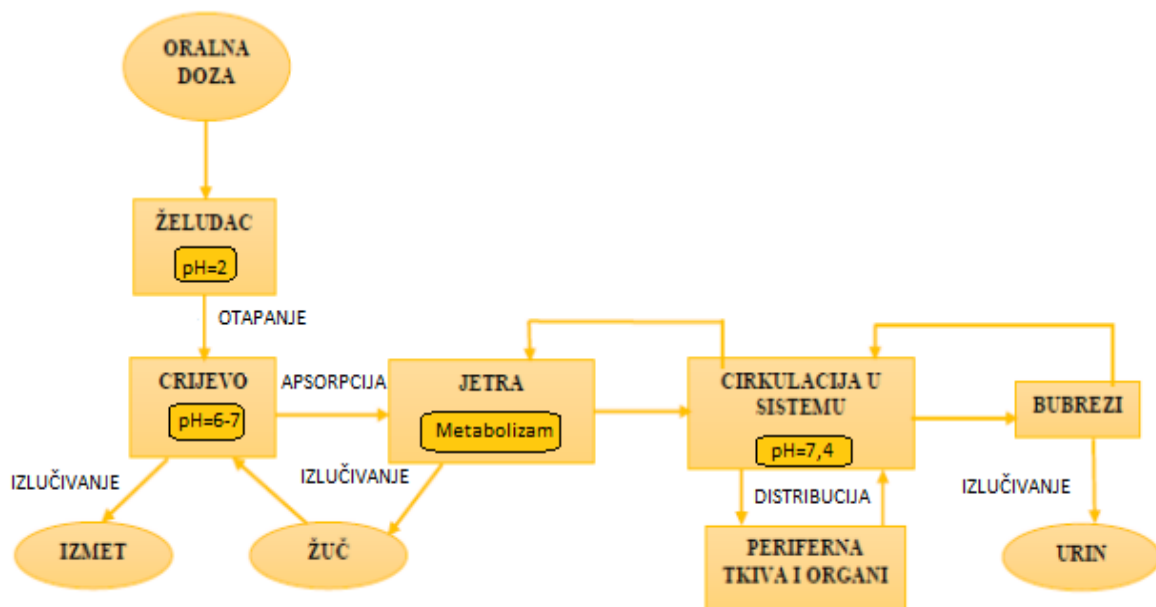


Slika 5. Strukturna formula amoksicilina

Glavni put eliminacije amoksicilina je putem bubrega. Približno 50 – 85 % amoksicilina izluči se u neizmijenjenu obliku u mokraću tijekom 24 sata. Nalazi se na listi ključnih lijekova

2.3. METABOLIZAM FARMACEUTIKA

Nakon unosa farmaceutika u organizam dolazi do apsorpcije u krvotok, raspodjele u tkiva, biotransformacije te eliminacije iz organizma. Eliminacija je ireverzibilno uklanjanje farmaceutski aktivne tvari iz organizma i sastoji se od dva procesa: metabolizma i izlučivanja. Metabolizam farmaceutika uključuje konverziju jednog kemijskog oblika u drugi (promjena strukture), dok se proces izlučivanja sastoji od eliminacije farmaceutika ili njegovih metabolita iz organizma koji su obično polarniji i hidrofilniji od izvornog spoja. Metabolizam farmaceutika je proces uzrokovan enzimima u ljudskom metabolizmu ili mikroorganizmima koji se nalaze u crijevima živih bića. Trajanje i intenzitet farmakološke aktivnosti ovise o brzini metabolizma koja je ovisna o vrsti lijeka, starosti osobe te o dugotrajnosti uzimanja lijeka. Na **slici 7** prikazani su procesi i put farmaceutika nakon unosa u organizam [6, 13, 18, 50-52]. Metabolizam farmaceutika podijeljen je u dvije faze. Iako nije pravilo, najčešće slijede jedna za drugom. U reakcije prve faze ubrajaju se oksidacija, redukcija, hidroliza, ciklizacija i deciklizacija. Produkti ovih reakcija su često kemijski reaktivniji i stoga ponekad toksičniji ili čak kancerogeniji od polaznog spoja. U ovim reakcijama dolazi do promjena na postojećim funkcionalnim skupinama ili do uvođenja novih (-OH, -NH₂, -SH, -COOH). Takvi modificirani spojevi se zatim konjugiraju u polarne spojeve u fazi II.



Slika 7. Procesi i put farmaceutika nakon unosa u organizam [1]

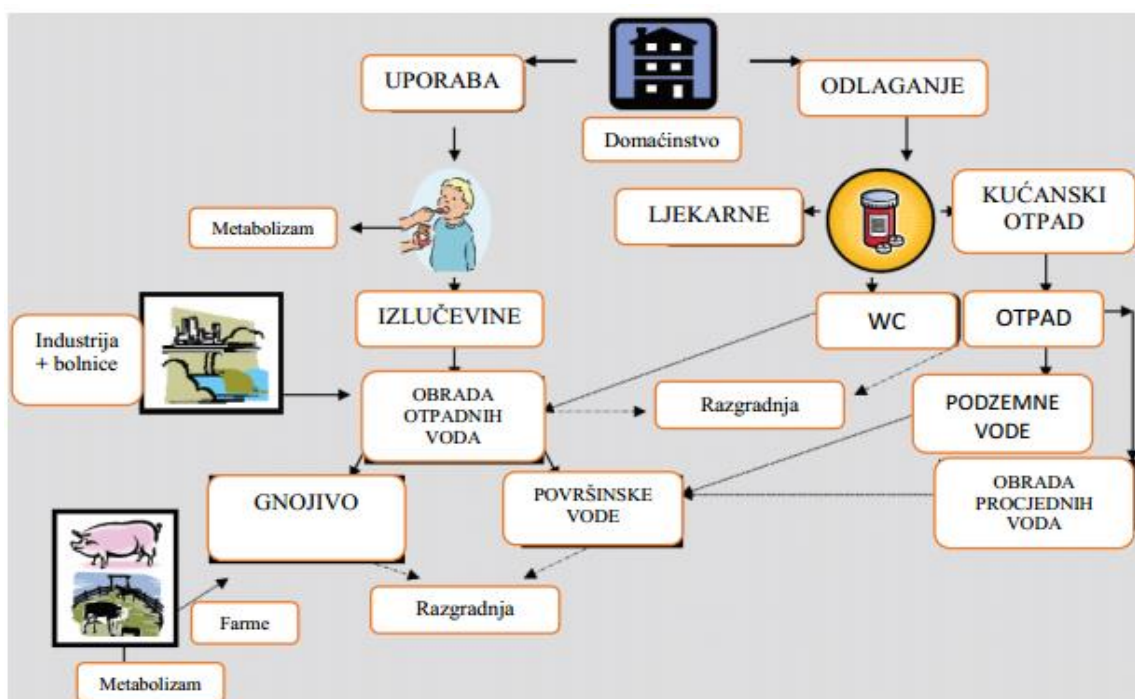
Reakcije druge faze su sintetičke reakcije koje uključuju metiliranje, aciliranje, sulfokonjugaciju i dr. Reakcije II. faze brže se odvijaju od reakcije I. faze. Produkti ovih reakcija su u većini slučajeva neaktivni i manje su toksični od polaznih spojeva. Tijekom ovih reakcija u molekule farmaceutika uvode se reaktivne skupine poput hidroksilne skupine. Hidroksilna skupina se u reakciji konjugacije zamjenjuje sulfatnom ili acetilnom skupinom čime metabolit postaje dovoljno topljiv i hidrofilan da bi se mogao izlučiti iz organizma. Reakcije I. i II. faze odvijaju se uglavnom u jetri, iako se neki antibiotici metaboliziraju u plazmi, plućima ili crijevu. Metaboliti se iz tijela čovjeka ili životinja izlučuju putem bubrega, pluća, urina ili izmeta. Koliko će se nekog farmaceutika izlučiti iz organizma ovisi o njegovim svojstvima, dobi pacijenta te načinu primjene (oralno ili intravenozno) [6, 12, 13, 18, 50-52].

2.4. FARMACEUTICI U OKOLIŠU

Farmaceutici su mikrozagađivala koja su u okolišu prisutna u koncentracijama od nekoliko $\mu\text{g/L}$ do nekoliko ng/L . Kako se radi o biološki aktivnim spojevima, dovoljni su tragovi farmaceutika za nepoželjno djelovanje na ljude i vodene organizme. Analize tržišta pokazuju da se za zdravstvenu zaštitu na svjetskoj razini koristi ukupno 4000 farmaceutski aktivnih spojeva čija godišnja proizvodnja iznosi više od 100 000 tona [7, 15]. Povećana potrošnja farmaceutika u različitim područjima primjene rezultirala je kontinuiranim ispuštanjem ovih molekula i njihovih metabolita u okoliš. S obzirom na kontinuirani unos, farmaceutici su stalno prisutni u okolišu te ih smatramo „pseudo-postojanima“. Od antibiotika, sulfonamidi i fluorokinolini su najpostojaniji u okolišu te se najviše koriste, zatim makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi i β -laktami [53]. Njihova prisutnost u okolišu prvi put je detektirana 60-ih godina 20. stoljeća u površinskim i otpadnim vodama SAD-a i Europe [5, 7, 53, 54].

Na **slici 8** prikazani su glavni putovi unosa farmaceutika u okoliš. Nakon primjene i izlučivanja dospijevaju u komunalne otpadne vode. Neki od izvora su i farmaceutska industrija, septički sustavi, bolnice te farme na kojima se velike količine lijekova, posebice antibiotici, dodaju životinjskoj hrani radi liječenja bolesti, u svrhu poboljšanog rasta i bolje iskoristivosti prehrane. Farmaceutici iz životinjskih izlučevina završavaju u gnojivima koja se koriste za gnojenje poljoprivrednih površina. Prilikom nanošenja gnojiva farmaceutici ili njihovi metaboliti prisutni u gnojivu, predstavljaju prijetnju podzemnim, površinskim te pitkim vodama. Problem predstavljaju i neiskorišteni farmaceutici koji završavaju u otpadnim

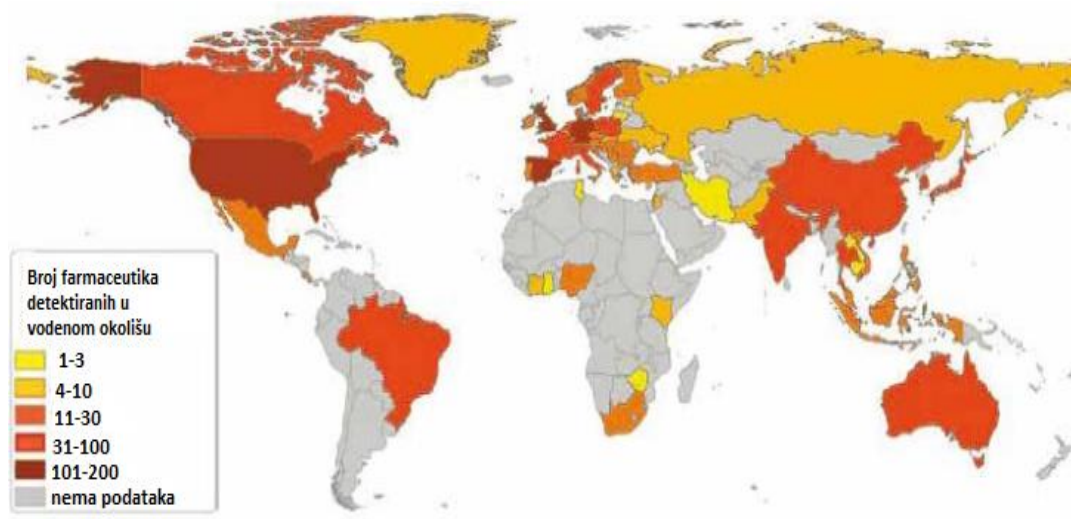
vodama jer se odbacuju u kanalizacijski sustav, što nije pravilan način odlaganja. Najvećim izvorom farmaceutika smatraju se postrojenja za obradu otpadnih voda koja nisu dizajnirana za uklanjanje velikog broja farmaceutika. Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava kao što je npr. hidrofilnost, farmaceutici i njihovi metaboliti imaju sposobnost prolaska kroz sve prirodne filtre i postrojenja za obradu otpadnih voda ugrožavajući sustav opskrbe pitkom vodom. Masena koncentracija eritromicina u ispuštima postrojenja za obradu voda kreće se između 0,109 – 0,62 µg/L, sulfametoksazola 0,07 – 0,62 µg/L, a trimetoprima 0,04 – 1,34 µg/L [15]. Uklanjanje u konvencionalnim postrojenjima za obradu otpadnih voda, koja nisu dovoljno djelotvorna, zahtjeva dodatna poboljšanja (poput ozonacije, UV-oksidacije) kako bi se spriječilo ispuštanje u okoliš [7, 13, 18, 23, 55]. Nakon ulaska u okoliš, koncentracija farmaceutika ovisi o njihovoj otpornosti na fotokemijsku i mikrobiološku razgradnju. Koncentracija farmaceutika u okolišu se ne mora nužno smanjiti zbog procesa razgradnje, već može biti posljedica sorpcije farmaceutika na čestice tla, sedimenta ili suspendirane čestice prisutne u vodi. Razlog otkrivanja sve većeg broja farmaceutika u okolišu je razvoj naprednih analitičkih instrumenata koji omogućavaju analizu tragova različitih spojeva s vrlo niskom granicom detekcije i kvantifikacije te visokom osjetljivošću [12, 23, 54, 56, 57].



Slika 8. Putovi unošenja farmaceutika u okoliš [58]

Istraživanja provedena u razvijenim zemljama kao što su SAD, Kanada, Koreja, Australija i mnoge zemlje u Europi pokazala su prisutnost više od 80 različitih farmaceutika u vodenom

okolišu (slika 9). Dokazano je da 10 – 15 % farmaceutika ima dugoročnu toksičnost za određene biološke vrste, a podaci su dostupni za manje od 15 % farmaceutika od ukupnog broja koji dopijevaju u okoliš [1-3, 5-7, 53-57, 59-61].



Slika 9. Broj farmaceutika detektiran u površinskim, podzemnim vodama i vodi za piće [62]

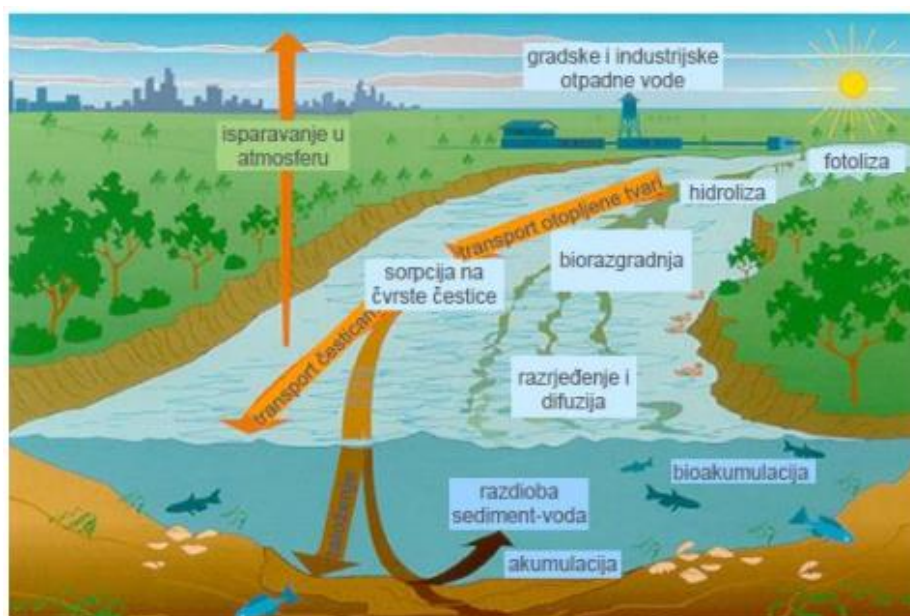
2.4.1. Sudbina farmaceutika u okolišu

Nakon primjene, farmaceutik se izlučuje iz tijela kao osnovna molekula ili smjesa osnovne molekule i metabolita te kao takav dolazi u okoliš u kojem može biti izložen biotičkim ili abiotičkim procesima razgradnje.

Sudbina farmaceutika u okolišu ovisi o fizikalno–kemijskim svojstvima spoja te o uvjetima u okolišu. Svojstva poput koeficijenta razdiobe n -oktanol - voda (K_{ov}), koeficijenta razdiobe (K_d), konstante ionizacije (K_k) te koeficijenta sorpcije na organski ugljik (K_{oc}) važna su da bi se moglo utvrditi hoće li se neki farmaceutik zadržavati u vodi ili u tlu. Brojni uvjeti u okolišu utječu na njihovo ponašanje: klima, pH-vrijednost i komponente prisutne u vodi i sedimentu (sastav matrice) [13].

Biotički procesi podrazumijevaju biorazgradnju djelovanjem gljivica, bakterija ili algi. Rezultat takve razgradnje je djelomična ili potpuna mineralizacija farmaceutika do ugljikova dioksida i anorganskih soli poput sulfata i nitrata. Budući da većina antibiotika ima stvorenu rezistenciju prema djelovanju bakterija, samo mali dio se može razgraditi biološkim putem.

Smatra se da su upravo bakterije od primarne važnosti za većinu procesa biorazgradnje u površinskoj, podzemnoj i morskoj vodi. Istraživanja pokazuju da su oksitetraciklin i amoksicilin samo djelomično podložni biorazgradnji [5]. Čimbenici koji su važni za rezultat biotičke razgradnje su temperatura, sastav matrice i geografska širina. Abiotički procesi razgradnje uključuju sorpciju, hidrolizu, fotolizu, oksidaciju i redukciju. Rezultat ovih procesa je *smanjenje aktivnosti* farmaceutika uslijed sorpcije na čestice tla ili sedimenta te razgradnje farmaceutika (hidroliza, fotoliza, oksidacija i redukcija) što vodi smanjenju koncentracije osnovnog spoja. Takvim procesima razgradnje nastaju novi spojevi, tj. razgradni i transformacijski produkti. Transformacijom dolazi do promjene u strukturi početne molekule farmaceutika pri čemu se molekulska masa ne mijenja, a prilikom razgradnje dolazi do cijepanja početne molekule i nastajanje spojeva s drugačijom molekulskom masom. Glavni procesi koji određuju sudbinu i prijenos farmaceutika u vodenom okolišu prikazani su na **slici 10** [1 – 3, 13, 18, 63].

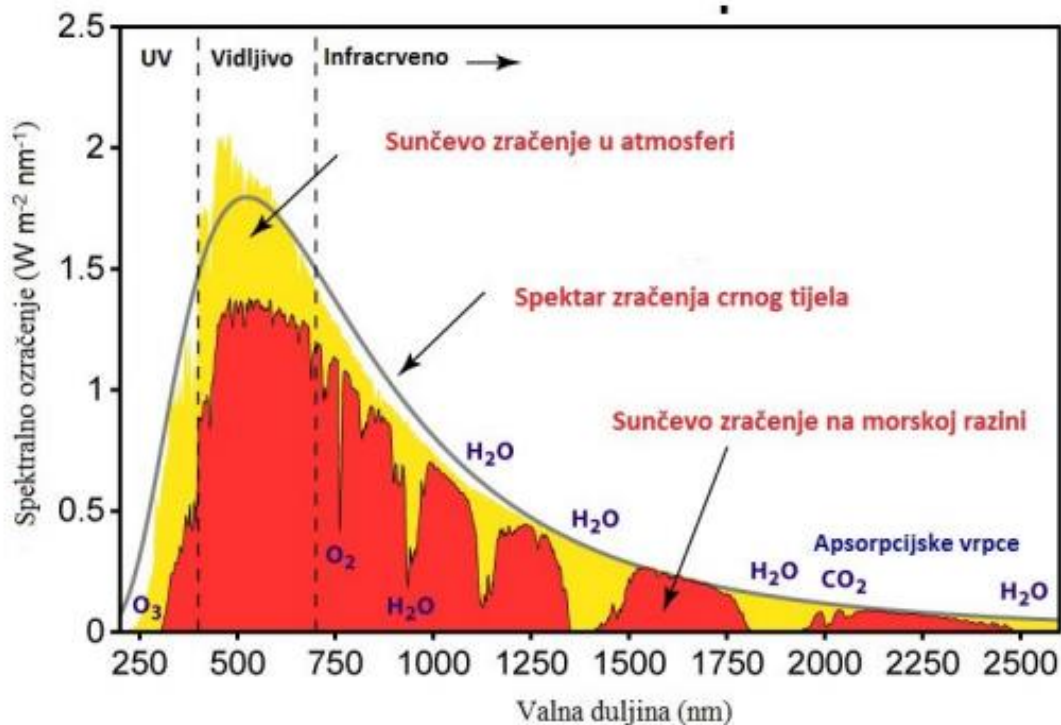


Slika 10. Prijenos farmaceutika u vodenom okolišu [64]

2.5. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA FARMACEUTIKA

Fotolitička razgradnja je važan abiotički proces razgradnje farmaceutika osobito onih koji su otporni na hidrolizu (fluorokinoloni i neki sulfonamidi) i biorazgradnju (trimetoprim i β -laktami). Najčešće se javlja u površinskim vodama zbog izloženosti direktnom Sunčevu zračenju. Da bi farmaceutik bio podložan fotolitičkoj razgradnji, mora apsorbirati Sunčevo

zračenje (290 – 800 nm), a tu sposobnost imaju farmaceutici koji sadrže aromatske prstene, heteroatome i druge kromoforne skupine [6, 13]. Spektar Sunčevog zračenja (slika 11), koje dolazi do Zemljine atmosfere, nalazi se u rasponu od 100 nm do oko 1 mm valne duljine.



Slika 11. Spektar Sunčeva zračenja [66]

Za fotolizu farmaceutika značajno je prizemno Sunčevo zračenje. Sunčeva svjetlost se filtrira i prigušuje kroz atmosferu te je najveća na gornjoj granici atmosfere. Na Zemljinu površinu dolazi u obliku izravnog i raspršenog zračenja. Količina tog zračenja iznosi $3 \cdot 10^{24}$ J/god. Ukupna ozračenost ovisi o trajanju insolacije (sijanja Sunca), klimatskim uvjetima te godišnjem dobu [12, 65]. Prema podjeli spektra elektromagnetskog zračenja, Sunce površinu Zemlje obasjava ultraljubičastim zračenjem prikazanim u **tablici 1**.

Tablica 1. Podjela ultraljubičastog zračenja prema ISO standardu [67]

<i>Naziv</i>	<i>Skraćenica</i>	<i>Valna duljina područja u nanometrима</i>	<i>Energija po fotonu</i>
Ultraljubičasto A ili dugovalno područje (crno svjetlo)	UVA	315 nm – 400 nm	3,10–3,94 eV
Blisko UV	NUV	300 nm – 400 nm	3,10–4,13 eV
Ultraljubičasto B ili srednjevalno područje	UVB	280 nm – 315 nm	3,94–4,43 eV
Srednje UV	MUV	200 nm – 300 nm	4,13–6,20 eV
Ultraljubičasto C ili kratkovalno područje	UVC	100 nm – 280 nm	4,43–12,4 eV
Daleko UV	FUV	122 nm – 200 nm	6,20–10,2 eV
Vakuumsko UV	VUV	100 nm – 200 nm	6,20–12,4 eV
Duboko UV	LUV	88 nm – 100 nm	12,4–14,1 eV
Super UV	SUV	10 nm – 150 nm	8,28–124 eV
Ekstremno UV	EUV	10 nm – 121 nm	10,2–124 eV

Razgradnja molekula prilikom njihovog osvjetljavanja uzrokovana je apsorpcijom Sunčevog zračenja te kvantnim iskorištenjem određene molekulske vrste. Apсорpcija elektromagnetskog zračenja izražena je kao molarni ekscitacijski (apsorpcijski) koeficijent, koji pokazuje koliko određena kemijska vrsta apsorbira elektromagnetsko zračenje pri valnoj duljini koja se koristi za njegovu razgradnju [68]. Za fotolitičku razgradnju bitni su oni procesi koji uzrokuju kemijske promjene u početnoj molekuli te vode smanjenju njihove koncentracije. Nadalje, učinkovitost procesa ovisi o intenzitetu i frekvenciji svjetlosti, vremenskim uvjetima, pH-vrijednosti, tvrdoći i dubini vode, te o koncentracijama pojedinih sastojaka vode [5, 6, 12, 13, 68].

Antibiotici, kao što su kinoloni, sulfonamidi i tetraciklini, su fotoosjetljivi i podložni fotolizi. No, nisu sve tvari podložne fotorazgradnji. Antibiotici iz skupine makrolida ne apsorbiraju Sunčevo zračenje iznad 290 nm, budući da nemaju kromoforne skupine, te nisu podložni

značajnijoj fotolizi. Stoga će razgradnja antibiotika u vodenom okolišu ovisiti ne samo o izravnoj nego i o neizravnoj fotolizi. Izravna fotoliza u prirodnim vodama uključuje transformaciju i razgradnju farmaceutika zbog apsorpcije fotona. Tvari uobičajeno prisutne u vodama u okolišu, poput nitratnih, kloridnih i željezovih iona te raznih otopljenih organskih tvari poput huminskih kiselina, mogu utjecati na tijek fotolitičke razgradnje [5, 6]. Huminske kiseline apsorbiraju UV-zračenje u širokom području valnih duljina smanjujući ukupnu količinu dostupne energije (djeluju kao filtri) te uzrokuju sporiju fotolitičku razgradnju [13]. Također, apsorpiranjem UV-zračenja prelaze u pobuđeno stanje u kojem izravno reagiraju s molekulama farmaceutika ubrzavajući njihovu razgradnju. Reakcijom s kisikom stvaraju radikale (singletni kisik, hidroksil i peroksi radikale) koji dovode do fotolitičke razgradnje farmaceutika i takvo ponašanje odlika je neizravne fotolize. Neizravna fotoliza važna je za farmaceutike čiji se apsorpcijski spektri slabo preklapaju sa spektrom Sunčeva zračenja te za one farmaceutike koji su otporni na izravnu fotolizu. Zanimljiv utjecaj nitratnih iona i huminskih kiselina zabilježen je u slučaju makrolida [69, 70]. Budući da makrolidi ne apsorbiraju Sunčevo zračenje iznad 290 nm, kompleksi s metalnim ionima poput Fe^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} mogli bi biti važni za njihovu fotolitičku razgradnju [69, 70]. Na tetracikline, također, utječu Fe^{2+} ioni jer su podložni stvaranju kompleksa [13].

Fotoliza jest primarni put razgradnje brojnih farmaceutika, budući da su uobičajeni procesi, poput hidrolize ili biorazgradnje, nedovoljno učinkoviti za njihovo uklanjanje iz okoliša. Ova činjenica se posebice odnosi na antibiotike. Fotolitička razgradnja ima važnu ulogu u određivanju njihove sudbine u okolišu. Potrebno je ispitati ponašanje farmaceutika, u različitim uzorcima voda, ne pojedinačno već u smjesama, budući da se u prirodi nalaze u takvom obliku [5, 6, 12, 13, 18, 71, 72].

2.6. KINETIKA FOTOLITIČKE RAZGRADNJE

Proučavanjem kinetike fotolitičke razgradnje moguće je odrediti brzinu razgradnje farmaceutika, odnosno vrijeme unutar kojega će se razgraditi pola od početne količine ispitivanog spoja, tzv. vrijeme poluraspada. Većina fotolitičkih reakcija ponaša se kao reakcija prvog reda koja pretpostavlja da se koncentracija ispitivanog spoja smanjuje proporcionalno s vremenom:

$$\frac{d [c]}{d [t]} = k [c] \quad (1)$$

gdje je c koncentracija početnog spoja, t je vrijeme provođenja eksperimenta, a k konstanta brzine razgradnje. Integriranjem izraza (2) dobije se izraz (3):

$$C = C_0 \cdot e^{-kt} \quad (2)$$

$$\ln \frac{c_t}{c_0} = k \cdot t \quad (3)$$

U navedenom izrazu c_0 je početna koncentracija spoja pri $t = 0$, a c_t koncentracija u vremenu t . Konstantu brzine razgradnje moguće je odrediti iz jednadžbe pravca, kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c_t/c_0)$ o vremenu.

Vrijeme poluraspada spoja ($t_{1/2}$) moguće je odrediti iz sljedećeg izraza [76]:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (4)$$

Brzina fotolitičke razgradnje ovisi o koncentraciji farmaceutika i koncentraciji tvari prisutnih u prirodnim vodama. Povećanje koncentracije farmaceutika vodi smanjenju brzine fotolitičke razgradnje [77, 78]. Ukoliko je farmaceutik prisutan u manjim količinama, može apsorbirati veći broj fotona što vodi bržoj razgradnji. Također, uzrok ovakvom ponašanju mogu biti razgradni produkti prisutni u znatno većem udjelu kada je koncentracija početne molekule veća. Naime, razgradni produkti mogu apsorbirati dio zračenja koji je potreban početnoj molekuli da bi se razgradila [13]. Brzina fotolitičke razgradnje antibiotika proučava se koristeći različite izvore zračenja (UV-zračenja, umjetno i prirodno Sunčevo zračenje) i različite matrice voda (izvorska voda, vode jezera i rijeka, morska voda, kanalizacijske vode, industrijske otpadne vode te deionizirana voda). Brzina razgradnje ovisi o strukturi antibiotika, pH-vrijednosti i sastavu matrice, dobu dana i godišnjem dobu [13, 71, 72].

2.7. UV-FILTRI

Posljednjih nekoliko desetljeća povećala se svijest o negativnom djelovanju UV-zračenja, što je rezultiralo povećanoj proizvodnji i upotrebi UV-filtara. UV-filtri su ključni i neizostavni sastojci krema za sunčanje i drugih proizvoda za osobnu njegu budući da apsorbiraju, reflektiraju i/ili raspršuju UV-zračenje (320 - 400 nm za UVA i 290 - 320 za UVB). Mogu biti anorganskog porijekla te tada reflektiraju i raspršuju UV-zračenje (TiO_2 i ZnO), dok organski UV-filtri apsorbiraju zračenje. Organski ili kemijski UV-filtri najviše se koriste i

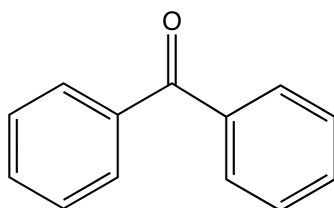
većinom su lipofilni ($\log K_{ov} = 4 - 8$) s konjugiranim aromatskim prstenima. Iako pružaju zaštitu od UVA i UVB zračenja, mnogi od njih pokazuju i toksične efekte. Bez obzira što je njihovo toksično djelovanje poznato, 55 UV-filtara odobreno je za upotrebu u kremama za sunčanje diljem svijeta (SAD, Novi Zeland, Japan i Kanada), dok Direktivom EU (76/768/EEC) o kozmetici dopuštena je komercijalna upotreba 26 organskih UV-filtara [8-10, 15].

UV-filtri mogu doći u okoliš izravno ili neizravno. Izravni unos podrazumijeva ispiranje krema za sunčanje tijekom kupanja u moru, rijekama ili bazenima, te ispuštanje industrijskih otpadnih voda. Neizravni unos UV-filtara u okolišu obuhvaća ispuštanje otpadnih voda iz kućanstava (tuširanje ili pranje odjeće). Prilikom jedne upotrebe nanese se 0,5 – 2 g UV-filtra na kožu [10]. Nadalje, preko kože oni ulaze u naš organizam te se izlučuju mokraćom iz tijela. U rijekama, jezerima i morskoj vodi detektirana koncentracija iznosi čak 10 mg/L [8]. Takva koncentracija izmjerena je za vrijeme najtoplijeg ljetnog dana, oko podneva kada se smatra da je Sunčevo zračenje najjače. UV-filtri su detektirani i u kanalizacijskim vodama, mulju, sedimentima i tlu. U ribama iz jezera i rijeka namijenjenih za kupanje količina filtara dosegla je i nekoliko g/L [8-10]. Najčešće detektirani UV-filtri u vodenom okolišu su benzofenoni (BP) i 2-etilheksil-4-metoksicinamat (EHMC), te se njihova prisutnost u okolišu i fotorazgradnja najčešće istražuju [8-10].

Zahvaljujući relativno visokoj vrijednosti koeficijenta sorpcije na organski ugljik (K_{oc}), značajan proces eliminacije UV-filtara u vodenom okolišu je sorpcija na sediment ili suspendirane čestice koje sedimentiraju na dno rijeka, jezera ili mora. Međutim, postoje i drugi procesi odgovorni za njihovu eliminaciju iz okoliša, poput fotolize. UV-filtri nisu podložni biološkoj razgradnji i kemijski su stabilni prilikom izlaganja Sunčevu zračenju. No, brojna istraživanja pokazuju da prilikom njihovog izlaganja prirodnom ili umjetnom Sunčevom zračenju može doći do fotolitičke razgradnje. Na njihovu razgradnju utječu otopljene organske tvari, nitrati, kloridi i bikarbonati [8]. Razgradni produkti, koji su često toksičniji od polaznog spoja [8], mogu imati negativne učinke na okoliš i zdravlje ljudi, stoga je njihova identifikacija od primarne važnosti. Potrebno je naglasiti da iako dolazi do fotolitičke razgradnje, produkti zadržavaju aktivnost te i dalje djeluju kao filtri apsorbiranjem UV-zračenja [8-10].

2.7.1. Benzofenoni

Najčešće korišteni benzofenon jest 2–hidroksi–4–metoksibenzofenon, poznat pod nazivom BP–3 (**slika 12**), blokira UV–zračenja, od 200 – 400 nm. Širom svijeta koristi se kao UV–filtar u kremama za sunčanje i ostalim proizvodima za osobnu njegu. BP–3 dolazi u površinske vode izravno (kupanje) ili neizravno putem kanalizacijskog sustava. U **tablici 2** prikazane su koncentracije BP-3 detektirane u vodenom okolišu.



Slika 12. Osnovna strukturna formula *benzofenona*

Tablica 2. Koncentracije BP–3 u okolišu [9]

<i>IZVOR</i>	<i>Koncentracija</i>
Jezera (hladniji dani)	< 2 – 35 ng/L
Jezera (topliji dani)	2 – 125 ng/L
Morska voda	8,2 ng/L
Sediment	0,5 – 3 ng/g
Industrijske otpadne vode	6 – 697 mg/L
Otpadne vode iz kućanstva (Švicarska)	720 - 7800 ng/L

Istraživanje [73] pokazuje da je BP–3 u vodenim otopinama, prilikom izlaganja umjetnom Sunčevu zračenju, stabilan. Uzorci su bili podvrgnuti umjetnom zračenju halogene lampe (290 - 800 nm), te nisu detektirani fotorazgradni produkti. Također, utvrđena je i značajna fotostabilnost pod utjecajem UV-zračenja i pod utjecajem direktnog Sunčevog zračenja [74]. Radi izrazite fotostabilnosti, kao i činjenice da apsorbira dio Sunčevog UV spektra, BP-3 može potencijalno utjecati na sudbinu mikrozagađivala u okolišu tako što sprječava njihovu fotolitičku razgradnju. Za benzotriazole je ustanovljeno da, u otopinama u kojima nije prisutan BP–3, dolazi do razgradnje, pri čemu zaostaje samo 11 % benzotriazole uslijed razgradnje pod utjecajem UV–zračenja. U otopinama, u koje je dodano 5 mg/L BP–3,

Tablica 3. Koncentracije EHMC-a u okolišu [9]

<i>IZVOR</i>	<i>Koncentracija</i>
Jezera (hladniji dani)	< 2 – 7 ng/L
Jezera (topliji dani)	< 2 – 15 ng/L
Morska voda	10,7 ng/L
Riječna voda	Nema dostupnih podataka
Otpadne vode	40 – 72 ng/L
Otpadne vode iz kućanstva (Švicarska)	480 –18800 ng/L

2.8. TEKUĆINSKA KROMATOGRAFIJA

Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika temeljena na različitoj moći sorpcije različitih sastojaka na različitim sorbensima. Jedna je od najraširenijih analitičkih metoda čija se načela primjenjuju u rutinskim analizama uzoraka iz okoliša, znanstvenim istraživanjima, biomedicinskim ispitivanjima i praćenju produkata organske sinteze. Začetnik kromatografije je ruski botaničar Mihail Semjonovič Cvet koji je propuštao otopine biljnih pigmenta klorofila i ksantofila kroz kolonu napunjenu kalcijevim karbonatom te uspio dobiti razdvojene obojene vrpce sastojaka [15, 79].

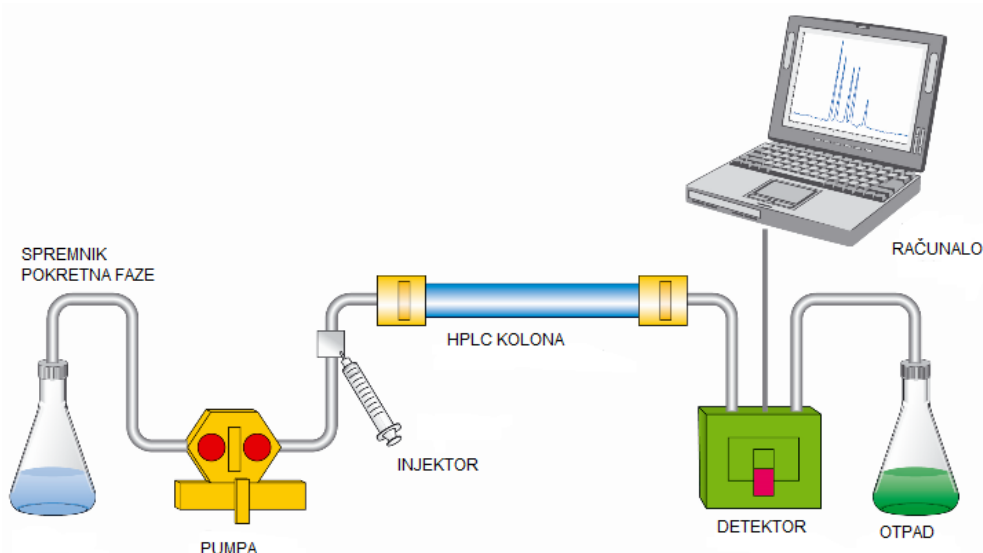
Kromatografski sustav čine pokretna faza, nepokretna faza i ispitivani spoj. Tijekom kromatografskog procesa ispitivani spoj nalazi se u dinamičkoj ravnoteži između dviju faza. Zbog narušavanja ravnotežnog stanja ispitivani spoj putuje s pokretnom fazom, zadržavajući se u nepokretnoj fazi. Nepokretna faza je, uglavnom, porozni zrnasti materijal velike specifične površine. Izbor nepokretne faze ovisi o prirodi ispitivanog spoja, prirodi ravnoteže i vrsti veze. Nepokretna faza mora se odabrati tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. da različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese. Molekule koje imaju veći afinitet prema nepokretnoj fazi gibat će se sporije od molekula koje imaju manji afinitet [13, 79-82].

Vrlo niske koncentracije farmaceutika u okolišu predstavljaju problem prilikom njihove identifikacije i kvantitativnog određivanja. Fizikalno-kemijska svojstva farmaceutika poput nehlapljivosti, nestabilnosti pri povišenim temperaturama i polarnosti otežavaju primjenu

plinske kromatografije. Zato se tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti primjenjuje za određivanje polarnih i termički nestabilnih farmaceutika u uzorcima iz okoliša [23]. Pouzdanu kromatografsku analizu treba provesti usporedbom s odgovarajućim referentnim tvarima, najčešće unutarnjim i vanjskim standardom [15].

2.8.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je suvremena analitička tehnika koja se koristi za razdvajanje različitih spojeva kao što su proteini, polimeri, vitamini, lipidi, aminokiseline, steroidi i farmaceutici. Glavna razlika između tekućinske kromatografije (eng. *liquid chromatography*, LC) i tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti je u tlaku koji se mora primijeniti kako bi došlo do mogućnosti prolaska pokretne kroz nepokretnu fazu. Vrijeme HPLC analize je u rasponu od 5 minuta pa do 2 sata. Nije primjereno poistovjećivati HPLC s LC iz razloga što veći tlakovi podrazumijevaju kompliciraniju i skuplju opremu (**slika 14**) od one koja se koristi kod klasičnih kromatografskih tehnika [13, 79, 82].



Slika 14. Shematski prikaz tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti [79]

Slika 14 prikazuje tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti koji se sastoji od spremnika pokretne faze, pumpe, automatskog uzorkivača, kromatografske kolone, detektora i računala za obradu podataka [79]

Spremnik pokretne faze omogućuje skladištenje dovoljnog volumena otapala (najmanje 500 mL) za kontinuirani rad sustava. Spremnici moraju biti opremljeni uređajem za uklanjanje otopljenih plinova iz pokretne faze koji bi mogli utjecati na rad detektora [12, 13, 79].

Pumpa je jedan od najvažnijih dijelova kromatografskog sustava tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti. Pumpa održava kontinuirano *konstantan protok* pokretne faze kroz HPLC injektor, kolonu i detektor. Budući da je pokretna faza najčešće kombinacija dva ili više otapala u različitom omjeru, pumpe omogućuju njihovo kontrolirano miješanje. Zahtjevi kojima moraju udovoljiti pumpe su: tlakovi do 30 MPa, izlaz bez pulsiranja tlaka, brzine protoka od 0,01 do 5 mL/min, reproducibilnost protoka od 99,5 % ili bolja te otpornost na koroziju koja se može pojaviti zbog djelovanja različitih otapala [12, 13, 79].

Automatski uzorkivač unosi uzorak u struju pokretne faze prije samog ulaska u kromatografsku kolonu. Najčešće se injektira volumen od 5 do 10 μ L uzorka [79].

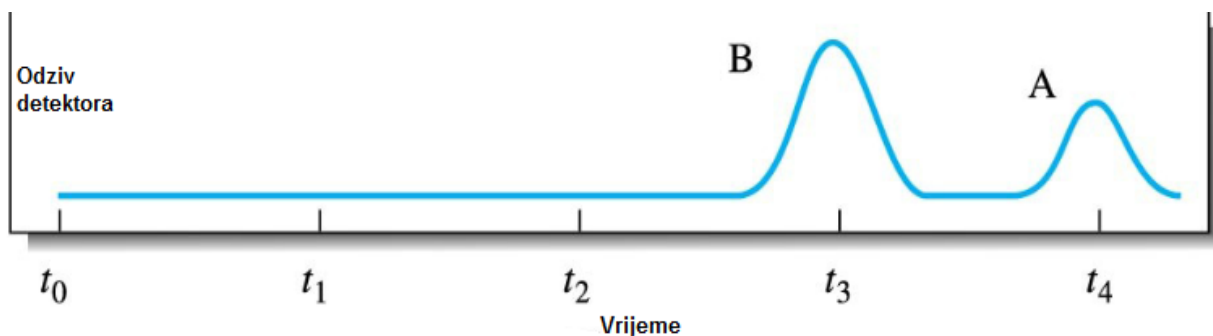
Kromatografska kolona je uska metalna cijev unutar koje je smještena nepokretna faza na kojoj dolazi do odjeljivanja sastojaka ispitnog uzorka. Dimenzije kromatografske kolone mogu biti različite: 100 – 250 mm duljine, 2,1 – 4,6 mm unutrašnjeg promjera te 2 – 5 μ m promjera čestice. Kolone koje se koriste za preparativnu kromatografiju izrađuju se sa zrcima od oko 10 μ m, no analitičke kolone se izrađuju sa sve manjim zrcima, jer to omogućava bolju separaciju [12, 13, 79].

Detektor ima važnu ulogu detekcije komponenti koje izlaze iz stupca nakon eluiranja. Odziv detektora proporcionalan je svojstvu analita. Zbog primjene visoko osjetljivih detektora dovoljne su nanogramske količine uzorka, a omogućeno je visoko razlučivanje sastojaka smjese [13, 18].

Računalo – pomoću računalnog programa moguće je kontrolirati HPLC sustav, prikupljati i obrađivati dobivene podatke [13].

Proces odjeljivanja započinje unošenjem uzorka i pokretne faze u kromatografsku kolonu. Mali volumen uzorka unosi se u tok pokretne faze i na temelju fizikalno-kemijskih interakcija dolazi do različitog zadržavanja komponenti smjese. Pokretna faza može biti voda, pufer, organsko otapalo (npr. metanol, acetonitril) ili smjesa otapala, pri čemu je bitno da otapala budu visoke čistoće. Kako bi se ostvario konstantan protok pokretne faze kroz zrna sorbensa vrlo malog promjera potrebni su visoki tlakovi što se omogućuje pumpom. Eluiranje pokretnom fazom može biti *izokratno* - sastav pokretne faze je cijelo vrijeme isti ili

gradijentno - sastav pokretne faze se mijenja tijekom kromatografskog procesa. Kod gradijentnog eluiranja otapala se moraju potpuno miješati prije ulaska u kolonu. Nakon odjeljivanja sastojaka uzorka na kromatografskoj koloni slijedi dokazivanje na detektoru, te prikaz kromatograma na računaru. Zadaća detektora je dati točnu informaciju na izlazu iz kolone. HPLC detektori su: refrakcijski detektor za mjerenje refrakcijskog indeksa, UV/Vid detektori koji mogu imati stalnu valnu duljinu, promjenjivu valnu duljinu ili mogu biti s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD), fluorescentni detektor, konduktometrijski detektor i spektrometar masa. Bitni parametri koje mora zadovoljiti detektor jest mali pomak i šum kod snimanja bazne linije, velika osjetljivost, brzi odziv neovisno o protoku, široko linearno dinamičko područje rada, mali „mrtvi“ volumen (minimalno širenje kromatografske krivulje), neosjetljivost na promjenu vrste otapala, protoka i temperature, nedestruktivni s obzirom na uzorak te podesivi tako da se mogu optimirati za različite spojeve [12, 13, 79-83]. Informacija o uspješnosti separacije sadržana je u kromatogramu, zapisu koncentracijskog ili masenog profila sastojaka uzorka nakon završenog procesa separacije (**slika 15**). Položaj kromatografskog pika na vremenskoj osi može služiti za identifikaciju sastojka, a iz površine ispod pika, odnosno visine, moguće je izračunati količinu svakog pojedinog sastojka (kvantitativna procjena) [84]. Procjenjivanje na temelju visine moguće je samo u pravilnoj krivulji koja slijedi normalnu razdiobu. Budući da na oblik krivulje utječe temperatura kolone, sastav i brzina protoka pokretne faze, preporučuje se mjerenje površine. Svaka kromatografska krivulja karakterizira se vremenom zadržavanja (t_R) i širinom kromatografske krivulje na polovici visine (w_i) (**slika 16**) [13, 15, 79].



Slika 15. Kromatogram [85]

Parametri kromatografskog razdvajanja su [13, 80, 81]:

- zadržavanje:

- ✓ zadržano vrijeme t_m , vrijeme koje prođe od trenutka injektiranja tvari koja se ne veže na nepokretnu fazu do trenutka njezine detekcije,
- ✓ vrijeme zadržavanja otopljene tvari t_R , vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu tvar. Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, nepokretnoj fazi i sastavu pokretne faze,
- ✓ prilagođeno vrijeme zadržavanja t_R'' , vrijeme koje otopljena tvar provede vezana uz nepokretnu fazu

$$t_R = t_m + t_R'' \quad (5)$$

- ✓ separacijski faktor (α) - pokazuje moć odjeljivanja sastojaka na koloni

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_m}{t_{R(A)} - t_m} \quad (6)$$

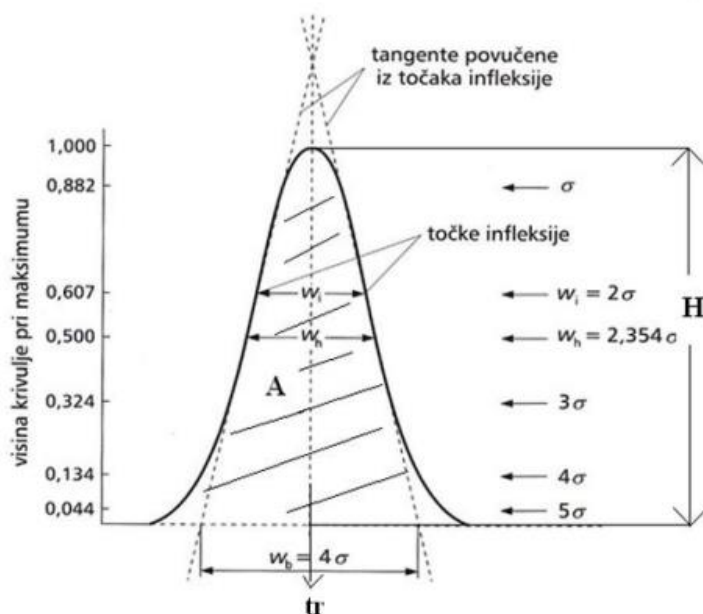
gdje je $t_{R(B)}$ vrijeme zadržavanja jedne komponente, $t_{R(A)}$ druge, a t_m zadržano vrijeme

- ✓ razlučivanje (R_s) - kvantitativna mjera kojom se izražava sposobnost odjeljivanja dva analita na koloni:

$$R_s = \frac{2[t_{RA} - t_{RB}]}{w_A + w_B} \quad (7)$$

gdje je t_{RB} vrijeme zadržavanja jedne komponente, t_{RA} druge, a w_A i w_B su bazne širine pikova prve i druge komponente (**slika 16**). Kako bismo bili sigurni u kvantitativnu procjenu potrebno je postići zadovoljavajuće razlučivanje kromatografskih krivulja. Što je R_s -vrijednost veća, to je razlučivanje dviju kromatografskih vrpca bolje.

- protok kroz porozni medij određen je Darcyjevim zakonom i
- širenje kromatografske zone.



Slika 16. Karakteristični parametri kromatografske krivulje [83]

Prolaskom kroz kromatografski stupac, kromatografska zona se širi proporcionalno duljini putovanja ili vremena. Uzroci širenja kromatografske zone jesu otpor prijenosu mase u obje faze, brzina protoka kroz nepokretnu fazu, uzdužna difuzija te nepredvidljiva sorpcija i desorpcija molekula. Širenje kromatografske vrpce ukazuje na učinkovitost kromatografskog odjeljivanja. Učinkovitost kromatografskog odjeljivanja može se kvantitativno izraziti brojem teorijskih tavana (n) i visinom teorijskog tavana (odsječaka) (h) [80]. Prema teoriji tavana, kromatografska kolona je podijeljena na određeni broj odsječaka koji imaju svoju visinu (HETP, eng. *height equivalent to theoretical plate*). Ukoliko kromatografska kolona ima veći broj odsječaka odnosno što je manja visina odsječaka, kromatografsko odjeljivanje je bolje [13, 79, 80].

Grafički prikaz ovisnosti *HETP* o brzini pokretne faze je hiperbola, a opisuje se općenito van Deemterovom jednačbom [80]:

$$HETP = A + B/v + (C_s + C_M) \cdot v \quad (8)$$

gdje je A prinos vrtložne difuzije, B prinos uzdužne difuzije, C_s i C_m su prinosi zbog prijenosa mase u nepokretnoj i pokretnoj fazi, a v je linearna brzina protoka pokretne faze. Uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografske separacije ovisi o duljini kolone, promjeru čestica punjenja, radnom tlaku i temperaturi [12].

Čimbenici koji utječu na kromatografski proces i širenje kromatografske zone su [13, 80]:

1. *Energijska barijera* – Da bi molekule prešle iz jedne faze u drugu, potrebno je da preskoče energijsku barijeru između faza. Energiju potrebnu da se prekine veza između promatrane molekule i pokretne odnosno nepokretne faze, molekula analita može dobiti u slučajnim sudarima s drugim molekulama.
2. *Veličina i geometrijski oblik zrna sorbensa koji tvori nepokretnu fazu* - što su zrna sorbensa manja, prolaz pokretne faze je teži. Veća zrnca imaju manju aktivnu površinu, ali omogućuju brži protok pokretne faze. Što je prostor između čestica veći potrebno je više vremena za difuziju što vodi širenju kromatografske vrpce. Smanjenjem promjera čestica, smanjuje se visina odsječaka u kromatografskoj koloni što vodi boljem kromatografskom razlučivanju.
3. *Temperatura sustava* – viša temperatura povećava difuzivnost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze, pa su kinetički parametri bolji.
4. *Brzina pokretne faze* – ako je brzina pokretne faze premala, disperzija molekula nastaje i zbog djelovanja difuzije. Prevelika brzina vodi turbulencijama te se molekule ne uspijevaju vezati za nepokretnu fazu. Optimizacija protoka pokretne faze može poboljšati razdvajanje i skratiti vrijeme zadržavanja.
5. *Priroda veza* – najpogodnije veze su dipol – dipol, dipol – inducirani dipol i vodikove veze.
6. *Količina ispitivanog spoja* – mora biti ograničena jer utječe na disperziju skupa molekula.

Višekratna upotreba kolona, automatsko unošenje uzorka i skraćeno trajanje analize razlozi su vrlo česte primjene HPLC. S druge strane, ne može se analizirati više uzoraka istovremeno te je za optimizaciju separacije potrebno iskustvo rada na instrumentu. Također, kada se analiziraju uzorci iz okoliša, neophodna je priprema uzorka i identifikacija spoja može biti otežana ako HPLC nije povezan sa spektrometrijom masa [18].

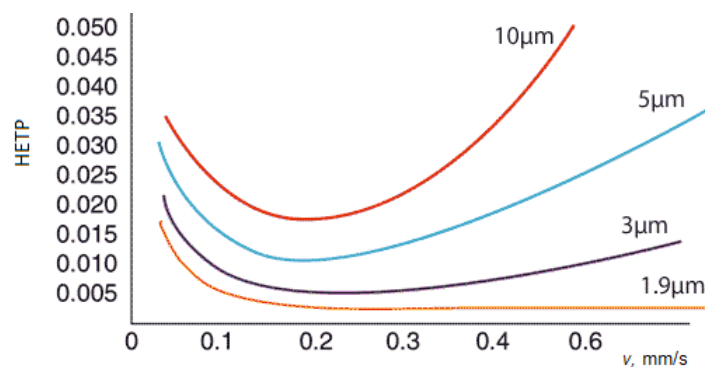
2.8.2. Tekućinska kromatografija ultra visoke djelotvornosti

Najvažniji dio kromatografskog sustava je kromatografska kolona. Tijekom vremena, kromatografske kolone znatno su se promijenile, pri čemu se mijenjala duljina kolona, njihov unutarnji promjer, a najviše se težilo smanjiti veličinu čestica sorbensa. Razlozi promjena dimenzija kromatografskih kolona jesu postizanje što boljeg razlučivanja i skraćivanja

vremena analize. 2004. godine tvrtka *Waters* uvela je novu tehnologiju baziranu na kromatografskim kolonama punjenim malim ($< 2 \mu\text{m}$), poroznim česticama.

Empirijska formula koja povezuje ovisnost između protoka pokretne faze i visine tavana (*HETP* ili učinkovitost kolone) jest van Deemterova jednadžba. Ona opisuje temeljna načela tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (UHPLC, eng. *ultra high performance liquid chromatography*) [86]. Prema Van Deemterovoj jednadžbi (jednadžba 8) razlozi nastajanja i širenja kromatografske vrpce ili visine tavana jesu prinosi vrtložne i uzdužne difuzije, kao i prinosi zbog prijenosa mase u nepokretnoj i pokretnoj fazi, pri linearnoj brzini protoka pokretne faze, v .

Širenje kromatografske vrpce ukazuje na učinkovitost kromatografskog odjeljivanja te se može kvantitativno izraziti brojem (n) i visinom teorijskih tavana (h). Da bi se povećala učinkovitost kromatografskog odjeljivanja, odnosno povećao broj teorijskih tavana (n), potrebno je smanjiti *HETP* (ukupna visina tavana) [86]. Korištenjem čestica manjeg promjera ($1,7 - 1,8 \mu\text{m}$) smanjuje se visina tavana u kromatografskoj koloni, što, naposljetku, vodi k boljem razlučivanju (**slika 17**). Naime, što je manji protok pokretne faze molekule uzorka ostaju duže u kromatografskoj koloni što uzrokuje širenje kromatografske vrpce [13].



Slika 17. Ovisnost visine tavana kromatografske kolone o brzini protoka pokretne faze za različite promjere čestica punila kolone [86]

Na svakom tavanu uspostavlja se ravnoteža raspodjele analita između pokretne i nepokretne faze. Da bi se odjeljivanje ostvarilo, kromatografska kolona mora imati dovoljan broj tavana. Broj odsječaka može se odrediti prema izrazu [80]:

$$n = 16 \cdot \frac{t_R^2}{w} \quad (9)$$

Učinkovitost kromatografskog odjeljivanja može se približe objasniti pomoću R_s -vrijednosti. Na koji način se može utjecati na razlučivanje kromatografskih vrpca dano je sljedećom jednadžbom [86]:

$$R_s = \frac{1}{4} \cdot \sqrt{n} \cdot \frac{\alpha-1}{\alpha} \cdot \frac{k}{k+1} \quad (10)$$

gdje je k faktor zadržavanja, α separacijski faktor te n broj odsječaka u kromatografskoj koloni. α je mjera selektivnosti kromatografskog sustava, pa se naziva i faktorom selektivnosti ili selektivnost. Separacijski faktor uvijek je veći od jedinice ili jednak jedinici [80]. Kada je $\alpha = 1$ nema odjeljivanja sastojaka ispitnog uzorka, dok za ostale vrijednosti dolazi do njihova odjeljivanja. Povećanje učinkovitosti kromatografskog odjeljivanja vodi k povećanju razlučivanja. Učinkovitost kromatografskog odjeljivanja je obrnuto proporcionalna veličini čestica (dp), a proporcionalna je duljini kolone (L):

$$n \propto \frac{1}{dp} \quad (11)$$

$$n \propto \frac{L}{dp} \quad (12)$$

Smanjenjem veličine čestica tri puta (sa 5 μm na 1,7 μm), učinkovitost, kao i razlučivanje, porasti će tri puta. Ako duljinu kolone smanjimo npr. 3 puta uz istovremeno jednako smanjenje (3x) veličine čestica punila, u konačnici neće doći do smanjenja razlučivanja.

Također, učinkovitost i visina kromatografske krivulje (H) su obrnuto proporcionalne širini kromatografske krivulje (w):

$$n \propto \frac{1}{w^2} \quad (13)$$

$$H \propto \frac{1}{w} \quad (14)$$

Na temelju gornjih činjenica, UHPLC analizom s kolonom punjenom zrnima 3 puta manjima u odnosu na punjenje HPLC kolone, moguće je koristiti 3 puta kraće kolone, pri čemu se protok povećava 3 puta, a analiza je brža (1/9 vremena HPLC analize) uz zadržavanje razlučivanja postignutog HPLC analizom.

Korištenje čestica malog promjera zahtijeva znatno veće tlakove od onih koji se koriste kod HPLC sustava. Razlike između HPLC-a i UHPLC-a prikazane su u **tablici 4**.

Tablica 4. Usporedba svojstava HPLC i UHPLC tehnika [88]

	HPLC	UHPLC
<i>Promjer čestica punila</i>	3 - 5 μm	manje od 2 μm
<i>Tlak</i>	35 – 40 MPa	130,5 MPa
<i>Dimenzije kolone</i>	150 x 3,2 mm	150 x 2,1 mm
<i>Temperatura kolone</i>	30 °C	65 °C
<i>Injektirani volumen</i>	5 mL	2 mL

Najvažnija karakteristika UHPLC-a jest izvođenje analize pri znatno višim tlakovima nego što je bilo moguće u HPLC. Visoki tlakovi smanjuju životni vijek kolone te da bi se kolona zaštitila, injektiranje mora biti izvršeno relativno brzo i bez pulsiranja. Navedene promjene u tehnologiji instrumenta i kolona dovele su do značajnog povećanja razlučivanja, brzine i osjetljivosti tekućinske kromatografije. Primjena UHPLC-a omogućila je detekciju metabolita lijekova i napredniju separaciju [13, 80, 86-90].

2.9. SPEKTROMETRIJA MASA

Spektrometrija masa (eng. *mass spectrometry*, MS) je tehnika kemijske analize koja počiva na identifikaciji i karakterizaciji iona u plinskoj fazi prema masi (m) i naboju (z). Primjenjuje se za dobivanje podataka o masi i strukturi molekula, izotopnom omjeru atoma u uzorku, za određivanje fizikalno-kemijskih svojstava tvari i proučavanje ponašanja iona u vakuumu, te kvalitativno i kvantitativno određivanja sastava smjesa. Jedna je od važnijih tehnika u analizi tragova u uzorcima iz okoliša te se primjenjuje za detekciju, identifikaciju i kvantifikaciju molekula farmaceutika, njihovih metabolita i razgradnih produkata u okolišu. Prednost ove tehnike je niska granica dokazivanja (10^{-12} g), preciznost određivanja masa, dobra ponovljivost određivanja te mogućnost analize smjesa.

Spektrometrija masa temelji se na principu prevođenja u plinsku fazu i ionizacije molekula, zatim slijedi razdvajanje tih molekula i njihova detekcija na temelju omjera mase i naboja (m/z). Uređaj se sastoji od sustava za unošenje uzoraka, ionskog izvora, analizatora masa i detektora. Uzorci u različitim agregatnim stanjima se u spektrometar masa mogu unijeti na više načina. U ovom radu korištena je tehnika elektroraspršenja kojom se pri atmosferskom

tlaku ioni iz otopine prevode u plinsku fazu. Nakon prevođenja u plinsku fazu ioni dolaze u analizator gdje dolazi do njihovog razdvajanja na temelju omjera mase i naboja (m/z). Na kraju, ioni odlaze u detektor koji registrira njihov broj pri svakoj vrijednosti omjera mase i naboja (m/z), što rezultira stvaranjem spektra masa. Spektar masa je grafički prikaz ovisnosti relativnog intenziteta iona o njihovom omjeru m/z [13, 15, 82, 84, 91-93].

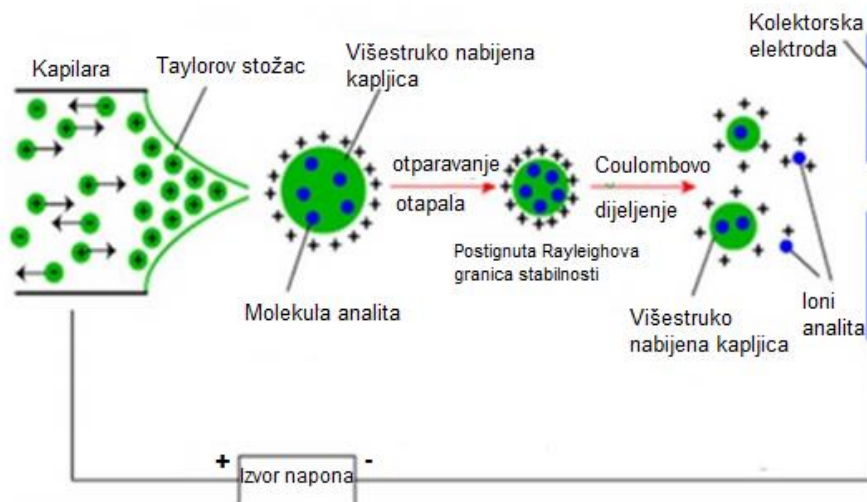
2.9.1. Ionski izvori

Glavna zadaća ionskog izvora je prevođenje analita u plinsku fazu te njegova ionizacija. Ionizacija se provodi na razini atoma (jednostavni atomski ioni) ili na molekulskoj razini (molekulski i fragmentni ioni), ovisno o količini energije koja se prenosi za vrijeme ionizacije i o svojstvima analita koji se ionizira. S obzirom na primijenjenu energiju razlikujemo „meku“ i „tvrdu“ ionizaciju. Pri „mekoj“ ionizaciji koriste se manje energije te je fragmentacija molekula zanemariva ili je nema, dok pri „tvrdoj“ ionizaciji kada se koriste velike energije ionizacije nastaje veliki broj fragmentnih iona. Za hlapljive i termički stabilne analite mogu se koristiti sljedeće tehnike ionizacije: ionizacija udarom elektrona (EI), kemijska ionizacija (CI), ionizacija fotonima (eng. *photoionization*, PhI) i ionizacija u polju (eng. *field ionization*, FI). Za nestabilne i nehlapljive uzorke najčešće se primjenjuju tehnike ionizacije raspršenjem i desorpcijom s površina: elektroraspršenjem (eng. *electrospray ionization*, ESI), djelovanjem čestica visoke energije (eng. *fast atom bombardment*, FAB;), toplinskim raspršenjem (eng. *thermospray ionization*, TSP) i laserom (eng. *laser ionization mass spectroscopy*, LIMS; eng. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI) [13, 15, 18].

2.9.1.1. Ionizacija elektroraspršenjem

Elektroraspršenje je jedan od najčešće korištenih i najblažih načina ionizacije. Najviše se koristi u vezanim sustavima LC–MS. Elektroraspršenje je način ionizacije uzorka direktno iz otopine koje omogućava analizu molekula bez obzira na veličinu i električni naboj. ESI uspijeva ionizirati i prevesti i polarne i nepolarne spojeve, kao i spojeve koji pokazuju termičku nestabilnost, u plinsku fazu što je glavni uvjet za daljnju analizu spektrometrom masa. Ionizacija započinje tako da se uzorak otopi u polarnom hlapljivom otapalu i pod

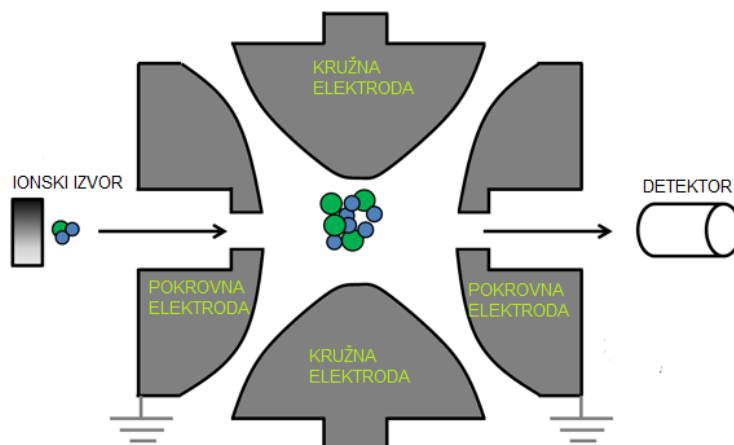
visokim tlakom tjera kroz kapilaru (**slika 18**). Metalna kapilara (igla), predstavlja elektrodu pod visokim naponom (2 – 5 kV). Primijenjeni napon može biti pozitivan ili negativan, ovisno o naboju iona analita ili pokretne faze, te uzrokuje gradijent električnog polja potreban da bi došlo do razdvajanja naboja na površini tekućine. Kada je kapilara priključena na pozitivni kraj izvora napona, pozitivno nabijeni ioni putuju prema katodi i akumuliraju se na površini tekućine. Na vršku igle se formira maglica sastavljena od niza kapljica otapala i nešto uparenog otapala. Pri kritičnoj jakosti polja, formira se tzv. Taylorov stožac u kojem se kontinuirano proizvode kapljice obogaćene pozitivno nabijenim ionima. Kada otopina koja tvori Taylorov stožac dosegne Rayleighev limit (točku pri kojoj su odbojne Coulombove sile naboja na površini jednake napetosti površine tekućine), kapljice koje sadrže višak pozitivnog ili negativnog naboja odvajaju se s vrha stošca. Kolektorska elektroda privlači tako nabijene kapljice i daje im dodatno ubrzanje. Zatim se jako nabijene kapljice provode kroz struju dušika, te na taj način otapalo isparava i kapljice se smanjuju. Nakon što se kapljice dovoljno smanje tako da se svi mogući ioni nalaze na površini kapljica, sile Coulombovog odbijanja postaju veće od sila napetosti površine i kapljice se otparavaju ili se razbiju na manje kapljice (Coulombovo dijeljenje). Postupak traje sve dok u kapljici ne ostane jedna ionizirana molekula. Ioni analita u trenutku napuštanja površine nisu u potpunosti bez otapala, nego se stvara sfera uparenog otapala. Radni protok iznosi od 5 μL do 1000 μL u minuti (optimalan protok ovisi o konstrukciji instrumenta i približno iznosi oko 50 μL), a optimalna temperatura ionizacije je iznad 100 °C. Prednost ionizacije elektroraspršenjem je stvaranje višestruko nabijenih čestica što omogućuje analizu makromolekula, ali osjetljivost znatno ovisi o pH-vrijednosti i ionskoj jakosti. ESI je nedestruktivan način ionizacije uzorka direktno iz otopine te omogućuje izravno povezivanje spektrometrije masa i tekućinske kromatografije. Glavni nedostatak ionizacije elektroraspršenjem je utjecaj matrice uzorka. Tijekom procesa ionizacije dolazi do natjecanja analita i sastojaka matrice uzorka što rezultira smanjenjem ili povećanjem ionizacije analita. Utjecaja matrice moguće je smanjiti korištenjem unutarnjeg standarda. ESI je najkorišteniji ionizacijski izvor koji se kombinira s različitim sustavima analizatora npr. HPLC-MS, te se i u ovom radu koristi kao ionski izvor [13, 18, 82, 84, 92-94].



Slika 18. Shematski prikaz ESI načina ionizacije [93]

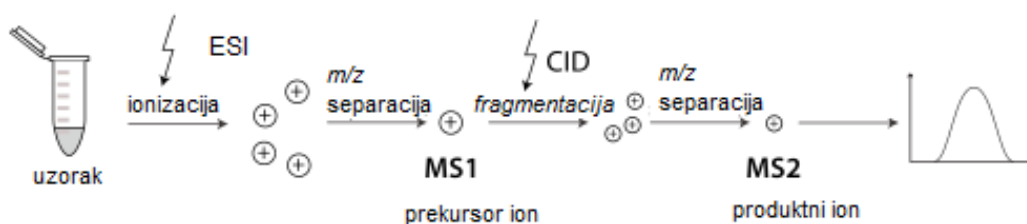
2.8.2. Analizatori masa

Analizator je dio spektrometra masa koji razdvaja nastale ione u vakuumu na temelju omjera mase i naboja, m/z . Vrste analizatora masa su analizator s mjerenjem vremena preleta (eng. *time of flight*, ToF), magnetni (sektorski) i četveropolni (eng. *quadrupole*, Q) analizator, analizator s ionskom stupicom (eng. *ion trap*, IT) i ionsko ciklotronski rezonancijski (eng. *ion cyclotron resonance*, ICR) analizator. Analizatori masa razlikuju se s obzirom na način primjene električnog polja kako bi se postiglo razdvajanje iona. Ioni nastali ESI ionizacijom najčešće se razdvajaju četveropolnim analizatorima te analizatorima ionskih stupica. *Analizatori masa s ionskom stupicom* mogu biti linearni (eng. *linear ion trap*, LIT) ili orbitalni (Orbitrap). Analizator masa s ionskom stupicom koristi oscilirajuće električno polje kako bi uhvatio ione u stupicu u dvije ili tri dimenzije. Trodimenzijski analizator masa s ionskom stupicom sastoji se od tri elektrode od kojih je jedna kružna, a zajedno čine prostor ionske stupice. Ioni u tom prostoru bivaju uhvaćeni u stupicu elektromagnetskog polja, nakon čega slijedi izbacivanje na osnovu njihovih masa (**slika 19**) [15]. Dvodimenzijski analizator masa sličan je četveropolnom analizatoru koji se, također, sastoji od četiriju elektroda. Orbitrap analizatori masa koriste orbitalno hvatanje iona u stalnom električnom polju, u kojemu ioni kruže oko središnje elektrode i osciliraju u smjeru središnje osi elektrode. Frekvencija oscilacije ovisi o omjeru m/z . Prednosti ovakvih analizatora masa su dobra osjetljivost i razlučivanje te mogućnost analiza do MS^n [13, 15, 84, 92, 93].



Slika 19. Trodimenzijski analizator masa s ionskom stupicom [15]

Spregnuta spektrometrija masa (MS/MS, MS/MS/MS, MSⁿ) je proces u kojemu izbor masa slijedi jedan za drugim. Analizatori u MS/MS analizi mogu biti spregnuti prostorno (Q i TOF) ili vremenski (IT i Orbitrap). Prostorno spregnuti uređaji zahtijevaju odvojene analizatore masa u svakom stupnju MS/MS analiza. Vremenski spregnuti analizatori sve stupnjeve MS/MS analize provode u istom analizatoru, ali vremenski odvojeno. Ioni nastali u ionskom izvoru ulaze u analizator masa, u kojemu se u prvom stupnju izdvaja željeni ion (ion prethodnik). Kako bi se dobilo više fragmentnih iona potrebno je provesti raspad prouzročen sudarom (eng. *collision induced dissociation*, CID). Inertni plin se uvodi u analizator, ioni se ubrzavaju određenim naponom pri čemu se sudaraju s molekulama plina dajući fragmentne ione. U drugom stupnju, nakon raspada prouzročnog sudarom, nastaju ioni produkti odabranog iona prethodnika kojima se tada određuju omjeri m/z (**slika 20**) [13, 15, 92, 93].



Slika 20. Shematski prikaz spregnute spektrometrije masa [95].

Pri kvantitativnom određivanju najčešće se koriste dva načina praćenja fragmentnih iona: praćenje jedne odabrane reakcije (eng. *single reaction monitoring*, SRM) ili više odabranih reakcija (eng. *multiple reaction monitoring*, MRM) [13].

Spajanjem HPLC uređaja i MS analizatora masa omogućena je kvantitativna i kvalitativna analiza velikog broja spojeva, kao što su termički nestabilni spojevi s visokom molekulskom masom. HPLC-MS znatno ovisi o prethodnoj pripremi uzoraka. Uređaj je vrlo osjetljiv i bilo kakve nečistoće u uzorku mogu izazvati komplikacije prilikom analize. Povezivanje tekućinske kromatografije i spektrometrije masa ograničava izbor otapala u HPLC-u na hlapljive pufere i organske aditive radi izbjegavanja taloženja soli u spektrometru masa. Zbog toga su natrijevi ili kalijeve fosfatni puferi, koji su često korišteni kao otapala u HPLC-u, zamijenjeni amonijevim formijatom ili acetatima. Prednosti HPLC-MS sustava su niska granica dokazivanja, dobra ponovljivost i mogućnost odvajanja interferencija od željenog analita [12, 13, 18, 82].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom izvođenja eksperimentalnog rada, njihove molekulske formule, čistoća te proizvođači prikazani su u **tablici 5**.

Tablica 5. Popis korištenih kemikalija

NAZIV KEMIKALIJE	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
<i>Acetonitril</i>	CH ₃ CN	HPLC/MS	Fisher Chemical, UK
<i>Amonij formijat</i>	CH ₅ NO ₂	HPLC/MS	Fisher Chemical, UK
<i>Askorbinska kiselina</i>	C ₆ H ₈ O ₆	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
<i>Limunska kiselina</i>	C ₆ H ₈ O ₇	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
<i>Metanol</i>	CH ₃ OH	p.a.	Kemika, Hrvatska
<i>Metanol</i>	CH ₃ OH	HPLC/MS	Fisher Chemical, UK
<i>Mravlja kiselina</i>	HCOOH	HPLC/MS	Fisher Chemical, UK
<i>Natrijev hidrogenfosfat</i>	Na ₂ HPO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
<i>Natrijev klorid</i>	NaCl	p.a.	Lachner, Češka
<i>Saharoza</i>	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska

3.1.2. Farmaceutici

U eksperimentalnom radu, provedena su ispitivanja fotolitičke razgradnje 7 farmaceutika (čistoće > 98 %, Veterina) iz skupine antibiotika: enrofloksacin, eritromicin, trimetoprim, oksitetraciklin, amoksicilin, sulfametoksazol i vankomicin (Sigma-Aldrich, čistoće LC/MS).

U **tablici 6** prikazane su njihove fizikalno-kemijske karakteristike. Radi pouzdane kvantitativne i kvalitativne kromatografske analize korištena su dva unutarnja standarda, njihova fizikalno-kemijska svojstva prikazana su u **tablici 7**.

Tablica 6. Fizikalno - kemijska svojstva ispitivanih antibiotika

Antibiotik	Grupa antibiotika	Molekulska formula	Molekulska masa, g/mol	CAS broj	p <i>K</i> _k [13, 96]
<i>Amoksicilin</i>	β-laktam	C ₁₆ H ₁₉ N ₃ O ₅ S	365,4	26787-78-0	3,32; 7,43 [100]
<i>Eritromicin</i>	makrolid	C ₃₇ H ₆₇ NO ₁₃	733,94	114-07-8	12,44; 8,38 [98]
<i>Enrofloksacin</i>	fluorokinolon	C ₁₉ H ₂₂ FN ₃ O ₃	359,39	93106-60-6	5,86; 8,24
<i>Oksitetraciklin</i>	tetraciklin	C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₉	460,434	79-57-22058-46-0	0,24; 7,75 [97]
<i>Sulfametoksazol</i>	sulfonamid	C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S	253,28	723-46-6	1,83; 5,57
<i>Trimetoprim</i>	sinergist sulfonamida	C ₁₄ H ₁₈ N ₄ O ₃	290,32	738-70-5	3,23; 6,76
<i>Vankomicin</i>	glikopeptid	C ₆₆ H ₇₅ Cl ₂ N ₉ O ₂₄	1449,3	1404-90-6	2,99; 9,93 [99]

Tablica 7. Fizikalno-kemijska svojstva korištenih unutarnjih standarada

Farmaceutik	Grupa farmaceutika	Molekulska formula	Molekulska masa, g/mol	CAS - broj	p <i>K</i> _t
<i>Febantel</i>	antihelminetik	C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S	446,48	58306-30-2	7,71; 4,79; 6,75
<i>Sulfametazin</i>	antibiotik	C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S	278,33	57-68-1	2,28; 7,42

3.1.3. UV–filtri

U ovom radu ispitivan je utjecaj UV–filtara na fotolitičku razgradnju antibiotika. U **tablici 8** prikazane su njihove fizikalno-kemijske karakteristike. UV-filtri korišteni u ovom radu su HPLC/MS čistoće (Sigma-Aldrich, Missouri, SAD).

Tablica 8. Fizikalno-kemijska svojstva korištenih UV–filtara [9, 101]

<i>Ime po IUPAC-u</i>	INCI* ime	CAS - broj	Molekulska masa, g/mol	Molekulska formula	$\log K_{ov}; S_v$ (mg/L, 25 °C)	λ_{max} , nm
2-hidroksi-4-metoksi-benzofenon (BP-3)	Benzofenon-3	131-57-7	228,25	C ₁₄ H ₁₂ O ₃	3,52; 68,56	290
5-benzoil-4-hidroksi-2-metoksi-benzensulfonska kiselina (BP-4)	Benzofenon-4	4065-45-6	308,31	C ₁₄ H ₁₂ O ₆ S	0,37; 2,5·10 ⁵	285
2-etilheksil-4-metoksicinamat, (EHMC)	Etilheksil metoksicinamat	5466-77-3	290,41	C ₁₈ H ₂₆ O ₃	5,80; 0,15	305

* eng. *international nomenclature for cosmetic ingredient* (INCI)

3.1.4. Uzorci vode

Za praćenje brzine fotolitičke razgradnje antibiotika korišteni su različiti uzorci vode tj. različite matrice:

- *ultračista voda* (MilliQ), izmjerena pH – vrijednost iznosi 6,98
- *izvorska voda* - uzorak izvorske vode uzorkovan je 20. listopada 2016. u 19:45 h na izvoru Vrelo u Fužinama (Republika Hrvatska) i profiltriran je prije provođenja eksperimenata. Pri 25 °C pH-vrijednost izvorske vode iznosila je 5,07, a električna provodnost izvorske vode iznosila je 35,09 μ S/cm. Izvorska voda sadrži 1,7 mg/L Cl⁻

iona, 7,8 mg/L NO_3^- iona i 1,9 mg/L SO_4^{2-} iona. TOC (*eng. total organic carbon*) izražen kao NPOC (*eng. non-purgeable organic carbon*) iznosi 0,2662 mg/L.

- *sintetska otpadna voda priređena je sukladno proceduri opisanoj u radu [127].* Detaljnije: Vodovodna voda uzeta iz slavine profiltrirana je kroz Millipore Millex – HV Hydrophilic PVDF filter (veličina pora 0,45 μm). Zatim je u vodi otopljeno: 1000 mg/L natrijevog klorida, 230 mg/L natrijevog hidrogenfosfata, 50 mg/L limunske kiseline, 30 mg/L askorbinske kiseline i 100 mg/L saharoze. pH-vrijednost pripremljene sintetske otpadne vode iznosila je 6,10. Svojstva vodovodne vode korištene za pripravu sintetske otpadne vode prikazana su u **tablici 9**.

Tablica 9. Svojstva vodovodne vode

	Vodovodna voda
<i>pH-vrijednost</i>	7,01
<i>Električna provodnost, $\mu\text{S}/\text{cm}$</i>	597
<i>Cl, mg/L</i>	8,53
<i>NO_3^-, mg/L</i>	2,93
<i>SO_4^{2-}, mg/L</i>	7,31
<i>DOC, mg/L</i>	0,547

3.2. INSTRUMENTI

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument koji služi za precizno određivanje mase tvari. Ni jednu kvantitativnu kemijsku analizu nije moguće napraviti bez uporabe vage, jer uvijek treba odvagati uzorak za analizu i potrebne količine reagensa za pripravu otopina. Točnost rezultata analize ovisi o ispravnosti analitičke vage, te o njejoj preciznosti. Tijekom rada korištena je analitička vaga AB104 marke Mettler Toledo (**slika 21**).

Specifikacije vage:

- napon: 8 – 14 V
- masa: 0,1 mg – 101 g
- frekvencija: 50 – 60 Hz



Slika 21. Analitička vaga AB104 Mettler Toledo.

3.2.2. pH–metar

pH-vrijednost je jedna od najvažnijih parametara koji se mjere u laboratorijima. pH-metar je uređaj za potenciometrijsko određivanje pH-vrijednosti. Sastoji se od mjerne elektrode koja se uranja u ispitni tekući uzorak te generira napon ($59 \text{ mV} / \text{pH}$) ovisan o pH–vrijednosti, odnosno napon ovisan o koncentraciji vodikovih iona. Izmjerena pH-vrijednost donosi informaciju o koncentraciji vodikovih iona i time se saznaje je li vodena otopina neutralna ($\text{pH} = 7$), kisela (vrijednosti niže od 7) ili bazična (vrijednosti iznad 7). Vrijednosti iznad 14,0 ili ispod 0,0 moguće su jedino u slučajevima kada su otopine visoko lužnate ili visoko kisele. pH-metar je potrebno učestalo umjeravati s puferskim otopinama poznatih pH–vrijednosti (pH 4 i 7).

Za određivanje pH-vrijednosti različitih uzoraka voda korišten je pH-metar S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) prikazan na **slici 22**. Specifikacije pH–metra: raspon vrijednosti 0 - 14, rezolucija 0,01 pH te temperaturni raspon 5 – 105 °C.



Slika 22. pH - metar S20 SevenEasy

3.3.3. Spektrofotometar

Spektrofotometar je uređaj za analizu spektra elektromagnetskog zračenja. Svjetlost iz lampe prolazi kroz monokromator, koji „izuzima“ određenu valnu duljinu svjetlosti iz kontinuiranog spektra. Svjetlost tada prolazi kroz ispitni uzorak i nakon njega se njezin intenzitet mjeri pomoću fotodiode ili drugog svjetlosnog senzora, te se izračunava njezina emisija. Bilježenjem intenziteta zračenja koje je uzorak apsorbirao, propustio ili reflektirao ovisno o valnoj duljini nastaje spektar. Dvoznačni spektrofotometri imaju dva puta svjetlosti i istovremeno mogu primiti dva uzorka: ispitni i referentni. Karakterizira ga velika brzina snimanja spektara, visoka točnost i razlučivanje. Instrument se može koristiti za snimanje spektara apsorpcijom ili propusnošću u intervalu valnih duljina od 190 do 1100 nm.

U ovom radu, za snimanje apsorpcijski spektara u području valnih duljina 200 - 800 nm, korišten je dvoznačni UV/VIS spektrofotometar LAMBDA 35, Perkin Elmer (Waltham, Massachusetts, SAD) (**slika 23**). Svaki antibiotik sniman je zasebno u tri različite matrice, dok su UV-filtri snimani u smjesi. Zahvaljujući dobivenim spektrima mogu se pratiti eventualne promjene do kojih dolazi promjenom matrice.



Slika 23. Spektrofotometar Perkin Elmer Lambda 35

3.3.4. Uređaj za filtraciju

Za filtraciju izvorske vode korišten je PALL Life Sciences uređaj za filtraciju (Washington, SAD) (**slika 24**) uz polipropilenske membranske filtre (GH Polypro, 47 mm, 0,45 μm). Izvorska voda profiltrirana je prije provođenja eksperimenata kako bi se uklonile suspendirane čestice.



Slika 24. Pall Life Science uređaj za filtraciju

3.3.5. "Millipore" sustav

Jedna od matrica koja se koristi u ovom radu je ultračista voda (MilliQ). Pripremljena je pomoću Millipore Simplicity UV sustava (Millipore, Francuska), prikazanog na **slici 25**.



Slika 25. Millipore Simplicity UV sustav

3.3.6. Suntest CPS+

Za osvjetljivanje otopina antibiotika umjetnim Sunčevim zračenjem i za provođenje fotolitičke razgradnje korišten je Suntest CPS+ uređaj (Atlas, Linsengericht, Njemačka) (**slika 26**). Umjetno Sunčevo zračenje, u rasponu valnih duljina od 300 – 800 nm, osvjetljava uzorke što u konačnici potiče fotolitičku razgradnju. Sustav zračenja čine optički filtri, ksenonova lampa koja je izvor umjetnog Sunčeva zračenja i ogledala. Parametri koji se mogu ugađati su temperatura unutar ispitne komore, intenzitet zračenja i vrijeme izlaganja uzorka umjetnom Sunčevu zračenju.



Slika 26. Suntest CPS+, Atlas

3.3.7. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa

Analiza uzoraka provedena je pomoću amaZon ETD spektrometra masa s ionskom stupicom (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka) povezanim s Ultimate 3000 RSLCnano tekućinskim kromatografom ultravisoke djelotvornosti (Dionex, Amsterdam, Nizozemska) (slika 27). Za praćenje fotolitičke razgradnje antibiotika korištena je Acquity UPLC HSS T3 kromatografska kolona (Waters, Wexford, Irska), dimenzija 50 mm x 2,1 mm i promjera čestica punila 1,8 μm (silikagel). Ionizacija uzorka provedena je elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada (ESI+) pri čemu nastaje molekularni ion $[M+H_n]^{n+}$.



Slika 27. AmaZon ETD spektrometra masa s ionskom stupicom (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka) povezanim s Ultimate 3000 RSLCnano tekućinskim kromatografom ultravisoke djelotvornosti (Dionex, Amsterdam, Nizozemska)

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljeni su pomoću računalnog programa Compass (Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Njemačka).

3.2. METODA RADA

3.2.1. Priprema standardnih otopina

Farmaceutici

Pripremljene su temeljne standardne otopine (TSO) pojedinačnih analita. TSO eritromicina, sulfametoksazola, oksitetraciklina, vankomicina i amoksicilina pripremljene su vaganjem standarda na analitičkoj vagi (približno 0,01 g) koji je, zatim, kvantitativno prenesen u odmjenu tikvicu od 10 mL i otopljen u metanolu. Masena koncentracija ovih antibiotika iznosila je 1000 mg/L. Temeljne standardne otopine enrofloksacina i trimetoprima, masene koncentracije 10 mg/L, pripravljene su otapanjem izvagane mase (približno 0,001 g) pojedinog antibiotika u metanolu, u tikvici od 100 mL. Temeljne standardne otopine unutarnjih standarda pripravljene su na identičan način te je njihova masena koncentracija, također iznosila 10 mg/L.

Budući da su u prirodnim vodama farmaceutici prisutni u smjesi, fotolitička razgradnja ispitana je sa smjesom farmaceutika. Standardna otopina smjese (SOS) antibiotika pripravljena je uzimanjem određenog alikvota temeljne standardne otopine pojedinog antibiotika, stavljanjem u tikvicu od 25 mL i nadopunjavanjem do oznake s ultračistom vodom, izvorskom ili sintetskom otpadnom vodom, ovisno o eksperimentu. Masena koncentracija pojedinog farmaceutika u SOS iznosila je 2,5 mg/L. Iz SOS pripravljene su otopine koje su izlagane umjetnom Sunčevom zračenju. Prije provođenja eksperimenata fotolitičke razgradnje pripravljene su otopine za umjernu krivulju, koncentracija 30, 50, 80, 110, 140, 170, 200, 250, 300 i 400 µg/L (koncentracija svakog pojedinog antibiotika u smjesi). Pripremljene su u vialama uzimanjem odgovarajućeg alikvota SOS te nadopunjavanjem s ultračistom vodom, izvorskom ili sintetskom otpadnom vodom, ovisno o eksperimentu. Konačan volumen otopina za umjernu krivulju iznosi 1 mL. U te otopine dodani su unutarnji standardi, febantel i sulfametazin. Koncentracija febantela u otopinama iznosi 100 µg/L, a sulfametazina 200 µg/L. U SOS nalaze se svi antibiotici osim vankomicina. Iz temeljne standardne otopine vankomicina pripravljene su otopine za umjernu krivulju, koncentracija 30, 50, 100, 200, 300, 400 i 500 µg/L, daljnjim

razrjeđivanjem s različitim uzorcima voda. Temeljne i radne standardne otopine čuvane su u mraku na 4 °C.

UV – filtri

Temeljne standardne otopine UV-filtara, koncentracije 1000 mg/L, pripravljene su otapanjem točno izvagane mase pojedinog UV-filtra (BP-3 i BP-4) u metanolu. EHMC je vrlo viskozna tekućina te je temeljna standardna otopina pripravljena uzimanjem određenog alikvota (0,01 mL) u tikvicu od 10 mL i nadopunjavanjem do oznake s metanolom.

3.2.2. Fotolitička razgradnja farmaceutika

U ovom radu ispitano je ponašanje antibiotika (eritromicina, vankomicina, amoksicilina, trimetoprima, enrofloksacina, sulfametoksazola i okistetraciklina) izloženih djelovanju umjetnog Sunčeva zračenja u ultračistoj, izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi. Također, ispitan je utjecaj UV-filtara na brzina fotolitičke razgradnje antibiotika.

3.2.2.1. Priprava otopina za fotolitičku razgradnju

Otopine antibiotika korištene za eksperimente fotolize, pripravljene su uzimanjem odgovarajućeg alikvota SOS i stavljanjem izravno u kvarcne posudice. Kvarcne posudice su nadopunjene s različitim uzorcima voda, ovisno o eksperimentu. Konačani volumen otopina za fotolitičku razgradnju iznosio je 30 mL. Preliminarna ispitivanja provedena su s različitim koncentracijama antibiotika (100, 200, 300 i 400 µg/L) te je izabrana masena koncentracija od 300 µg/L. Pri toj koncentraciji detektirani su svi antibiotici i njihov intenzitet je jasno vidljiv na kromatogramu. Također, tako niska koncentracija odabrana je zbog simulacije realnih uvjeta. U izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi detekcija enrofloksacina, amoksicilina i oksitetraciklina bila je otežana te je njihova koncentracija povećana na 600 µg/L. Otežana detekcija pripisuje se sastavu matrice uzorka vode.

Za praćenje brzine fotolitičke razgradnje pojedinog antibiotika pripravljene su otopine s dodatkom smjese UV-filtara. U otopinama izloženim umjetnom Sunčevom zračenju koncentracija svakog pojedinog UV-filtra iznosila je 300 µg/L.

Otopine vankomicina korištene za eksperimente fotolize pripremljene su uzimanjem određenog alikvota temeljne standardne otopine vankomicina, direktno u kvarcne posudice te su nadopunjavane s različitim uzorcima voda. Koncentracija otopine vankomicina iznosila je 500 µg/L, kao i koncentracija dodanih UV-filtara. Vankomicin je izložen umjetnom Sunčevom zračenju zasebno, ne u smjesi antibiotika.

3.2.2.2. Osvjetljivanje otopina umjetnim Sunčevim zračenjem

Za provođenje eksperimenata korišteno je 30 mL otopine antibiotika smještenih u kvarcne posudice. Fotolitička razgradnja ispitana je s tri različite matrice, s dodatkom i bez dodatka UV-filtara. Za provođenje eksperimenta fotolitičke razgradnje korišten je uređaj Suntest CPS+ opremljen ksenonskom lampom kao izvorom umjetnog Sunčeva zračenja, u rasponu valnih duljina 300 – 800 nm. Tijekom eksperimenata intenzitet lampe održavan je na 250 W/m², a temperatura na (25±2) °C. Za dobivanje što pouzdanijih rezultata, pripremljene su tri otopine (300 µg/L s ili bez UV-filtara) kao i tri kontrolna uzorka, koja se istovremeno podvrgavaju fotolitičkoj razgradnji. Kontrolni uzorci imaju isti sastav kao i otopine namijenjene za ispitivanje fotolize, ali su zaštićeni aluminijskom folijom od utjecaja zračenja. Kontrolni uzorci korišteni su kako bi se potvrdilo da je razgradnja farmaceutika posljedica djelovanja svjetlosti, a ne temperature ili hidrolize. Tijekom eksperimenta uzimani su alikvoti (200 µL) u određenim vremenskim intervalima: 0, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120, 150, 200 i 300 min. Kontrolni uzorci su uzimani samo pri vremenima: 0, 20, 60, 200 i 300 min. Prije svake serije mjerenja ili zbog promjene matrice ponovno je pripremljena otopina za umjernu krivulju. Uzeti alikvoti otopina antibiotika analizirani su UHPLC-MS/MS-om kako bi se utvrdila brzina fotolitičke razgradnje.

3.2.3. Analiza spregnutim sustavom tekućinska kromatografija ultravisoke djelotvornosti - spektrometar masa (UHPLC-MS)

Identifikacija i kvantifikacija antibiotika u različitim matricama provedena je tekućinskom kromatografijom ultravisoke djelotvornosti vezanom s trodimenzionalnim, četveropolnim spektrometrom masa s ionskom stupicom, uz ionizaciju elektroraspršenjem u pozitivnom načinu rada. Uzorci su injektirani (volumen injektiranja je bio 20 µL) na kromatografsku kolonu Acquity UPLC HSS T3 (Waters, Wexford, Irska), dimenzija 50 x 2,1 mm, promjera

čestica unutar kolone 1,8 μm , na sobnoj temperaturi. Prije početka eksperimenta kolona je kondicionirana na početne uvjete gradijenta u vremenu od 30 min. Razdvajanje antibiotika postignuto je gradijentnim eluiranjem, dok je izokratno eluiranje korišteno samo za čišćenje kolone. Pokretna faza sastojala se od binarne smjese eluensa A, kao vodene faze (amonijev formijat, 20 mM, pH = 4,1) i eluensa B, kao organske faze (metanol). Gradijent pokretne faze korišten u analizi šest antibiotika i vankomicina prikazan je u **tablicama 10 i 11**. Protok pokretne faze iznosio je 200 $\mu\text{L}/\text{min}$.

Tablica 10. Gradijent pokretne faze korišten za analizu šest antibiotika (enrofloksacina, amksicilina, eritromicina, oksitetraciklina, sulfametoksazola i trimetoprima) tekućinskom kromatografijom

Vrijeme, min	Organska faza (B), %
0,0	30,0
0,5	30,0
7,0	95,0
9,0	95,0
9,0	30,0
11,0	30,0

Tablica 11. Gradijent pokretne faze korišten za analizu vankomicina tekućinskom kromatografijom

Vrijeme, min	Organska faza (B), %
0,0	10,0
6,0	50,0
8,0	80,0
8,0	80,0
9,0	10,0
9,0	10,0

Sve analize provedene su pri istim uvjetima ionskoga izvora spektrometra masa:

- ❖ temperatura plina, 200 °C
- ❖ protok plina, 50 L/min

- ❖ napon kapilare, - 4,5 kV
- ❖ tlak raspršivača plina, 10 psi

Uzorci su analizirani u rasponu omjera mase i naboja (m/z) od 50 do 800 Da. Nakon odabira molekuskog iona, u drugom stupnju, nastaju ioni produkti odabranog iona prethodnika kojima se tada određuju omjeri m/z . Analizirani antibiotici identificirani su na temelju spektara masa i vremena zadržavanja na kromatografskoj koloni. Kvantitativna analiza provedena je očitavanjem površine (u nekim slučajevima i visine) ispod odgovarajuće kromatografske krivulje za svaki određeni antibiotik.

4. REZULTATI I RASPRAVA

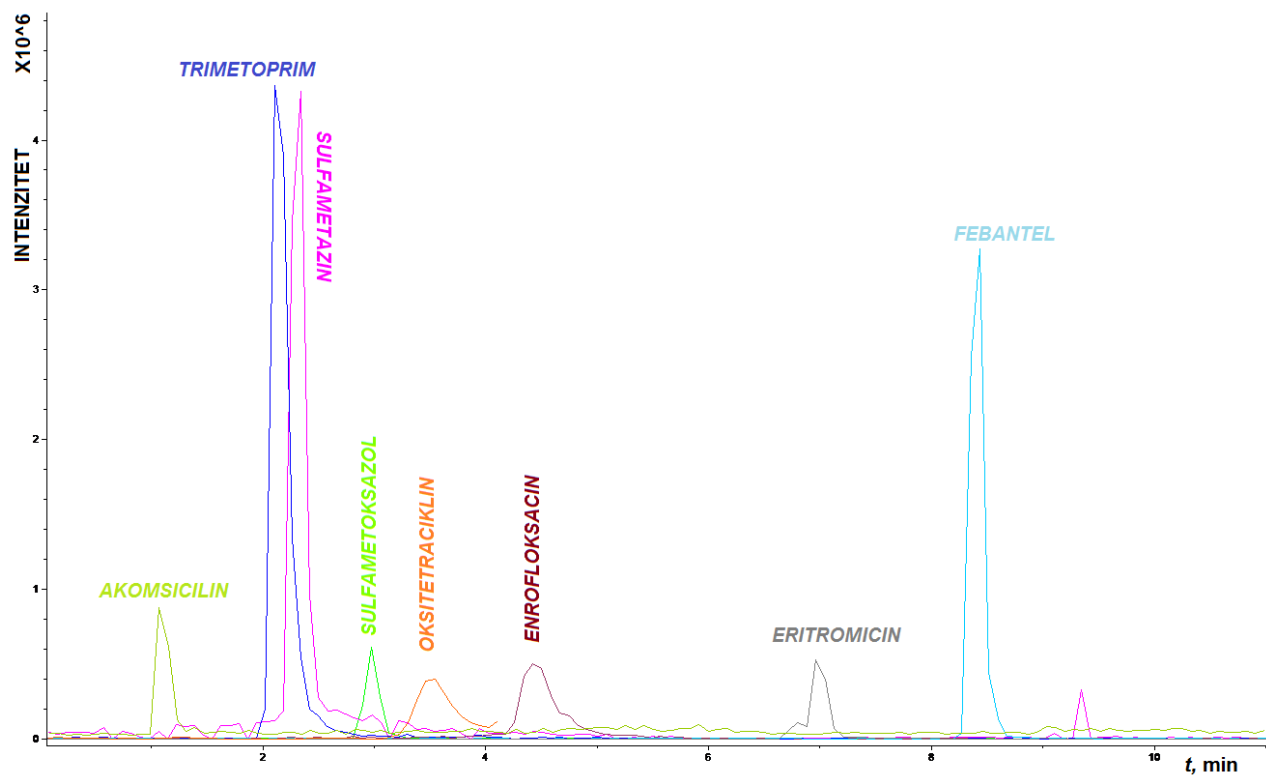
Zabrinutost oko antibiotika raste zbog njihovog neprestanog ispuštanja u okoliš. Njihova prisutnost detektirana je i u tlu, sedimentima, površinskim i podzemnim vodama. Iako su u okolišu otkriveni u niskim koncentracijama, ne znači da ne predstavljaju značajan rizik. Osnovna karakteristika farmaceutika je da oni ne moraju biti postojani u okolišu da bi negativno utjecali na njega budući da se kontinuirano unose. Farmaceutici mogu utjecati na kvalitetu vode, potencijalno ugroziti izvor pitke vode, ekosustav i ljudsko zdravlje [13]. Kako se radi o biološki aktivnim spojevima, koji su razvijeni da izazivaju biološke učinke pri vrlo niskim koncentracijama, dovoljni su tragovi farmaceutskih preparata za nepoželjno djelovanje na vodene ekosustave. Problemi vezani uz prisutnost antibiotika u okolišu uključuju poremećaje fizioloških procesa i reproduktivne funkcije organizma, razvoj rezistentnih bakterija te povećanje toksičnosti nekih farmaceutski aktivnih supstanci [7]. Dolaskom u okoliš antibiotici mogu biti podvrgnuti biotičkim i abiotičkim procesima razgradnje. Ponekad tijekom razgradnje mogu nastati spojevi koji su toksičniji i stabilniji od polaznog spoja te mogu imati pojačane negativne posljedice za ekosustav i hranidbeni lanac. Uslijed navedenog od primarne važnosti je praćenje njihovog ponašanja u okolišu. Fotoliza jest abiotički proces za koji se smatra da može značajno utjecati na smanjenje koncentracije antibiotika u okolišu. Stoga je cilj ovog rada ispitati proces fotolitičke razgradnje sedam antibiotika iz sedam različitih skupina u različitim uzorcima voda.

Posljednjih nekoliko desetljeća povećala se svijest o negativnom djelovanju UV–zračenja, što je rezultiralo povećanoj proizvodnji i upotrebi UV–filtra. UV–filtri su detektirani u kanalizacijskim vodama, mulju, sedimentima i tlu. Ispitana je razgradnja antibiotika u prisutnosti UV–filtara koji se, također, u velikim količinama ispuštaju u okoliš.

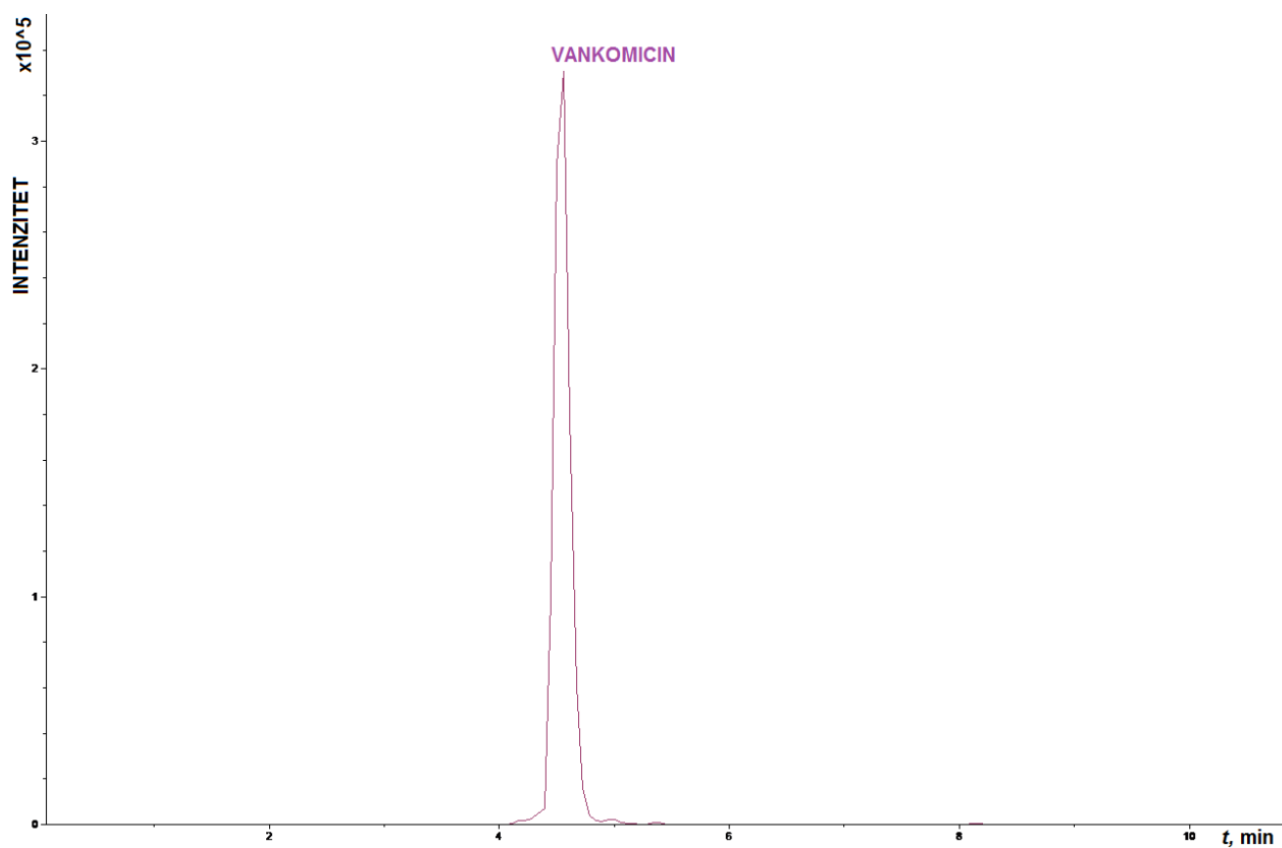
Za praćenje prisutnosti antibiotika u okolišu potrebno je koristiti metode kojima se postižu niske granice dokazivanja i kvantifikacije. U tu svrhu razvijena je UHPLC-MS/MS metoda za kvantitativno određivanje sedam farmaceutika iz skupine antibiotika. Prilikom razvoja metode optimiran je niz kromatografskih uvjeta kako bi postigli željeno razlučivanje, te uvjeti na spektrometru masa s ciljem postizanja što boljeg odziva za svaki antibiotik. Sastavni dio razvoja metode je validacija.

4.1. OPTIMIZACIJA KROMATOGRAFSKIH UVJETA

Kromatografsko određivanje antibiotika provedeno je na koloni Acquity UPLC HSS T3, dimenzija 50 x 2,1 mm, promjera čestica unutar kolone 1,8 μm . Kolona je punjena silikagelom čija veličina pora iznosi 100 Å. Na koloni Acquity UPLC HSS T3 postignuto je zadovoljavajuće razdvajanje svakog pika antibiotika te nije bilo potrebe za promjenom kromatografskih kolona. Razvoj metode tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti podrazumijevao je optimizaciju odjeljivanja ispitivanih antibiotika promjenom sastava pokretne faze. U prvom nizu mjerenja pokretna faza sastojala se od binarne smjese eluensa A, kao vodene faze (98 % vode i 2 % acetonitrila) i eluensa B, kao organske faze (98 % acetonitrila i 2 % vode). Takav sastav pokretne faze nije pokazivao zadovoljavajuće kromatografsko odjeljivanje antibiotika te je acetonitril zamijenjen metanolom, s kojim je postignuto adekvatno odjeljivanje svih antibiotika. Kao vodena faza izabran je amonijev formijat (20 mM, pH = 4,1). Na odjeljivanje antibiotika utječe i protok pri čemu je kao optimalan izabran protok od 200 $\mu\text{L}/\text{min}$. Volumen injektiranja tijekom svih analiza iznosio je 20 μL . Odjeljivanje na navedenoj koloni nastojalo se postići gradijentnim eluiranjem. Ispitivanja su provedena s gradijentima od 5 – 95 % eluensa B te je izabrani udio organske faze iznosio 30 – 80 % jer je pri tim vrijednostima ostvareno najbolje odjeljivanja kromatografskih krivulja. Mijenjala se i dužina trajanja kromatografske metode, od 10 – 20 min. Skraćivanjem vremena analize želi se postići najbolji omjer između trajanja same analize i razdvajanja antibiotika. Odabrano vrijeme iznosilo je 11 min. Pri navedenim uvjetima snimljeni su kromatogrami (**slika 28 i slika 29**). Tijekom postupka optimiranja kromatografskog odjeljivanja korištena je otopina u kojoj je koncentracija ispitivanih antibiotika iznosila 1 mg/L (SOS koja ne sadrži vankomicin). Budući da su odzivi nekih antibiotika poput enrofloksacina, bili manji u usporedbi s ostalim antibioticima, koncentracija SOS povećana je na 2,5 mg/L, te su daljnja ispitivanja rađena koristeći tu koncentraciju SOS. Iz te otopine pripremljene su otopine za umjernu krivulju 5, 10, 30, 50, 80, 100, 150, 200, 250, 300, 350 i 400 $\mu\text{g}/\text{L}$. Za praćenje fotolitičke razgradnje korištena je otopina koncentracije 300 $\mu\text{g}/\text{L}$. Vankomicin je analiziran pri istim uvjetima, ali je korištena otopina vankomicina koncentracije 500 $\mu\text{g}/\text{L}$.



Slika 28. Kromatogrami šest antibiotika



Slika 29. Kromatogram vankomicina

4.2. OPTIMIZACIJA UVJETA RADA NA SPEKTROMETRU MASA

S obzirom na složenost uzoraka vode i niske koncentracije u kojima se antibiotici detektiraju u okolišu, izabran je MRM način rada instrumenta koji omogućava praćenje više odabranih reakcija. Dokazivanje farmaceutika provedeno je s trodimenzionalnim, četveropolnim spektrometrom masa s ionskom stupicom uz ionizaciju elektroraspršenjem. Pri ionizaciji elektroraspršenjem, ovisno o pozitivnom ili negativnom načinu rada, uglavnom nastaju jednostruko ili višestruko protonirani odnosno deprotonirani molekularni ioni $[M+H_n]^{n+}$ ili $[M-H_n]^{n-}$. Kako bi se postigli što veći odzivi ispitivanih antibiotika potrebno je optimirati sudarnu ćeliju i ionski izvor za svaki pojedini farmaceutik. Ispitivani su različiti naponi kapilare u vrijednosti od 2000 do 5000 V. Optimalan napon kapilare, pri kojem nije dolazilo do raspada molekularnog iona u ionskom izvoru, iznosio je 4500 V. Sve analize provedene su pri istim uvjetima ionskoga izvora spektrometra masa: temperatura plina, 200 °C; protok plina, 50 L/min; napon kapilare, 4,5 kV; tlak raspršivača plina, 10 psi. Obzirom da svi ispitivani antibiotici posjeduju bazične funkcionalne skupine koje su protonirane pri pH-vrijednosti mobilne faze (4,1) odabran je pozitivan način ionizacije. Kako bi se postigla optimalna fragmentacija molekularnih iona u smislu intenziteta i broja fragmenata optimiran je napon sudarne ćelije te amplituda fragmentacije. Ispitivani naponi kretali su se od 80 do 250 V. Nakon ionizacije uslijedila je fragmentacija odabranih $[M+H_n]^{n+}$ molekularnih iona u sudarnoj ćeliji uz amplitudu fragmentacije (energija sraza) u rasponu od 0,1 – 1. Korišteni naponi i amplitude sudarne ćelije prikazane su **tablici 12**. U ovom radu za potrebe kvantitativnog određivanja korišten je najintenzivniji fragmentni ion, dok je za potrebe dokazivanja korišten cjelokupni MS/MS spektar. Svi navedeni parametri korišteni su u MRM načinu rada instrumenta pri Ultra SCAN brzini pretraživanja (32,500 m/z po sekundi). Praćene tranzicije u MRM načinu rada prikazane su u **tablici 12**.

MS/MS spektri antibiotika i unutarnjih standarda nalaze se u prilog (**slika P.1-9**).

Tablica 12. Ionske tranzicije korištene za kvantifikaciju i antibiotika, uz kromatografska vremena zadržavanja

Antibiotik	t_R , min	$[M+H_n]^{n+}$	Fragmentni ion	Amplituda fragmentacije	Napon sudarne ćelije, V
Amoksisilin	1,1	366,1	349,0	0,30	100
Enrofloksacin	4	360,2	316,1	0,70	100
Eritromicin	7	734,5	576,3	0,70	200
<i>Febantel</i>	8,4	447,1	415,1	0,60	130
Oksitetraciklin	3,4	461,2	443,1	0,30	100
<i>Sulfametazin</i>	2,4	278,9	204,0	0,60	100
Sulfametoksazol	3	254,1	156,6	0,70	80
Trimetoprim	2,1	291,1	230,0	0,70	100
Vankomicin	4,6	724,7; $z = 2$	1305,3	0,25	250

4.3. VALIDACIJA

Nakon optimizacije kromatografskih uvjeta i optimizacije uvjeta rada na spektrometru masa za smjesu šest antibiotika i vankomicina, razvijena metoda je validirana. Za validaciju su korišteni standardi pripremljeni u izvorskoj, ultračistoj i sintetskoj otpadnoj vodi te su određene izvedbene značajke: linearnost i granice kvantifikacije.

4.3.1. Linearnost

Za određivanje linearnosti potrebno je provesti umjerni postupak. Svrha samog umjeravanja je ukloniti ili minimalizirati pogrešku mjernog sustava. Rezultat postupka umjeravanja je umjerni pravac koji prikazuje ovisnost odziva metode o koncentraciji analita.

Linearnost jest određena pripremom otopina za umjernu krivulju iz SOS. U ultračistoj vodi pripremljene su otopine koncentracija u rasponu od 30 – 300 $\mu\text{g/L}$, a u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi koncentracije se kreću od 30 – 700 $\mu\text{g/L}$. U te otopine izravno je dodan unutarnji standard. Unutarnji standardi upotrebljavaju se kada količina analita u uzorku nije reproducibilna, kada odziv instrumenta varira jer ga je teško kontrolirati ili ako se tijekom pripreme gubi dio uzorka [80].

Za određivanje linearnosti vankomicina pripremljene su otopine koncentracija 30, 50, 100, 200, 300, 400 i 500 µg/L u koje nisu dodani unutarnji standardi. Pojedine otopine analizirane su bez unutarnjih standarda jer je intenzitet unutarnjih standarda jako varirao ovisno o koncentraciji što je utjecalo na točnost rezultata. Na temelju umjernih krivulja određeno je linearno područje za svaki antibiotik u tri različite matrice (**tablica 13**).

Umjerne krivulje prikazuju linearnu ovisnost odziva instrumenta (površina ispod kromatografske krivulje, A) o koncentraciji. Jednadžbe pravca određene su linearnom regresijskom analizom korištenjem metode najmanjih kvadrata. Metoda najmanjih kvadrata je statistička metoda određivanja jednadžbe koja najbolje opisuje mjerne podatke. Jednadžbe pravca i koeficijenti determinacije (R^2) prikazani su u **tablici P.2**.

Tablica 13. Linearno područje svih antibiotika u tri različite matrice

	Ultračista voda		Izvorska voda		Sintetska otpadna voda	
	Linearno područje, µg/L	Unutarnji standard	Linearno područje, µg/L	Unutarnji standard	Linearno područje, µg/L	Unutarnji standard
<i>Amoksicilin</i>	30-300	-	30-400	-	30-700	-
<i>Enrofloksacin</i>	30-300	✓	30-700	-	30-700	✓
<i>Eritromicin</i>	30-300	✓	30-700	-	30-700	✓
<i>Oksitetraciklin</i>	30-300	✓	110-700	✓	110-700	-
<i>Sulfametoksazol</i>	30-300	✓	30-700	✓	30-700	✓
<i>Trimetoprim</i>	30-300	✓	30-700	✓	30-700	✓
<i>Vankomicin</i>	30-500	-	50-700	-	30-500	-

Koeficijenti determinacije (R^2) se u svim matricama kreću od 0,98 – 0,99 čime je potvrđena linearnost. Koeficijenti determinacije pokazuju da umjerni pravci dobro opisuju ovisnost odziva instrumenta (površina ispod kromatografske krivulje) o koncentraciji.

4.3.2. Granice kvantifikacije

Određene su granice kvantifikacije UHPLC-MS/MS metode za svaki antibiotik u tri različite matrice s obzirom da su one ovisne o matrici u kojoj se određuju. *Granica kvantifikacije* je

najmanja moguća koncentracija analita koja se može odrediti uz dopuštenu pogrešku. Granica kvantifikacije (GK) eksperimentalno je definirana kao koncentracija analita kod kojih se postiže vrijednost omjera signal/šum > 10 [80]. U **tablici 14** prikazane su vrijednosti granica kvantifikacije svih antibiotika u tri različite matrice. Obzirom da u ovom radu nije cilj određivanja što nižih koncentracija u nepoznatom uzorku već praćenje kinetike razgradnje odabrane granice kvantifikacije predstavljale su najnižu koncentraciju umjerne krivulje. Sve najniže točke umjerne krivulje zadovoljavale su kriterij da je S/N (omjer signala i šuma) veći od 10 te je takvim koncentracijama ostvarena mogućnost dobivanja MS/MS spektra.

Tablica 14. Granice kvantifikacije antibiotika

	Ultračista voda	Izvorska voda	Sintetska otpadna voda
	Granica kvantifikacije, $\mu\text{g/L}$	Granica kvantifikacije, $\mu\text{g/L}$	Granica kvantifikacije, $\mu\text{g/L}$
<i>Amoksisicilin</i>	30	30	30
<i>Enrofloksacin</i>	30	30	30
<i>Eritromicin</i>	30	30	30
<i>Oksitetraciklin</i>	30	110	110
<i>Sulfametoksazol</i>	30	30	30
<i>Trimetoprim</i>	30	30	30
<i>Vankomicin</i>	30	50	30

4.4. FOTOLITIČKA RAZGRADNJA

Optimirana i razvijena metoda primijenjena je za praćenje brzine fotolitičke razgradnje sedam antibiotika u tri različite matrice: ultračista, izvorska i sintetska otpadna voda. Otopine antibiotika podvrgnute su umjetnom Sunčevu zračenju pri 25 °C i pri intenzitetu zračenja od 250 W/m². Većina fotolitičkih reakcija ponaša se kao reakcija prvog reda koja pretpostavlja proporcionalno smanjenje koncentracije antibiotika s vremenom (jednadžba 1). Promjene koncentracije antibiotika u ultračistoj, izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi, s i bez dodatka UV-filtara, tijekom izlaganja Sunčevu zračenju praćene su kao smanjenje početne koncentracije (c_0) u vremenu $t = 0$, do koncentracije (c_t) antibiotika nakon određenog vremena

(*t*) izlaganja Sunčevu zračenju. Proučavanjem kinetike fotolitičke razgradnje određena je konstanta brzine razgradnje, odnosno vrijeme poluraspada (jednadžba 4).

Iz konstanti brzina razgradnje i vremena poluraspada može se zaključiti u kojoj matrici će se odvijati najbrža fotolitička razgradnja, tj. koja matrica će imati najveći utjecaj na razgradnju. Međutim, kako bi takvo zaključivanje bilo pouzdano potrebno je primijeniti statističke metode koje testiraju pretpostavke o različitosti populacija npr. postoje li značajne razlike u fotolitičkoj razgradnji antibiotika u tri različite matrice, bez i s dodatkom UV-filtara. Nulta hipoteza postavlja se tijekom testiranja i ona je pretpostavka da se populacije ne razlikuju u ispitivanom svojstvu, tj. da su opažene razlike slučajne (stvarne populacijske razlike ne postoje), pri čemu je vjerojatnost prihvatanja ili odbacivanja hipoteze postavljena na npr. $p=0,05$, što znači da postoji 5%-tna vjerojatnost odbacivanja ili prihvatanja ispravne hipoteze. U ovom radu za određivanje statistički značajnih razlika između konstanti brzina razgradnje u tri različite matrice, s ili bez UV-filtara, korištena je (*složena*) *analiza varijance*. Složena analiza varijance je statistički postupak koji se primjenjuje kada uspoređujemo rezultate više zavisnih varijabli za nezavisnu varijablu koje imaju različite razine ili kategorije. Za razliku od jednostavne analize varijance, gdje imamo samo jednu zavisnu varijablu, kod složene analize varijance, osim utjecaja većeg broja zavisnih varijabli (matrice, UV-filtri) na nezavisnu (konstante), gledamo i međudjelovanje (interakciju) između zavisnih varijabli. Za primjenu analize varijance i tumačenje značajnosti razlika potrebno je provoditi *post hoc* testiranja. Naime, ako dobijemo vrijednost da je $p < 0,05$, to znači da se promatrane skupine statistički značajno razlikuju u istraživanoj varijabli, ali ne možemo tvrditi između kojih skupina je razlika statistički značajna. Provođenjem *post hoc* testova moguće je odrediti između kojih skupina postoji razlika. Postoji više različitih *post hoc* testova npr. Scheffe-ov, Tuckey-ev, Duncan-ov, Bonferroni-ev test, itd. U ovom radu odabran je Bonferroni-ev test iz razloga jer strogo kontrolira pogrešku tipa 1 (vjerojatnost odbacivanja nulte hipoteze dok je ona točna) te je podesan za mali broj uzoraka [80, 81, 102].

Brojnim znanstvenim istraživanjima utvrđeno je da na fotolitičku razgradnju antibiotika utječu različiti sastojci matrice u kojima se nalaze [104, 105], pa se u prvom nizu mjerenja želi utvrditi hoće li različite matrice utjecati na fotolitičku razgradnju antibiotika, te između kojih matrica postoji statistički značajna razlika. Zatim, potrebno je utvrditi kakva će biti brzina fotolitičke razgradnje antibiotika dodatkom UV-filtara te hoće li UV-filtri imati statistički značajan utjecaj u odnosu na otopine koje ne sadrže UV-filtre. Dakle, usporedbom otopina bez i s UV-filtrima, u istim matricama, možemo utvrditi postoje li značajni utjecaji

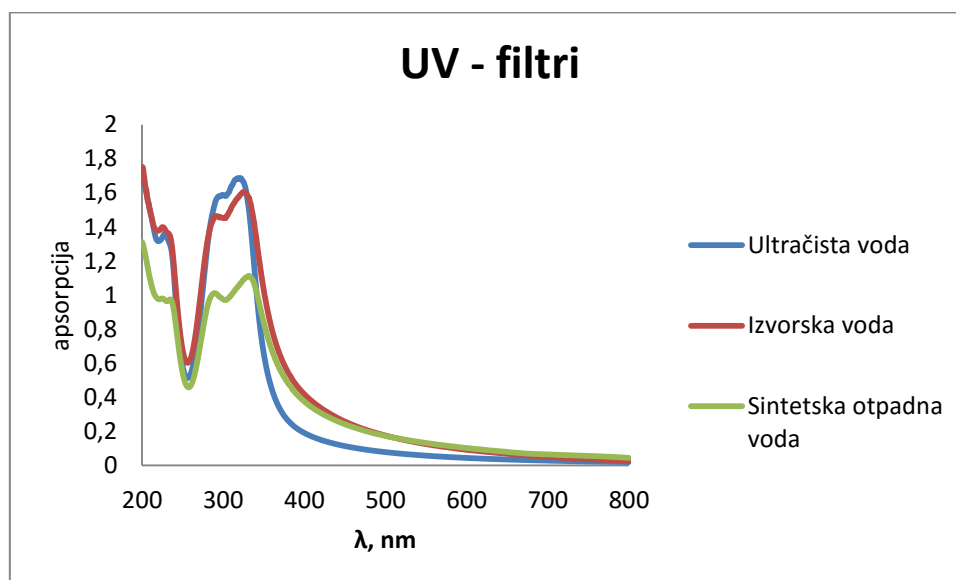
matrice te hoće li prisutnost UV-filtara dovesti do promjena u fotolitičkoj razgradnji. Potrebno je prikazati hoće li i međudjelovanje (interakcija) između UV-filtara i matrica biti statistički značajno. Koncentracija pojedinog antibiotika u konačnoj otopini podvrgnutoj umjetnom Sunčevom zračenju iznosi 300 µg/L, dok koncentracija vankomicina iznosi 500 µg/L. U izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi detekcija enrofloksacina, amoksicilina i oksitetraciklina bila je otežana te je njihova koncentracija povećana na 600 µg/L. Da bi se ispitaio utjecaj UV-filtara na kinetiku fotolitičke razgradnje antibiotika, u otopinu smjese dodani su UV-filtri tako da njihova masena koncentracija iznosi 300 µg/L. UV-filtri se u otopinama za fotolitičku razgradnju vankomicina nalaze u koncentraciji od 500 µg/L. Budući da su farmaceutici i UV-filtri u okolišu detektirani u približnom omjeru koncentracija 1:1 i zbog simulacije realnih uvjeta, izabrane su navedene koncentracije UV-filtara. Pripremaju se i tri otopine kontrolnih uzoraka koje nisu izložene zračenju. Kontrolni uzorci korišteni su kako bi se potvrdilo da je razgradnja posljedica djelovanja svjetlosti, a ne temperature ili hidrolize. Tijekom svih eksperimenata u kontrolnim uzorcima nije došlo do smanjenja koncentracija antibiotika, što potvrđuje da je uočeno smanjenje koncentracije ispitivanih antibiotika posljedica samo fotolitičke razgradnje.

Za praćenje fotolitičke razgradnje određena je konstante brzine razgradnje (k , min^{-1}) u tri paralelne otopine te je kao konačna vrijednost uzeta srednja vrijednost tri paralelna mjerenja. Konstanta brzine razgradnje određena je iz jednadžbe pravca, kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c_t/c_0)$ o vremenu. Konstante brzina razgradnje antibiotika i njihovo vrijeme poluraspada te standardno odstupanje, s i bez prisutnosti UV-filtara, prikazani su u **tablici 15**. Dobivene konstante fotolitičke razgradnje antibiotika uspoređene su s vrijednostima kontrolnih uzoraka. Potrebno je ustvrditi postoji li statistički značajna razlika između otopina podvrgnutih umjetnom Sunčevom zračenju i kontrolnih uzoraka. Ukoliko nema statistički značajne razlike između vrijednosti konstanti brzine fotolitičke razgradnje antibiotika i kontrolnih uzoraka, razgradnja se nije dogodila ($p > 0,05$). *t-testom* utvrđeno je da nema statistički značajne razlike kod trimetoprima u svim uzorcima voda, s i bez dodatkom UV-filtara, kod eritromicina u svim uzorcima voda izuzevši ultračistu vodu te amoksicilina u otopinama u kojima su dodani UV-filtri.

Tablica 15. Konstante brzina fotolitičke razgradnje (k), vremena poluraspada ($t_{1/2}$) i standardna odstupanja (s) antibiotika u tri različite matrice, s i bez prisutnosti UV-filtara (*n.r. – nema razgradnje)

	Ultračista voda			Izvorska voda			Sintetska otpadna voda		
<i>Bez UV-filtara</i>	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	s, min^{-1}	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	s, min^{-1}	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	s, min^{-1}
Amoksicilin	0,0010	693,15	0,0002	0,0025	247,55	0,0001	0,0021	462,09	0,0006
Enrofloksacin	0,0809	8,56	0,0164	0,1255	5,52	0,0014	0,3069	2,26	0,0179
Eritromicin	0,0023	301,37	0,0003	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Oksitetraciklin	0,0161	43,05	0,0025	0,0194	35,73	0,0019	0,1054	6,58	0,0189
Sulfametoksazol	0,0235	29,50	0,0014	0,0038	182,41	0,0002	0,0042	165,04	0,0006
Trimetoprim	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Vankomicin	0,0083	83,51	0,00006	0,0119	58,25	0,00692	0,0096	72,20	0,00029
	Ultračista voda			Izvorska voda			Sintetska otpadna voda		
<i>S UV-filtara</i>	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	s, min^{-1}	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	s, min^{-1}	k, min^{-1}	$t_{1/2}, \text{min}$	s, min^{-1}
Amoksicilin	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Enrofloksacin	0,0634	10,93	0,0092	0,0833	8,32	0,0029	0,1830	3,79	0,0347
Eritromicin	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Oksitetraciklin	0,0082	84,53	0,0009	0,0112	61,88	0,0031	0,0721	9,61	0,0074
Sulfametoksazol	0,0230	30,14	0,0019	0,0014	495,11	0,00005	0,0021	330,07	0,0007
Trimetoprim	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.	n.r.
Vankomicin	0,0045	154,03	0,00021	0,0035	198,04	0,00006	0,0073	94,95	0,00098

Za predviđanje mogućnosti fotolitičke razgradnje antibiotika poželjno je poznavanje njihovih apsorpcijskih spektara. Da bi antibiotik bio podložan fotolitičkoj razgradnji, mora apsorbirati Sunčevu svjetlost (290 – 800 nm). Apсорpcijski spektri antibiotika snimljeni su u ultračistoj, izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi na spektrofotometru u rasponu valnih duljina 200 – 800 nm. Iz **tablice 15** vidljivo je da dodatak UV-filtara usporava brzinu fotolitičke razgradnje, u odnosu na otopine u koje nisu dodani filtri. Zahvaljujući fotostabilnosti i apсорpcijskim svojstvima, UV-filtri inhibiraju utjecaj UV-zračenja u različitim uzorcima voda. Apsorbiraju Sunčevo zračenje iznad 290 nm, što je prikazano na **slici 30**. Zbog preklapanja apсорpcijskih spektara UV-filtara s apсорpcijskim spektrima antibiotika, dolazi do usporavanja fotolitičke razgradnje antibiotika jer UV-filtri preuzimaju energiju potrebnu za fotolitičku razgradnju. Iako je vidljivo smanjenje brzine fotolitičke razgradnje dodatkom UV-filtara, mora se utvrditi jesu li te razlike statistički bitne pomoću ANOVA testa.

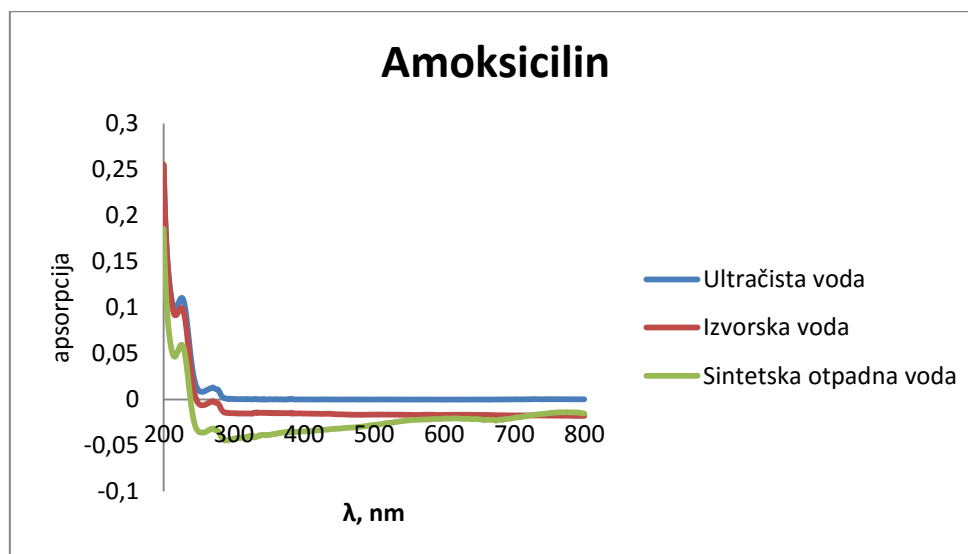


Slika 30. Apсорpcijski spektar UV-filtara

4.4.1. Amoksicilin

Iz **tablice 15**, na temelju vremena poluraspada, možemo zaključiti da je fotolitička razgradnja amoksicilina vrlo spora u sve tri matrice. Primjenom umjetnog Sunčevog zračenja amoksicilin pokazuje smanjenje koncentracije, ali se potpuna razgradnja ne događa ni nakon 300 minuta eksperimenta u sve tri matrice (**slika P.8**). Konstanta brzine razgradnje najmanja je u ultračistoj vodi, pa izravna fotoliza amoksicilina neće biti značajna, što potvrđuje i apсорpcijski spektar na **slici 31**. Apсорpcijski maksimumi javljaju se na 225,80 nm (0,11 A) u

ultračistoj vodi, na 225,46 nm (0,06 Å) u izvorskoj vodi, a u sintetskoj otpadnoj vodi na 271,16 nm (0,09 Å).



Slika 31. Apsorpcijski spektar amoksicilina

U 300 minuta, u ultračistoj vodi, zaostaje oko 80 % početne koncentracije amoksicilina. Određena konstanta brzine fotolitičke razgradnje iznosi $0,001 \text{ min}^{-1}$, a vrijeme poluraspada 693,15 minuta. Dosadašnja istraživanja [106] fotolize amoksicilina u ultračistoj vodi navode bržu fotolizu s konstantom brzine razgradnje $0,0037 \text{ min}^{-1}$ ($t_{1/2}=182,2$ minuta). U izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi brzina razgradnje je i dalje vrlo spora, ali zbog porasta konstante brzine razgradnje i smanjenja vremena poluraspada (**tablica 15**) možemo zaključiti da je amoksicilin potencijalno podložan neizravnoj fotolizi.

Promjena matrice, za otopine bez prisutnosti UV-filtara, imat će statistički značajan utjecaj na brzinu fotolitičke razgradnje, $F(2, 6) = 11,43$, $p < 0,05$. *Post hoc* testom prema Bonferroni-u utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između konstanti brzina fotolitičke razgradnje određenih u ultračistoj i izvorskoj vodi te između konstanti brzina fotolitičke razgradnje određenih u ultračistoj i sintetskoj otpadnoj vodi. Statistički značajne razlike nema između konstanti brzina razgradnje određenih u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi.

Navedeno ukazuje na značajan udio neizravnih procesa u fotolitičkoj razgradnji amoksicilina uzrokovanih prisutnošću otopljenih organskih tvari. S druge strane, povećana koncentracija otopljenih organskih tvari (izvorska u odnosu na sintetsku otpadnu vodu) nema značajnijeg pozitivnog ili negativnog utjecaja na brzinu neizravne razgradnje. Jedno od mogućih objašnjenja je da prisutne, ali niske koncentracije otopljenih organskih tvari u izvorskoj vodi

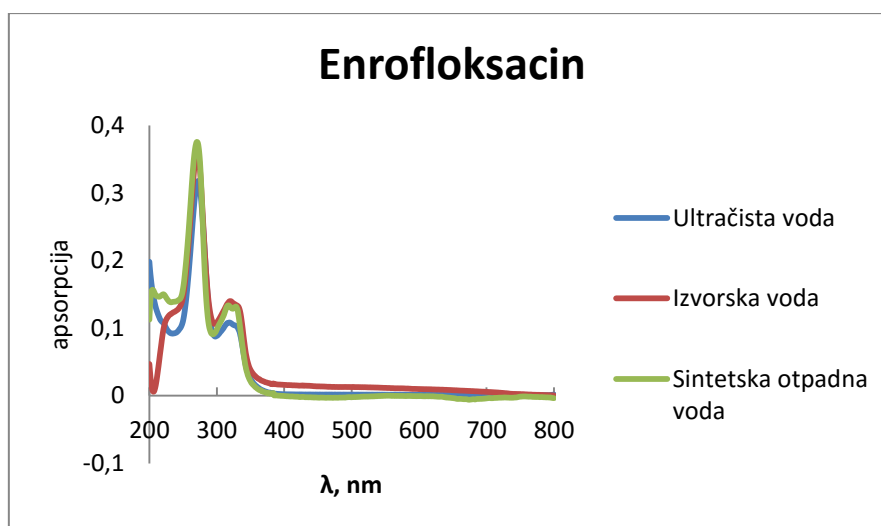
služe kao izvor reaktivnih vrsta u neizravnoj fotolizi. S druge strane, povećana koncentracija otopljenih organskih tvari u sintetskoj otpadnoj vodi, iako služi kao izvor reaktivnih vrsta, umanjuje ukupnu količinu dostupne energije fotona sumarno ne povećavajući brzinu razgradnje. Navedeni rezultati u skladu su s istraživanjem koje [107] potvrđuje da je neizravna fotoliza, pod utjecajem otopljenih organskih tvari npr. huminskih kiselina, dominantan transformacijski put amoksicilina u vodenom okolišu, gdje vrijeme poluraspada varira od 0,9 do 3,3 dana. S druge strane, izravna fotoliza je zanemariva zbog slabije apsorpcije Sunčevog zračenja. Izravnom fotolizom izgubi se svega 6 – 21 % ukupne mase amoksicilina [108].

Dodatak UV-filtara onemogućava fotolitičku razgradnju amoksicilina (**slika P.15**) u svim matricama te nema statistički značajne razlike između kontrolnih uzoraka i uzorka s dodatkom UV-filtara. UV-filtri smanjuju ukupnu količinu fotona na nivo koji je nedovoljan za izravnu i neizravnu fotolitičku razgradnju.

4.4.2. Enrofloksacin

Znanstvenim istraživanjima utvrđeno je da su fluorokinoloni otporni na biološku razgradnju i hidrolizu [54]. Rezultati brojnih istraživanja ukazuju da značajan proces smanjenja njihove koncentracije u okolišu predstavlja sorpcija na tlo i sediment te fotolitička razgradnja [101, 109]. Enrofloksacin je podložan fotolitičkoj razgradnji zahvaljujući apsorpciji Sunčevog zračenja u području od 290 – 350 nm (**slika 32**). Apsorpcijski spektri enrofloksacina pokazuju dva maksimuma u ultračistoj vodi: 272,07 nm (0,32 A) i 318,63nm (0,11 A) te dva maksimuma u izvorskoj vodi: 270,94 nm (0,36 A) i 319,34 nm (0,14 A). U sintetskoj otpadnoj vodi nalazimo tri apsorpcijska maksimuma: 204,72 nm (0,16 A), 270,53 nm (0,38 A) i 316,74 nm (0,13 A). Također, iz **slike 32** je vidljivo da je u ultračistoj vodi najmanja apsorbanacija. Stoga, možemo pretpostaviti da će razgradnja enrofloksacina biti najsporija upravo u toj matrici. Takva hipoteza može se potvrditi praćenjem brzine fotolitičke razgradnje. Izlaganjem umjetnom Sunčevu zračenju početna koncentracija enrofloksacina naglo se smanjuje te se enrofloksacin u sve tri matrice razgrađuje u rasponu od 15 do 20 min (**slika P.9**). Iz konstanti brzina reakcije i vremena poluraspada može se zaključiti da je sukladno pretpostavci, fotolitička razgradnja enrofloksacina najsporija u ultračistoj vodi (**tablica 15**).

Izračunata vremena poluraspada usporediva su s literaturnim podacima koja govore da konstanta brzine razgradnje enrofloksacina, u riječnoj vodi, iznosi $0,24 \text{ min}^{-1}$ s vremenom poluraspada 2,89 min [110]. Takve vrijednosti mogu se poistovjetiti s vrijednostima dobivenim u ovom radu za sintetsku otpadnu vodu. Nadalje, dobivene vrijednosti vremena poluraspada (**tablica 15**) u skladu su s vremenima poluraspada od 0,2 min do 20 min izmjerenim za različite antibiotike iz grupe flurokinolona [71, 72, 110].

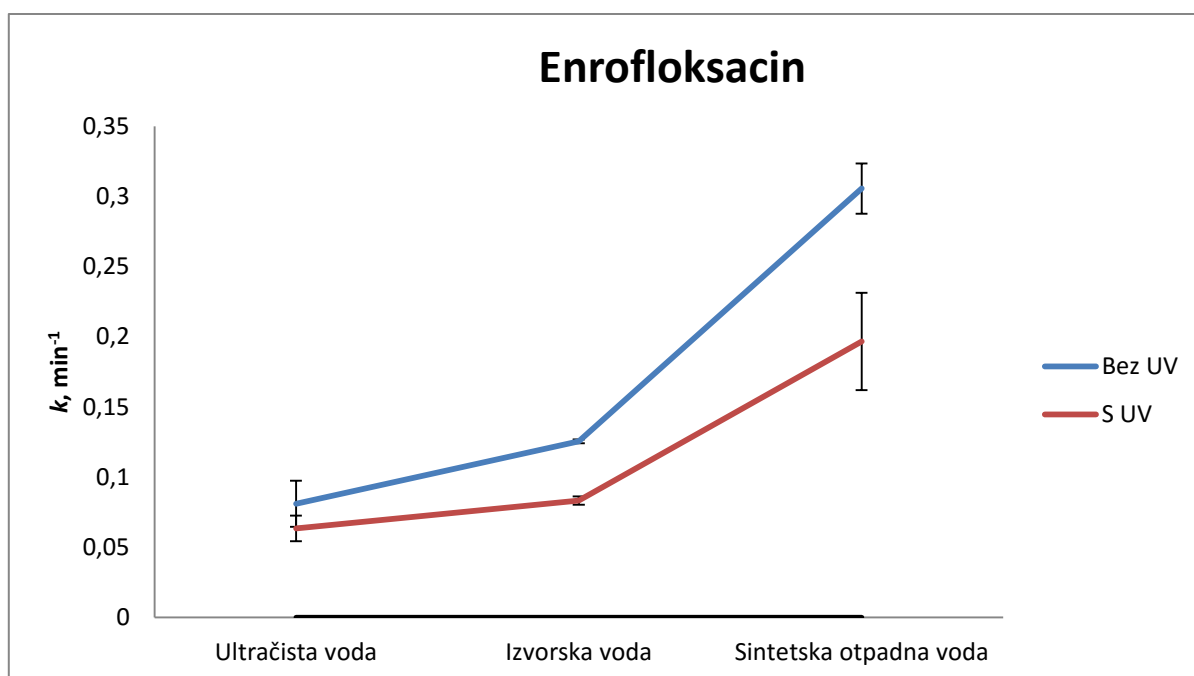


Slika 32. Apsorpcijski spektar enrofloksacina

Rezultati ukazuju da će promjena matrice imati značajan utjecaj na brzinu razgradnje te primjećujemo da je razgradnja najbrža u sintetskoj otpadnoj vodi ($k=0,3069 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=2,26 \text{ min}$), sporija u izvorskoj ($k=0,1255 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=5,52 \text{ min}$) a najsporija u ultračistoj vodi ($k=0,0809 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=8,56 \text{ min}$). Dvosmjerna analiza varijance (*two-way ANOVA*) detektirala je statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotolitičke razgradnje, $F(2, 12) = 160,51$, $p < 0,05$. *Post hoc* testom prema Bonferroni-u utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između konstanti brzina razgradnje određenih u ultračistoj, izvorskoj vodi i sintetskoj otpadnoj vodi ($p < 0,05$) te između izvorske i sintetske otpadne vode ($p < 0,05$).

Dodatkom UV-filtara brzina fotolitičke razgradnje enrofloksacina odvija se sporije nego li u otopinama u kojima nisu prisutni UV-filtri (**slika 33**) i govori o statistički značajnom efektu usporenja brzine fotolitičke razgradnje u otopinama s UV-filtrima, $F(1, 12) = 53,42$, $p < 0,05$. Izlaganjem umjetnom Sunčevu zračenju, potpuni raspad enrofloksacina, dodatkom UV-filtara, nastupa unutar 20 – 30 minuta (**slika P.16**). Nadalje, utvrđena je statistički značajna interakcija između matrice i dodatka UV-filtara, $F(2, 12) = 14,74$, $p < 0,05$.

Interakcije između matrica i UV-filtara pokazuju da će utjecaj UV-filtara biti drugačiji obzirom na matricu te da će utjecaj matrice ovisiti o prisutnosti UV-filtara. Na **slici 33** vidljivo je da će konstanta brzine razgradnje rasti u matricama (od ultračiste do sintetske otpadne vode) bez dodatka UV-filtara što je i detektirano kao primarni efekt. Međutim, efekt matrice na brzinu razgradnje je veći u otopinama bez UV-filtara. Također, dodatkom UV-filtara u matricu nema statistički značajne promjene između konstanti brzina razgradnje u ultračistoj i izvorskoj vodi s dodanim UV-filtrima te u ovom slučaju matrica ne utječe na porast brzine fotorazgradnje. Nadalje, ne postoji statistički značajna razlika između otopina, s i bez UV-filtara, u ultračistoj vodi, dok se značajne razlike javljaju između otopina u sintetskoj otpadnoj vodi i izvorskoj vodi.

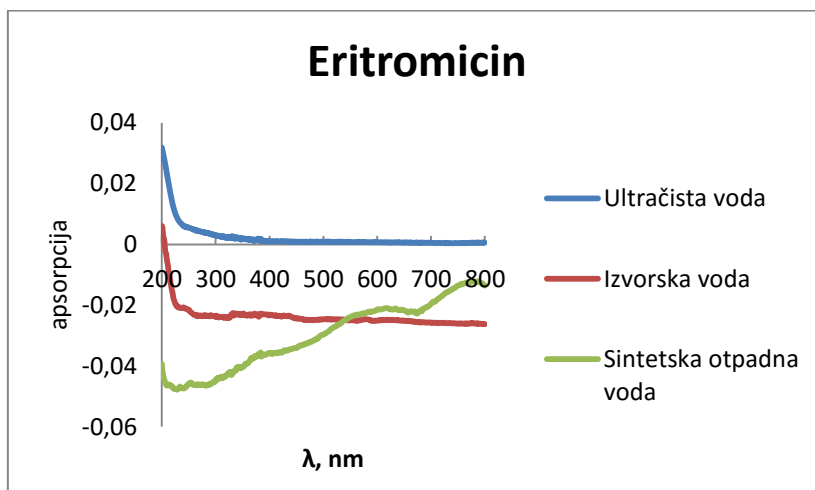


Slika 33. Ovisnost konstanti brzina razgradnje o utjecaju matrice, bez i s dodatkom UV-filtara

Činjenica da konstanta brzine razgradnje enrofloksacina raste od ultračiste do sintetske otpadne vode (u matricama bez dodatka UV-filtara) je u skladu s dosadašnjim opažanjima istog efekta u skupini fluorokinolona [110]. S. R. Batchu i suradnici [71] detektirali su povećanje brzine fotolitičke razgradnje ciprofloksacina od ultračiste do riječne vode. Navedeni efekt se može objasniti povećanjem udjela neizravne fotolitičke razgradnje koja se povećava sukladno povećanju koncentracije otopljenih organskih tvari i anorganskih iona, u skladu s rezultatima koji ukazuju da PO_4^{3-} značajno utječe na brzinu fotolitičke razgradnje enrofloksacina [111, 112, 113].

4.4.3. Eritromicin

Farmaceutici iz skupine makrolida pokazuju minimalnu apsorbciju Sunčevog zračenje iznad 290 nm, jer ne posjeduju kromoforne skupine (slika 34).



Slika 34. Apsorpcijski spektar eritromicina

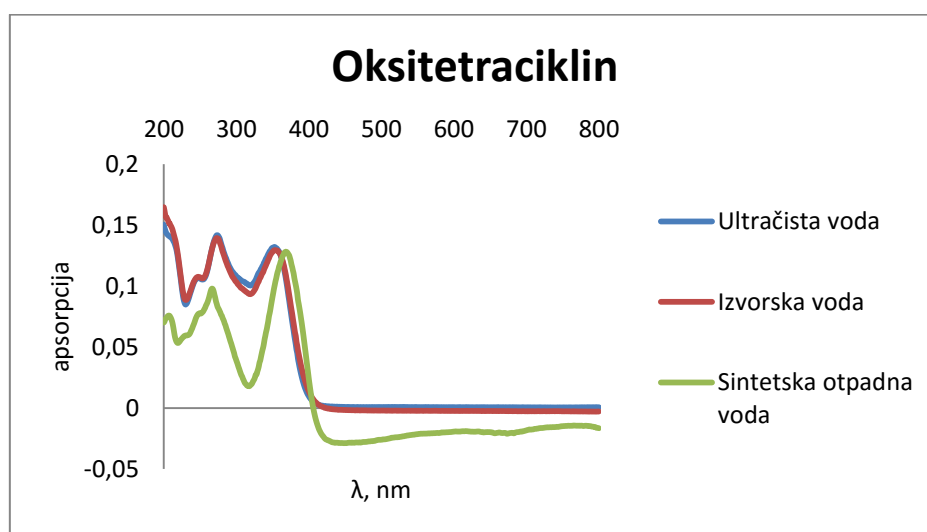
Također, iz slike 34 je vidljivo da se apsorpcija dodatno smanjuje prelaskom u kompleksnije matrice. Iako eritromicin pokazuje minimalnu apsorpciju ipak dolazi do fotolitičke razgradnje i djelomičnog smanjenja koncentracije, ali potpuni raspad se ne događa ni nakon 300 minuta eksperimenta (slika P.10). Iz tablice 15 možemo zaključiti da je vrlo spora fotolitička razgradnja eritromicina prisutna samo u ultračistoj vodi (vrijeme poluraspada iznosi 301,37 minuta). U izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi ne dolazi do fotolitičke razgradnje, što je potvrđeno usporedbom s kontrolnim uzorcima ($p > 0,05$). Dodatkom UV-filtara fotolitička razgradnja eritromicina u ultračistoj vodi prestaje i govori o statistički značajnom efektu prekida fotolitičke razgradnje, $F(1, 4) = 23,684$, $p < 0,05$.

Navedeni rezultati u skladu su s opažanjima smanjenja brzine fotolitičke razgradnje eritromicina prelaskom u kompleksnije matrice [71], npr. primjenom umjetnog Sunčevog zračenja opažene su konstante: $0,0002 \text{ min}^{-1}$ u deioniziranoj vodi, $0,00016 \text{ min}^{-1}$ u slanoj vodi i $0,00005 \text{ min}^{-1}$ u otpadnoj vodi [71]. Iako je u ovom radu opažena fotorazgradnja u ultračistoj vodi ne isključuje se mogućnost vrlo spore fotorazgradnje i u ostalim matricama koja zbog relativno kratkog vremena uzorkovanja (do 300 min) nije mogla biti detektirana. Za izvorsku i sintetsku vodu detektirane su vrijednosti konstanta od $\sim 0,0008 \text{ min}^{-1}$, međutim razlika u odnosu na kontrolne uzorke nije bila statistički značajna. Dobivene konstante, odnosno

vremena poluraspada su na donjoj granici raspona vremena poluraspada makrolida od 0,5 – 40 dana [70]. Sumarno navedeni rezultati ukazuju na vrlo sporu izravnu fotolizu eritromicina te odsutnost neizravnih fotolitičkih procesa. Također, tvari prisutne (Cl^- , OH^- , otopljene organske tvari) [71, 114] u sintetskoj otpadnoj vodi i izvorskoj vodi usporavaju brzinu razgradnje eritromicina, apsorbirajući zračenje potrebno za razgradnju, a efekt je dodatno naglašen prisutnošću UV-filtara.

4.4.4. Oksitetraciklin

Tetraciklini su podložni fotolitičkoj razgradnji te ni jedan drugi put razgradnje za ove antibiotike do sada nije poznat [115]. Podložnost fotolitičkoj razgradnji oksitetraciklina ukazuje njegov apsorpcijski spektar prikazan na **slici 35**. Oksitetraciklin apsorbira Sunčevo zračenje iznad 290 nm te će biti podložan izravnoj razgradnji. Primjenom umjetnog Sunčevog zračenja, oksitetraciklin se u ultračistoj vodi razgrađuje unutar 120 minuta, dok se početna koncentracija oksitetraciklina naglo smanjuje u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi, gdje potpuna razgradnja nastupa već unutar 30 minuta eksperimenta (**slika P.11**).



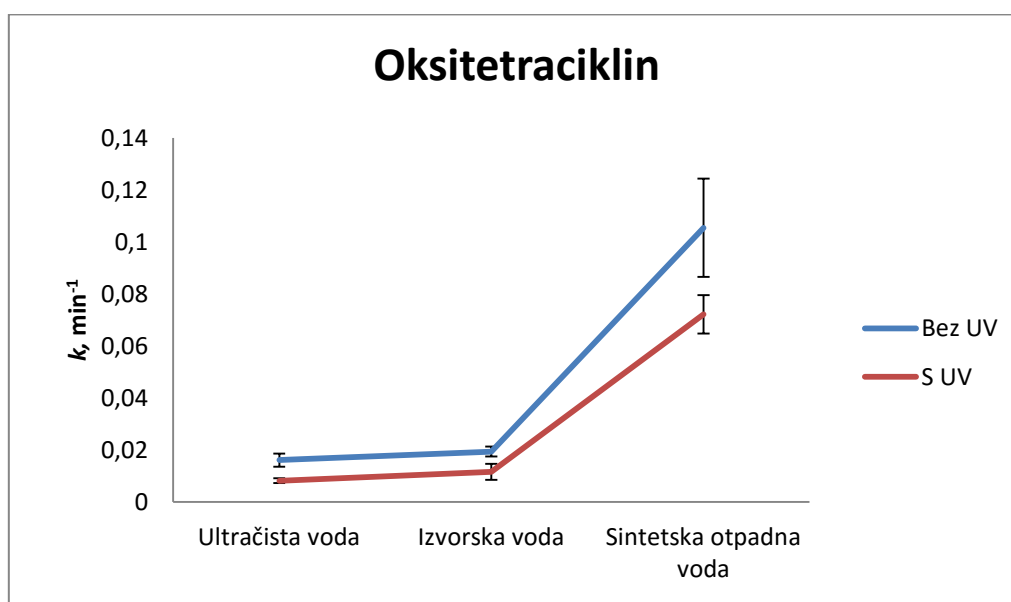
Slika 35. Apsorpcijski spektar oksitetraciklina

Rezultati ukazuju da promjena matrice ima značajan utjecaj na brzinu razgradnje te primjećujemo da je razgradnja najbrža u sintetskoj otpadnoj vodi ($k=0,1054 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=6,58 \text{ min}$), sporija u izvorskoj ($k=0,0194 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=35,73 \text{ min}$), a najsporija u ultračistoj vodi ($k=0,0161 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=43,05 \text{ min}$). Dvosmjerna analiza varijance (*two-way ANOVA*) detektirala je statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotolitičke razgradnje, $F(2, 12) =$

155,202, $p < 0,05$. *Post hoc* testom prema Bonferroni-u utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između konstanti brzina razgradnje u ultračistoj i sintetskoj otpadnoj vodi ($p < 0,05$) te između izvorske i sintetske otpadne vode ($p < 0,05$) (**slika 36**). Statistički značajne razlike nema između konstanti brzina razgradnje u izvorskoj i ultračistoj vodi ($p > 0,05$).

Dodatkom UV-filtara brzina fotolitičke razgradnje oksitetraciklina odvija se sporije nego li u otopinama u kojima nisu prisutni UV-filtri (**slika 36**) i govori o statistički značajnom efektu usporenja brzine fotolitičke razgradnje u otopinama s UV-filtrima, $F(1, 12) = 16,571$, $p < 0,05$. U ultračistoj vodi potpuni raspad nastupa nakon 200 minuta, u izvorskoj unutar 60 minuta, a u sintetskoj otpadnoj vodi unutar 30 minuta (**slika P.18**). Nadalje, utvrđena je statistički značajna interakcija između matrice i dodatka UV-filtara, $F(2, 12) = 4,470$, $p < 0,05$ koju potvrđuje činjenica da je efekt UV-filtara na brzinu reakcije puno veći u sintetskoj otpadnoj vodi nego u ultračistoj i izvorskoj.

Statističkim testom utvrđeno je da postoji statistički značajna razlika između otopina, s i bez UV-filtara, u sintetskoj otpadnoj vodi ($p < 0,05$), između otopina u ultračistoj ($p < 0,05$) te između otopina u izvorskoj vodi ($p < 0,05$).



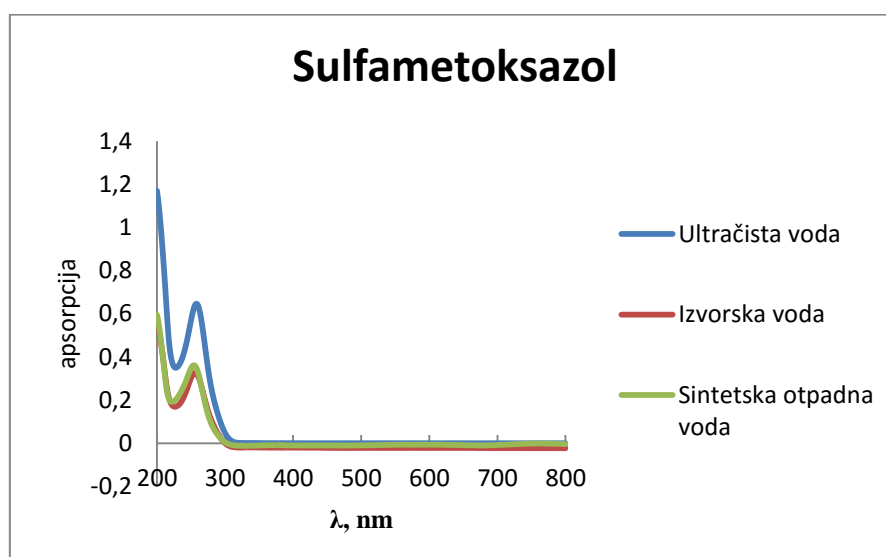
Slika 36. Ovisnost konstanti brzina razgradnje o utjecaju matrice, bez i s dodatkom UV-filtara

U sintetskoj vodi razgradnja je vrlo brza te zbog porasta konstante brzine razgradnje i smanjenja vremena poluraspada možemo zaključiti da je uz izravnu fotolizu oksitetraciklin podložan i neizravnoj fotolizi. Naglo smanjenje koncentracije u sintetskoj otpadnoj vodi može se pripisati prisutnosti nitratnih iona i različitih otopljenih organskih tvari u skladu s

opažanjima koja potvrđuju da velike koncentracije nitratnih iona i otopljenih organskih tvari mogu dovesti do smanjenja vremena poluraspada [77, 78]. Isto tako, utvrđeno je da prisutnost Ca^{2+} iona povećava fotolizu oksitetraciklina. Oksitetraciklin postaje podložniji razgradnji stvarajući komplekse s Ca^{2+} i Mg^{2+} ionima [5, 116].

4.4.5. Sulfametoksazol

Fotolitička razgradnja jest vrlo važan put razgradnje sulfametoksazola u okolišu, budući da je njegova sorpcija na tlo i sediment vrlo slaba zbog polarnosti i dobre topljivosti u vodi [117]. Na temelju apsorpcijskog spektra prikazanog na **slici 37** moguće je pretpostaviti da će sulfametoksazol biti podložan fotolitičkoj razgradnji. Farmaceutici iz skupine sulfonamida imaju funkcionalne skupine koje mogu apsorbirati svjetlost, pa se njihovi spektri, kao i u slučaju fluorkinolona, preklapaju sa spektrom Sunčeva zračenja u području 300 – 325 nm [24]. Primjenom umjetnog Sunčevog zračenja, sulfametoksazol se u ultračistoj vodi razgrađuje unutar 120 minuta, dok u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi potpuna razgradnja nije postignuta unutar 300 minuta eksperimenta (**slika P.12**).



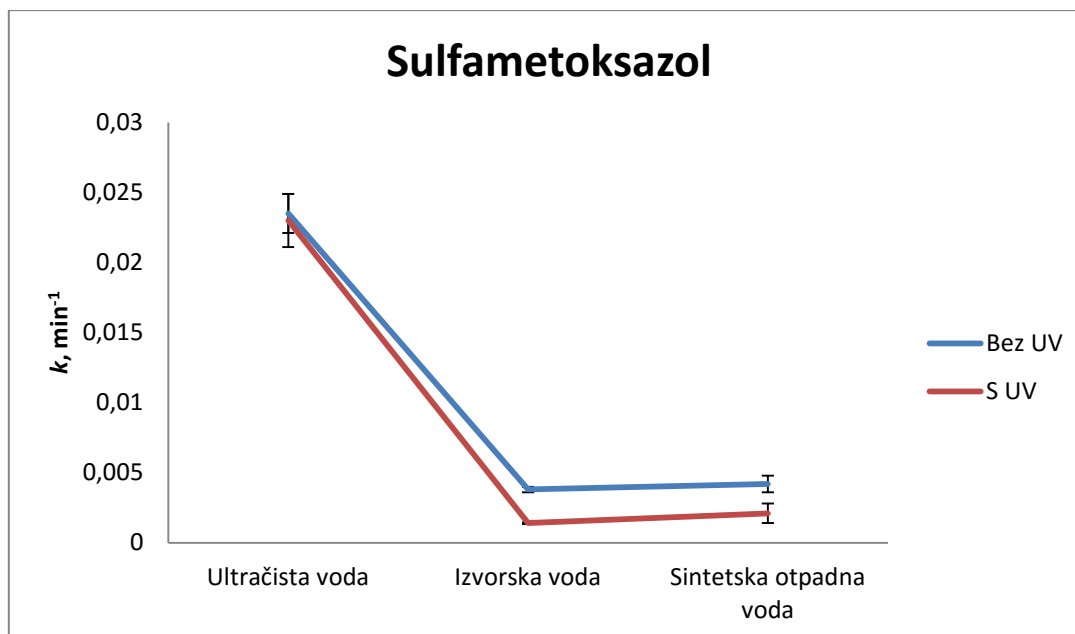
Slika 37. Apsorpcijski spektar sulfametoksazola

Farmaceutici su vrlo kompleksne molekule s različitim kiselim i baznim funkcijskim skupinama koje se pod određenim pH-vrijednostima ioniziraju ili neioniziraju. Budući da prirodne vode imaju različite pH-vrijednosti za očekivati je da će to uvelike utjecati na fotolitičku razgradnju farmaceutika. Ovisnost fotolitičke razgradnje o pH - vrijednosti povezana je s ionskim (kationskim, anionskim) oblikom molekule koji u konačnici utječe na

apsorpcijski spektar farmaceutika [13]. Dosadašnja istraživanja su pokazala da je važan čimbenik, koji utječe na razgradnju sulfametoksazola, pH-vrijednost matrica [27]. Naime, sulfametoksazol ima dvije pK_k -vrijednosti (**tablica 6**), te ovisno o pH-vrijednosti može biti u kationskom ($pH < pK_{k1}(1,83)$), anionskom ($pH > pK_{k2}(5,57)$) ili neutralnom obliku ($1,83 < pH < 5,7$). Pri $pH = 4$ sulfametoksazol će biti u neutralnom obliku (97,5 – 98,6%), s < 2,5 % kationskog oblika, dok je pri $pH = 8$ prisutan u anionskom obliku (99,1%) [13]. Istraživanje je pokazalo da je razgradnja sulfametoksazola najbrža kada je on prisutan u neutralnom obliku [118]. pH-vrijednost matrica, u ovom radu, kreće se od 6 – 7, budući da pH-vrijednost prirodnih voda iznosi oko 6 – 9 [71]. Utvrđeno je da se povećanjem pH-vrijednosti fotolitička razgradnja sulfametoksazola smanjuje jer se on pri tim vrijednostima nalazi u anionskom obliku [13].

Rezultati dobiveni u ovom radu ukazuju da promjena matrice ima značajan utjecaj na brzinu razgradnje te primjećujemo da je razgradnja najbrža u ultračistoj vodi ($k=0,0235 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=29,50 \text{ min}$), sporija u sintetskoj otpadnoj ($k=0,0042 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=165,04 \text{ min}$) a najsporija u izvorskoj vodi ($k=0,0038 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=182,41 \text{ min}$). Dvosmjerna analiza varijance (*two-way ANOVA*) detektirala je statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotolitičke razgradnje, $F(2, 12) = 742,349$, $p < 0,05$. *Post hoc* testom prema Bonferroni-u postoji statistički značajna razlika između konstanti brzina fotolitičke razgradnje u ultračistoj i izvorskoj vodi i između ultračiste i sintetske otpadne vode (**slika 38**). Statistički značajne razlike nema između konstanti brzina fotolitičke razgradnje u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi, $p > 0,05$ (**slika 38**).

Dodatkom UV-filtara brzina fotolitičke razgradnje sulfametoksazola odvija se sporije nego li u otopinama u kojima nisu prisutni UV-filtri (**slika 38**) i govori o statistički značajnom efektu usporenja brzine fotolitičke razgradnje u otopinama s UV-filtrima, $F(1, 12) = 11,231$, $p < 0,05$. Dodatak UV-filtara nema značajnog utjecaja na fotolitičku razgradnju sulfametoksazola u ultračistoj vodi, dok se fotolitička razgradnja u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi smanjuje (**slika 38**). Nadalje, utvrđeno je ne postoji statistički značajna interakcija između matrice i dodatka UV-filtara, $p > 0,05$. Statističkim testom utvrđeno je da ne postoji statistički značajna razlika između otopina, s i bez UV-filtara, u ultračistoj vodi ($p = 0,755$), dok se značajne razlike javljaju između otopina u sintetskoj otpadnoj vodi ($p = 0,017$) i otopina u izvorskoj vodi ($p = 0$).



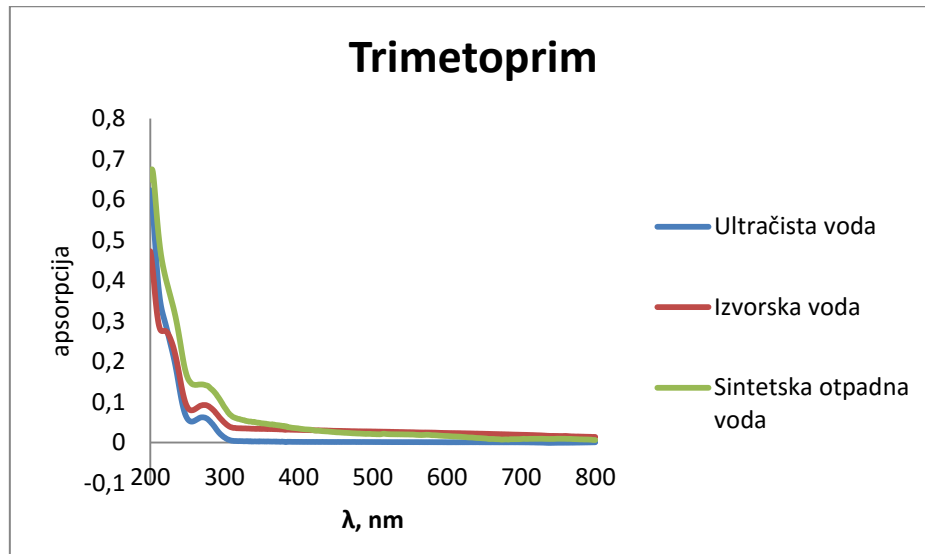
Slika 38. Ovisnost konstanti brzina razgradnje o utjecaju matrice, bez i s dodatkom UV-filtara

Određena vremena poluraspada u skladu su s istraživanjima koja potvrđuju da je razgradnja sulfametoksazola vrlo brza s vremenima poluraspada: $t_{1/2} = 1,86-60$ min [119, 120, 121] te da se brzina razgradnje može smanjiti promjenom matrice ($t_{1/2} = 168-360$ min – kontaminirana voda) [123]. Nadalje, rezultati ovog rada pokazuju da izravna fotolitička razgradnja ima primarnu ulogu u fotorazgradnji sulfametoksazola, a sporija razgradnja u izvorskoj i sintetskoj otpadnoj vodi u odnosu na ultračistu vodu može se pripisati inhibicijskom utjecaju otopljenih anorganskih i organskih tvari. Navedena opažanja podudaraju se s opažanjima da huminske kiseline te Cl^- , SO_4^{2-} i PO_4^{3-} ioni imaju značajan utjecaj na usporenje brzine fotolitičke razgradnje sulfametoksazola [13].

4.4.6. Trimetoprim

Fotolitička razgradnja mogla bi biti proces smanjenja koncentracije trimetoprima u okolišu budući da se apsorpcijski spektar (**slika 39**) preklapa sa spektrom Sunčeva zračenja u području 300 – 325 nm. Apsorpcijski spektar trimetoprima ima maksimum apsorpcije pri valnoj duljini od 202,20 nm (0,67 A) u sintetskoj otpadnoj vodi, 270,90 nm (0,06 A) u ultračistoj vodi i 271,16 nm (0,09 A) u izvorskoj vodi. Međutim, pod utjecajem umjetnog Sunčevog zračenja ne dolazi do fotolitičke razgradnje trimetoprima u sve tri matrice što je vidljivo na **slici P.13**. Obzirom da nema fotolitičke razgradnje dodatak UV-filtara nema

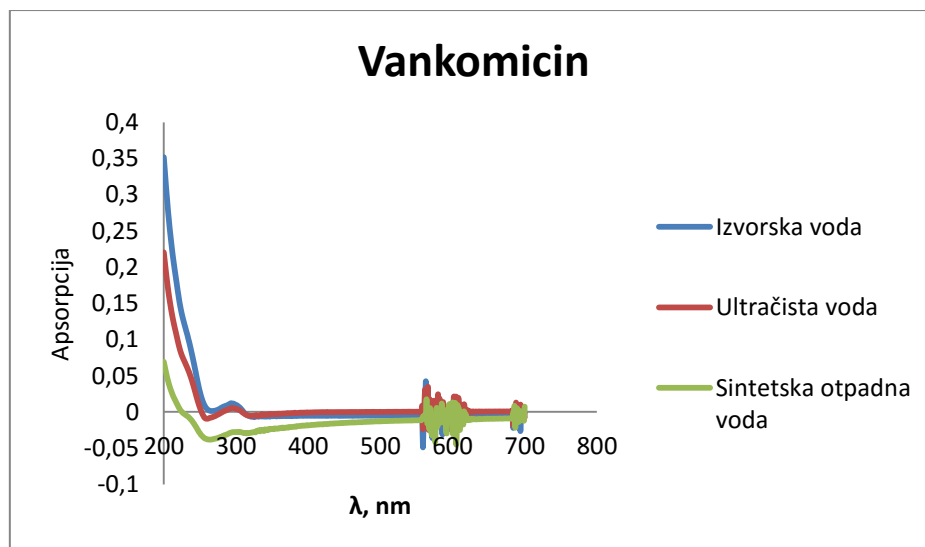
nikakvog utjecaja što je i prikazao na **slici P.20**. Iznimno sporu razgradnju i značajnu stabilnost trimetoprima je u skladu s dosadašnjim istraživanjima [125].



Slika 39. Apсорpcijski spektar trimetoprima

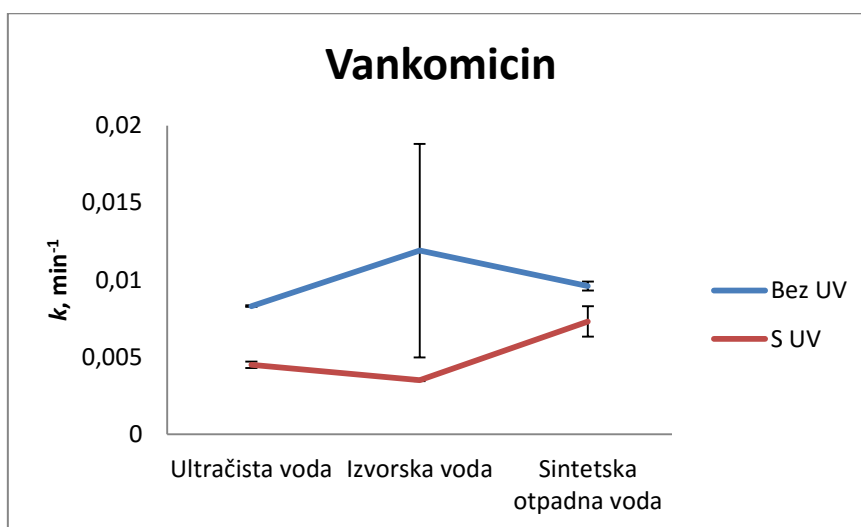
4.4.7. Vankomicin

Vankomicin je podložan fotolitičkoj razgradnji zahvaljujući apсорpciji Sunčevog zračenja iznad 290 nm. Apсорpcijski spektri vankomicina, u tri različite matrice, prikazani su na **slici 40**.



Slika 40. Apсорpcijski spektar vankomicina

Zbog preklapanja apsorpcijskih spektara vankomicina sa spektrom Sunčeva zračenja, mogućnost njegove razgradnje pod utjecajem Sunčeva zračenja ne smije se zanemariti. Primjenom umjetnog Sunčevog zračenja, vankomicin pokazuje linearno smanjenje koncentracije te se potpuna razgradnja događa unutar 120-200 minuta, u tri različite matrice bez dodatka UV-filtara (**slika P.14**). Iz **tablice 15** možemo zaključiti da je razgradnja najbrža u izvorskoj vodi ($k=0,0119 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=58,25 \text{ min}$), sporija u sintetskoj otpadnoj vodi ($k=0,0096 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=72,20 \text{ min}$), dok je najsporija razgradnja uočena u ultračistoj vodi ($k=0,0083 \text{ min}^{-1}$, $t_{1/2}=83,51 \text{ min}$). Iako su vidljive razlike konstanti brzina razgradnje u sve tri matrice, one su preblizu jedne drugima da bi bile statistički značajne, što je i potvrdila statistička analiza (**slika 41**). Dvosmjerna analiza varijance (two-way ANOVA) detektirala je da ne postoji statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotolitičke razgradnje, $F(2, 12) = 0,821$, $p > 0,05$. Međutim, dodatkom UV-filtara brzina fotolitičke razgradnje vankomicina je sporija nego u otopinama u kojima nisu prisutni UV-filtri (**slika 41**) te je detektiran statistički značajan efekt usporenja brzine fotolitičke razgradnje u otopinama s UV-filtrima, $F(1, 12) = 12,945$, $p < 0,05$. Nadalje, utvrđeno je ne postoji statistički značajna interakcija između matrice i dodatka UV-filtara, $F(2, 12) = 1,956$, $p = 0,184$.



Slika 41. Ovisnost konstanti brzina razgradnje o utjecaju matrice, bez i s dodatkom UV-filtara

Sumarno navedeni rezultati ukazuju na odsutnost neizravnih fotolitičkih procesa tj. prisutnost otopljene anorganske i organske tvari ne utječe na brzinu fotorazgradnju vankomicina. S druge strane, prisutnost UV-filtara smanjuje ukupnu količinu dostupne energije uzrokujući sporiju fotolitičku razgradnju.

5. ZAKLJUČAK

U prvom djelu ovog rada razvijena je i validirana UHPLC-MS/MS metoda za kvantitativno određivanje sedam farmaceutika iz skupine antibiotika. Optimizacijom kromatografskih uvjeta najbolje odjeljivanje ispitivanih farmaceutika postignuto je na koloni Acquity UPLC HSS T3, dimenzija 50 x 2,1 mm, promjera čestica unutar kolone 1,8 μm , gradijentnim eluiranjem uz optimalni protok 200 $\mu\text{L}/\text{min}$, pri čemu se pokretna faza sastojala od amonij formijata (20 mM, pH=4,1) kao vodene faze i metanola kao organske faze.

U drugom dijelu rada istraživana je fotolitička razgradnja sedam antibiotika u tri različite matrice, s ili bez prisutnosti UV filtera. Nađeno je da tijekom izlaganja umjetnom Sunčevom zračenju dolazi do fotolitičke razgradnje amoksicilina, enrofloksacina, eritromicina, oksitetraciklina, sulfametoksazola i vankomicina, dok trimetoprim nije podložan fotolitičkoj razgradnji.

Utvrđeno je da postoji statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotolitičke razgradnje za većinu proučavanih antibiotika. Kod amoksicilina, enrofloksacina, oksitetraciklina detektirano je povećanje brzine fotolize u kompleksnijim matricama što je posljedica neizravne fotolitičke razgradnje uslijed povećane koncentracije otopljenih organskih tvari i anorganskih iona. Nasuprot tome, eritromicin i sulfametoksazol pokazuju smanjenje brzine ili prestanak fotolitičke razgradnje prelaskom u kompleksnije matrice sumarno ukazujući na odsustvo neizravnih fotolitičkih procesa te inhibitorne učinke otopljenih organskih i anorganskih tvari. Za vankomicin nije nađen statistički značajan utjecaj matrice na brzinu fotorazgradnje.

Rezultati nedvojbeno dokazuju da prisutnost UV-filtera smanjuje brzinu ili zaustavlja fotolitičku razgradnju proučavanih antibiotika u odnosu na otopine u koje nisu dodani filtri. Zahvaljujući fotostabilnosti i apsorpcijskim svojstvima, UV-filtri inhibiraju utjecaj UV-zračenja u različitim uzorcima voda. Zbog preklapanja apsorpcijskih spektara UV-filtera s apsorpcijskim spektrima antibiotika, dolazi do usporavanja fotolitičke razgradnje antibiotika jer UV-filtri preuzimaju energiju potrebnu za fotolitičku razgradnju.

6. LITERATURA

1. M. Petrović, S. Pérez, D. Barcelo, Analysis, removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle, Elsevier, Amsterdam (2007), str. 361-385.

2. B. L. Edlund, Natural water photochemistry: Singlet oxygen production and the degradation of dissolved organic nitrogen and organic pollutants, disertacija, University of Minnesota, 2008.
3. K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the environment, *The Annual Review of Environment and Resources*, 35 (2010) 57-75.
4. M. Gros, M. Petrović, A. Ginebreda, D. Barceló, Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes, *Environment International*, 36 (2010) 15–26.
5. K. Kümmerer, Antibiotics in the aquatic environment, A review-Part I, *Chemosphere*, 75 (2009) 417-434.
6. K. Kümmerer, *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer, Germany, 2008.
7. S. Zrnčević, Farmaceutici i metode obrade otpadne vode iz farmaceutske industrije, *Hrvatske vode*, 24 (2016) 119-136.
8. A. J. M. Santos, M. S. Miranda, J. C. G. Esteves da Silva, The degradation products of UV filters in aqueous and chlorinated aqueous solutions, *Water research*, 46 (2012) 3167-3176.
9. D. L. Giokas, A. Salvador, A. Chisvert, UV filters: From sunscreens to human body and the environment, *Trends in Analytical Chemistry*, 26(5) (2007) 360-374.
10. T. Poiger, H. R. Buser, M. E. Balmer, P. A. Bergqvist, M. D. Muller, Occurrence of UV filter compounds from sunscreens in surface waters: regional mass balance in two Swiss lakes, *Chemosphere*, 55 (2004) 951–963.
11. P. Vukić, Biosorpcijski potencijal aktivnog mulja u obradi farmaceutskih otpadnih voda, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
12. A. Cvijanović, Razgradnja antihelminitika u okolišu: Hidroliza i fotoliza, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
13. M. Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu, disertacija, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
14. K. Kümmerer, The presence of pharmaceuticals in the environment due to human use – present knowledge and future challenges, *Journal of Environment Management*, 90 (2009) 2354 - 2366.

15. M. Kaštelan–Macan, M. Petrović (ur), *Analitika okoliša*, Hinus i Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2013.
16. A. Čović, *Određivanje farmaceutika u aktivnom mulju*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.
17. B. Bedenić, *Antibakterijski lijekovi*, u: S. Kalenić (ur.), *Medicinska mikrobiologija*, Medicinska naklada, Zagreb, 2013, str. 221-249.
18. K. Vrbat, *Fotokatalitička razgradnja abendazola*, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2016.
19. D. Ašperger, S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Dolar, K. Košutić, A. J. M. Horvat, M. K. Macan, *SPE-HPLC/DAD determination of trimethoprim, oxytetracycline and enrofloxacin in water samples*, *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 89 (2009) 809–819.
20. S. Makovec, B. Kos, J. Šušković, N. Bilandžić, *Tetraciklinski antibiotici i određivanje njihovih rezidua u hrani*, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam* 9 (1-2) (2014) 7-16.
21. A. Markotić, L. Cvetko–Krajinović, *Protuupalno djelovanje antibiotika*, *Croatian Journal of Infection*, 31(1) (2011) 41-48.
22. <http://www.slobodnadalmacija.hr/scena/mozaik/clanak/id/149408/antibiotici-ne-hvala-zloupotreba-lijekova-jaca-bakterije> (srpanj 2017.)
23. J. Papac, K. Perović, M. Halužan, *Određivanje ekotoksičnosti farmaceutika u vodi*, znanstveni rad – Rektorova nagrada, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2017.
24. V. Vrček, *Lijekovi u okolišu*, Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, predavanja, Zagreb.
25. M. Levak, *Utjecaj inhibitorске, mikrobiološke i analitike somatskih stanica na kvalitetu mlijeka u četiri najproduktivnije županije RH*, završni rad, Sveučilište u Karlovcu, Karlovac, 2016.
26. http://mz.ks.gov.ba/sites/mz.ks.gov.ba/files/bactrim_480_mg_smpc.pdf (srpanj) 2017.
27. A. G. Trovo, R. F.P. Nogueira, A. Aguera, A. R. Fernandez-Alba, C. Sirtori, S. Malato, *Degradation of sulfamethoxazole in water by solar photo-Fenton. Chemical and toxicological evaluation*, *Water research*, 43 (2009) 3922 – 3931.
28. J. E. Renew, C. H. Huang, *Simultaneous determination of fluoroquinolone, sulfonamide, and trimethoprim antibiotics in wastewater using tandem solid phase*

- extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 1042 (2004) 113–121.
29. C. Nguyen Dang Giang, Z. Sebesvari, F. Renaud, I. Rosendahl, Q. Hoang Minh, W. Amelung, Occurrence and Dissipation of the Antibiotics Sulfamethoxazole, Sulfadiazine, Trimethoprim, and Enrofloxacin in the Mekong Delta, Vietnam, 2015, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131855>.
 30. Z. Ye, H. S. Weinberg, M. T. Meyer, Trace Analysis of Trimethoprim and Sulfonamide, Macrolide, Quinolone, and Tetracycline Antibiotics in Chlorinated Drinking Water Using Liquid Chromatography Electrospray Tandem Mass Spectrometry, *Analytical Chemistry*, 79(3) (2007) 1135–1144.
 31. R. Hirscha, T. Ternesa, K. Haberera, K. L. Kratzb, Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of The Total Environment*, 225(1-2) (1999) 109-118.
 32. <https://mediately.co/hr/drugs/LqnMgsz6YJAbbaDWxr4AKPzyGTZ/eritromicin-belupo-250-mg-tvrde-kapsule#pharmacokinetic> (srpanj 2017.)
 33. S. Zulfikari, Sinteza i svojstva protuupalnih konjugata makrolida i nesteroidnih protuupalnih lijekova, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Zagreb, 2012.
 34. V. Eraković – Haber, Makrolidi – više od antibiotika, *Infektološki glasnik*, 31(1) (2011) 29–39.
 35. A. L. Cinquina, F. Longo, G. Anastasi, L. Giannetti, R. Cozzani, Validation of a high-performance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle, *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 227–233.
 36. https://www.krka.biz/media/products/hr/vet/gen_pdf/2014/fuvicin_prasak_za_peroral_u_otopinu_pil_04_06_2012.pdf (srpanj 2017.)
 37. P. Dzomba, M. F. Zaranyika, J. Kugara, T. Zhanda, Analysis of oxytetracycline and doxycycline in surface water sources and treated drinking water in Harare Metropolitan using Ultrasonic Assisted Dispersive Solid Phase Extraction (UA-DSPE) and RP-HPLC-UV Technique, *Bulletin Of Environment, Pharmacology and Life Sciences*, 3(3) (2014) 100-109.
 38. E. Turiel, A. Martin-Esteban, J. L. Tadeo, Multiresidue analysis of quinolones and fluoroquinolones in soil by ultrasonic-assisted extraction in small columns and HPLC/UV, *Analytica Chimica Acta*, 562 (2006) 30-35.

39. A. L. Cinquina, P. Roberti, L. Giannetti, F. Longo, R. Draisci, A. Fagiolo, N.R. Brizioli, Determination of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in goat milk by high-performance liquid chromatography with diode-array detection - Optimization and validation, *Journal of Chromatography A*, 987 (2003) 221–226.
40. E. Članjak, M. Smajlović, F. Čaklović, D. Alagić, K. Čaklović, A. Smajlović, Detekcija ostataka enrofloksacina u kozumnom pilećem mesu mikrobiološkom (test inhibicije rasta) i ELISA metodom nakon eksperimentalne profilaktičke i terapijske aplikacije, *Meso*, XIII (2011) svibanj - lipanj, broj 3.
41. https://www.krka.biz/media/products/hr/vet/gen_pdf/2014/Enroxil_10__otopina_za_injekciju_PIL_05_06_2012.pdf (srpanj 2017.)
42. B. Solomun - Kolanović, N. Bilandžić, M. Đokić, I. Varenina, M. Sedak, Mehanizam djelovanja, biosinteza i identifikacija beta-laktamskih antimikrobnih lijekova, *Croatian Journal of Food Science and Technology*, 3(2) (2011) 65-75.
43. T. A. Ternes, Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples, *Trends in Analytical Chemistry*, 20(8) (2001) 419-433.
44. R. Hirsch, T. A. Ternes, K. Haberer, A. Mehlich, F. Ballwanz, K. Kratz, Determination of antibiotics in different water compartments via liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, 815 (1998) 213–223.
45. F. Sacher, F. T. Lange, H. Brauch, I. Blankenhorn, Pharmaceuticals in groundwaters. Analytical methods and results of a monitoring program in Baden-Wurttemberg, Germany, *Journal of Chromatography A*, 938 (2001) 199–210.
46. D. Sakar, Beta-laktami - Penicilini, prezentacija, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb.
47. M. Šalković - Petrišić, V. Bradamante, Beta-laktamski antibiotici – Penicilini, *e-nastavni članak*, Katedra za farmakologiju Medicinskog fakulteta, Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
48. M. J. Bogusz, H. Hassan, M. Al Tufail, Comparative determination of various vancomycin preparations with positive ionization electrospray LC-MS-MS, *T + K*, (2004) 71 (1): 2.
49. <https://mediately.co/hr/drugs/US8dQcq9WjRWggbatMEqrRoPN1p/vankomicin-pharmaswiss-1000-mg-prasak-za-otopinu-za-infuziju#pharmacokinetic> (srpanj 2017.)

50. http://www.pmf.unsa.ba/hemija/files/Katedra%20za%20organsku%20hemiju%20i%20biohemiju/Predmeti%20KOHBBH/I_ciklus/IV_godina/Biohemija_lijekova/3-Reakcije_I_i_II_faze.pdf (srpanj 2017.)
51. K. Jindal, M. Narayanam, S. Singh, Pollution of aqueous matrices with pharmaceuticals, *Water and Health*, Springer, Berlin, 2013., str. 355–373.
52. M. S. Diaz-Cruz, M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003) 340-350.
53. W. W. Buchberger, Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment, *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 603–618.
54. K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment, Part II, *Chemosphere*, 75 (2009) 435–441.
55. J. Wilga, A. K. Wasik, J. Namiesnik, Studies of Human and Veterinary Drugs' Fate in Environmental Solid Samples - Analytical Problems, *Journal of Chromatographic Science*, 46 (2008) 601-608.
56. A. J. Watkinson, E. J. Murby, S. D Costanzo, Removal of antibiotics in conventional and advanced wastewater treatment: Implications for environmental discharge and wastewater recycling, *Water Research*, 41 (2007) 4164-4176.
57. A. J. Watkinson, E. J. Murby, D. W. Kolpin, S. D. Constanzo, The occurrence of antibiotics in an urban watershed: From wastewater to drinking water, *Science of the Total Environment*, 407 (2009) 2711-2723.
58. <http://archive.sciencewatch.com/dr/fbp/2010/10febfbp/10febfbpKass/> (kolovoz 2017.)
59. J. Rađenovic, M. Petrovic, D. Barceló, Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387 (2007) 1365-1377.
60. E. S. Williams, B. W. Brooks, Human pharmaceuticals in the environment, principles, approaches and perspectives, Springer, New York, 2012, str. 167–224.
61. S. Webb, T. Ternes, M. Gibert, K. Olejniczak, Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water, *Toxicology Letters*, 142 (2003) 157–167.
62. Pharmaceuticals in the environment – the global perspective: Occurrence, effects, and potential cooperative action under SAICM, IWW-Rheinisch-Westfaelisches Institut für Wasser, 2014

63. H. B. Jayasiri, C. S. Purushothaman, A. Vennila, Pharmaceutically Active Compounds (PhACs): A Threat for Aquatic Environment? *Journal of Marine Science: Research & Development* 4 (2013) 1-2.
64. https://toxics.usgs.gov/regional/emc/images/transport_figure_1g.jpg (srpanj 2017.)
65. M. Mitrevski, Utjecaj sastava uzorka vode na fotolitičku razgradnju metabolita sulfonamida, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2014.
66. https://en.wikipedia.org/wiki/Solar_irradiance#/media/File:Solar_Spectrum.png (srpanj 2017.)
67. ISO 21348:2007 Space environment (natural and artificial) — Process for determining solar irradiances.
68. A. Cafuta, Fotokatalitička razgradnja nitrofurantoina, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.
69. L. Tong, P. Eichhorn, S. Perez, Y. Wang, D. Barcelo, Photodegradation of azithromycin in various systems under simulated and solar radiation: Kinetics and identification of photoproducts, *Chemosphere*, 83 (2011) 340-348.
70. D. Vione, J. Feitosa-Felizzola, C. Minero, S. Chiron, Phototransformation of selected human-used macrolides in surface water: kinetics, model predictions and degradation pathways, *Water Research*, 43 (2009) 1959-1967.
71. S. R. Batchu, V. R. Panditi, Ke. E. O'Shea, P. R. Gardinali, Photodegradation of antibiotics under simulated solar radiation: Implications for their environmental fate, *Science of the Total Environment*, 470–471 (2014) 299–310.
72. J. K. Challis, M. L. Hanson, K. J. Friesen, C. S. Wong, A critical assessment of the photodegradation of pharmaceuticals in aquatic environments: defining our current understanding and identifying knowledge gaps, *Environmental Science: Processes and Impact*, 16 (2014) 672.
73. R. Rodil, M. Moeder, R. Altenburger, M. Schmitt-Jansen, Photostability and phytotoxicity of selected sunscreen agents and their degradation mixtures in water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 395(5) (2009) 1513-1524.
74. Y. S. Liu, G. G. Ying, A. Shareef, R. S. Kookana, Photostability of the UV filter benzophenone-3 and its effect on the photodegradation of benzotriazole in water, *Environmental Chemistry*, 8(6) (2001) 581-588.
75. https://en.wikipedia.org/wiki/UV_filter#cite_note-21 (kolovoz 2017.)

76. OECD guidelines for the testing of chemicals, Phototransformation of Chemicals in Water – Direct Photolysis, OECD/OCDE, 2008.
77. S. Jiao, S. Zheng, D. Yin, L. Wang, L. Chen, Aqueous photolysis of tetracycline and toxicity of photolytic products to luminescent bacteria, *Chemosphere*, 73 (2008) 377-382.
78. J. Shaojun, Z. Shourong, Y. Daqiang, W. Lianhong, C. Liangyan, Aqueous oxytetracycline degradation and the toxicity change of degradation compounds in photoirradiation process, *Journal of Environmental Science*, 20 (2008) 806-813.
79. A. M. Čižmek, Razvoj i validacija SPE-HPLC-DAD metode za određivanje plave boje u dizel gorivima, znanstveni rad - Rektorova nagrada, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
80. M. Kaštelan – Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217-235.
81. D. Ašperger, Upravljanje kvalitetom, predavanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2017.
82. J. Budimir, Određivanje granice kvantifikacije antibiotika u medu vezanim sustavom tekućinska kromatografija – tandemna spektrometrija masa, diplomski rad, Prirodoslovno – matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 2016.
83. I. Đurić, Izbor nepokretne faze za određivanje veterinarskih farmaceutika HPLC-DAD metodom, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, znanstveni rad – Rektorova nagrada, Zagreb, 2010.
84. M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Sprengute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina*, 45(3) (2009) 218-232.
85. S. Babić, Kemijska analiza materijala, predavanja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2011.
86. <https://benthamopen.com/FULLTEXT/CHEM-3-1> (kolovoz 2017.)
87. <http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720001136en.pdf> (kolovoz 2017.)
88. T. Milekić, Razvoj UHPLC metode po principu kvalitete ugrađene u dizajn (QbD) za višekomponentne sustave ljekovitih supstancija anthelmintika, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko – biokemijski fakultet, Zagreb, 2015.
89. T. Škrinjar, Karakterizacija nepokretnih faza u kromatografiji reverznih faza ultravisoke djelotvornosti, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2015.

90. M. Taleuzzaman, S. Ali, S. J. Gilani, S. S. Imam, A. Hafeez, Ultra Performance Liquid Chromatography (UHPLC) - A review, *Austin Journal of Analytical and Pharmaceutical Chemistry*, 2(6) (2015) 1056.
91. D. J. Burinsky, Mass spectrometry, *Comprehensive Analytical Chemistry*, 47 (2006) 319-396.
92. P. Novak, Spektrometrija masa, predavanja, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, 2012./2013.
93. S. Ujević, Određivanje mikroorganizama pomoću MS/MS analize proteoma, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno – biotehnološki fakultet, Zagreb, 2016.
94. M. Radić, Ionizacija negativnih iona nano - elektroraspršenjem uzrokovana umiješavanjem estera, aldehida i ketona u tok pokretne faze, diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno – matematički fakultet, Zagreb, 2016.
95. https://en.wikipedia.org/wiki/Mass_spectrometry#/media/File:TandemMS.svg (kolovoz 2017.)
96. S. Babić, A. J. M. Horvat, D. Mutavdžić-Pavlović, M. Kaštelan-Macan, Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, 26 (2007) 1043-1061.
97. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00595> (9. kolovoza 2017.)
98. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00199> (9. kolovoza 2017.)
99. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00512> (9. kolovoza 2017.)
100. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01060> (9. kolovoza 2017.)
101. L. M. Peruchi, A. H. Fostier, S. Rath, Sorption of norfloxacin in soils: Analytical methods, kinetics and Freundlich isotherms, *Chemosphere*, 119 (2015) 310-317.
102. D. Eterović, G. Kardum, Biostatistika, Medicinski fakultet, Split, 2010, str. 12-30.
103. D. Fatta-Kassinos, M. I. Vasquez, K. Kümmerer, Transformation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed during photolysis and advanced oxidation processes – Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency, *Chemosphere*, 85 (2011) 693–709.
104. Y. Li, J. Niu, W. Wang, Photolysis of Enrofloxacin in aqueous systems under simulated sunlight irradiation: Kinetics, mechanism and toxicity of photolysis products, *Chemosphere*, 85 (2011) 892-897.

105. D. Vogna, R. Marotta, R. Andreozzi, A. Napolitano, M. d'Ischia, Kinetic and chemical assessment of the UV/H₂O₂ treatment of antiepileptic drug carbamazepine, *Chemosphere*, 54 (2004) 497-505.
106. R. Palmisano, L. Campanella, B. Ambrosetti, Photodegradation of amoxicillin, streptomycin, erythromycin and ciprofloxacin by UV and UV/TiO₂ processes. Evaluation of toxicity changes using a respirometric biosensor, *Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 2(143) (2015) 2380-2391.
107. Q. Zhao, L. Feng, X. Cheng, C. Chen, L. Zhang, Photodegradation of amoxicillin in aqueous solution under simulated irradiation: influencing factors and mechanisms, *Water Science and Technology*, 67(7) (2013) 1605-1611.
108. H. Xu, W. J. Cooper, J. Jung, W. Song, Photosensitized degradation of amoxicillin in natural organic matter isolate solutions, *Water research*, 45 (2011) 632-638.
109. K. Kummerer, A. Al-Ahmad, V. Mersch-Sundermann, Biodegradability of some antibiotics, elimination of genotoxicity and affection of wastewater bacteria in a simple test, *Chemosphere*, 40 (2000) 701-710.
110. M. Sturini, A. Speltini, F. Maraschi, A. Profumo, L. Pretali, E. A. Irastorza, E. Fasani, A. Albini, Photolytic and photocatalytic degradation of fluoroquinolones in untreated river water under natural sunlight, *Applied Catalysis B: Environmental*, 119–120 (2012) 32–39.
111. M. W. Lam, S. A. Mabury, Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters, *Aquatic Science*, 67 (2005) 177-188.
112. L. Ge, J. Chen, X. Wei, S. Zhang, X. Oiao, X. Cai, Q. Xie, Aquatic photochemistry of fluoroquinolone antibiotics: kinetics, pathways, and multivariate effects of main water constituents, *Environmental Science and Technology*, 44 (2010) 2400–2405.
113. M. Sturini, A. Speltini, F. Maraschi, L. Pretali, E. Fasani, A. Albini, Photochemical degradation of marbofloxacin and enrofloxacin in natural waters, *Environmental Science and Technology*, 44 (2010) 4564-4569.
114. S. Gartsier, E. Urich, R. Alexy, K. Kummerer, Ultimate biodegradation and elimination of antibiotics in inherent tests, *Chemosphere*, 67 (2007) 604-613.
115. H. Oka, Y. Ikai, N. Kawamura, M. Yamada, K. Harada, S. Ito, M. Suzuki, Photodecomposition products of tetracycline in aqueous solution, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 37 (1989) 226–231.

116. R. Xuan, L. Arisi, Q. Wang, S. R. Yates, K. C. Biswas, Hydrolysis and photolysis of oxytetracycline in aqueous solution, *Journal of Environmental Science and Health, Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 45 (2009) 1.
117. M. J. Garcia-Galan, M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, Determination of 19 sulfonamides in environmental water samples by automated on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Talanta*, 81 (2010) 355–366.
118. A. L. Boreen, W. A. Arnold, K. McNeill, Photochemical fate of sulfa drugs in the aquatic environment: sulfa drugs containing five-membered heterocyclic groups, *Environmental Science and Technology*, 38 (2004) 3933–3940.
119. F. Bonvin, J. Omlin, R. Rutler, W. B. Schweizer, P. J. Alaimo, T. J. Strathmann, K. McNeill and T. Kohn, Direct photolysis of human metabolites of the antibiotic sulfamethoxazole: evidence for abiotic back-transformation, *Environmental Science and Technology*, 47 (2013) 6746–6755.
120. J. Niu, L. Zhang, Y. Li, J. Zhao, S. Lv, K. Xiao, Effects of environmental factors on sulfamethoxazole photodegradation under simulated sunlight irradiation: kinetics and mechanism, *Journal of Environmental Science*, 25 (2013) 1098–1106.
121. A. G. Trovo, R. F. P. Nogueira, A. Agueera, C. Sirtori, A. R. Fernandez-Alba, Photodegradation of sulfamethoxazole in various aqueous media: persistence, toxicity and photoproducts assessment, *Chemosphere*, 77 (2009) 1292–1298.
122. J. T. Jasper, D. L. Sedlak, Phototransformation of wastewater-derived trace organic contaminants in open-water unit process treatment wetlands, *Environmental Science and Technology*, 47 (2013) 10781–10790.
123. M. W. Lam, S. A. Mabury, Photodegradation of the pharmaceuticals atorvastatin, carbamazepine, levofloxacin, and sulfamethoxazole in natural waters, *Aquatic Sciences*, 67 (2005) 177–188.
124. X. Lou, Z. Zheng, J. Greaves, W. J. Cooper, W. Song, Trimethoprim: Kinetic and mechanistic considerations in photochemical environmental fate and AOP treatment, *Water Research*, 46 (2012) 1327–1336.
125. C. Sirtori, A. Aguera, V. Gernjak, S. Malato, Effect of water-matrix composition on Trimethoprim solar photodegradation kinetics and pathways, *Water Research*, 44(9) (2010) 2735–2744.
126. G. K. Randhawa, S. J. Kullar, Bioremediation of pharmaceuticals, pesticides and petrochemicals with gomeya/cow dung, *ISRN Pharmacology*, 2011(2011) 1–7.

127. S. Babić, M. Periša, I. Škorić, Photolytic degradation of norfloxacin, enrofloxacin and ciprofloxacin in various aqueous media, *Chemosphere*, 91 (2013) 1635-1642.

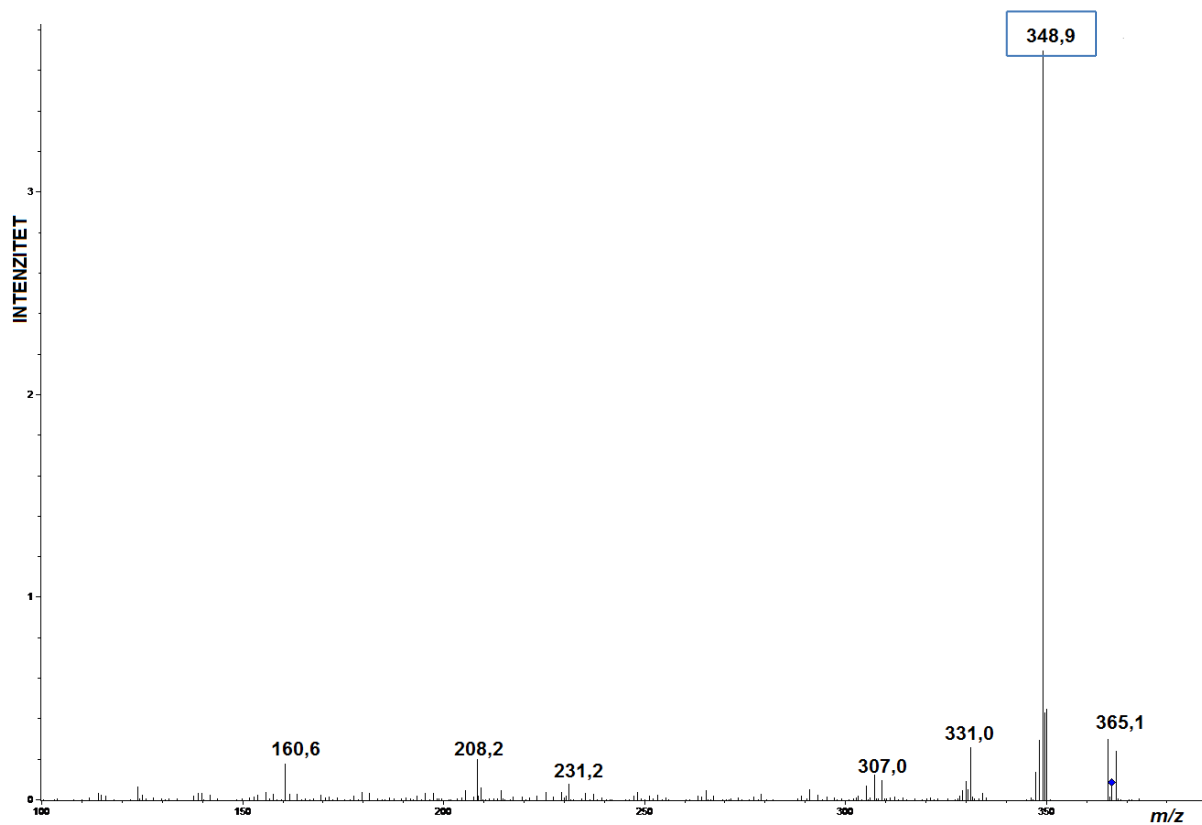
7. PRILOZI

Tablica P.1. Utjecaj nekih sintetskih aktivnih farmaceutskih tvari na ljude i životinje [126]

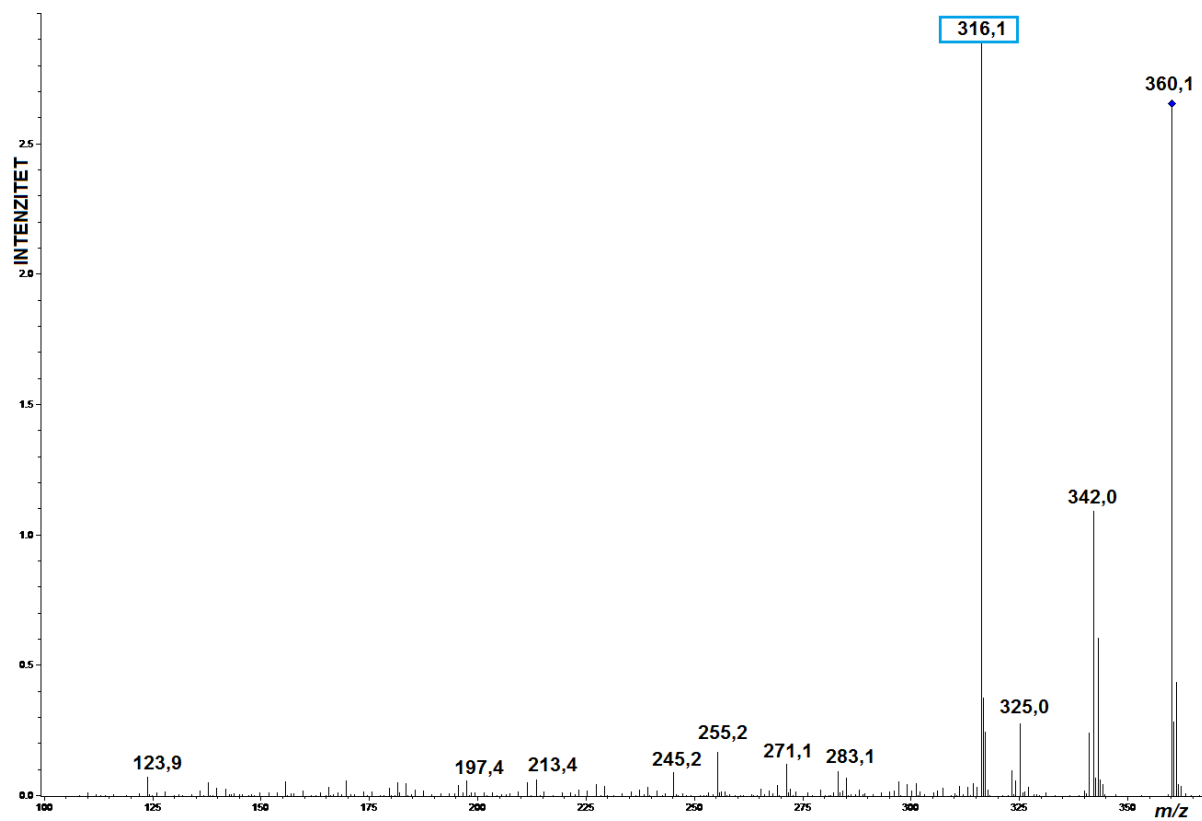
Aktivna farmaceutska tvar (API)	Farmakološki učinak na ciljane organizme	Potencijalni negativni učinci na neciljane organizme
Fluoksetin	Seksualne disfunkcije u ljudi kao nuspojava	Mijenja razinu estradiola kod riba
Diklofenak	Bubrežna toksičnost kod ljudi	Oštećenje bubrega kod riba i ptica te uzrokuje smrt supova
Etinil estradiol	Feminizacija mužjaka kao nuspojava	Utječe na plodnost riba, gmazova i vodenih beskralježnjaka
Citotoksici	Željeni učinak - antikancerogen	Reproduktivni toksikanti, citotoksični za ribe i vodene vrste

Tablica P.2. Jednadžbe pravca i koeficijenti determinacije (R^2) svih antibiotika u tri različite matrice

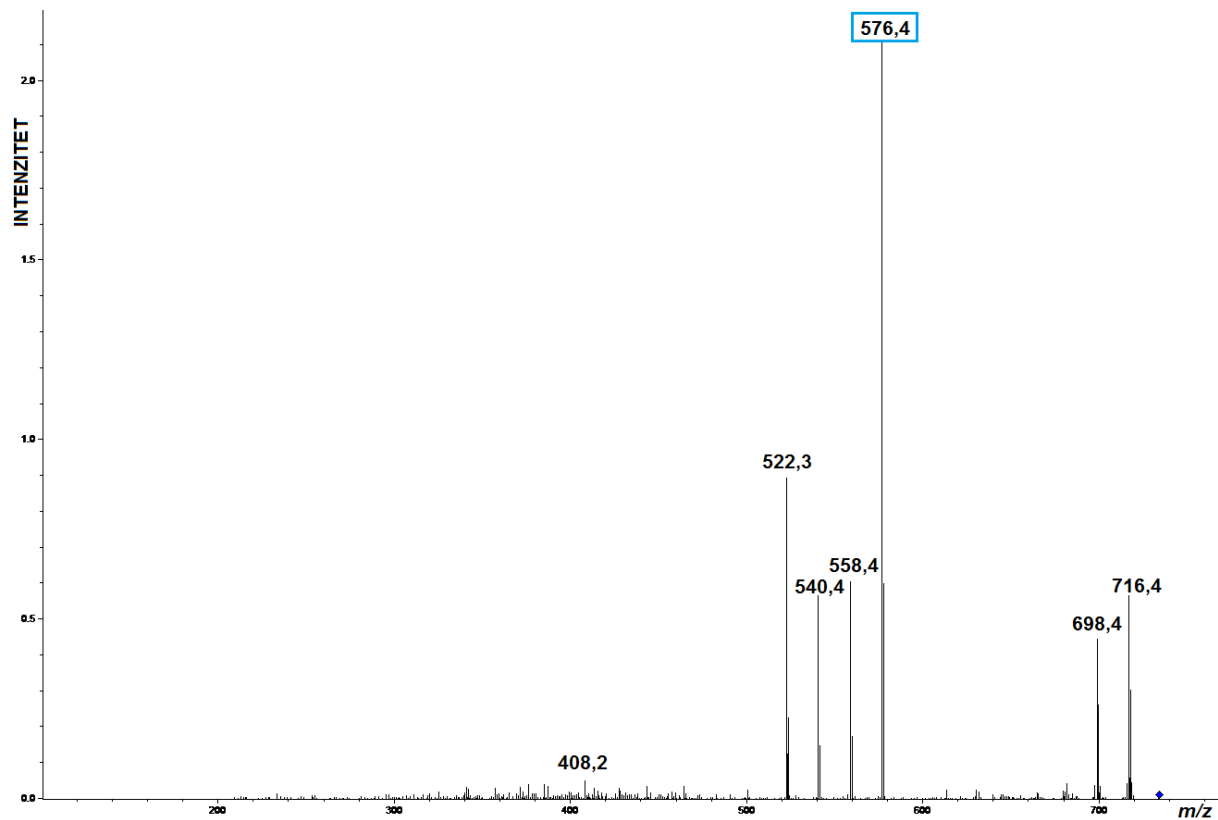
	<i>Ultračista voda</i>	<i>Izvorska voda</i>	<i>Sintetska otpadna voda</i>
	Jednadžba pravca	Jednadžba pravca	Jednadžba pravca
<i>Amoksicilin</i>	$y=17977,35x-11062,6$ $R^2=0,98$	$y=19906,28x+87858,7$ $R^2=0,99$	$y=14285,7x+ 322710,73$ $R^2=0,95$
<i>Enrofloksacin</i>	$y=0,6999x-0,0527$ $R^2=0,99$	$y=1158515x-4698498$ $R^2=0,99$	$y=3,9501x-0,0779$ $R^2=0,99$
<i>Eritromicin</i>	$y=0,0909x+0,0001$ $R^2=0,99$	$y=41949,97x-12934,53$ $R^2=0,99$	$y=49373,4x-646753$ $R^2=0,99$
<i>Oksitetraciklin</i>	$y=0,1261x-0,0063$ $R^2=0,99$	$y=0,5121x-0,7578$ $R^2=0,96$	$y=9943,72x-290852,12$ $R^2=0,98$
<i>Sulfametoksazol</i>	$y=0,0832x+0,0028$ $R^2=0,99$	$y=0,0825x-0,0029$ $R^2=0,99$	$y=0,0740x-0,0002$ $R^2=0,99$
<i>Trimetoprim</i>	$y=0,8263x+0,0828$ $R^2=0,98$	$y=0,8858x-0,1015$ $R^2=0,98$	$y=0,8472x-0,0044$ $R^2=0,99$
<i>Vankomicin</i>	$y=7555,5x-129197,4$ $R^2=0,98$	$y=11260,41x-65533,6$ $R^2=0,99$	$12917,89x-129398,80$ $R^2=0,98$



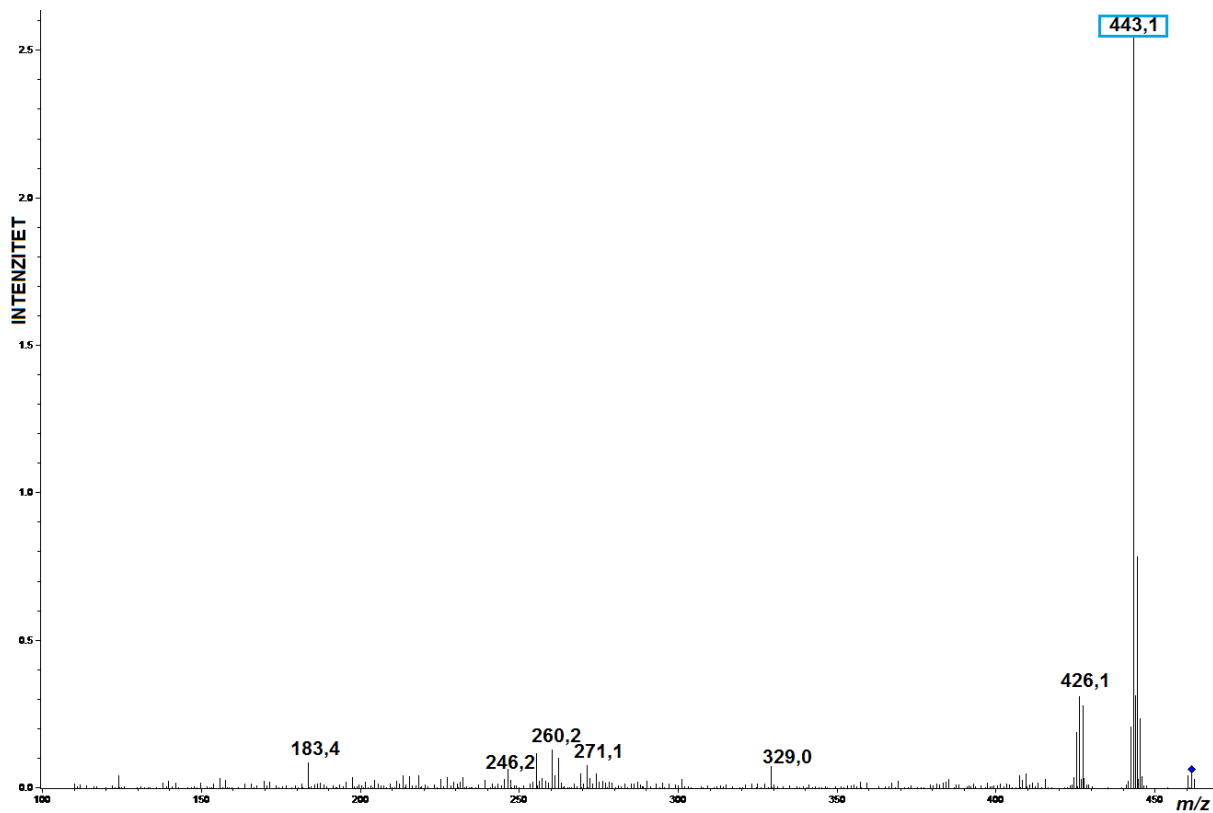
Slika P.1. MS/MS spektar amoksicilina



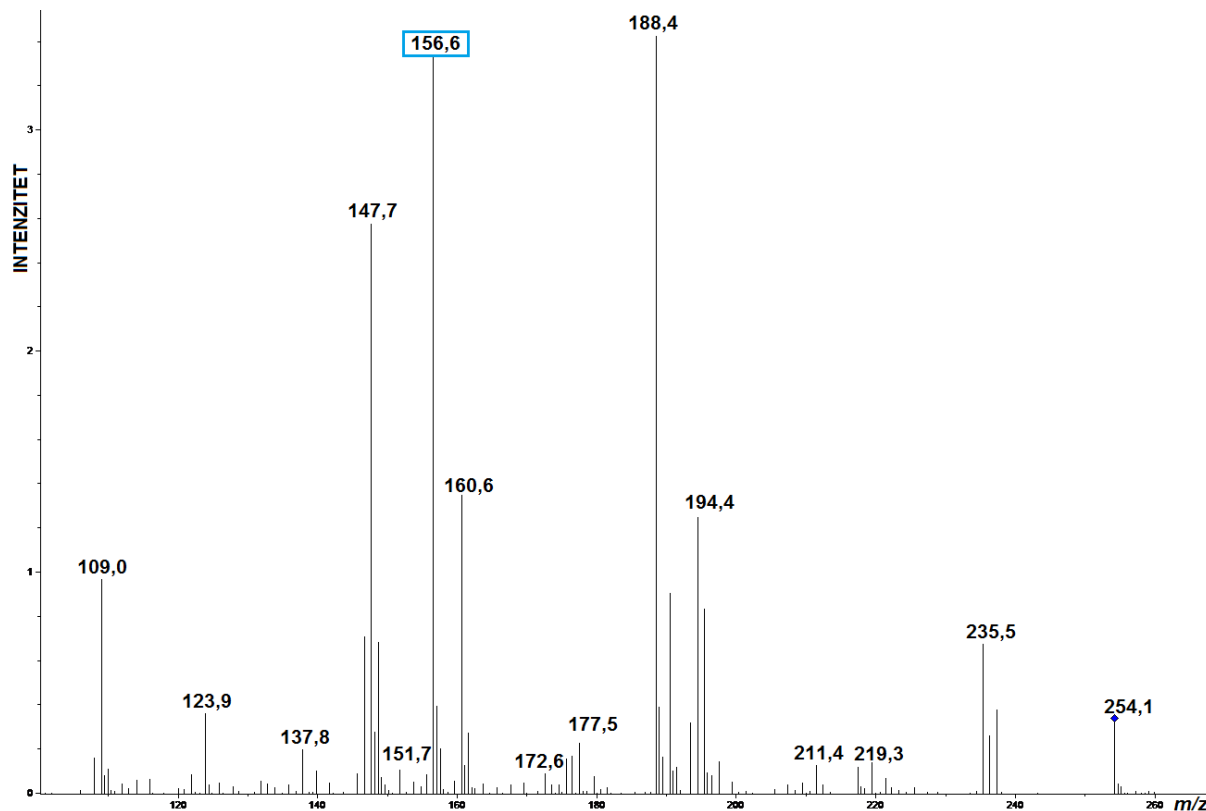
Slika P.2. MS/MS spektar enrofloksacina



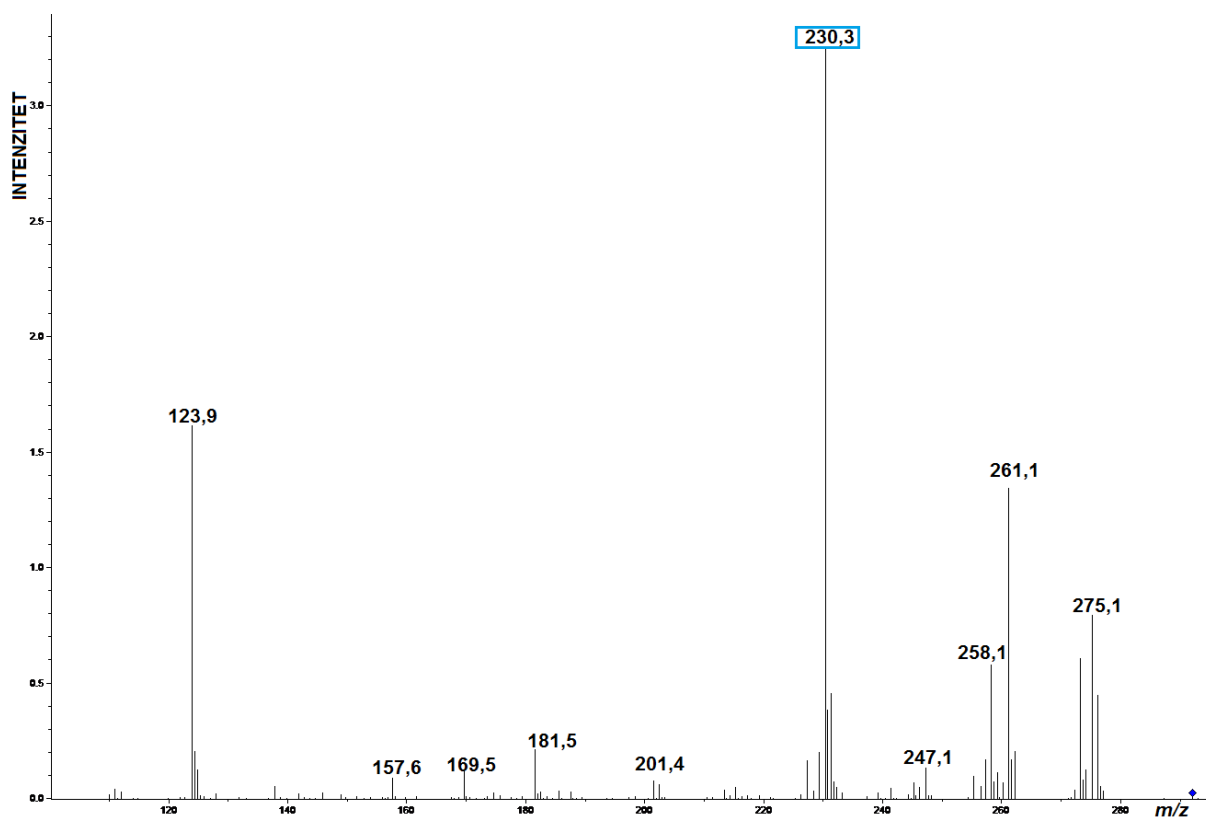
Slika P.3. MS/MS spektar eritromicina



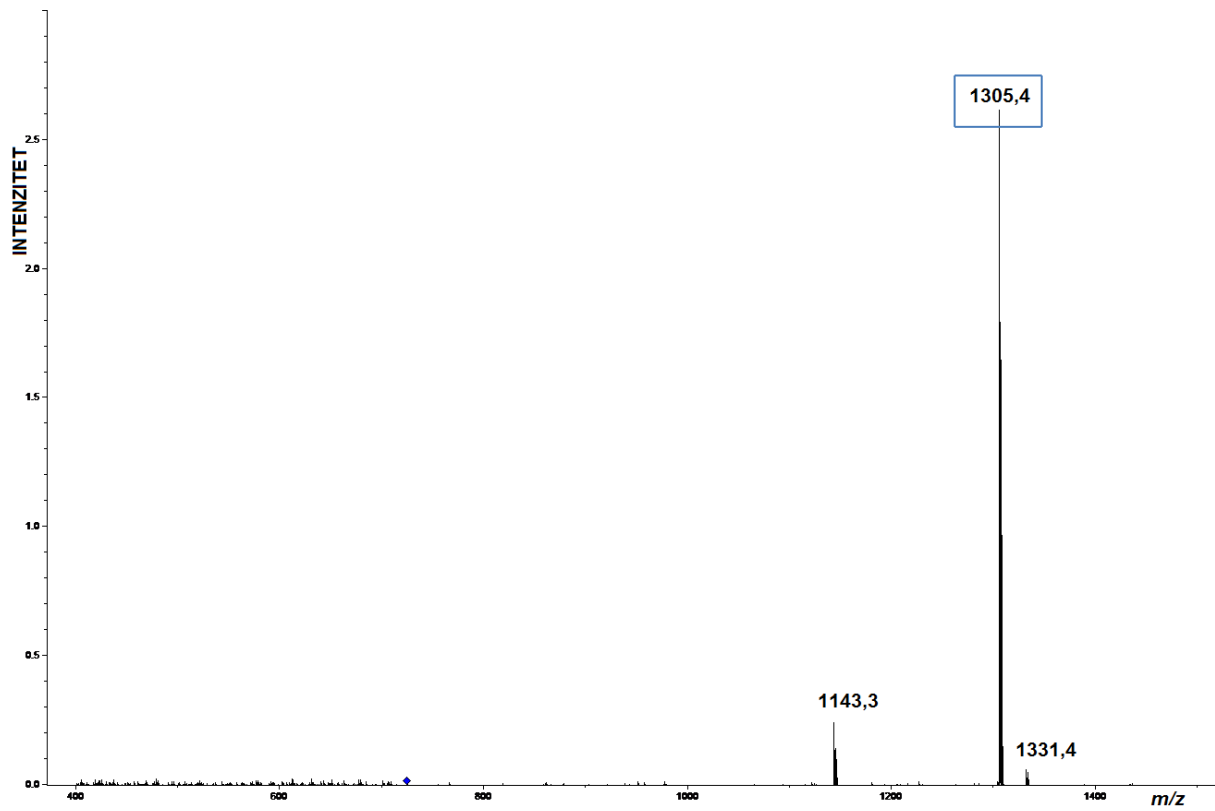
Slika P.4. MS/MS spektar oksitetraciklina



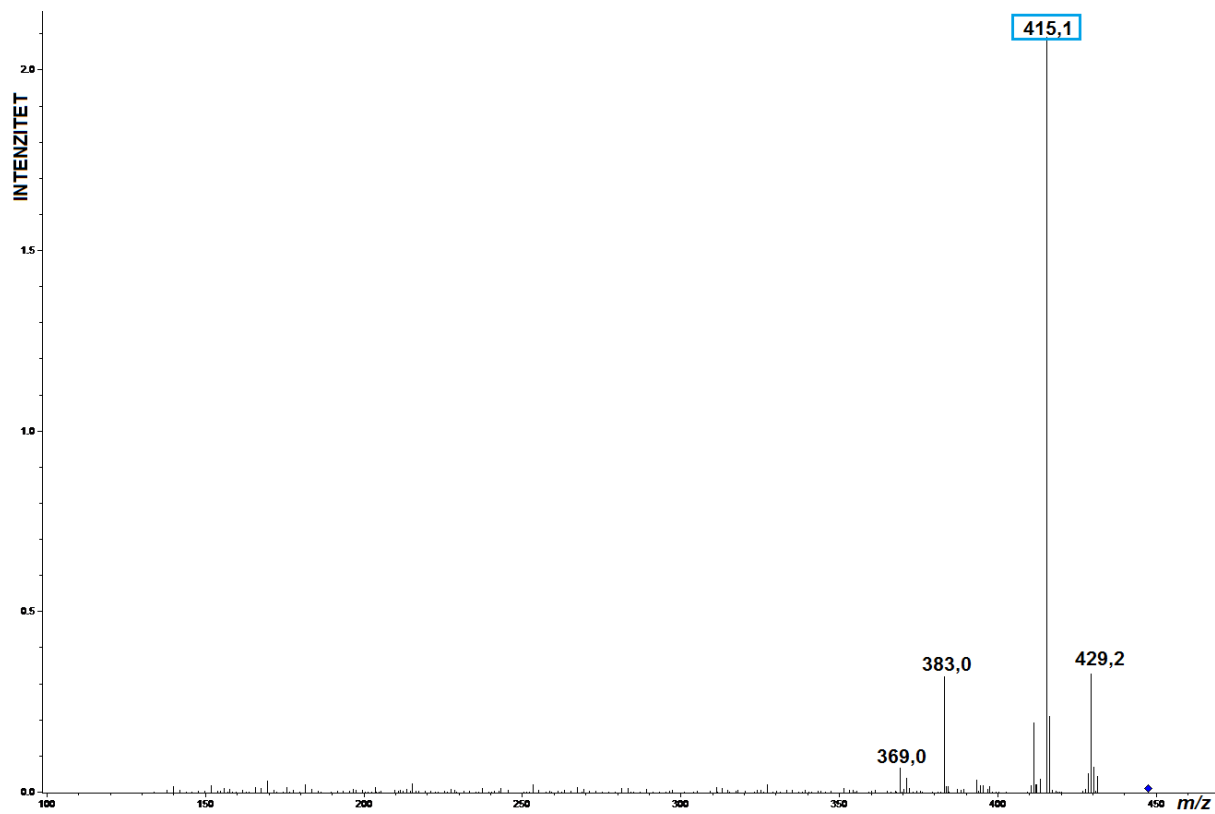
Slika P.5. MS/MS spektar sulfametoksazola



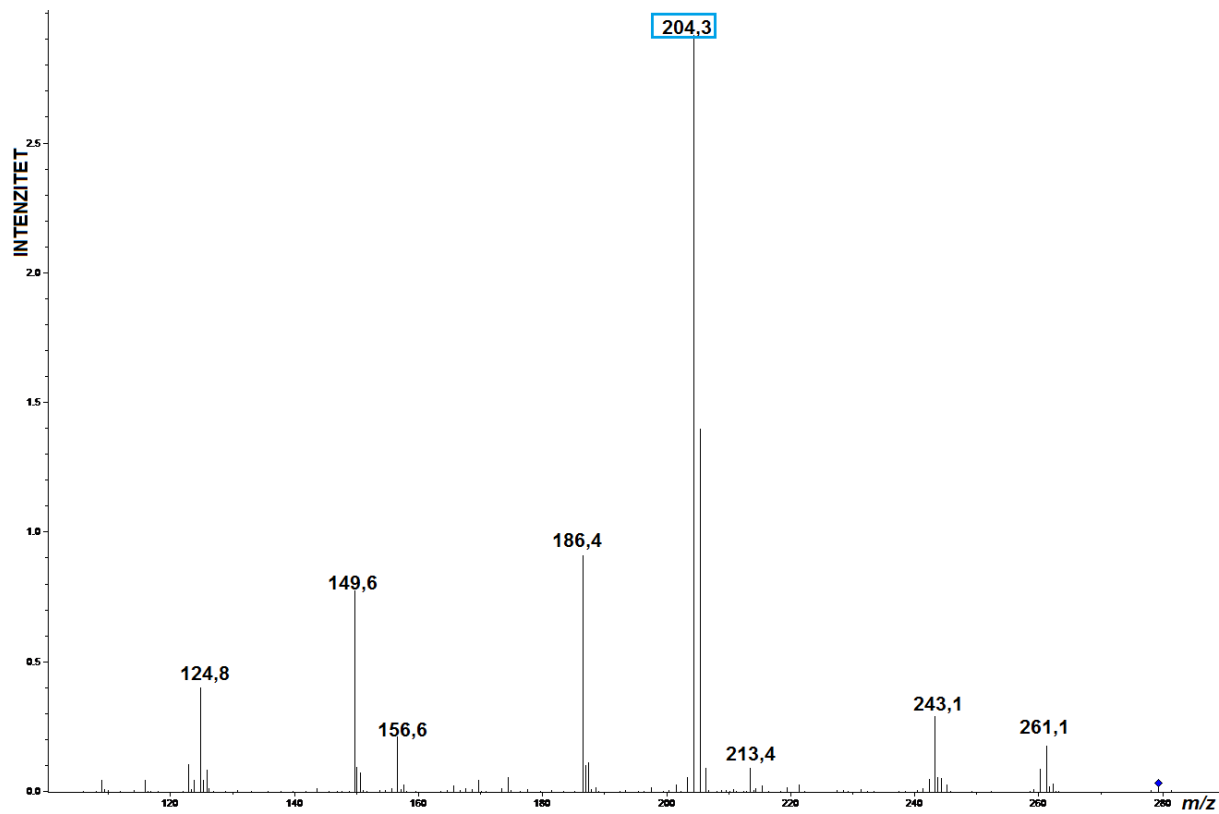
Slika P.6. MS/MS spektar trimetoprima



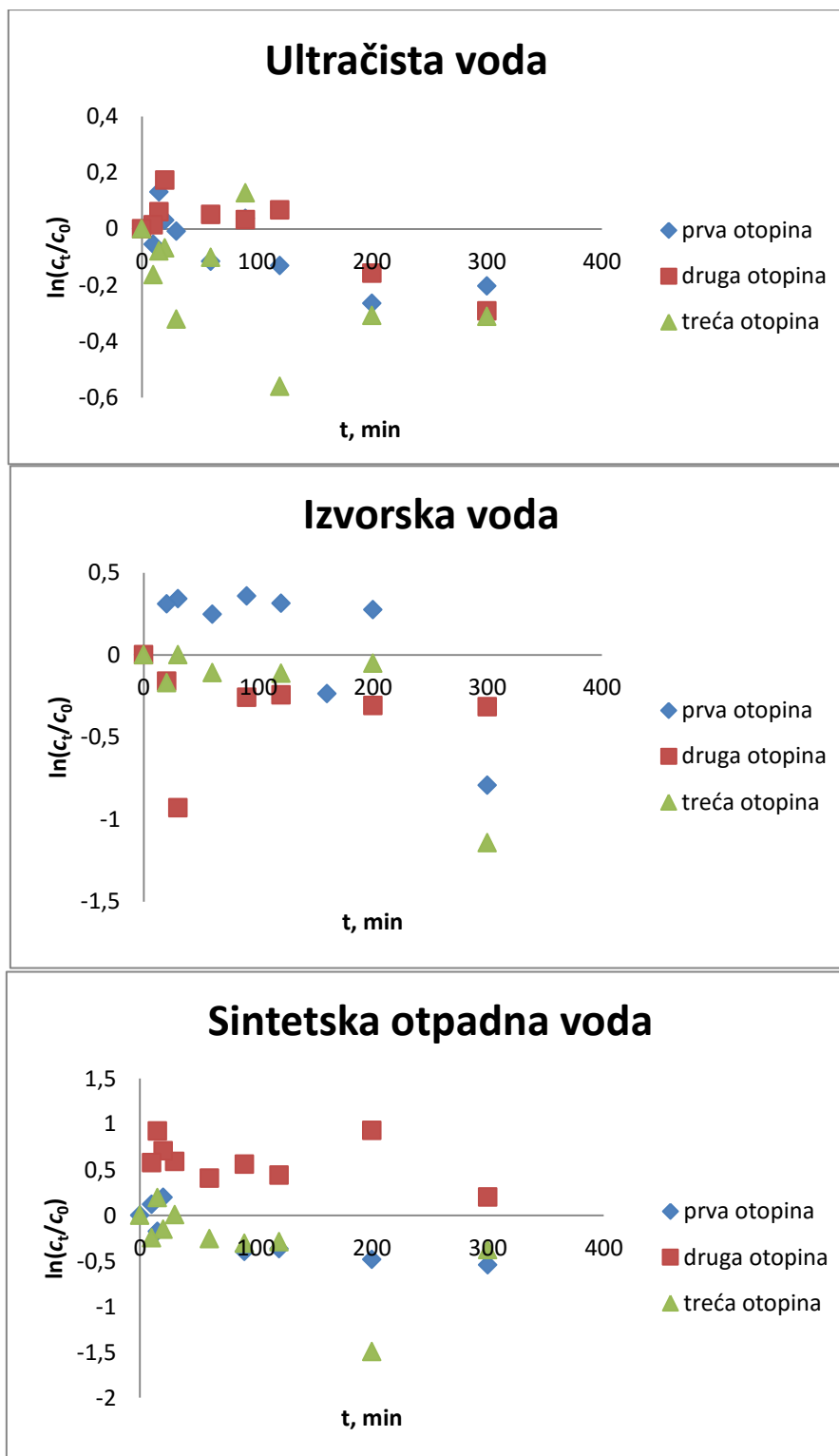
Slika P.7. MS/MS spektar vankomicina



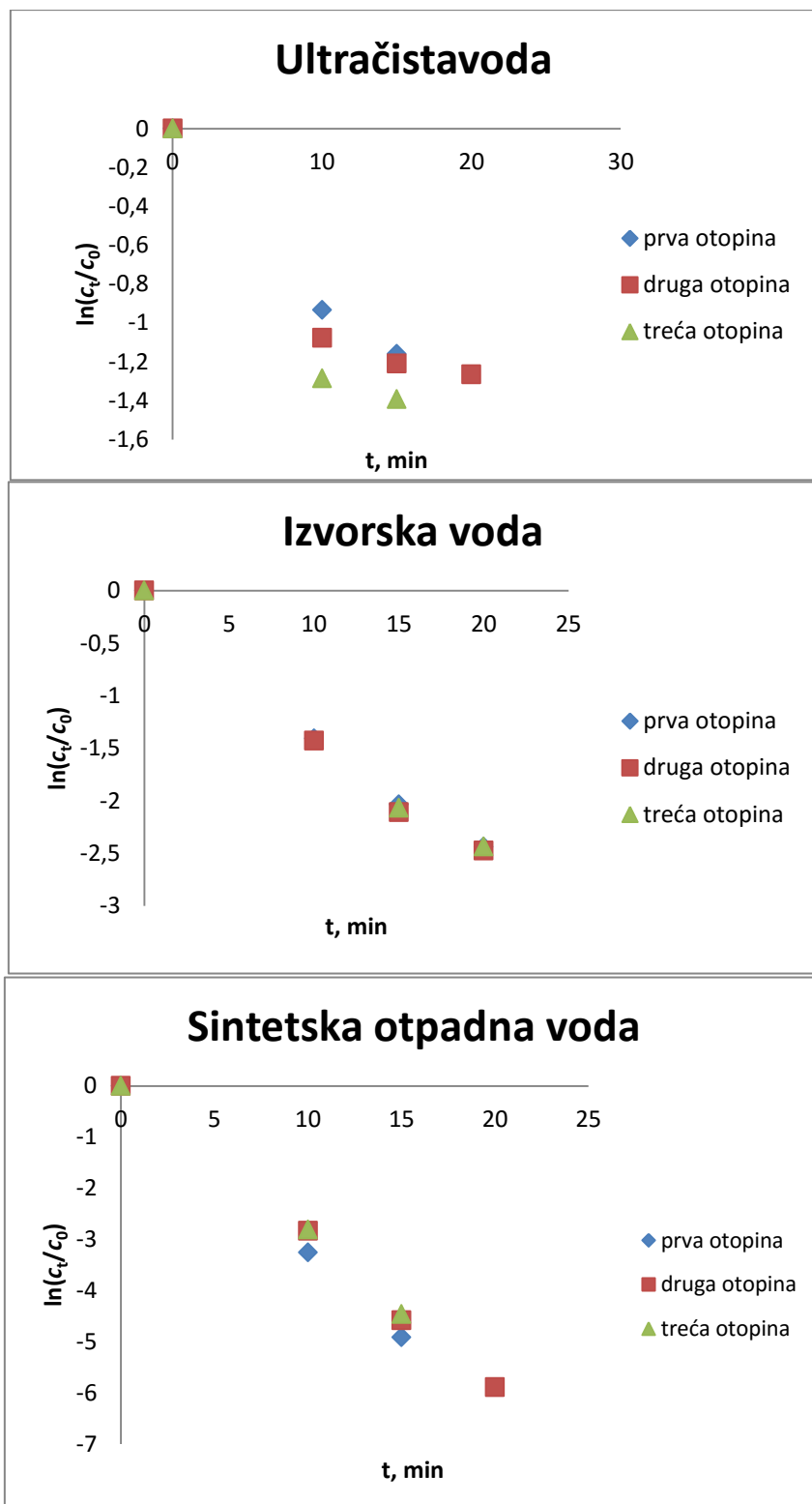
Slika P.8. MS/MS spektar febantela



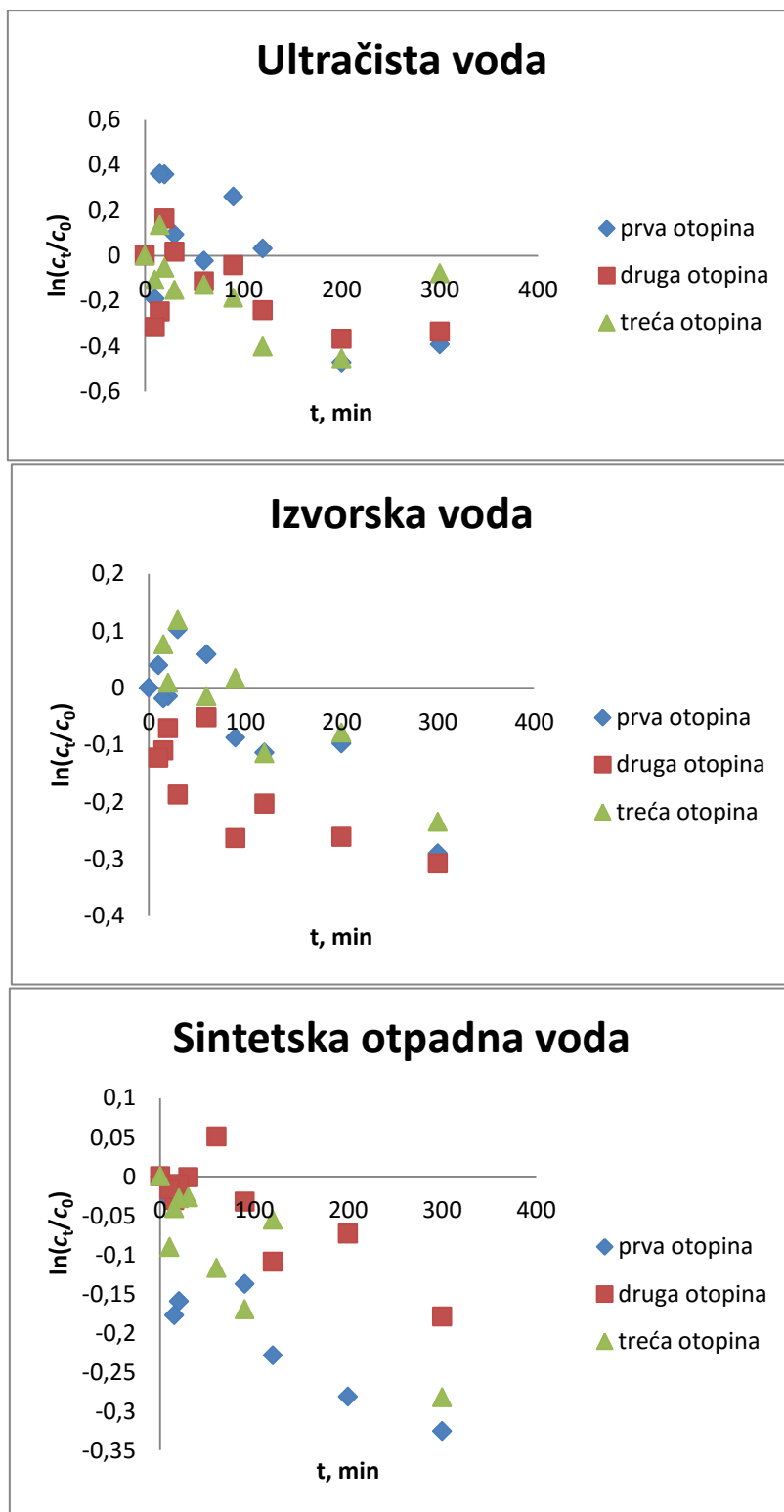
Slika P.9. MS/MS spektar sulfametazina



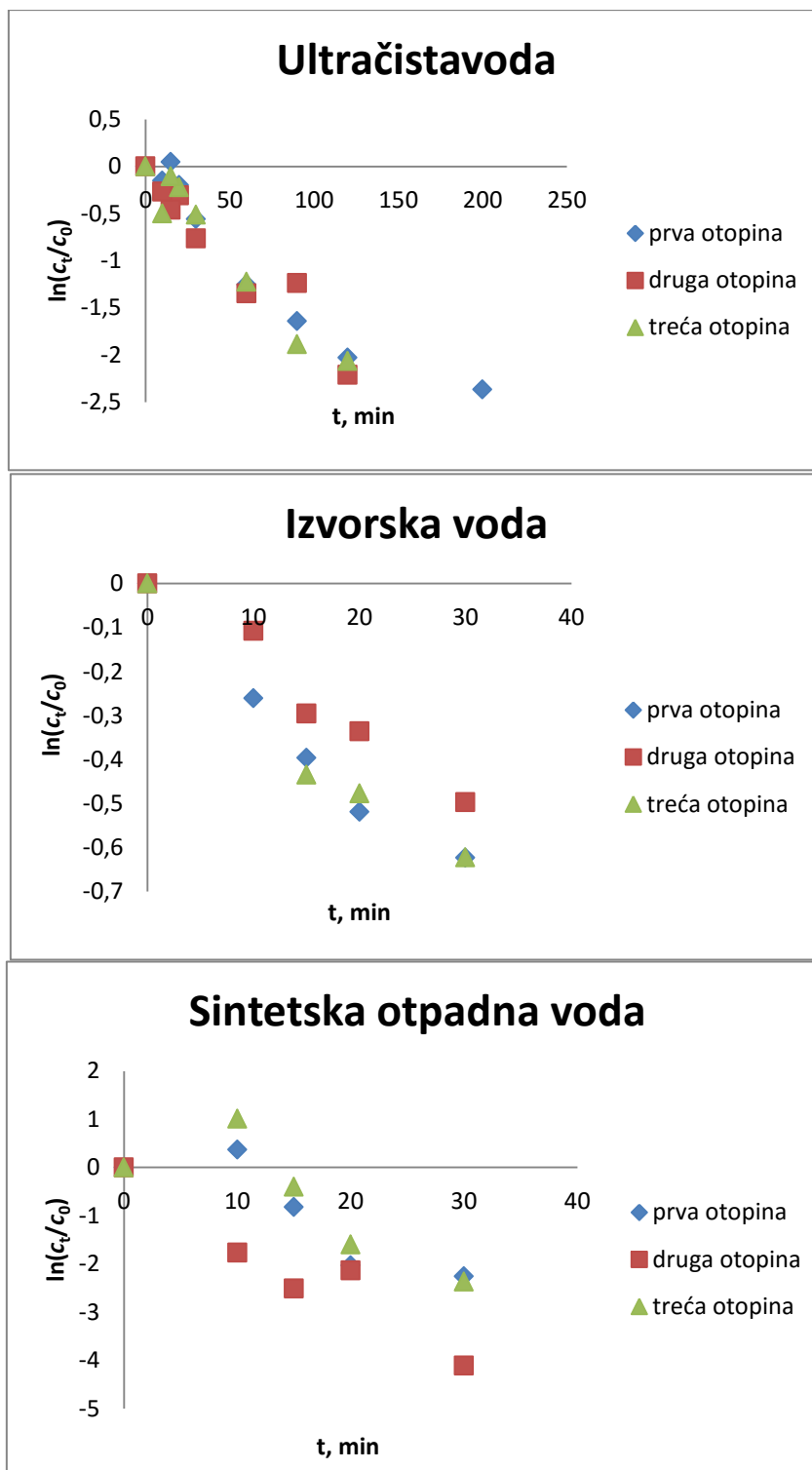
Slika P. 10. Promjena koncentracije amoksicilina tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



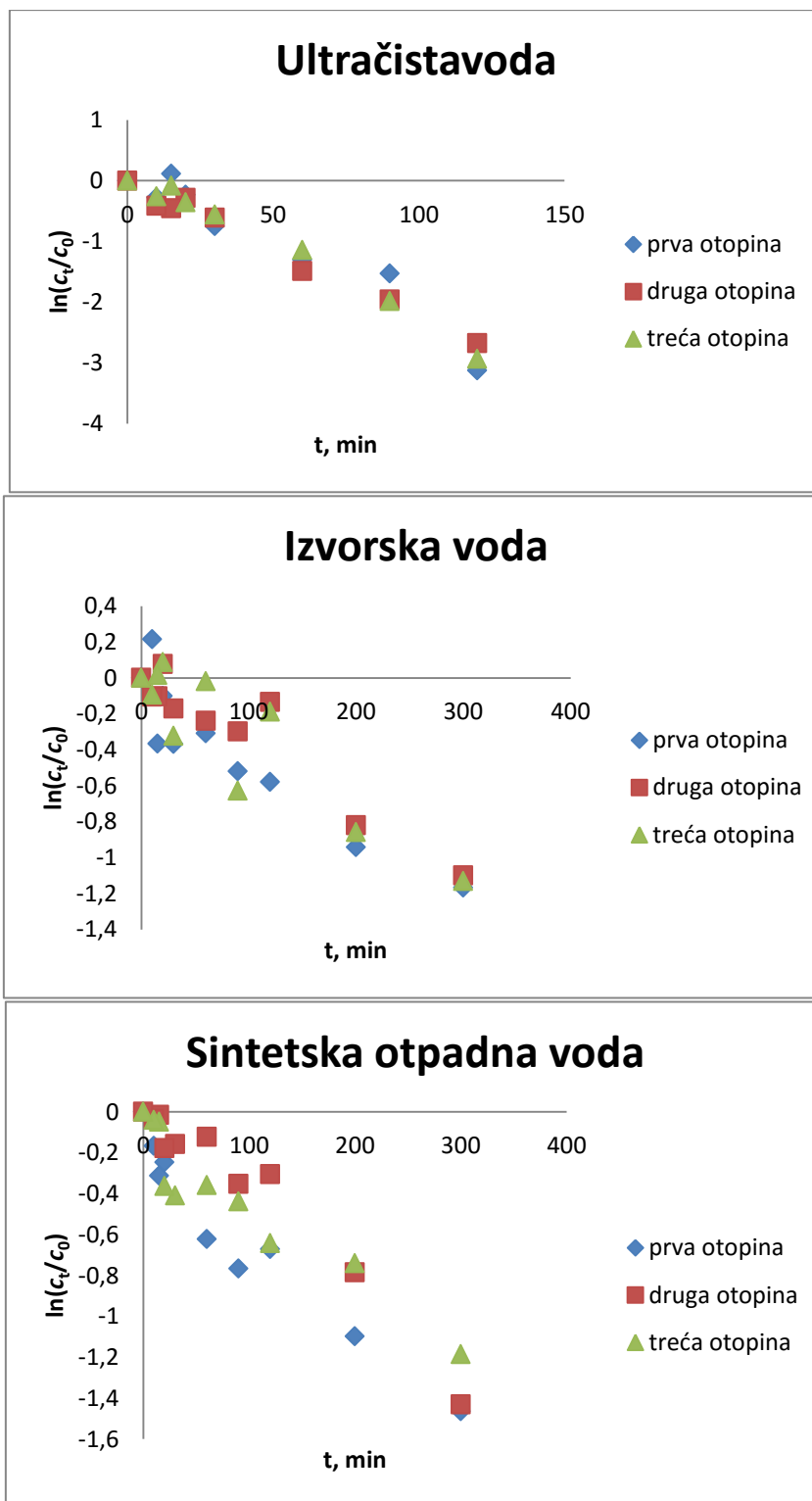
Slika P. 11. Promjena koncentracije **enrofloksacina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



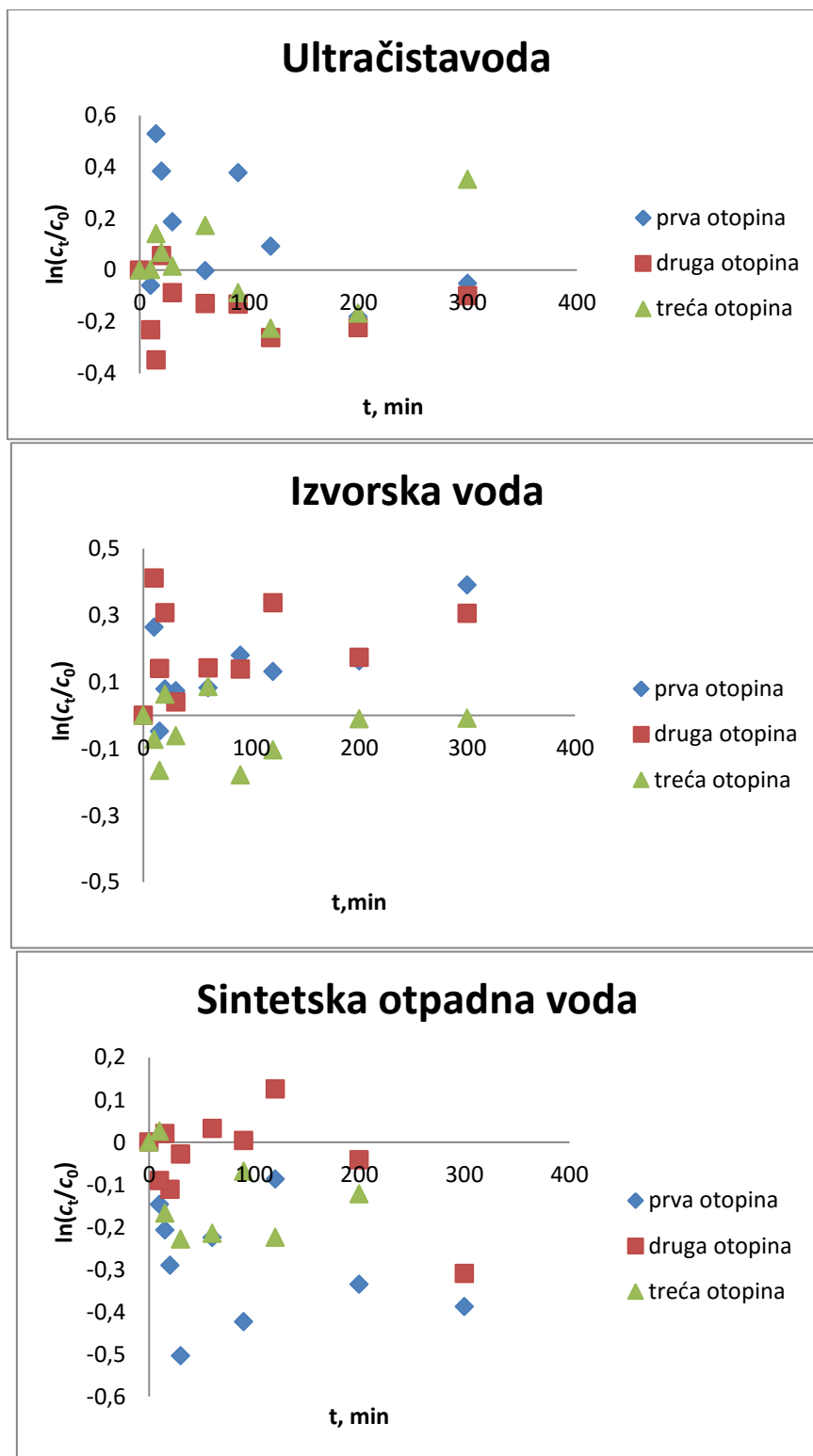
Slika P. 12. Promjena koncentracije eritromicina tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



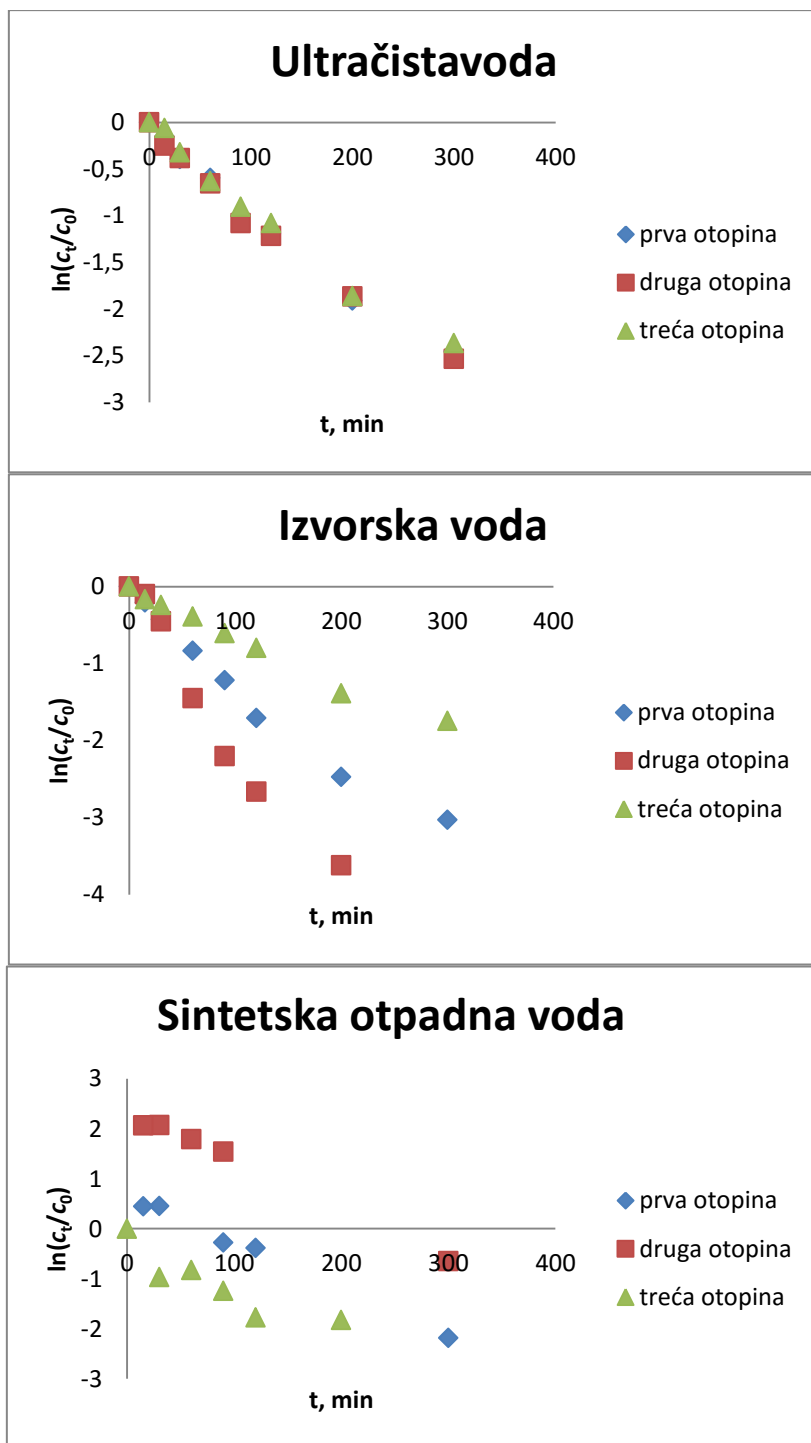
Slika P. 13. Promjena koncentracije **oksitetraciklina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



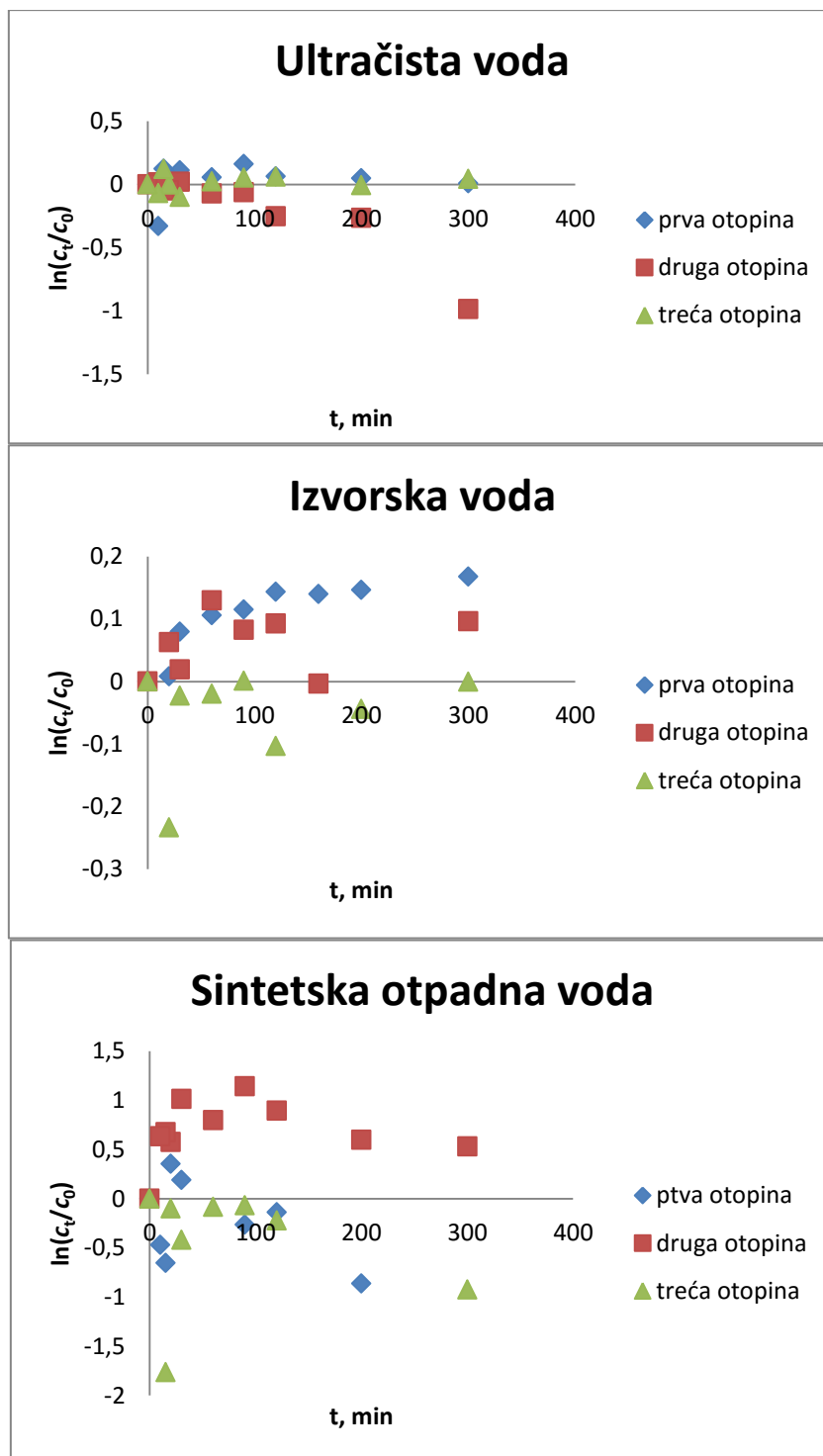
Slika P. 14. Promjena koncentracije **sulfametoksazola** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



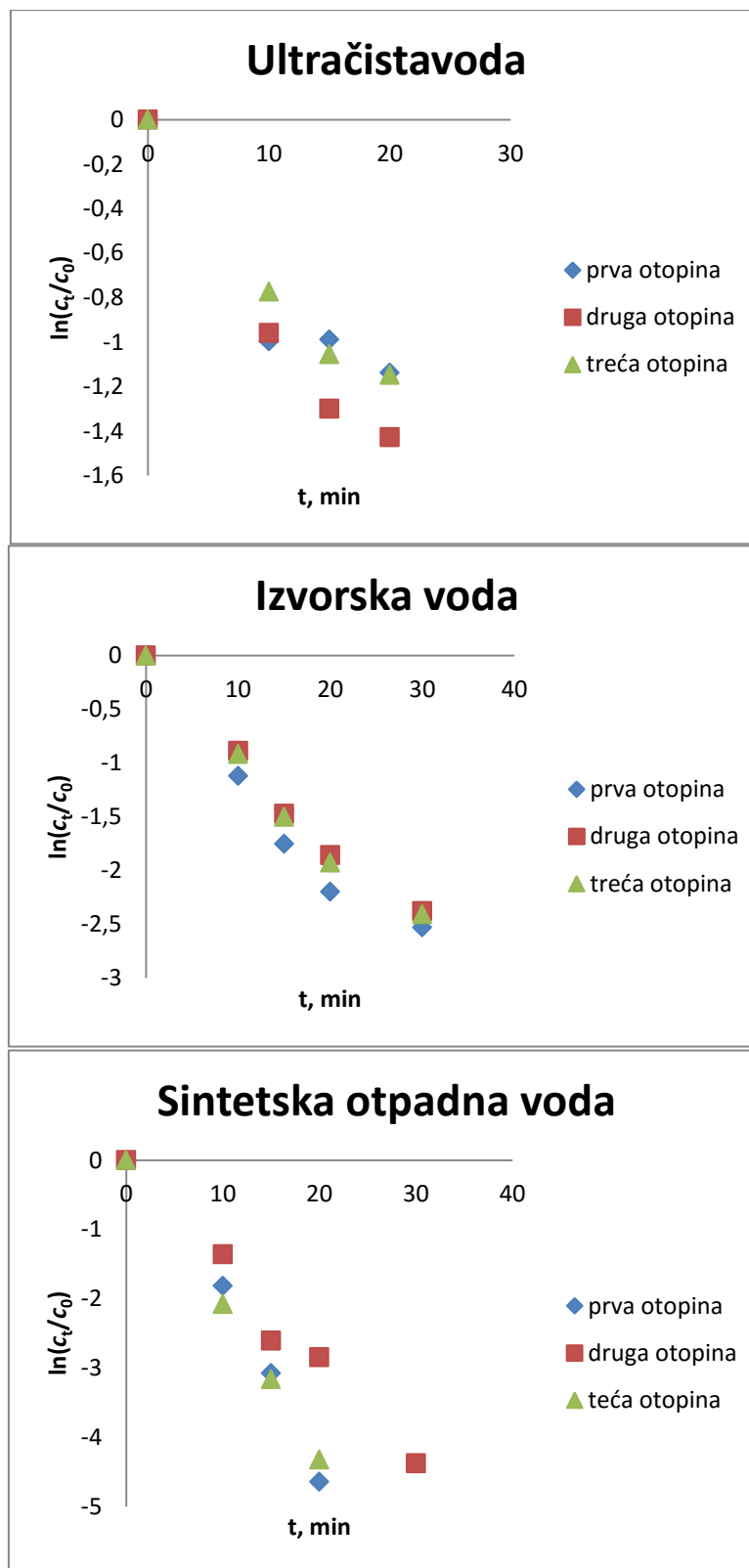
Slika P. 15. Promjena koncentracije trimetoprima tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



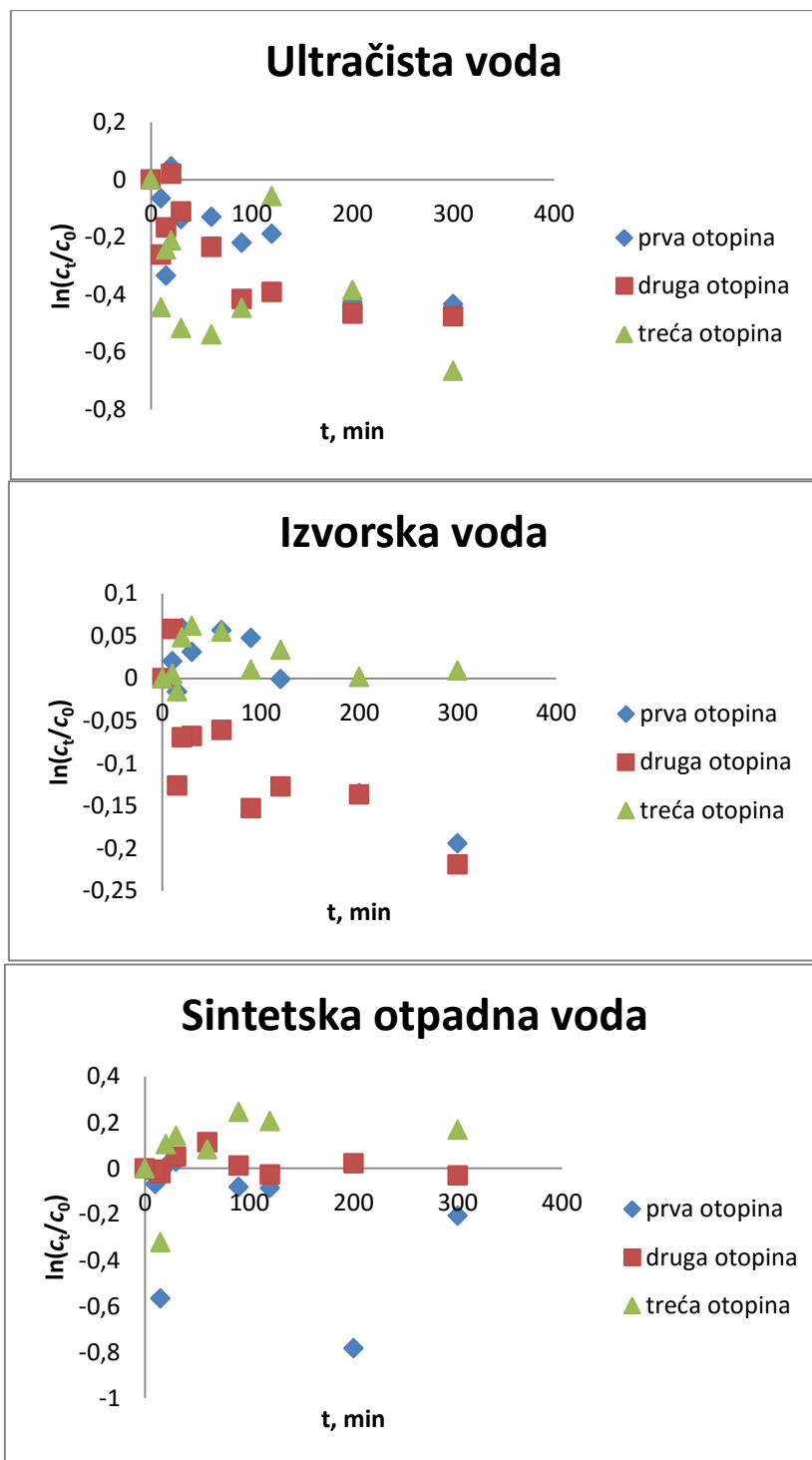
Slika P. 16. Promjena koncentracije **vankomicina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice



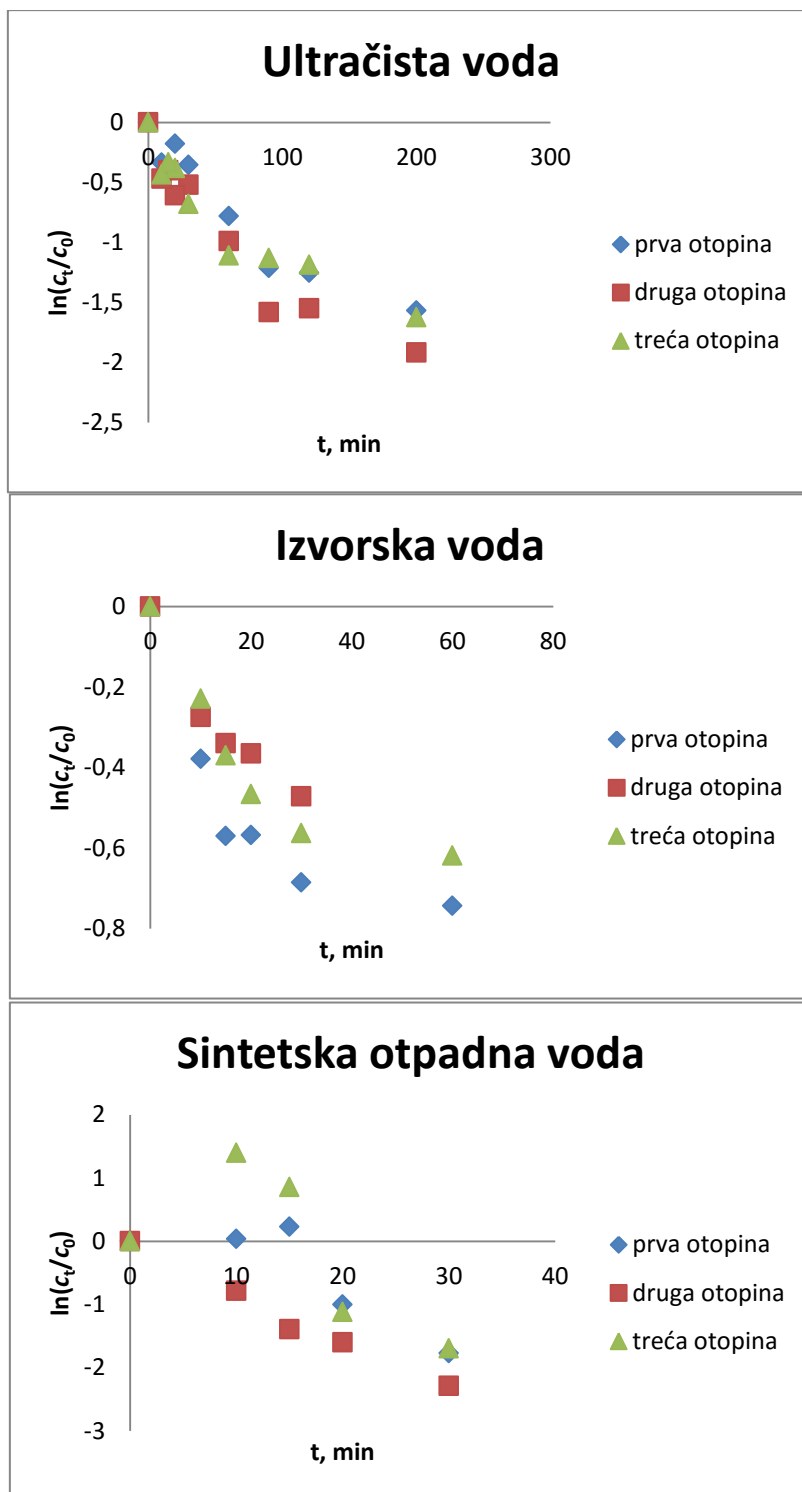
Slika P. 17. Promjena koncentracije amoksicilina tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera



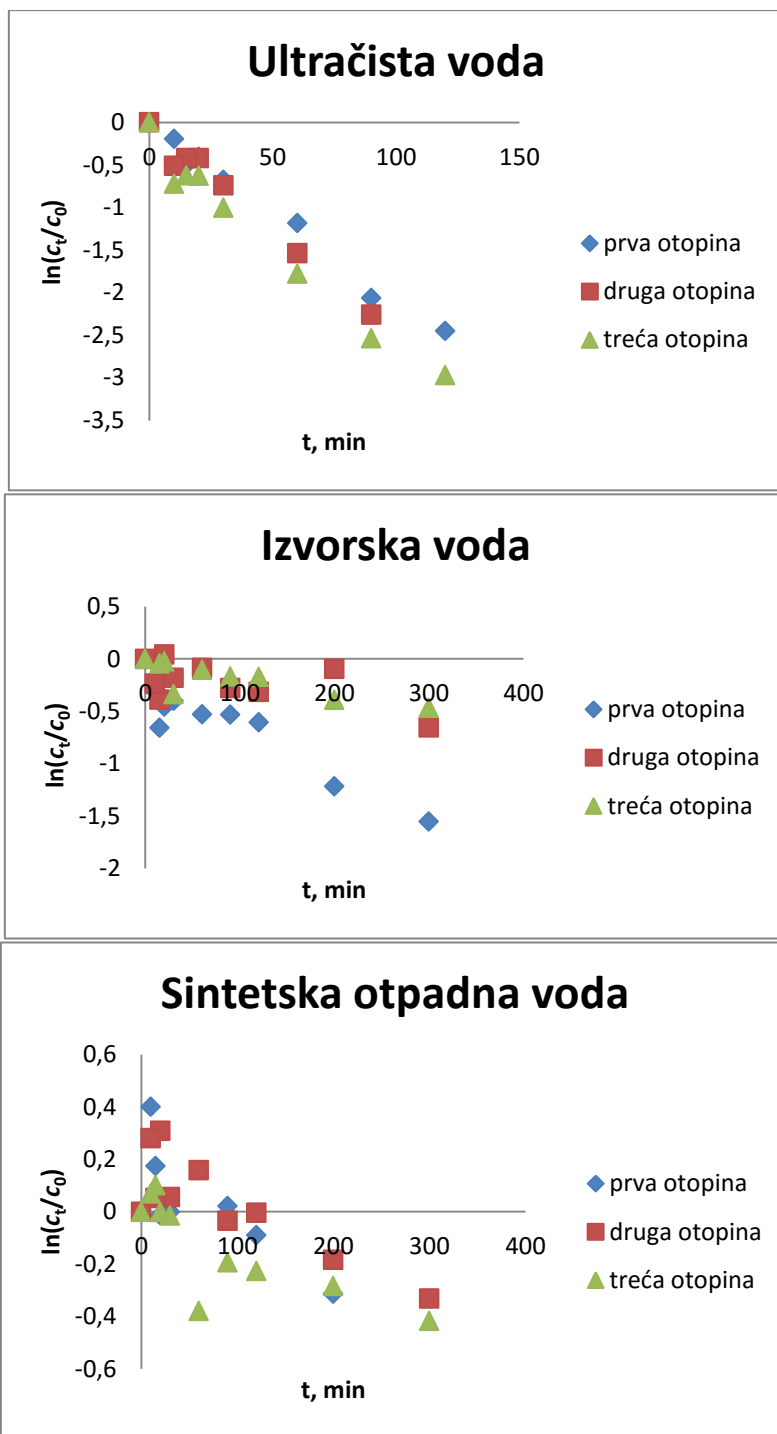
Slika P. 18. Promjena koncentracije **enrofloksacina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera



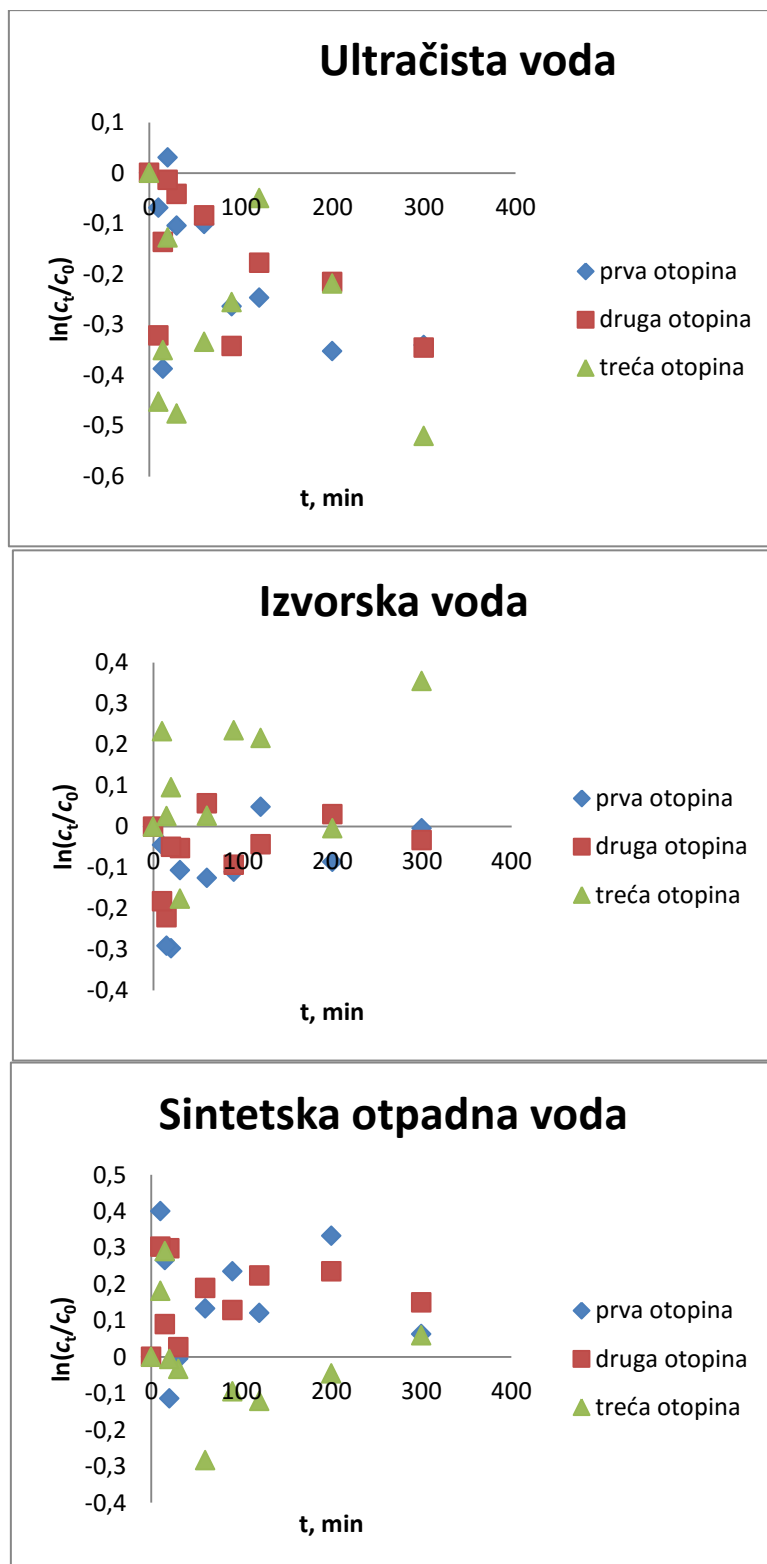
Slika P. 19. Promjena koncentracije **eritromicina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera



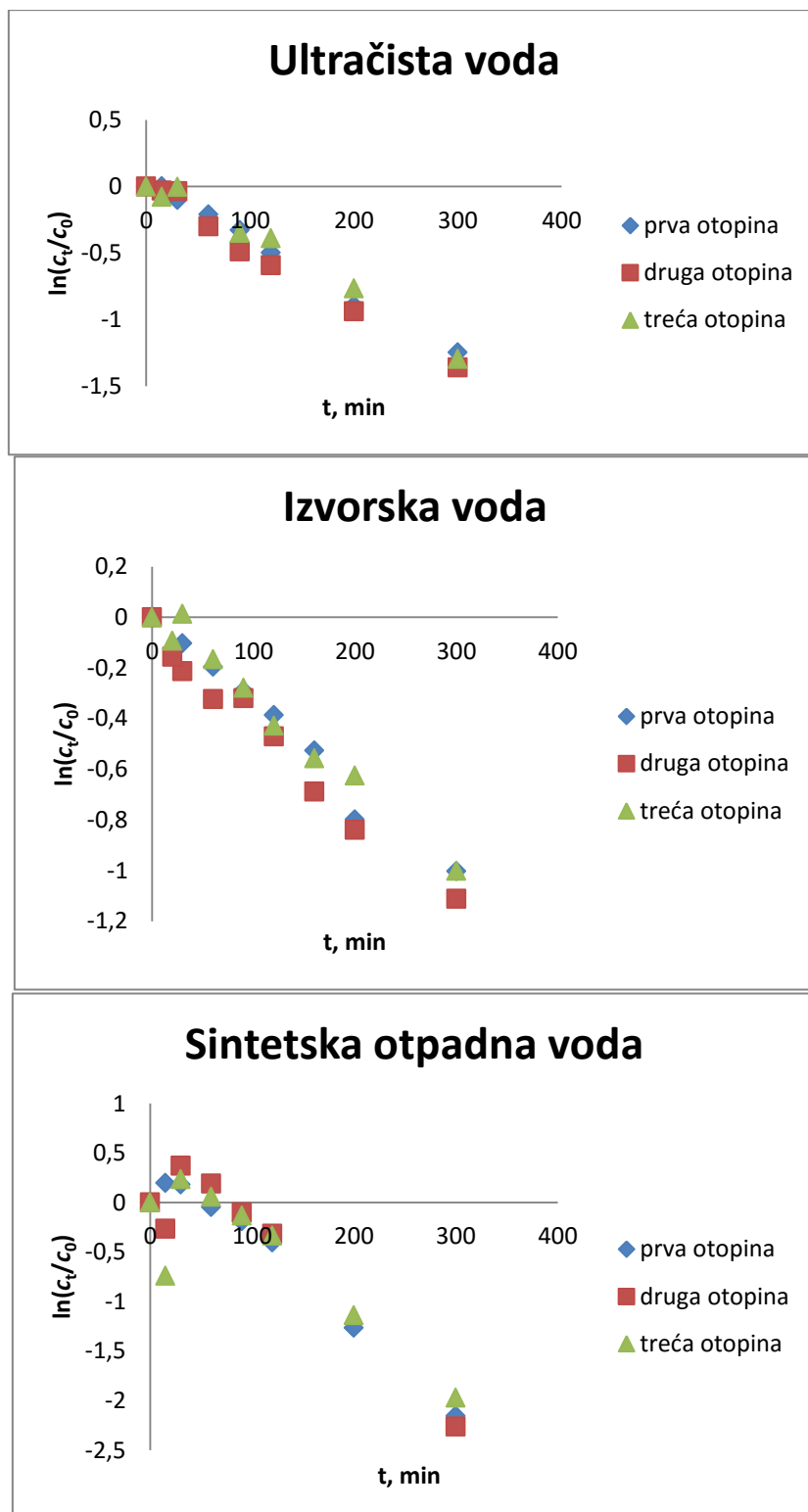
Slika P. 20. Promjena koncentracije **oksitetraciklina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera



Slika P. 21. Promjena koncentracije **sulfametoksazola** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera



Slika P. 22. Promjena koncentracije **trimetoprima** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera



Slika P. 23. Promjena koncentracije **vankomicina** tijekom fotolitičke razgradnje u tri različite matrice uz dodatak UV – filtera

