

Ultrazvučna ekstrakcija farmaceutika iz aktivnog mulja

Horvat, Tajana

Master's thesis / Diplomski rad

2018

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:149:817756>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-10-14**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Tajana Horvat

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ KEMIJE I INŽENJERSTVA MATERIJALA

Tajana Horvat

ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ AKTIVNOG MULJA
ULTRASONIC EXTRACTION OF PHARMACEUTICALS FROM ACTIVATED SLUDGE

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Članovi ispitnog povjerenstva: Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger

Doc. dr. sc. Davor Dolar

Dr. sc. Mirjana Novak Stankov

Zagreb, rujan 2018.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na spremnosti prihvaćanja još jedne naknadne teme diplomskog rada. Na posvećenom vremenu i pomoći prilikom izrade ovog rada, ali i na nesebičnim i dobronamjernim sugestijama koje uvijek rado dijeli sa svojim studentima. Također, zahvaljujem i na ukazanom povjerenju prilikom izrade ovog rada.

Zahvaljujem i svim ostalim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na njihovoj ljubaznosti i spremnosti pomoći te svim profesorima Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije na prenesenom znanju.

Hvala mojoj majci, ocu, braći i prijateljima.

Ovaj rad sufinanciran je od strane Hrvatske zaklade za znanost projektom IP-2014-09-2353 i od strane Vlade Republike Hrvatske projektom ReHOHMem, a izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2017./2018. pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Danijele Ašperger.



Vlada
Republike
Hrvatske

**Izravna uporaba komunalne otpadne vode za navodnjavanje membranskim tehnologijama
(ReHOHMem)**

Projekt se financira u sklopu Programa Vlade Republike Hrvatske za poticanje istraživačkih i razvojnih aktivnosti u području klimatskih promjena za razdoblje od 2015. do 2016. godine

**Sadržaj ove publikacije isključiva je odgovornost Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije*



REPUBLIKA HRVATSKA
MINISTARSTVO ZAŠTITE
OKOLIŠA I ENERGETIKE



ministarstvo znanosti
obrazovanja i sporta



FOND ZA ZAŠTITU OKOLIŠA I
ENERGETSKU UČINKOVITOST



HRZZ
Hrvatska zaklada
za znanost

SAŽETAK

ULTRAZVUČNA EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ AKTIVNOG MULJA

Farmaceutici su kemijske tvari koje se koriste pri liječenju i sprječavanju bolesti kod ljudi i životinja. Nazivaju se "novim onečišćivačima" jer još uvijek ne postoje propisane zakonske doze ispuštanja obrađenih otpadnih voda u okoliš te su još uvijek nedovoljno istraženi. Ipak, danas je postignuta viša svijest o mogućim negativnim utjecajima farmaceutika na cjelokupni živi svijet te je stoga i sve više istraživanja znanstvenika usmjereno na otkrivanje njihova ponašanja u vodenim sustavima, tlu i sedimentu. Kako bi se izbjegle neželjene posljedice, potreban je konstantni nadzor i zakonsko propisivanje maksimalno dopuštenih koncentracija farmaceutika u okolišu s obzirom da oni pokazuju veliku tendenciju zadržavanja u čvrstim prirodnim maticama. Farmaceutici ispitivani u ovom radu su: antibiotici (azitromicin, cefdinir, eritromicin), antihelmintici (albendazol, febantel, prazikvantel), antiemetik (metoklopramid) i kemoterapeutik (hidroksiklorokin). U radu je proučavano ponašanje farmaceutika u različitim čistim organskim otapalima, ali i u dvokomponentnim sustavima otapala. Pri tome je korištena metoda ultrazvučne ekstrakcije, kao jeftina i vrlo dostupna metoda. Separacija i kvalitativna analiza farmaceutika te iskorištenja farmaceutika u ekstraktima, određena su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s nizom dioda (HPLC-DAD). Željeno iskorištenje više od 50 % postignuto je u samo četiri slučaja, za metoklopramid u etanolu i metanolu te za hidroksiklorokin u etanolu i dvokomponentnom sustavu etanol:heksan. Iz tog razloga, potrebno je primijeniti neke druge metode ekstrakcije kojima bi se smanjio utjecaj matice uzorka te tako dobilo bolje iskorištenje ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja.

Ključne riječi: aktivni mulj, farmaceutici, ultrazvučna ekstrakcija,

tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

ABSTRACT

ULTRASONIC EXTRACTION OF PHARMACEUTICALS FROM ACTIVATED SLUDGE

Pharmaceuticals are chemical substances used in the treatment and prevention of human and animals diseases. They are called a “new pollutants” because there still are not defined a regulatory legal doses for releasing treated wastewater into the environment and they are still insufficiently studied. However, today is achieved higher awareness about possible negative impacts pharmaceuticals to the entire living world and the more and more researches of scientists are focused on discovering their behavior in water, soil and sediment. In order to avoid unintended consequences, constant supervision and regulation of the maximum legal residue levels pharmaceuticals in environment is required since they show a high tendency to retain in solid natural matrices. The pharmaceuticals used in this paper are: antibiotics (azitromycine, eritromycine, cefdinir, chloritromycine, nitrofurantoin), antihelminitics (albendazole, febantel, praziquantel), antiemetic (metoclopramide) and chemoterapeutic agent (hydroxychloroquine). In this paper behavior of pharmaceuticals in various pure organic solvents is studied, as well as in two-component solvent systems. The ultrasonic extraction method is used, as a cheap and highly available method. Separation and qualitative analysis of pharmaceuticals and utilization of pharmaceuticals in the extracts were determined by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC – DAD). The yield of more than 50% was achieved in only four cases, for metoclopramide in ethanol and ethanol and for hydroxylchlorocin in ethanol and a two-component ethanol: hexane system. For this reason, some other extraction methods should be used to reduce the impact of the sample nut, thus increasing the utilization of extraction of active pharmaceutical sludge.

Key words: *activated sludge, pharmaceuticals, ultrasonic solvent extraction,*

high performance liquid chromatography (HPLC-DAD)

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1 Aktivni mulj	3
2.2 Farmaceutici	7
2.2.1 Antibiotici	9
2.2.1.1 Azitromicin	10
2.2.1.2 Cefdinir	11
2.2.1.3 Eritromicin	12
2.2.1.4 Klaritromicin	13
2.2.1.5 Nitrofurantoin	13
2.2.2 Antihelmintici	14
2.2.2.1 Albendazol	14
2.2.2.2 Febantel	15
2.2.3 Antiemetici	16
2.2.3.1 Metoklopramid	16
2.2.4 Kemoterapeutici	17
2.2.4.1 Hidroksiklorokin	17
2.3 Priprava uzoraka za analizu	18
2.4 Određivanje farmaceutika u okolišu	19
2.4.1 Metode ekstrakcije	20
2.4.1.1 Ultrazvučna ekstrakcija	20
2.4.2 Kromatografske metode analize	21
2.4.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	21
3. EKSPERIMENTALNI DIO	23
3.1 Materijali	23
3.1.1 Aktivni mulj	23
3.1.2 Kemikalije	23
3.1.3 Farmaceutici	24
3.2 Instrumenti, uređaji i pribor	25
3.2.1 Analitička vaga	25
3.2.2 Ultrazvučna kupelj	25
3.2.3 Filtriranje	26
3.2.4 Uparavanje (rotavapor)	26
3.2.5 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)	27
3.3 Metoda rada	27
3.3.1 Priprava standardne otopine farmaceutika	27
3.3.2 Priprava špikanog aktivnog mulja	27
3.3.3 Ultrazvučna ekstrakcija	28

3.3.4 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti.....	28
4. REZULTATI I RASPRAVA	29
5. ZAKLJUČAK.....	36
6. LITERATURA	37
7. DODATAK	44
7.1 Popis slika.....	44
7.2 Popis tablica.....	45
8. ŽIVOTOPIS.....	46

1. UVOD

Danas je poznato da su lijekovi široko rasprostranjeni u globalnom okruženju te da predstavljaju opasnost za okoliš od onečišćenja. Koriste se za liječenje ljudi i životinja, ali i poticanja rasta životinja. Prilikom uzimanja lijekova ljudska osoba ili životinja apsorbira lijekovite spojeve i podliježe metaboličkim reakcijama, no u mnogim slučajevima može doći do izlučivanja značajnih količina izvornih tvari iz urina i fekalija pri čemu može doći do onečišćenja okoliša. U okoliš dolaze i kao rezultat proizvodnih procesa, odlaganja neupotrijebljenih farmaceutika te ispuštanja komunalnih i industrijskih otpadnih voda čime ugrožavaju život biljnog i životinjskog svijeta, a kod ljudi mogu potaknuti razvoj bolesti.

U ovom radu korišten je aktivni mulj koji nastaje obradom komunalnih i industrijskih otpadnih voda te sadrži većinom organske tvari. Problem nastaje kada određena količina industrijskih otpadnih voda dolazi u kontakt s gradskom pitkom vodom te na taj način izravno utječe na okoliš i ljudsko zdravlje.

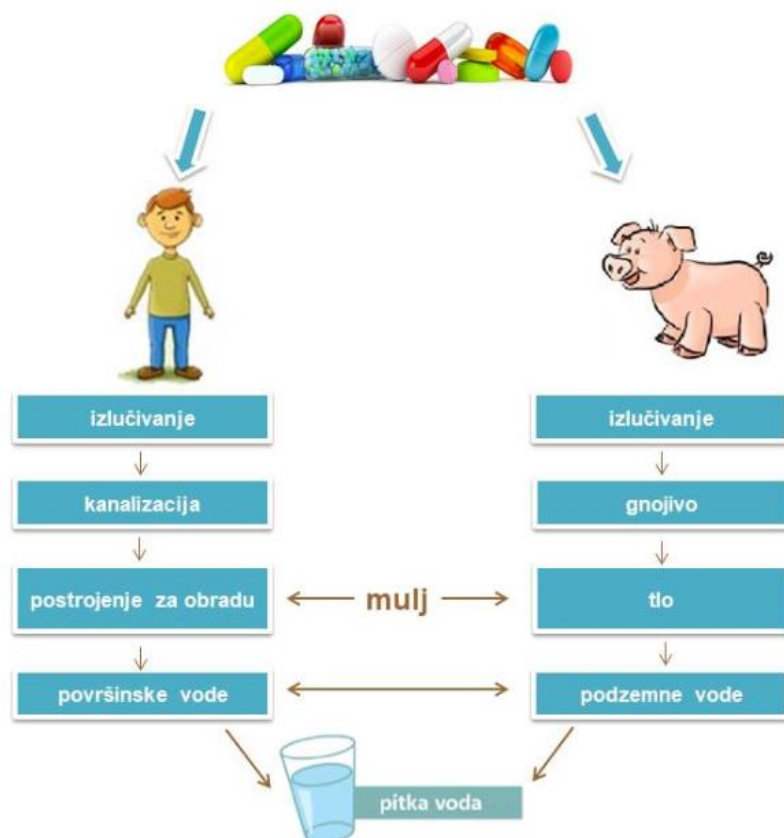
Ispitivani su farmaceutici (albendazol, azitromicin, cefdinir, eritromicin, febantel, hidroksiklorokin, klaritromicin, metoklopramid, nitrofurantoin i prazikvantel) koji se nalaze na listi Okvirne direktive o vodama izdane od Europske komisije.

Da bi se smanjio njihov negativan utjecaj na okoliš i omogućilo praćenje njihova ponašanja, neophodno je razviti prikladnu analitičku metodu određivanja farmaceutika. Do sada se kao važna analitička metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi farmaceutika pokazala tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD), jer se s njom može odijeliti veliki broj farmaceutika. Uzorak je potrebno pripremiti prije kromatografskog određivanja, odnosno aktivno ekstrahirati aktivne tvari iz složene matice. U ovom radu uzorak je pripremljen metodom ultrazvučne ekstrakcije zbog njezine jednostavnosti, dostupnosti, smanjenja čestica i ubrzanog prijenosa mase tvari. Željelo se ispitati može li ovako jednostavna i dostupna metoda pokazati dobre rezultate prilikom određivanja farmaceutika u aktivnom mulju.

2. TEORIJSKI DIO

Tijekom čitave ljudske povijesti konstantno se ispuštaju različite štetne tvari u okoliš nadajući se da će se prirodno razgraditi, a u posljednjem desetljeću u različitim okolišnim dijelovima diljem svijeta, kao najvažnija skupina globalnih onečišćivača javljaju se farmaceutici.^[1]

Farmaceutici su dizajnirani s ciljem specifičnog djelovanja u biološkim sustavima te, ukoliko dospiju u okoliš, predstavljaju problem zbog mogućeg štetnog djelovanja na pojedine organizme ekosustava. Zbog zakonski nereguliranih graničnih vrijednosti emisija i nedovoljno poznatog utjecaja na okoliš i ljudsko zdravlje spadaju u skupinu tzv. novih onečišćujućih tvari. Njihov ulazak u okoliš moguć je iz više izvora, postrojenja za obradu otpadnih voda, bolnica, životinjskih farmi, odlagališta, pa čak i groblja. Sastav otpadnih voda ovisi o polaznoj sirovini, tehnološkim postupcima i procesima te otpadnim produktima. Specifična onečišćenja koja mogu dospjeti u otpadne vode iz farmaceutske proizvodnje su organska otapala, katalizatori, aditivi, neizreagirani reaktanti, međuprodukti te ostaci aktivnih farmaceutskih tvari.^[2] Farmaceutici obuhvaćaju terapijske lijekove za životinje i ljude te dodatke prehrani. Iako su farmaceutici i njihovi metaboliti u okolišu prisutni u vrlo niskim koncentracijama, još uvijek nema dovoljno saznanja o dugoročnim posljedicama koje širok spektar farmaceutika može imati na nedefinirane organizme i ljudsko zdravlje.^[3] Aktivne farmaceutske tvari većinom su biološki aktivne i hidrofilne kako bi ih ljudsko tijelo lakše apsorbiralo. Također, moraju biti stabilne kako bi se izbjegla razgradnja prije nego li dođe do ciljanog djelovanja. To su poželjna svojstva sa stajališta farmakologije, no ekofarmakologija ukazuje da upravo te karakteristike stvaraju potencijalni problem u okolišu.^[2] Način ulaska farmaceutske aktivne tvari u okoliš su neadekvatno odlaganje neiskorištenih lijekova, bolnice i farme. Korištenje veterinarskih lijekova široko je prihvaćeno pri liječenju bakterijskih infekcija životinja u stočarstvu. Međutim, ostaci tih tvari mogu ući u hranidbeni lanac te tako štetno utjecati na ljudsko zdravlje. Kao rezultat toga, njihova prisutnost u hrani životinjskog podrijetla može izazvati širenje patogenih bakterijskih spojeva otpornih na lijekove ili proizvesti alergijske reakcije kod ljudi. Korištenjem stajskog gnojiva antibiotici dolaze u doticaj sa tlom, a ispiranjem tog tla dospijevaju u podzemne vode. Također, i gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem koji je proizvod obrade komunalnih otpadnih voda mogu dospjeti u tlo, odnosno površinske i podzemne vode.^[4] Na **Slici 1** prikazano je kako farmaceutici dospijevaju u okoliš.



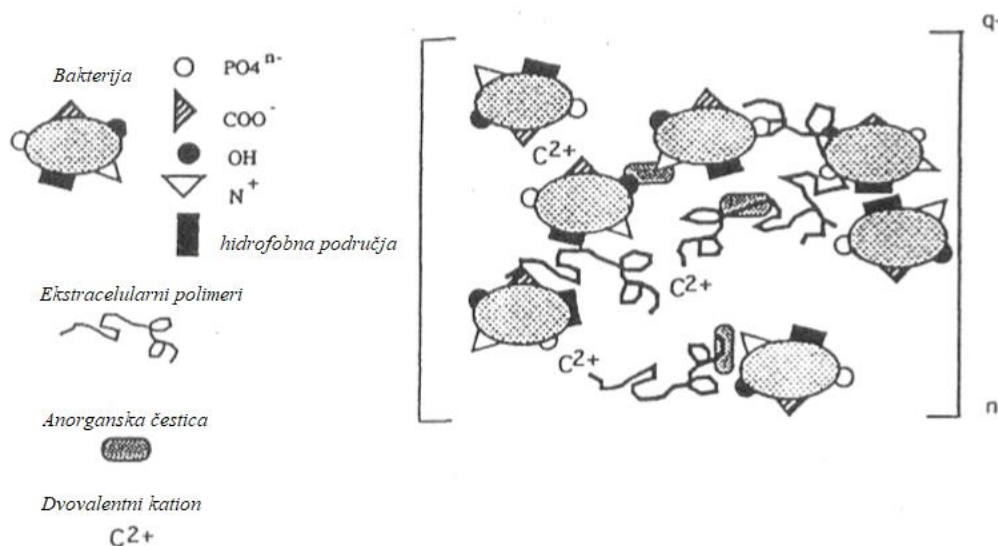
Slika 1. Način ulaska farmaceutika u okoliš

Iz **Slike 1** vidljivo je da farmaceutici u okoliš dopijevaju putem ljudskih i životinjskih fekalija koje potom završavaju u otpadnim vodama i tlu, iz kanalizacijskog sustava, iz industrijskog i medicinskog otpada nastalog u zdravstvenim i veterinarskim ustanovama, muljem dobivenim obradom otpadnih voda te sve do podzemnih voda koje se crpe i koriste kao voda za piće.

2.1 Aktivni mulj

Aktivni mulj nastaje međusobnim povezivanjem bakterija, kvasaca, algi, metazoa i protozoa koje imaju različiti naboj sa suspendiranim česticama u veće ili manje nakupine, flokule. Struktura flokule aktivnog mulja temelji se na kombinaciji bakterija štapićastog oblika vrste *Zooglea ramigera*, nitastih bakterija, drugih oblika bakterija i mikrozoekomponente. Nitaste bakterije s vrstom *Z. ramigera* čine srž flokule i pripijaju se čvrsto uz česticu organske tvari. Bakterije drugih oblika zapinju između filamenata nitastih bakterija i sudjeluju u gradnji flokule. Ravnoteža između oba oblika bakterija daje najbolji

(kuglasti ili sferični) oblik flokule, koja brzo sedimentira. Brza sedimentacija flokula obilježje je dobre kvalitete izlazne vode. Čimbenici poput koncentracije otopljenog kisika, pH, temperature, starosti mulja i otpadne vode utječu na sastav mikroflore u aktivnom mulju. Na **Slici 2** predočen je model mehanizma flokulacije aktivnog mulja, koji sugerira da polimeri povezuju mikroorganizme zajedno pomoću elektrostatskih sila.



Slika 2. Mehanizam flokulacije aktivnog mulja^[5]

Proces aktivnog mulja razvili su 1914. godine Arden i Lockett u Engleskoj, a primjenjuje se za biološku obradu komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Sastoji se od 3 procesa u seriji:

- bioreaktor sa suspendiranom biomasom za biorazgradnju otpadnih voda,
- separacija tekuće – kruto koja se zasniva na sedimentaciji,
- recikliranje aktivnog mulja prenoseći biološku krutu tvar nazad u bioreaktor.^[5]

Proces aktivnog mulja prikladan je proces za uklanjanje organskih onečišćivala i organskog ugljika iz otpadnih voda.^[6] Proces zahtjeva stalni rad muljevitih pumpi i puhaljki kisika, pa je stalna opskrba energijom bitna i potrebna je predobrada kao što je primarna sedimentacija. Proizvodnja aktivnog mulja ovisi o vrsti procesa koji se koristi, o pogonu otpadnih voda i o karakteristikama otpadnih voda.^[5]



Slika 3. Aktivni mulj^[7]

U današnje se vrijeme postavljaju sve veći zahtjevi za zaštitu okoliša, posebice za pročišćavanje otpadnih voda jer su nepročišćene otpadne vode značajan zagađivač vodotoka i podzemnih voda. Na područjima s nizom manjih naselja raspoređenih na većem području s velikom međusobnom udaljenošću, gdje se financijski ne isplati graditi kanalizacijsku mrežu sa središnjim uređajem za pročišćavanje otpadnih voda, javlja se veliki problem nekontroliranog ispuštanja otpadnih voda. Kako bi se izbjegla posljedica nekontroliranog ispuštanja komunalnih otpadnih voda i istodobna izgradnja dugačkih kolektora s malim brojem priključaka, za takva su naselja prikladno rješenje manji sustavi odvodnje s tipiziranim manjim uređajima za pročišćavanje otpadnih voda koji rade na principu tehnologije aktivnog mulja. Takvi uređaji su posebno prikladni za manja naselja u kojima broj stanovnika ne prelazi 2000 ES (ekvivalentnih stanovnika).^[8] Prilikom biološke obrade otpadne vode mogu postojati mikrobne zajednice aerobnog ili anaerobnog aktivnog mulja ovisno o koncentraciji otopljenog kisika.^[5] Aktivni mulj koristi otopljeni kisik za promicanje rasta biološkog materijala koji značajno uklanja organski materijal i dušik u danim uvjetima^[9], odnosno kako bi se olakšalo uklanjanje nutrijenata poput dušika i fosfora.^[5]

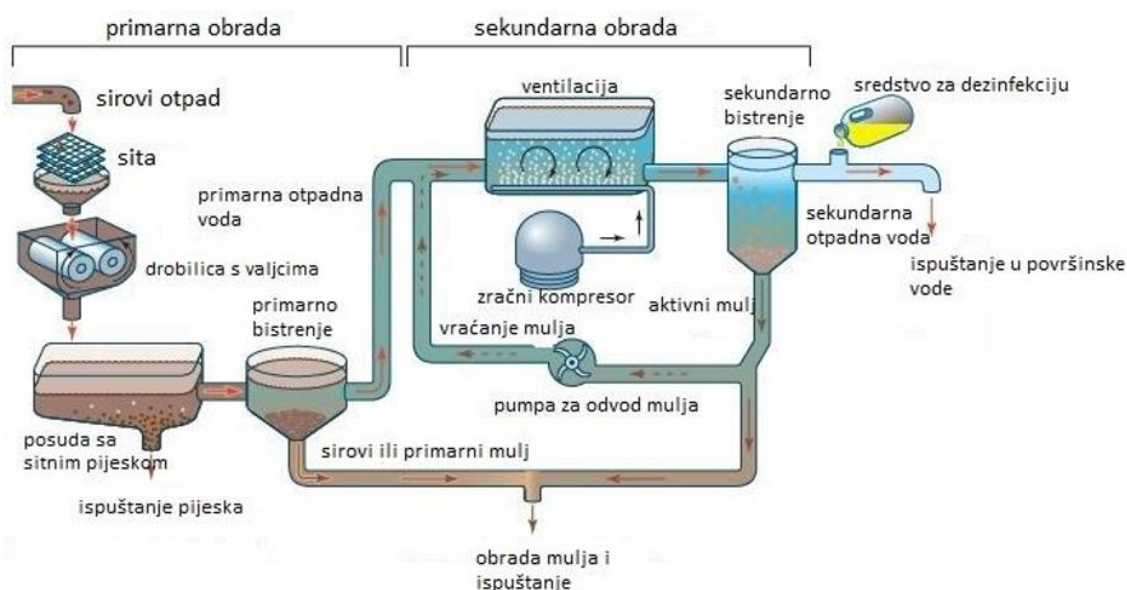
Prednosti korištenja tehnologije temeljene na aktivnom mulju:

- primjenjivost na razne veličine naselja (osim za najmanje),
- visok stupanj eliminacije ukupne suspendirane tvari i biokemijske potrošnje kisika (više od 90 %),
- dobra eliminacija dušika pri nitrifikaciji i denitrifikaciji (20 – 40 %),
- dobra eliminacija fosfora (20 – 30 %),

- pogodna za područja gdje je potreban veći stupanj zaštite vodotoka ili podzemnih voda kada se pročišćene vode ispuštaju u podzemlje,
- najčešći korišteni oblik sekundarne obrade otpadnih voda.

Nedostaci korištenja tehnologije temeljene na aktivnom mulju:

- relativno veliki investicijski troškovi,
- velika potrošnja energije,
- zahtjeva stručno osoblje za rad i održavanje,
- proizvodnja većih količina mulja koje je potrebno negdje odložiti.^[8]



Slika 4. Obrada aktivnog mulja^[10]

Sastav sirovog mulja ovisi o vrsti otpadnih voda i o postupku kojim se one pročišćavaju.

Vrste mulja su:

- primarni mulj – sadrži anorganske tvari (pijesak, glinu, karbonate, kovinske okside), organske lako razgradive tvari (bjelančevine, masti, ugljikohidrate), teško razgradive tvari (različita vlakna, gumu) kao i žive organizme (bakterije, viruse, parazite),
- biološki mulj – sadrži živu masu bakterija i njihove ostatke, a količina ovisi o vrsti uređaja, odnosno postupku pročišćavanja otpadnih voda, starosti mulja i unosu zraka,
- tercijarni mulj – sadrži ostatke reakcije dodanih kemikalija s otpadnom vodom i s njenim sadržajem pri koagulaciji te adsorbente sa sastojcima koji su adsorbirani iz otpadnih voda,

- kombinacija muljeva – muljevi koji imaju različita podrijetla.^[11]

Mulj sadrži ukupnu vodu koja može biti slobodna, vezana (kapilarno ili adhezijski) i intermolekularna (adsorbirana). Taloživost mulja ovisi o načinu vezanja vode u mulju, primarni mulj se odlikuje dobrom taloživošću.^[12] Granulometrijski sastav ovisi o vrsti mulja, a vlaga o temperaturi te je proporcionalna koncentraciji suhe tvari. Količina suhe tvari predstavlja ukupnu količinu organskih i anorganskih tvari koje nakon sušenja mulja ostaju pri temperaturi od 105 °C. Vrijednost pH svježeg mulja je oko 7, a prilikom procesa raspadanja njegova pH vrijednost pada i može biti manja od 6, jer nastaje kiselo vrenje.^[11] Odlaganje svježeg mulja mora biti u skladu sa zakonskim propisima kako ne bi predstavljao opasnost za okoliš i ljudsko zdravlje te treba osigurati prikladan transport kako ne bi došlo do širenja neugodnog mirisa.^[13] Smatra se da mulj kao nusprodukt obrade komunalnih otpadnih voda ima više korisnih nego štetnih svojstava, jer sadrži vrijedne hranjive tvari koje primjerice pospješuju rast poljoprivrednih kultura.^[14] Aktivni mulj uklanja veće količine farmaceutskih spojeva od pročišćenih filtera, a kanalizacijski objekti u kojim se primjenjuju postupci nitrifikacije i denitrifikacije pokazuju značajno niže koncentracije lijekova u svojim ispustima,^[15] otporan je na organske otpadne tvari koje se mogu naći u otpadnim vodama farmaceutske industrije.^[2]

2.2 Farmaceutici

Farmaceutici su kemijske aktivne tvari koje se uglavnom proizvode od organskih spojeva (prirodnih ili sintetiziranih). Primjenjuju se za liječenje ili prevenciju bolesti ljudi i životinja, kao i za poboljšanje kvalitete života ljudi i životinja. Mogu se podijeliti s obzirom na koji biološki sustav utječu, kemijski sastav, terapijski učinak i način primjene.^[16] Osim što su neophodni za prevenciju i liječene bolesti ljudi i životinja, ostavljaju i štetne učinke na okoliš, ponajprije vodu i tlo. Štetnost, odnosno toksičnost, određenog farmaceutika ovisi dijelom o njegovom načinu djelovanja te akumulira li se ili ne.^[17] U **Tablici 1** navedene su neke od kratkoročnih, srednjoročnih i dugoročnih mjera za smanjenje farmaceutika u okolišu.

Tablica 1. Mjere za smanjenje farmaceutika u okolišu^[18]

LJUDSKI FARMACEUTICI
Kratkoročne mjere:
<ul style="list-style-type: none">- izbjegavanje sumnjivih recepata- redovito obrazovanje i usavršavanje liječnika i medicinskog osoblja- viši higijenski standardi i upravljanje bolnicama- izbjegavanje zbrinjavanja lijekova putem sudopera ili sanitarnog čvora- provedba sustava povratnih lijekova za lijekove- razvoj tehničkih procesa za uklanjanje malih količina tvari u postrojenima za pročišćavanje otpadnih voda- smanjenje emisije onečišćenje iz postrojenje za proizvodnju lijekova- praćenje aktivnih sastojaka u okolišu i njihov utjecaj na žive organizme
Srednjoročne mjere:
<ul style="list-style-type: none">- promjena recepta na ekološki prihvatljive lijekove- smanjenje izlučivanja aktivnih sastojaka- uključivanje relevantnih aspekata lijekova na održivost za okoliš- izvješća o okolišu kod farmaceutskih poduzeća
VETERINARSKI FARMACEUTICI
Kratkoročne mjere:
<ul style="list-style-type: none">- izbjegavanje sumnjivih tretmana- poboljšanje higijenskih standarda i stabilno upravljanje- poboljšanje zdravlja i dobrobiti životinja (posebnim hranjenjem i profilaktičkim cijepljenjem)- korištenje mikrobiološke degradacije lijekova u gnojivima pasivnim skladištenjem ili anaerobnom fermentacijom u bioplinskim postrojenjima- praćenje aktivnih sastojaka u okolišu i njihov utjecaj na žive organizme
Srednjoročne mjere:
<ul style="list-style-type: none">- razvoj i implementacija dozirnih sustava za lijekove u stajama- promjena doze lijekova kako bi se smanjilo izlučivanje aktivnih sastojaka- promjene formulacije i primjene lijekova

Tablica 1 Mjere za smanjenje farmaceutika u okolišu^[18] [Nastavak]

LJUDSKI I VETERINARSKI FARMACEUTICI – dugoročne mjere:
<ul style="list-style-type: none"> - razvoj novih ili redizajn farmaceutika (razvoj ciljanih lijekova) - poboljšanje dijagnostike za personalizaciju zdravstvene zaštite (personalizirana medicina) - poticanje proizvođača lijekova na projektiranje blagih/dobročudnih proizvoda

2.2.1 Antibiotici

Antibiotici su prirodna ili sintetička kemijska sredstva koja pripadaju skupini lijekova koja zauzimaju važnu ulogu u prevenciji i liječenju ljudi i životinja. Uništavanjem ili sprječavanjem razmnožavanja bakterije, potiču imunološki sustav organizma na obranu od infekcije. Prvi antibiotik, pencilin, prirodnog je podrijetla iz gljive *Penicillium genus*, a otkrio ga je 1929. godine liječnik i bakteriolog Alexander Fleming. Danas se proizvode kemijskom sintezom ili kemijskom modifikacijom prirodno nastalih spojeva.

Primjena antibiotika u veterinarskoj medicini prisutna je jer oni osim prevencije i terapije protiv mikroorganizama kao što su gljive, bakterije ili protozoe, potiču i rast životinja. Kao i kod većine kemijskih spojeva, na ponašanje antibiotika u okolišu utječu fizikalna i kemijska svojstva spojeva (molekulska struktura, topljivost, hidrofobnost) svojstva tla (pH i organska tekstura tla), klimatski uvjeti (temperature, oborine) i biološki faktori (mikrobna degradacija). Kako su oni složene molekule koje mogu imati različite funkcionalnosti unutar iste molekule, u različitim pH uvjetima mogu biti neutralni, kationski ili anionski. Antibiotici se mogu podijeliti na bakteriostatska, zaustavljaju rast i razmnožavanje mikroba omogućujući vlastitim obrambenim snagama organizma lakše uklanjanje infekcije, i baktericidna sredstva, izravno ubijaju mikrobe i mogu izliječiti infekciju i kada se bolesnikov organizam ne može sam braniti. Nadalje, na temelju kemijske strukture svrstavamo ih u nekoliko skupina: sulfonamide, β -laktame, tetracikline, makrolide, fluorokinolone, diaminopirimidne, linkozamidne, aminoglikozidne i ostale. U posebnu skupnu pripadaju makrolidi koji sprječavaju razvoj bakterija, ali su otporni na mnoge gram – pozitivne bakterije. Danas je poznato pet makrolida: azitromicin, eritromicin, fidaksomicin, klaritromicin i telitromicin, a u ovom radu ispitivana su ponašanja azitromicina, eritromicina i klaritromicina.^[19] Makrolidi se koriste za liječenje slabih infekcija, a najviše se izlučuju preko žuči (više od 60 %) te urinom (manje od 10 %). Uzimaju se oralno, netoksični su, a nuspojave su im rijetke. Kod velikih

doza mogu izazvati proljev i povraćanje, a primjenjuju se u obliku tableta, praška i injekcijske otopine.^[20]

Zbog svoje široke proizvodnje i primjene, otkriveno je da se antibiotski spojevi oslobađaju u velikim količinama kao aktivni farmaceutski sastojci (API) u prirodnim ekosustavima.^[21] Većinom su hidrofilni i oblikovani su tako da su biološki otporni zbog čega uglavnom ostaju u vodenoj fazi otpadnih voda.^[9] Antibiotici nisu potpuno metabolizirani, 30 do 90 % antibiotika danih ljudima i životinjama izlučuju se kroz fekalije i urin nepromijenjeni^[22] te to predstavlja glavni izvora antibiotika u vodenom okruženju i tlu. Ostali načini uvođenja antibiotika u tlo i vodu su zbrinjavanje ambalaže na neprikladnim mjestima, zagađenja tijekom samog procesa njihove pripreme, izravno onečišćenje vode kroz akvakulturu^[19] te otpadne vode i mulj iz postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda koji se ispuštaju u okoliš ili služe za navodnjavanje tla.^[23] U posljednjih nekoliko godina povećala se zabrinutost učinka tih spojeva jer su oni jedan od najvećih onečišćavala okoliša. Do sada je značajno istraživana pojava i uklanjanje antibiotika u uređajima pročišćavanja otpadnih voda koji obično koriste aktivni mulj, dok je pojava uklanjanja antibiotika u ekološkim procesima pročišćavanja otpadnih voda uglavnom nepoznata.^[24] Sam postupak određivanja antibiotika u uzorcima okoliša, težak je zadatak zbog visoke složenosti analiziranih matica i niskih koncentracija tih spojeva (lijekova) u uzorcima koje variraju između nanograma do mikrograma po litri.^[21] Za određivanje antibiotika u čvrstim maticama u okolišu, tlu, koriste se postupci koji uključuje tehniku koja je korištena i u ovom radu, ultrazvučnu ekstrakciju. Odabir otapala ključan je segment kako bi se osigurala selektivnost. Potencijalna korisna alternativa sintetičkim antibioticima su bioaktivni spojevi iz ljekovitih biljaka.^[25]

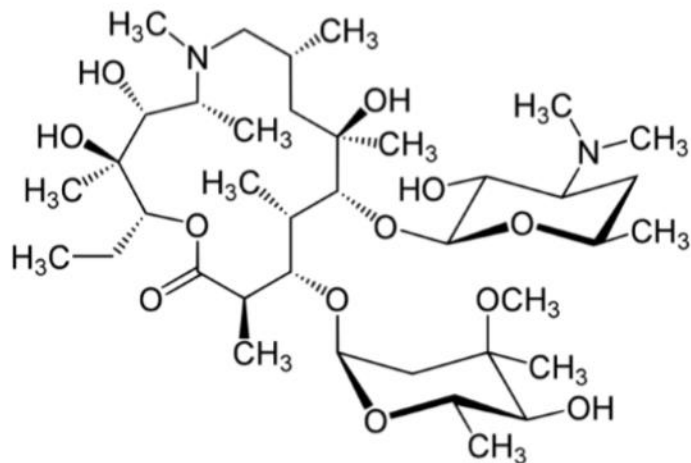
2.2.1.1 Azitromicin

Azitromicin je makrolid koji je danas među najprodavanijima i najčešće korištenim u svijetu.^[26] Sintetiziran je početkom osamdesetih godina kao polusintetski derivat eritromicina, istodobno su ga otkrili istraživači Pfizer-a u SAD-u i Pliva, Hrvatska, no Pliva ga je prije patentirala. U usporedbi s ostalim makrolidima, stabilniji je u kiselom mediju, isporučuje se u visokoj koncentraciji na mjestu infekcije i ima dulji poluživot te mu to omogućava djelotvornost pri jednokratnom liječenju.^[27]

Dihidrat ovog lijeka je kristalni prah bijele boje, čija je molekulska formula $C_{38}H_{72}N_2O_{12} \cdot 2H_2O$, a molekulska masa mu je 748,98 g mol⁻¹. Jedan od glavnih nedostatak

anzitromicina je njegova slaba topljivost u biološkim tekućinama koja predstavlja slabu biodostupnost nakon oralne primjene. Dolazi u obliku praška, tablete i otopine.^[28]

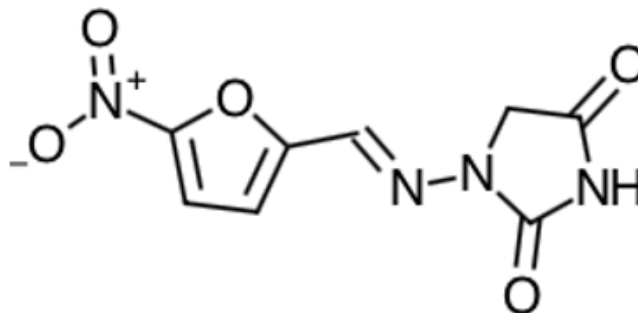
Koristi se za liječenje infekcija dišnih putova, parodontne bolesti u stomatologiji, u oftalmologiji za liječenje bakterijskog konjunktivitisa i prilikom upale očnih kapaka, liječenje želudca.^[27] On je najčešće korišteni makrolidni antibiotik.^[29] Na **Slici 5** prikazana je njegova molekulska struktura.



Slika 5. Struktura azitromicina^[28]

2.2.1.2 Cefdinir

Cefdinir je antibiotik treće generacije cefalosporina, sintetiziran 1988. godine. Baktericidan je s širokim spektrom aktivnosti. Stabilan je za hidrolizu mnogih β -laktamaza i ima veću aktivnost od cefalosporina prve i druge generacije.^[30] Iako cefalosporini treće generacije ne pokazuju ujednačena farmakokinetička svojstva, uklanjaju se iz tijela prvenstveno mokraćnim ili žučnim putem. Mogu dobro prodirati u većinu tjelesnih tkiva i tekućina.^[31] Molekulska formula mu je $C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$, a molekulska masa mu je $395,42 \text{ g mol}^{-1}$. Uzima se oralno^[32], koristi se za liječenje infekcijskih dišnih putova, infekcije mekih tkiva i liječenje upale srednjeg uha. Učinkovit je protiv mnogih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija.^[33] Uobičajeni štetni učinci cefdinira su proljev, mučnina, glavobolja i osip.^[34] Na **Slici 6** prikazana je njegova molekulska struktura.

Slika 9. Struktura nitrofurantoina^[41]

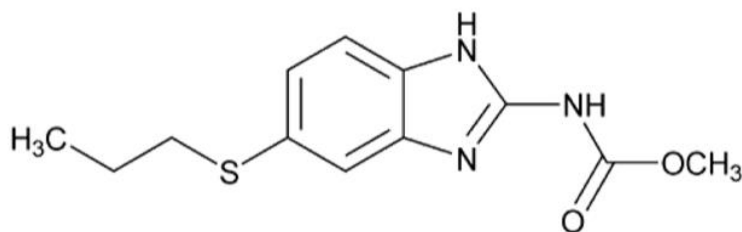
2.2.2 Antihelmintici

Antihelmintici su antiparazitski lijekovi koji se naširoko koriste u liječenju ljudi i životinja od nametnika kao što su crvi i trakavice. Koriste se u kombinaciji s lijekovima za pražnjenje crijeva kako bi se što lakše uklonili paraziti iz tijela domaćina (čovjeka ili životinja). Primjena nekih antihelmintika može potaknuti toksične učinke te je stoga potrebna kontrola kvalitete, naročito u farmaceutskim pripravcima u kojima treba osigurati da paraziti budu izloženi višim koncentracijama lijeka, nego stanice domaćina.^[42] Idealan antihelmintik odlikuje se: širokim spektrom djelovanja, netoksiknošću za životinju, brzim izlučivanjem, jednostavnošću primjene i niskom cijenom. Prema kemijskoj strukturi ih možemo podijeliti na: derivate kinolina (prazikvantel), organofosforne spojeve, derivate benzimidazola (albendazol, febantel), derivate imidazotiazola, tetrahidropirdini, derivate fenola uključujući salicilamide, derivate piperazina i makrociklične laktone.^[43] U ovom radu, od antihelmintika korišteni su albendazol, febantel i prazikvantel.

2.2.2.1 Albendazol

Albendazol je antihelmintik širokog spektra, otkriven 1961. godine.^[44] Ovaj benzimidazol karbamat, koristi se u ljudskoj i veterinarskoj medicini, pokazuje nepredvidljiv terapijski odgovor zbog niske i nepravilne oralne bioraspodjelivosti uzrokovane slabom topljivošću u vodi.^[45] Molekulska formula mu je $C_{12}H_{15}N_3O_2S$, a molekulska masa mu je $265,33 \text{ g mol}^{-1}$. Najčešći i najučinkovitiji je antiparazitski lijek za liječenje alveolarne ehinokokoze, bolesti koja započinje na jetri, ali se može proširiti i na druge dijelove tijela, kao što su pluća ili mozak.^[46] Nusprodukti koji se mogu javiti korištenjem ovog lijeka su

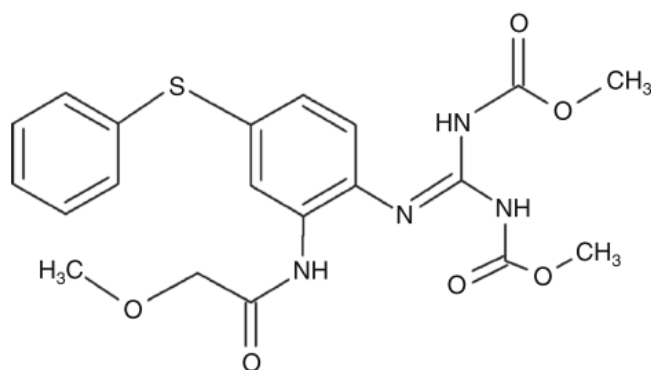
glavobolja, mučnina, vrtoglavica i kratkotrajni bolovi u donjem dijelu trbuha. Na **Slici 10** prikazana je njegova molekulska struktura.



Slika 10. Struktura albendazola^[47]

2.2.2.2 Febantel

Febantel je antihelminitički lijek koji pripada grupi benzimidazola, široki raspon antiparazitskog djelovanja kvalificirao ga je kao lijek za liječenje crijevnih preživača i nametnika kod svinja, ovaca i goveda. Primjenjuje se oralno, poput paste, suspenzije ili tableta ili kao stočna hrana. Odlikuje ga visoki stupanj učinkovitosti, raznovrsna primjena i dobra granica sigurnosti. Molekulska formula mu je $C_{20}H_{22}N_4O_6S$, a molekulska masa mu je $446,48 \text{ g mol}^{-1}$.^[48] U literaturi je trenutno poznato postojanje njegovog samo jednog polimorfnog oblika, a na **Slici 11** prikazana je njegova molekulska struktura koja prikazuje monoklinsku kristalnu strukturu.^[49]

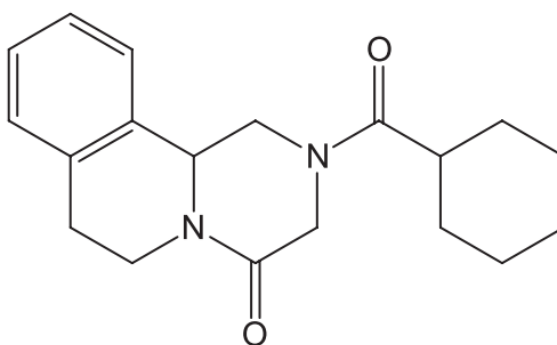


Slika 11. Struktura febantela^[49]

2.2.2.3 Prazikvantel

Prazikvantel je široko učinkovit trematocid i cestocid, koristi se u veterinarstvu i ljudskoj medicini.^[50] Otkriven je početkom 1970.-tih, molekulska formula mu je $C_{19}H_{24}N_2O_2$,

a molekulska masa mu je $312,41 \text{ g mol}^{-1}$.^[51] Nakon oralne primjene, brzo se apsorbira nakon čega slijedi brzi i opsežni prvi metabolički prolaz. Posjeduje široki terapijski indeks, a njegove nuspojave vidljive su tek nakon vrlo velikih doza. Nuspojave koje se mogu javiti su mučnina, vrućica, osipi i povremena bol.^[50] Koristi se pri liječenju parazitskih bolesti kućnih ljubimaca, hidrofoban je, odnosno netopljiv u vodi.^[52] Zbog svoje učinkovitosti, sigurnosti i ekonomičnosti, Svjetska zdravstvena organizacija smatra ga bitnim lijekom.^[51] Na **Slici 12** prikazana je njegova molekulska struktura.



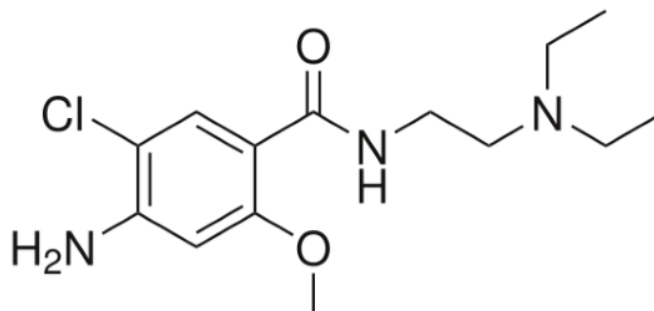
Slika 12. Struktura prazikvantela^[53]

2.2.3 Antiemetici

Antiemetici su lijekovi koji djeluju na centar za povraćanje, neovisno o njegovom uzorku te sprječavaju povraćanje. Odabiremo ih prema tipu i uzroku simptoma, a za uspješno liječenje potrebna je njihova kombinacija. Njihova primjena je opravdana kada ne postoji druga mogućnost zaustavljanja povraćanja.^[54]

2.2.3.1 Metoklopramid

Metoklopramid pripada prvoj grupi antiemetika, dostupan od 1960.-tih godina. Molekulska formula mu je $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{ClN}_3\text{O}_2$, a molekulska masa mu je $299,80 \text{ g mol}^{-1}$. Sprječava mučninu i povraćanje inducirano kemoterapijom, netopljiv je u vodi. Učinci mu se odnose na gornji probavni trakt, brzo se apsorbira nakon oralnog uzimanja, a izlučuje se urinom s poluživotom od 4 do 6 sati. Ne smiju ga koristiti bolesnici s epilepsijom jer može povećati učestalost i težinu napadaja.^[55] Na **Slici 13** prikazana je njegova molekulska struktura.



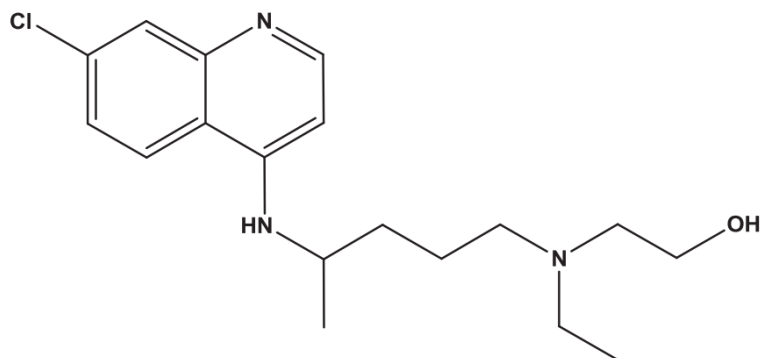
Slika 13. Struktura metoklopramida^[56]

2.2.4 Kemoterapeutici

Kemoterapeutici pripadaju skupini lijekova za liječenje raka, koji su selektivno destruktivni za maligna tkiva i stanice. Mogu predstavljati i lijekove koji su selektivno toksični za viruse ili bakterije. S obzirom na njihovu izrazitu toksičnost, mučnine mogu biti jake i dugotrajne te stoga pacijenti najčešće odustaju od ove vrste liječenja karcinoma.^[57]

2.2.4.1 Hidroksiklorokin

Hidroksiklorokin je sintetički lijek koji se zbog svojih antimalarijskih svojstava upotrebljava u liječenju autoimunih bolesti poput reumatoidnog artritisa i sistemskog eritemskog lupusa, odnosno upalne autoimune bolesti vezivnog tkiva.^[58] Antimalarijska svojstva ekvivalentna su mu s aktivnošću klorokina, ali s manjom očnom toksičnošću. Osim što se učinkovito koristi za liječenje različitih kroničnih autoimunih bolesti, daje obećavajuće izgleda i u liječenju limfoma i tumora dojke. Unatoč širokoj upotrebi i priznatoj sigurnosti, zabilježena su slučajna i namjerna predoziranja, što je rezultiralo teškim otrovima i smrtonosnim posljedicama. Molekulska formula mu je $C_{18}H_{26}ClN_3O$, a molekulska masa mu je $335,87 \text{ g mol}^{-1}$.^[59] Na **Slici 14** prikazana je njegova molekulska struktura.



Slika 14. Struktura hidroksiklorokina^[59]

2.3 Priprava uzoraka za analizu

Analiza uzorka iz okoliša (voda, tlo, sediment, biološki materijal, aktivni mulj) sastoji se od pet osnovnih koraka:

- uzorkovanja,
- priprave uzorka,
- odijeljivanja analita,
- detekcije,
- procjene mjernih podataka pomoću kojih dobivamo informacije o identifikaciji uzorka i kvantitativnom sastavu.

Uzorci iz okoliša vrlo su složeni i ne mogu se izravno analizirati, a kada je riječ o analizi tragova zahtjevi za pripravu uzorka postaju sve stroži. Kako bi proveli pravilnu pripravu uzorka, potrebno je prevesti realni uzorak u uzorak pogodan za analizu, pri čemu su neizbježne interakcije sastojaka uzorka s okolinom. One ovise o kemijskim i fizikalnim svojstvima analita i matice uzorka pa mogu utjecati na djelotvornost, primjenjivost i ponovljivost postupaka priprave uzorka. Priprava uzoraka mora biti usklađena s ciljem analize, uzimajući u obzir instrumente kojima se analiziraju. Pritom se nastoji:

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

Premda su još u uporabi mnoge tradicijske metode pripreme uzorka, razvoj novih metoda usmjeren je prema:

- većoj selektivnosti i specifičnosti postupka,
- mogućnosti uporabe manje količine uzorka i organskih otapala,
- povećanju mogućnosti automatizacije ili izravnog povezivanja s mjernom metodom, što smanjuje utjecaj sustavne pogreške.^[60]

U ovom radu pripravljeni su čvrsti uzorci aktivnog mulja za kromatografsku analizu farmaceutika.

2.4 Određivanje farmaceutika u okolišu

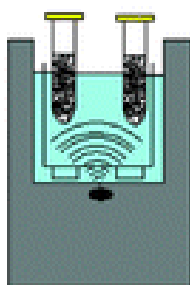
Uzimanjem lijekova u svakodnevnoj pojavi u većini života, dovelo je do godišnje potrošnje lijekova koja prelazi nekoliko tisuća tona, ne uključujući u tu brojku lijekove koji se uzimaju bez recepta. Kako zapadno stanovništvo svakoga dana sve više stari i poboljšava se zdravstvena zaštita, očekuje se da će ta brojka i u budućnosti rasti. Ljudska osoba od 20 do 24 godine prosječno uzima 56 dnevnih doza, dok muškarci stariji od 60 godina prosječno trebaju 649 dnevnih doza.^[18] Kao sastojci medicinskih proizvoda koristi se oko tri tisuće različitih spojeva koji imaju širok spektar različitih kemijskih struktura. Dobra topljivost u vodi i slaba razgradivost farmaceutika omogućuje njihov prolaz kroz sve prirodne filtre i postrojenja za obradu otpadnih voda te na taj način ugrožavaju sustav opskrbe pitkom vodom.^[61] Uklanjanje onečišćujućih tvari iz voda zahtjeva primjenu različitih postupaka obrade, pri čemu sam izbor postupka obrade ovisi o mjestu nastanaka otpadne vode, odnosno o onečišćujućim tvarima koje se nalaze u otpadnoj vodi.^[2] Ponašanje većine spojeva farmaceutika tijekom obrade otpadnih voda još je uvijek uglavnom nepoznato, a dosadašnja istraživanja pokazala su da mnogi farmaceutski spojevi nisu potpuno uklonjeni konvencionalnom tehnologijom pročišćavanja otpadnih voda.^[62] Iz toga razloga, potrebno je poboljšati analitičke metode koje omogućuju kvantifikaciju navedenih onečišćenja u okolišu, posebice u složenim maticama poput otpadnih voda i sedimentu.^[63] U nastavku je opisana metoda ultrazvučne ekstrakcije i kromatografska metoda analize, korištene u ovom radu kao važne analitičke metode u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi farmaceutika.

2.4.1 Metode ekstrakcije

Moderne metode pripreve uzorka zasnivaju se na ekstrakciji. Dije se na metode koje mogu zadržati analit i na one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugoga otapala. Ekstrakcijske metode pripreve uzorka mogu se podijeliti i prema fazama između kojih dolazi do prijenosa analita pa govorimo o ekstrakciji tekuće – tekuće, ekstrakciji čvrsto – tekuće ili ekstrakciji plinovito – tekuće. Izbor metode pripreve uzorka ovisi o njegovom agregatnom stanju. U ovom radu korištena je metoda ultrazvučne ekstrakcije.^[60]

2.4.1.1 Ultrazvučna ekstrakcija

Ultrazvučna ekstrakcija ubraja se u ekstrakcije iz čvrstih uzoraka, a koristi se energijom ultrazvuka kako bi se poboljšao ekstrakcijski proces. Uzorak se kratko vrijeme izlaže velikoj količini energije pri čemu se zagrijava i povisuje tlak. Frekvencija ultrazvuka koji se primjenjuje u ekstrakciji je u rasponu od 20 do 100 kHz, što izaziva stvaranje, rast i snažan raspad šupljina (mjehurića) u tekućini. Ultrazvuk omogućuje bolji kontakt između čvrste i tekuće faze. Ova ekstrakcija omogućuje smanjenje volumena otapala (do 100 mL), skraćanje vremena ekstrakcije (10 – 45 min), ekstrahiranje velike mase uzorka (2 – 30 g). Nakon završene ekstrakcije, ekstrakti se moraju filtrirati, a često i upariti i pročititi. Metoda je brza i jednostavna, ali se postiže niža djelotvornost ekstrakcije nego s ostalim metodama. Djelotvorna je pri analizi ostataka antibiotika i različitih sastojaka hrane, određivanja pesticida i dioksina u uzorcima tla i sedimenta.^[60] Na **Slici 15** prikazana je shema ultrazvučne ekstrakcije.



Slika 15. Ultrazvučna ekstrakcija^[64]

2.4.2 Kromatografske metode analize

Začetnik kromatografije je ruski botaničar Mihail Cvet, a ova tehnika počela se primjenjivati 1930.-tih godina. Plinsku kromatografiju otkrili su 1951. godine A. J. P. Martin i A. T. James, a tankoslojnu 1958. godine E. Stahl. Instrumentalna tekućinska kromatografija počela se razvijati nakon 1965. godine.

Kromatografija je jedna od najraširenijih i najvažnijih analitičkih metoda, njezin sustav čine pokretna i nepokretna faza te ispitivana tvar koja se tijekom kromatografskog procesa nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske tehnike mogu se podijeliti na:

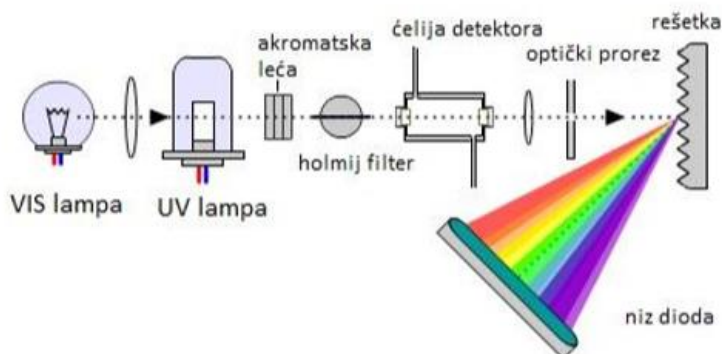
- razdjelnu kromatografiju – ravnoteža se uspostavlja između pokretne faze i tekuće nepokretne faze vezane na inertni čvrsti nosač,
- ionsko – izmjenjivačku kromatografiju – izmjena iona analiziranog spoja s ionima nepokretne faze,
- adsorpcijsku kromatografiju – ravnoteža između plina ili tekućine u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

Na temelju sastava pokretne faze dijele se na plinsku, tekućinsku i fluidnu kromatografiju u superkritičnim uvjetima, dok se na temelju sastava nepokretne faze mogu podijeliti na plošnu (tankoslojna i kromatografija na papiru) i kromatografiju na stupcu ili u koloni. U ovom radu korištena je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD).

2.4.2.1 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija je razdvajanje tvari na osnovi razmještanja između čvrste nepokretne faze i tekuće pokretne faze. Razlikujemo dvije vrste: klasična i LC visoke djelotvornosti (HPLC). HPLC je suvremenija analitička tehnika kod koje se pokretna faza

dovodi pomoću pumpe, stupci su punjeni silikatnim ili polimernim materijalom. Na osnovi polarnosti razlikuje se LC na normalnim i obrnutim fazama. Razdvajanje na normalnim fazama podrazumijeva da je nepokretna faza polarna (silikatna), a pokretna faza nepolarna (heksan). Kod razdvajanja na obrnutim fazama nepokretna faza je nepolarna (C-18 ugljikovodici) a pokretna faza polarna (voda i metanol). Osnovni dijelovi su spremnici za otapala pokretne faze, pretkolona, kolona, crpka i detektor. Uloga crpke je da ubacuje pokretnu fazu u detektor pod visokim tlakom stalnom brzinom, a uzorak se automatskim dodavanjem unosi u sustav za injektiranje. Otapalo prolazi kroz injektor te unosi uzorak u kolonu u kojoj je obično cijev od nehrđajućeg čelika, za dulje trajanje kolone koristi se pretkolona.^[60] Postoje različite vrste detektora, a njegova uloga je dati točnu informaciju na izlazu iz kolone u obliku električnog signala, koji je proporcionalan nekom svojstvu analita. Dobar detektor odlikuje se malim unutarnjim volumenom koji smanjuje širenje vrpce, osjetljivošću, širokim linearnim rasponom odziva, stabilnošću, reproducibilnošću, neosjetljivošću na promjene temperature i tlaka, visokom pouzdanošću i jednostavnošću za korištenje.^[65] Neki od detektora koji se koriste su spektrometar masa, detektori na osnovi molekulske fluorescencije, indeksa loma, elektrokemijski detektori i spektrofotometrijski detektori u UV/VID području elektromagnetskog spektra. U ovom radu korišten je detektor s nizom dioda (DAD). Princip rada DAD-a zasniva se na svjetlosti iz deutrijeve svjetiljke koja je usmjerena s prozirnou lećom tako da cijeli snop svjetla prolazi kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Uzorak se podvrgava svjetlu svih valnih duljina koje generira svjetiljka. Raspršena svjetlost iz rešetke usmjerena je na niz dioda, niz može sadržavati stotine dioda i izlaz iz svake diode je računalo, a podaci se spremaju na tvrdi disk. Spektar otopljene tvari dobiva se u obliku krivulja koje povezuju apsorpciju s valnom duljinom. Nedostatak ovog tipa detektora je ograničenost broja dioda u nizu dioda.^[66] Na **Slici 16** prikazan je detektor s nizom dioda.



Slika 16. Detektor s nizom dioda^[67]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Aktivni mulj

Ekstrakcija farmaceutika metodom ultrazvuka provedena je na aktivnom mulju dobivenom iz tvrtke Jamnica d.o.o. Određivanjem slijepe probe dokazano je da korišteni aktivni mulj ne sadrži farmaceutike koji bi smetali prilikom određivanja optimalnih uvjeta ekstrakcije farmaceutika metodom ultrazvuka te ga se namjerno onečišćivalo poznatom koncentracijom farmaceutika.

3.1.2 Kemikalije

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

Tablica 2. Naziv, molekulska formula, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

Naziv	Molekulska formula	Čistoća	Proizvođač
Aceton	CH ₃ COCH ₃	p.a.	Gram – mol, Hrvatska
Acetonitril	CH ₃ CN	HPLC	Fisher Chemical, UK
Diklormetan	CH ₂ Cl ₂	p.a.	Kemika, Zagreb
Etanol	CH ₃ CH ₂ OH	p.a.	Gram – mol, Hrvatska
Etil acetat	C ₄ H ₈ O ₂	p.a.	Merck, Njemačka
Heksan	C ₆ H ₁₈	p.a.	Sigma – Aldrich, SAD
Kloroform	CHCl ₃	aRG	Mallinkrodt Chemical
Metanol	CH ₃ OH	HPLC	JT Baker, Nizozemska
Voda	H ₂ O	MiliQ	FKIT
1-propanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	p.a.	Kemika, Zagreb
2-propanol	CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH	p.a.	Kemika, Zagreb

3.1.3 Farmaceutici

Ispitivanja su provedena na 10 farmaceutika iz grupa antibiotika (azitromicin, cefdinir, eritromicin, klaritromicin, nitrofurantoin), antihelmintika (albendazol, febantel, prazikvantel), antiemetika (metoklopramid) i kemoterapeutika (hidroksiklorokin). U **Tablici 3** navedena su fizikalno-kemijska svojstva ispitivanih farmaceutika.

Tablica 3. Prikaz fizikalno-kemijskih svojstava korištenih farmaceutika

Farmaceutik	Molekulska formula	CAS broj	M_w , g/mol	Čistoća	Proizvođač
Albendazol	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$	54965-21-8	265,33	99 %	Veterina d.o.o.
Azitromicin	$C_{38}H_{72}N_2O_{12}$	83905-01-5	748,98	≥ 95 %	Sigma – Aldrich
Cefdinir	$C_{14}H_{13}N_5O_5S_2$	91832-40-5	395,41	≥ 95 %	Sigma – Aldrich
Eritromicin	$C_{37}H_{67}NO_{13}$	114-07-8	733,93	≥ 95 %	Sigma – Aldrich
Febantel	$C_{20}H_{22}N_4O_6S$	58306-30-2	446,48	≥ 99 %	Veterina d.o.o.
Hidroksiklorokin	$C_{18}H_{26}ClN_3O$	118-42-3	335,872	≥ 95 %	Sigma – Aldrich
Klaritromicin	$C_{38}H_{69}NO_{13}$	81103-11-9	747,953	≥ 95 %	Riedel – de Haën
Metoklopramid	$C_{14}H_{22}ClN_3O_2$	364-62-5	299,8	99,9 %	Fluka (HPLC)
Nitrofurantoin	$C_8H_6N_4O_5$	67-20-9	238,16	98 %	Acros Organics
Prazikvantel	$C_{19}H_{24}N_2O_2$	55268-74-1	312,41	≥ 99 %	Veterina d.o.o.

3.2 Instrumenti, uređaji i pribor

3.2.1 Analitička vaga

Za precizno određivanje mase aktivnog mulja i farmaceutika korištena je analitička vaga Mettler Toledo, model AB104, Švicarska prikazana na **Slici 17**.



Slika 17. Analitička vaga Mettler Toledo AB104

3.2.2 Ultrazvučna kupelj

Ekstrakcija farmaceutika iz aktivnog mulja provedena je u ultrazvučnoj kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka prikazanoj na **Slici 18**. Na ultrazvučnoj kupelji moguće je podešavati temperaturu kupelji, vrijeme trajanja ekstrakcije i snagu ultrazvuka. Maksimalna temperatura na koju je moguće podesiti kupelj iznosi 80 °C, vremensko trajanje je u rasponu od 1 do 99 minuta, a maksimalna snaga iznosi 1200 W.



Slika 18. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka

3.2.3 Filtriranje

Nakon ultrazvučne ekstrakcije uzorci su profiltrirani kako bi se dobili ekstrakti koji se analiziraju tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti. Na **Slici 19** prikazan je pribor za filtriranje koji se sastojao od filter papira, igle i šprice. Filter papir korišten za filtriranje je FilterBio NY Syringe Filter, veličina pora 0,45 μm .



Slika 19. Pribor za filtriranje

3.2.4 Uparavanje (rotavapor)

Uparavanje ekstrakata provedeno je na uparivaču Büchi Waterbath B-480, Švicarska i Büchi Rotavapor R-114 pri 40 °C. Na **Slici 20** prikazan je korišteni instrument.



Slika 20. Büchi Waterbath B-480

3.2.5 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Dobiveni ekstrakti analizirani su tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti Varian ProStar 500, SAD prikazan na **Slici 21**. Instrument se sastoji od ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka, ProStar 230 tercijarne pumpe, ProStar 330 detektora s nizom dioda (DAD), boca za pokretnu fazu i otpad te računala kojim se upravlja preko računalnog programa pomoću kojeg se očitavaju rezultati nakon analize.



Slika 21. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, Varian ProStar 500

3.3 Metoda rada

3.3.1 Priprava standardne otopine farmaceutika

Standardna otopina farmaceutika pripremljena je vaganjem 5 mg pojedinog farmaceutika i otopljenja u metanolu HPLC čistoće u tikvici od 100 mL. Masena koncentracija pojedinog farmaceutika je 50 mg/L. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku pri temperaturi od 4 °C.

3.3.2 Priprava špikanog aktivnog mulja

Dobiveni aktivni mulj dekantiran je i stavljen na filter papir te sušen tjedan dana na suncu. Osušeni mulj usitnjen je u tarioniku, zatim je sušen u sušioniku pri 105 °C kako bi se uklonila vlaga te je čuvan u eksikatoru. U posudicu za vaganje vagano je 10 g aktivnog mulja te je zatim dodano 10 mL standardne otopine farmaceutika i 12 mL metanola. Dobivena smjesa promiješala se laganim pokretima u obliku osmice kako bi se lakše homogenizirala i ostavljena je jedan dan na zraku da metanol ishlapi.

3.3.3 Ultrazvučna ekstrakcija

U staklene bočice s čepom (3 paralelne probe) izvagano je 0,5 g špikanog aktivnog mulja i jedna bočica s aktivnim muljem koji nije onečišćen, špikan farmaceuticima te koja je služila kao slijepa proba. Dodano je 3 mL otapala i stavljeno u ultrazvučnu kupelju (60 min, 600 W i 30 °C). Nakon ultrazvučne ekstrakcije provedeno je filtriranje ekstrakata. Ekstrakti su uparavani do suha na rotavaporu pri temperaturi od 40 °C. Suhi ostatak otopljen je u 1 mL metanola u HPLC viala koje su stavljene na kromatografsku analizu.

3.3.4 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Kvantifikacija i identifikacija farmaceutika u ekstraktima provodila se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Analizirana je standardna otopina farmaceutika, slijepa proba (ekstrahirani aktivni mulj koji nije onečišćen) i ekstrakti. Svaki uzorak injektiran je tri puta volumenom od 30 µL, pri tlaku od 20 do 25 atmosfera i temperaturi od 20 do 25 °C. Prije i nakon analize uzoraka kolona je ispirana propuštanjem 65 %-tnim acetonitrilom jedan sat protokom od 0,5 mL/min. Volumen injektiranja acetonitrila je 10 µL. Kromatogrami su snimljeni pri valnim duljinama od 210 i 370 nm. Kao pokretna faza korišteni su 0,01 % mravlje kiseline u vodi i 0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu. Iz snimljenih kromatograma očitane su površine farmaceutika dobivenih špikanjem aktivnog mulja i uspoređivane s površinom farmaceutika iz standardne otopine. Na temelju očitanih površina izračunato je iskorištenje ekstrakcije koje ukazuje na učinkovitost ekstrakcije prema izrazu:

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

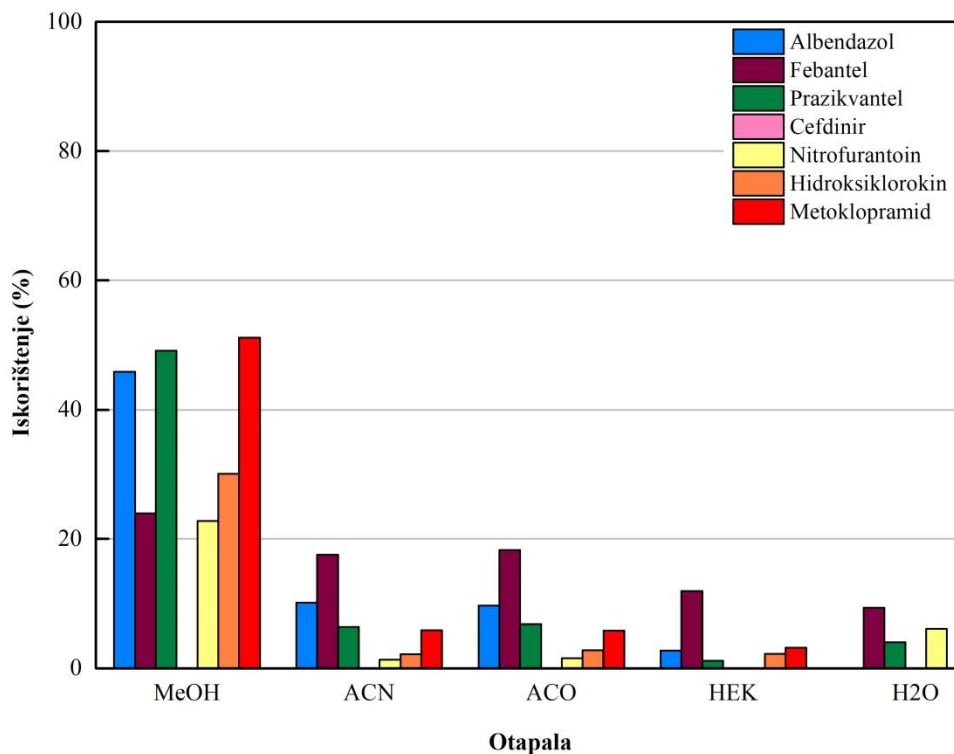
gdje ($A_{i,E}$) predstavlja površinu kromatografske krivulje analita u ekstraktu i ($A_{i,STD}$) površinu kromatografske krivulje analita u standardu.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Za ekstrakciju farmaceutika iz aktivnog mulja odabrana je ultrazvučna ekstrakcija kojom je ispitivan utjecaj otapala na iskorištenje ekstrakcije. Metoda kojom su analizirani dobiveni ekstrakti farmaceutika iz aktivnog mulja je tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD). Kromatogrami farmaceutika snimani su pri valnoj duljini od 210 nm, osim nitrofurantoina čiji su kromatogrami snimani pri 370 nm. Za detekciju farmaceutika uz apsorpcijske spektre korištena su vremena zadržavanja koja označavaju vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu komponentu. Kromatogrami dobiveni na kromatografskom sustavu HPLC-DAD korišteni su za određivanje učinkovitosti ekstrakcije farmaceutika metodom ultrazvuka, očitavanjem površine kromatografske krivulje dobivene za standardnu otopinu smjese farmaceutika i uspoređivanjem sa površinom kromatografske krivulje dobivene nakon provedene ekstrakcije ultrazvukom odgovarajućim otapalom prema izrazu (1).

U prvom i drugom eksperimentu ispitivan je utjecaj čistih otapala na ekstrakciju farmaceutika iz aktivnog mulja, a odabrana otapala su: metanol (MeOH), acetonitril (ACN), aceton (ACO), heksan (HEK), voda (H₂O), etil acetat (EtAc), diklormetan (DKM), kloroform (KLO), etanol (EtOH), 1-propanol (1-PrOH) i 2-propanol (2-PrOH). Na temelju rezultata dobivenih nakon tih eksperimenata odlučeno je daljnji tijek eksperimenta u kojem je ispitivano ponašanje farmaceutika u dvokomponentnim sustavima. S obzirom da su farmaceutici pokazali najviše iskorištenje ekstrakcije kada su kao otapala korišteni čisti metanol i etanol, ispitivani su dvokomponentni sustavi metanola i etanola sa pojedinim otapalima. Na kraju je utvrđeno koji od ispitivanih sustava pokazuje najbolje iskorištenje ekstrakcije te u kojem smjeru bi istraživanje trebalo nastaviti.

Na **Slici 22** grafički je prikazano iskorištenje farmaceutika za pojedina otapala provedeno nakon prvog eksperimenta.

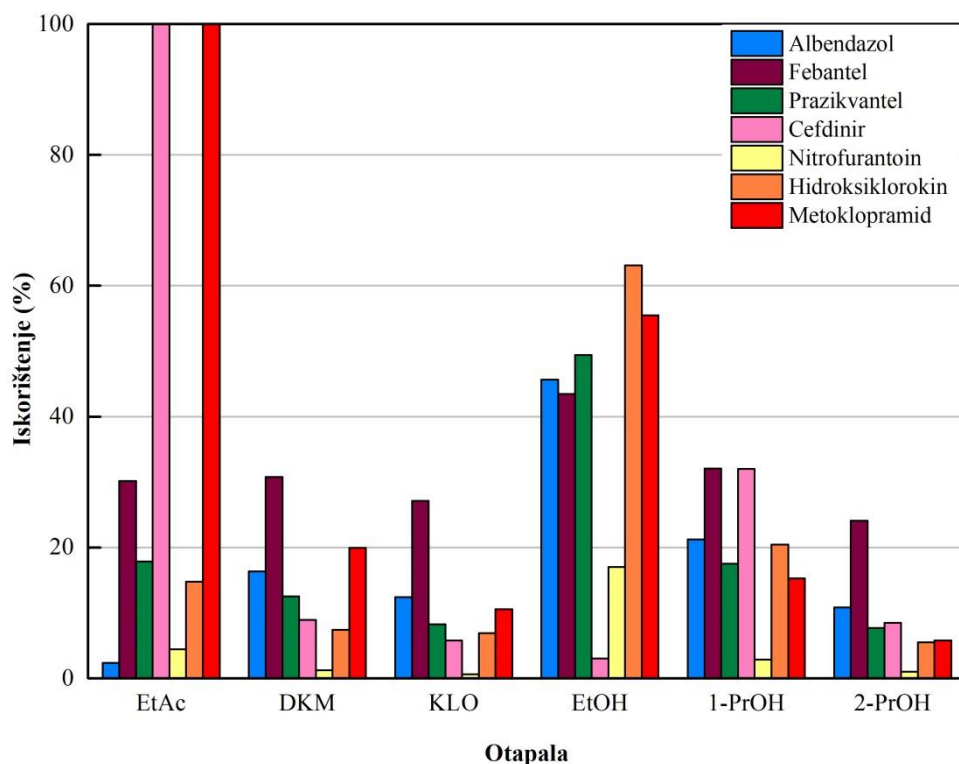


Slika 22. Iskorištenja ekstrakcija čistih otapala prvog eksperimenta

Vidljivo je da je najbolje otapalo za sve farmaceutike metanol, jer su detektirani svi farmaceutici, osim cefdinira, i dobivena iskorištenja najviša su u odnosu na iskorištenja drugih otapala. Kod acetonitrila i acetona su također detektirani svi farmaceutici osim cefdinira, ali sa znatno nižim iskorištenjem. Heksan se pokazao kao najbolje otapalo za febantel, dok su iskorištenja albendazola, prazikvantela, hidroksiklorokina i metoklopramida detektirana u znatno nižem postotku. Cefdinir također ni kod ovog otapala nije detektiran, a isto vrijedi i za nitrofurantoin. Za vodu je vidljivo da je najlošije otapalo u ovom eksperimentu jer su detektirana samo tri farmaceutika, febantel, prazikvantel i nitrofurantoin sa iskorištenjem nižim od 10 %. Najviše iskorištenje u ovom eksperimentu dobiveno je za metoklopramid u metanolu, 51 %. Farmaceutici azitromicin, eritromicin i klaritromicin nisu detektirani niti u jednom eksperimentu, iako su prisutni u ispitivanoj standardnoj otopini farmaceutika te stoga nisu navedeni na priloženim grafičkim rezultatima. Za njih je karakteristično da se ne mogu određivati korištenim detektorom s nizom dioda (DAD) zbog nedostatka konjugiranog sustava te je za njih potrebna analiza detektorom spektrometar masa.

Tehnika HPLC-MS/MS je osjetljivija i specifičnija a za identificiranje ili detekciju nepoznatih komponenti. Kako iskorištenje niti jednog farmaceutika u ovom eksperimentu nije iznad 55 %, odlučeno je ispitati utjecaj još šest čistih otapala na ekstrakciju farmaceutika iz aktivnog mulja u sljedećem eksperimentu.

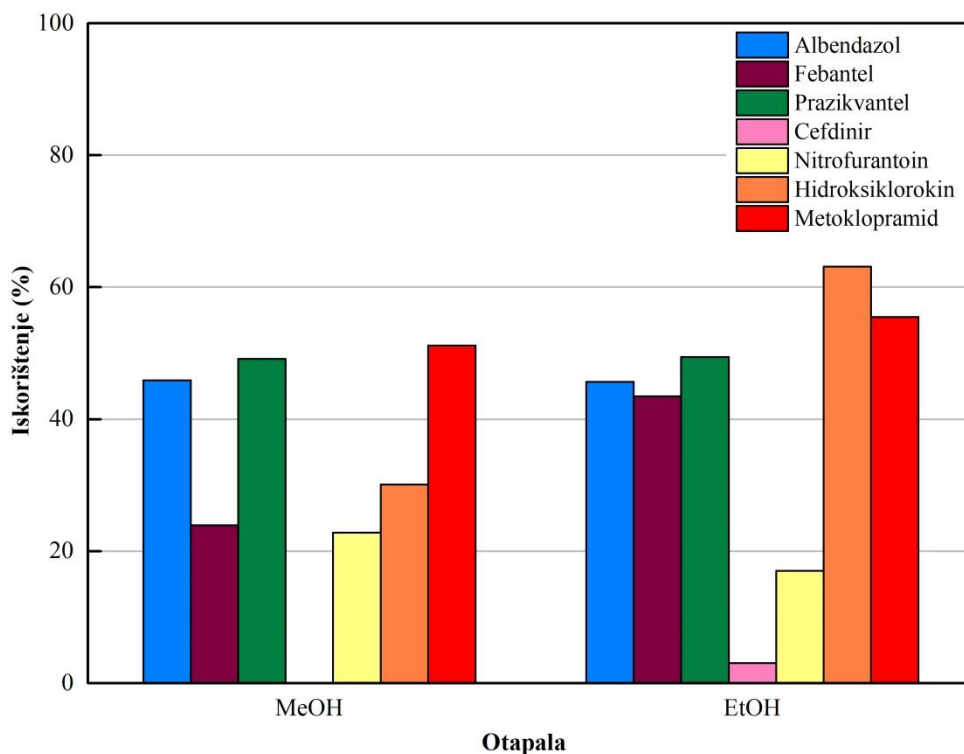
Na **Slici 23** grafički je prikazano iskorištenje farmaceutika za pojedina otapala korištena u drugom eksperimentu. Iz grafa je vidljivo da su dobiveni rezultati bolji u odnosu na prvi eksperiment, odnosno iskorištenja su viša te je detektiran i cefdinir u svim otapalima. Etanol se u ovom eksperimentu pokazao kao najbolje otapalo, detektirani su svi farmaceutici i vidljiva su najviša iskorištenja pojedinih farmaceutika. Najviše dobiveno iskorištenje ovog eksperimenta je upravo za hidrosiklorokin u etanolu, 63 %, te je to ujedno i najviše zabilježeno iskorištenje za pojedini farmaceutik u ispitivanom čistom otapalu. Za metoklopramid, prazikvantel, albendazol i febantel u etanolu zabilježena su viša iskorištenja u odnosu na metanol i ostala otapala. U 1-propanolu dobro je ekstrahiran cefdinir, 32 %, što je najviše za ispitivana otapala. Cefdinir je podjednako ekstrahiran u 2-propanolu i diklorometanu, dok je u kloroformu i etanolu njegovo iskorištenje ispod 6 %. Febantel u svim otapalima pokazuje iskorištenje više od 24 %, dok je iskorištenje nitrofurantoina u svim otapalima, osim etanola, ispod 5 %. U etil acetatu vidljiv je veliki utjecaj matice na cefdinir i metoklopramid jer su im iskorištenja viša od 100 %.



Slika 23. Iskorištenja ekstrakcija čistih otapala drugog eksperimenta

S obzirom da su u prethodnim eksperimentima metanol i etanol pokazali najbolja iskorištenja pojedinih farmaceutika, odabrani su njihovi dvokomponentni sustavi kako bismo utvrdili ponašala li se etanol i kada je u dvokomponentnom sustavu bolje od metanola.

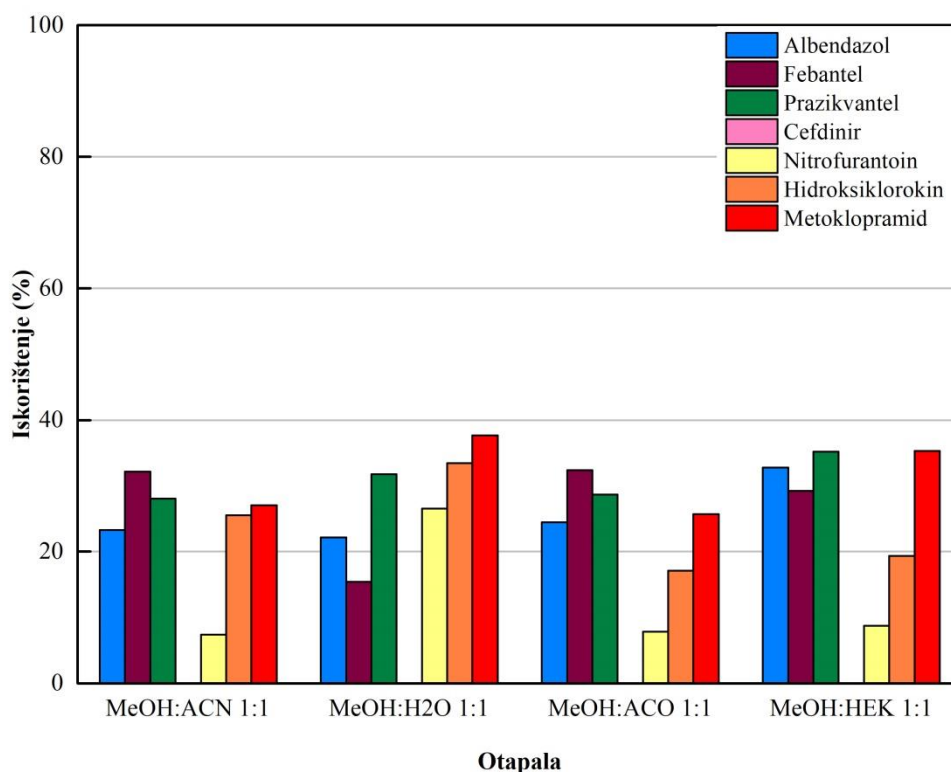
Na **Slici 24** grafički je prikazana usporedba iskorištenja ekstrakcije farmaceutika za čista otapala metanola i etanola na temelju koje je još jasnije vidljivo više iskorištenje ekstrakcije u etanolu.



Slika 24. Usporedba iskorištenja ekstrakcija čistih otapala metanola i etanola

Na **Slici 25** grafički je prikazano iskorištenje farmaceutika za dvokomponentne sustave: metanol:acetonitril (1:1), metanol:voda (1:1), metanol:aceton (1:1) i metanol:heksan (1:1). Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se svi farmaceutici, osim cefdinira, detektiraju u sva četiri sustava otapala. Nitrofurantoin i hidroksiklorokin pokazuju najbolja iskorištenja ekstrakcije u sustavu metanol:voda u odnosu na druge sustave, ali također i kada je kao čisto otapalo korišten metanol. Za metoklopramid i prazikvantel dobivena su viša iskorištenja ekstrakcije u čistom otapalu, metanolu, u odnosu na dvokomponentne sustave. Metoklopramid je od dvokomponentnih sustava najviše ekstrahiran u sustavu metanol:voda, a prazikvantel u sustavu metanol:heksan. Albendazol također pokazuje više iskorištenje ekstrakcije u čistom metanolu, a od dvokomponentnih sustava najviše iskorištenje ekstrakcije

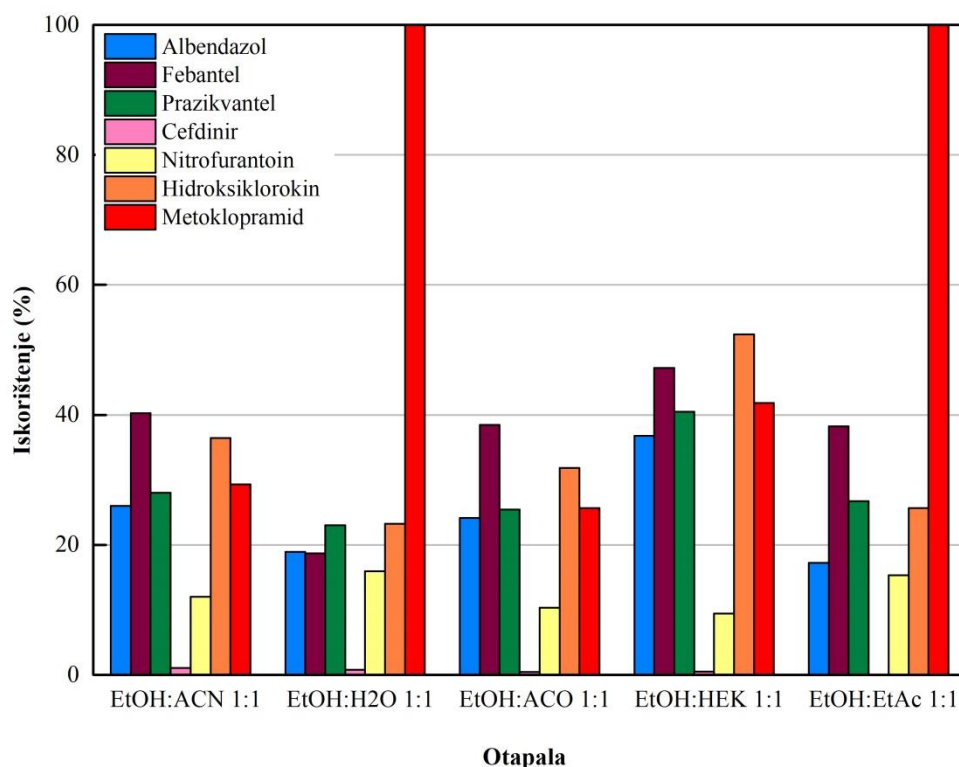
dobiveno je za sustav metanol:heksan. Febantel pokazuje bolje iskorištenje u dvokomponentnim sustavima metanol:aceton i metanol:acetonitril, u odnosu na iskorištenje ekstrakcije u čistom metanolu.



Slika 25. Iskorištenja ekstrakcija za sustav otapala metanol:acetonitril, metanol:voda, metanol:aceton i metanol:heksan

Nakon ovog eksperimenta najboljim sustavom pokazao se sustav metanol:voda, a u sljedećem eksperimentu praćeno je ponašanje farmaceutika u dvokomponentnom sustavu u kojem se umjesto metanola nalazi etanol. Tim eksperimentom ispitivano je ponašanje etanola u odnosu na čisti etanol, na dvokomponentni sustav i metanol, odnosno jesu li iskorištenja ekstrakcije viša.

Na **Slici 26** grafički je prikazano iskorištenje farmaceutika za dvokomponentne sustave: etanol:acetonitril (1:1), etanol:voda (1:1), etanol:aceton (1:1), etanol:heksan (1:1) i etanol:etil acetat (1:1).



Slika 26. Iskorištenja ekstrakcija za sustav otapala etanol:acetonitril, etanol:voda, etanol:aceton, etanol:heksan i etanol:etil acetat

Iz dobivenih rezultata vidljivo je da se svi farmaceutici detektiraju u svih pet sustava otapala, osim cefdinira koji se detektira manje od 1 % ili se uopće ne detektira te se njegovi rezultati mogu zanemariti. Sustav koji pokazuje najbolja iskorištenja ekstrakcija za sve ispitivane farmaceutike, osim nitrofurantoina, je sustav etanol:heksan. U tom je sustavu zabilježeno i više iskorištenje za pojedine farmaceutike u odnosu na iskorištenje u čistom etanolu. Za hidroksiklorokin dobiveno je željeno iskorištenje ekstrakcije koje je više od 52 %. Nitrofurantoin pokazuje najviše iskorištenje u sustavu etanol:voda. U sustavima etanol:voda i etanol:etil acetat vidljiv je veliki utjecaj matice na metoklopramid jer su im iskorištenja viša od 100 %.

Iz literature^[60] je poznato da je ultrazvučna ekstrakcija brza te da su za nju potrebne male količine otapala, djelotvornost ekstrakcije joj je manja te je time i iskorištenje niže. U ovom radu korištenjem ultrazvučne ekstrakcije željeno 50 % iskorištenje postignuto je samo

za četiri slučaja, za metoklopramid u etanolu i metanolu te za hidroksiklorokin u etanolu i dvokomponentnom sustavu etanol:heksan. Iz tog razloga, potrebno je primijeniti neke druge metode ekstrakcije kojima bi se smanjio utjecaj matice uzorka te tako dobilo više iskorištenje ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja, primjerice ekstrakciju mikrovalovima ili ekstrakciju raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD).

5. ZAKLJUČAK

U radu je proučavano ponašanje deset farmaceutika u različitim čistim organskim otapalima, ali i u dvokomponentnim sustavima otapala. Pri tome je korištena metoda ultrazvučne ekstrakcije. Cilj je bio postići iskorištenje ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja više od 50 %. Nakon provedenih eksperimenata može se zaključiti:

- u prvom eksperimentu najviše iskorištenje farmaceutika dobiveno je u metanolu, dok je za metoklopramid dobiveno željeno iskorištenje više od 50 %,
- u drugom eksperimentu za najbolje otapalo dobiveno je da je etanol, hidroksiklorokin pokazuje u njemu iskorištenje više od 63 % te je to ujedno i najviše dobiveno iskorištenje za pojedini farmaceutik u ispitivanim čistim otapalima,
- otapalo čistog etanola pokazuje više iskorištenje farmaceutika u odnosu na otapalo čistog metanola,
- u dvokomponentnim sustavima metanola i pojedinih otapala, najviše iskorištenje dobiveno je za sustav metanol:voda,
- u dvokomponentnim sustavima etanola, najviše iskorištenje dobiveno je za sustav etanol:heksan, hidroksiklorokin postigao je i u ovom sustavu željeno iskorištenje više od 50 %.

Od svih farmaceutika i navedenih otapala i sustava otapala, iskorištenje više od 50 % postignuto je sam za četiri slučaja. Iz toga razloga potrebno je primijeniti neke druge metode za određivanje farmaceutika iz aktivnog mulja, jer je utjecaj matice uzorka prevelik prilikom ispitivanja metodom ultrazvučne ekstrakcije. Posljedično tome vjerojatno bi se postiglo i više iskorištenje ekstrakcije farmaceutika iz aktivnog mulja, te tako znanstveno doprinijelo ovom još uvijek nedovoljno, a tako bitnom području za živi svijet.

6. LITERATURA

1. Senta, I., Terzic, S., Ahel, M., (2013). Occurrence and fate of dissolved and particulate antimicrobials in municipal wastewater treatment. *Water Research* **47**(2): 705-714.
2. Šabić, M., Vuković Domanovac, M., Findrik Blažević, Z., Meštrović, E., (2015). Kinetika bioremedijacije farmaceutske industrije otpadne vode. *Kemija u industriji*. **64** (5-6): 229-236.
3. Periša, M., Babić, S., (2014). Simultaneous determination of pharmaceuticals and some of their metabolites in wastewaters by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **37**(11): 1289-1296.
4. Alcántara-Durán, J., Moreno-González, D., Gilbert-López, B., (2018). Matrix-effect free multi-residue analysis of veterinary drugs in food samples of animal origin by nanoflow liquid chromatography high resolution mass spectrometry. *Food Chemistry* **245**: 29-38.
5. Wilen, B.-M., (1995). Effect of Different Parameters on Settling Properties of Activated Sludge., *Rapport* **4**:1-19.
6. Dolar, D., Ignjatić Zokić, T., Košutić, K., Ašperger, D., Mutavdžić Pavlović, D., (2012). RO/NF membrane treatment of veterinary pharmaceutical wastewater: comparison of results obtained on a laboratory and a pilot scale. *Environmental Science and Pollution Research* **19**(4): 1033-1042.
7. Aktivni mulj: <https://mixing.com/photo-gallery/63-directional-mix-jet-aerators> (preuzeto 10.9.2018.).
8. Kardum, M., (2008). Uređaj za pročišćavanje otpadnih voda na bazi aktivnog mulja. *Građevinar* **60**(5): 421-428.
9. Michael, I., Rizzo, L., McArdell, C. S., Manaia, C. M., Merlin, C., Schwartz, T., Dagot, C., Fatta-Kassinos, D., (2013). Urban wastewater treatment plants as hotspots for the release of antibiotics in the environment: A review. *Water Research* **47**(3): 957-995.
10. Obrada aktivnog mulja: <http://media1.britannica.com/eb-media/55/23955-004-2C395C6A.jpg> (preuzeto 10.9.2018.).
11. Tušar, B., (2009) Pročišćavanje otpadnih voda, Kigen d.o.o., Zagreb.
12. Tušar, B., (2004) Ispuštanje i pročišćavanje otpadne vode, CROATIA KNJIGA, Zagreb, 79-88.

13. Vouk, D., Malus, D., Tedeschi, S., Muljevi s komunalnih uređaja za pročišćavanje otpadnih voda. Sveučilište u Zagrebu, Građevinski fakultet, Zagreb.
14. Frleta, R., (2009). Solarno sušenje biološkog mulja iz naprava za pročišćavanje. Zbornik radova sa stručnog skupa: Aktualna problematika u vodoopskrbi i odvodnji, Ekoprodukt.
15. Jones, O. A. H., Voulvoulis, N., Lester, J. N., (2007). The occurrence and removal of selected pharmaceutical compounds in a sewage treatment works utilising activated sludge treatment. *Environmental Pollution* **145**(3): 738-744.
16. Salimi, M., Esrafil, A., Gholami, M., Jonidi Jafari, A., Rezaei Kalantary, R., Farzadkia, M., Kermani, M., Reza Sobhi, H., (2017). Contaminants of emerging concern: a review of new approach in AOP technologies. *Environmental Monitoring and Assessment* **189**(8): 414.
17. Schroeder, R. L., Gerber, J. P., (2014). Chloroquine and hydroxychloroquine binding to melanin: Some possible consequences for pathologies. *Toxicology Reports* **1**: 963-968.
18. Klatte, S., Schaefer, H.-C., Hempel, M., (2017). Pharmaceuticals in the environment – A short review on options to minimize the exposure of humans, animals and ecosystems. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* **5**: 61-66.
19. Grossi Botelho, R., Monteiro, S. H., Tornisielo, V. L., (2015.). Emerging Pollutants in the Environment – Current and Further Implications, *Veterinary Antibiotics in the Environment*, Chapter 5, 105-132.
20. Sakar, D., Makrolidi i linkozamidi, Zavod za farmakologiju i toksikologiju, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, <http://www.jelena-surran.com/predavanja/Makrolidi.pdf> (preuzeto: 15.6.2018.).
21. Selvi, A., Das, N., (2015). Remediation of cefdinir from aqueous solution using pretreated dead yeast *Candida* sp. SMN04 as potential adsorbent: An equilibrium, kinetics and thermodynamic studies. *Der Pharmacia Lettre* **7**(4): 74-81.
22. Perez, R. A., Albero, B., Ferriz, M., Tadeo, J. L., (2017). Analysis of macrolide antibiotics in water by magnetic solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **146**: 79-85.
23. Mirzaei, R., Yunesian, M., Nasser, S., Gholami, M., Jalilzadeh, E., Shoeibi, S., Mesdaghinia, A., (2018). Occurrence and fate of most prescribed antibiotics in

- different water environments of Tehran, Iran. *Science of The Total Environment* **619-620**: 446-459.
24. Dong, H., Yuan, X., Wang, W., Qiang, Z., (2016). Occurrence and removal of antibiotics in ecological and conventional wastewater treatment processes: A field study. *Journal of Environmental Management* **178**: 11-19.
25. Sharma, A., Verma, R., Ramteke, P., (2014). *Cyperus rotundus*: A potential novel source of therapeutic compound against urinary tract pathogens. *Journal of Herbal Medicine* **4**(2): 74-82.
26. Pawlowski, A. C., Stogios, P. J., Koteva, K., Skarina, T., Evdokimova, E., Savchenko, A., Wright, G. D., (2018). The evolution of substrate discrimination in macrolide antibiotic resistance enzymes. *Nature Communications* **9**(1): 112.
27. Parnham, M. J., Erakovic Haber, V., Giamarellos-Bourboulis, E. J., Perletti, G., Verleden, G. M., Vos, R., (2014). Azithromycin: Mechanisms of action and their relevance for clinical applications. *Pharmacology & Therapeutics* **143**(2): 225-245.
28. Adeli, E., (2016). Preparation and evaluation of azithromycin binary solid dispersions using various polyethylene glycols for the improvement of the drug solubility and dissolution rate. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* **52**: 1-13.
29. Wang, Q., Mi, G., Hickey, D. J., Li, Y., Tu, J., Webster, T., Shen, Y., (2018). Azithromycin-loaded respirable microparticles for targeted pulmonary delivery for the treatment of pneumonia. *Biomaterials* **160**: 107-123.
30. Ibrahim, F., Wahba, M. E. K., Magdy, G., (2018). Analytical method development and validation of spectrofluorimetric and spectrophotometric determination of some antimicrobial drugs in their pharmaceuticals. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* **188**: 525-536.
31. Jin, H. E., Jin, S. E., Maeng, H. J., (2014). Recent bioanalytical methods for quantification of third- generation cephalosporins using HPLC and LC- MS(/MS) and their applications in pharmacokinetic studies. *Biomedical Chromatography* **28**(11): 1565-1587.
32. Chen, Z.-j., Zhang, J., Yu, J.-c., Cao, G.-y., Wu, X.-j., Shi, Y.-g., (2006). Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B* **834**(1): 163-169.
33. Khan, A., Iqbal, Z., Khan, M. I., Javed, K., Khan, A., Ahmad, L., Shah, Y., Nasir, F., (2011). Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma by RP-

- HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B* **879**(24): 2423-2429.
34. Chen, J., Ahmad, J., (2008). Cefdinir-Induced Hepatotoxicity: Potential Hazards of Inappropriate Antibiotic Use. *Journal of General Internal Medicine* **23**(11): 1914-1916.
35. Terzic, S., Udikovic-Kolic, N., Jurina, T., Krizman-Matasic, I., Senta, I., Mihaljevic, I., Loncar, J., Smital, T., Ahel, M., (2018). Biotransformation of macrolide antibiotics using enriched activated sludge culture: Kinetics, transformation routes and ecotoxicological evaluation. *Journal of Hazardous Materials* **349**: 143-152.
36. Louvet, J. N., Giammarino, C., Potier, O., Pons, M. N., (2010). Adverse effects of erythromycin on the structure and chemistry of activated sludge. *Environmental Pollution* **158**(3): 688-693.
37. Johnson, A. C., Jürgens, M. D., Nakada, N., Hanamoto, S., Singer, A. C., Tanaka, H., (2017). Linking changes in antibiotic effluent concentrations to flow, removal and consumption in four different UK sewage treatment plants over four years. *Environmental Pollution* **220**: 919-926.
38. Autori nisu navedeni, (2008). Clarithromycin. *Tuberculosis* **88**(2): 92-95.
39. Arancibia, V., (2003). Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection. *Talanta* **61**(3): 377-383.
40. Lu, X., Chan, T., Zhu, L., Bao, X., Velkov, T., Zhou, Q. T., Li, J., Chan, H.-K., Zhou, F., (2018). The inhibitory effects of eighteen front-line antibiotics on the substrate uptake mediated by human Organic anion/cation transporters, Organic anion transporting polypeptides and Oligopeptide transporters in in vitro models. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **115**: 132-143.
41. Nitrofurantoin: <https://www.ebmconsult.com/articles/monograph-nitrofurantoin-macrobid-macrodantin> (preuzeto 5.7.2018.).
42. Degaut Pontes, F. L., Pontarolo, R., Ramos Campos, F., Cleverison Gasparetto, J., Cardoso, M. A., Piantavini, M. S., Leal Badaró Trindade, A. C., (2013). Development and validation of an HPLC-MS/MS method for simultaneous determination of ivermectin, febantel, praziquantel, pyrantel pamoate and related compounds in fixed dose combination for veterinary use. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* **6**(2): 191-200.

43. Crosby, N. T., (2007). Determination of veterinary residues in food, Woodhead Publishing Limited, str. 240-245.
44. Goodman&Gilman's, (2001). The Pharmacological Basis Of Therapeutics. 10th Edition, The McGraw-HillCompanies. Inc., 1125-1251.
45. Bongioanni, A., Sousa Araújo, B., de Oliveira, Y. S., Longhi, M. R., Ayala, A., Garnero, C., (2018). Improving Properties of Albendazole Desmotropes by Supramolecular Systems with Maltodextrin and Glutamic Acid. An Official Journal of the American Association of Pharmaceutical Scientists **19**(3): 1468-1476.
46. Pensel, P., Paredes, A., Albani, C. M., Allemandi, D., Sanchez Bruni, S., Palma, S. D., Elissondo, M. C., (2018). Albendazole nanocrystals in experimental alveolar echinococcosis: Enhanced chemoprophylactic and clinical efficacy in infected mice. *Veterinary Parasitology* **251**: 78-84.
47. Albendazol: <http://blogs.lasalabs.com/albendazole-2/> (preuzeto 5.7.2018.).
48. Dusi, G., Gamba, V., Faggionato, E., (2005). Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **38**(2): 375-379.
49. Bruni, G., Pardi, F., Capsoni, D., Berbenni, V., Bini, M., Valle, G., Milanese, C., Girella, A., Marini, A., (2017). Febantel: looking for new polymorphs. *Journal of Thermal Analysis and Calorimetry* **130**(3): 1605-1612.
50. Giorgi, M., Meucci, V., Vaccaro, E., Mengozzi, G., Giusiani, M., Soldani, G., (2003). Effects of liquid and freeze-dried grapefruit juice on the pharmacokinetics of praziquantel and its metabolite 4'-hydroxy praziquantel in beagle dogs. *Pharmacological Research* **47**(1): 87-92.
51. Borrego-Sánchez, A., Viseras, C., Aguzzi, C., Sainz-Díaz, I., (2016). Molecular and crystal structure of praziquantel. Spectroscopic properties and crystal polymorphism. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **92**: 266-275.
52. Zheng, X.-S., Duan, C.-Z., Xiao, Z.-D., Yao, B.-A., (2008). Transdermal Delivery of Praziquantel: Effects of Solvents on Permeation Across Rabbit Skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* **31**(5): 1045-1048.
53. Piantavini, M. S., Pontes, F. L. D., Weiss, L. X., Sena, M. M., Pontarolo, R., (2015). Comparison between Ultraviolet and Infrared Spectroscopies for the Simultaneous Multivariate Determination of Pyrantel and Praziquantel. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **26**: 1387-1395.

54. Habek Čerkez, J., (2013). Liječenje gastrointestinalnih simptoma u palijativnoj skrbi, Klinika za unutrašnje bolesti, Klinička bolnica "Sveti Duh", Zagreb, Hrvatska, *Acta Med Croatica*, **67**:241-249.
55. Pero, R.W., Olsson, A., Simanaitis, M., Amiri, A., Andersen, I., (1997). Pharmacokinetics, toxicity, side effects, receptor affinities and in vitro radiosensitizing effects of the novel metoclopramide formulations, sensamide and neu-sensamide. *Pharmacology Toxicology* **80**(5), 231-239.
56. Metoklopramid:
https://lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Tractos+Extrapiramidales&lang=2
(preuzeto 5.7.2018.).
57. Neziri, H., (2015). Primjena marihuane u terapijske svrhe—pro i contra. Farmaceutsko—biokemijski fakultet, Zagreb,38.
58. González-Hernández, I., Aguirre-Cruz, L., Sotelo, J., López-Arellano, R., Morales-Hipólito, A., Jung-Cook, H., (2014). Distribution of Hydroxychloroquine in Lymphoid Tissue in a Rabbit Model for HIV Infection. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**(1): 584-586.
59. Soichot, M., Mégarbane, B., Houzé, P., Chevillard, L., Fonsart, J., Baud, F. J., Laprévote, O., Bourgogne, E., (2014). Development, validation and clinical application of a LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of hydroxychloroquine and its active metabolites in human whole blood. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **100**: 131-137.
60. Mutavdžić Pavlović, D., Ašperger, D., (2012).: Priprava uzoraka za analizu, u: M. Kaštelan—Macan, M. Petrović: *Analitika okoliša*, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 140-165.
61. Kummerer, K., (2004). *Pharmaceuticals in the Environment*. Springer, str. 1-10.
62. Nakada, N., Tanishima, T., Shinohara, H., Kiri, K., Takada, H., (2006). Pharmaceutical chemicals and endocrine disruptors in municipal wastewater in Tokyo and their removal during activated sludge treatment. *Water Research* **40**(17): 3297-3303.
63. Periša, M., Babić, S. (2014). Simultaneous determination of pharmaceuticals and some of their metabolites in wastewaters by high performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry. *Journal of Separation Science* **37**(11): 1289-1296.

64. De Souza, M. R., Saraceno, A. L., Da Silveira, C. L. P., Aucélio, R. Q., (2006). Determination of trace elements in crude oil by ICP-OES using ultrasound-assisted acid extraction. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* **21**(11): 1345–1349.
65. Zrnčić, M., (2013). Razvoj i optimizacija analitičkih postupaka za određivanje farmaceutika u otpadnim vodama, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 41-42; 7475, 82-84.
66. HPLC-DAD: <https://www.scribd.com/document/57998471/Tandem-Techniques-R-P-W-Scott> (preuzeto 25.7.2018.).
67. HPLC-DAD: <https://www.crawfordscientific.com/images/Diode-Array-Detector-Settings01.jpg> (preuzeto 25.7.2018.).

7. DODATAK

7.1 Popis slika

Slika 1. Način ulaska farmaceutika u okoliš

Slika 2. Mehanizam flokulacije aktivnog mulja^[5]

Slika 3. Aktivni mulj^[7]

Slika 4. Obrada aktivnog mulja^[10]

Slika 5. Struktura azitromicina^[28]

Slika 6. Struktura cefdinira^[30]

Slika 7. Struktura eritromicina^[35]

Slika 8. Struktura klaritromicina^[35]

Slika 9. Struktura nitrofurantoina^[41]

Slika 10. Struktura albendazola^[47]

Slika 11. Struktura febantela^[49]

Slika 12. Struktura prazikvantela^[53]

Slika 13. Struktura metoklopramida^[56]

Slika 14. Struktura hidroksiklorokina^[59]

Slika 15. Ultrazvučna ekstrakcija^[64]

Slika 16. Detektor s nizom dioda^[67]

Slika 17. Analitička vaga Mettler Toledo AB104

Slika 18. Ultrazvučna kupelj SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka

Slika 19. Pribor za filtriranje

Slika 20. Büchi Waterbath B-480

Slika 21. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, Varian ProStar 500

Slika 22. Iskorištenja ekstrakcija čistih otapala prvog eksperimenta

Slika 23. Iskorištenja ekstrakcija čistih otapala drugog eksperimenta

Slika 24. Usporedba iskorištenja ekstrakcija čistih otapala metanola i etanola

Slika 25. Iskorištenja ekstrakcija za sustav otapala metanol:acetonitril, metanol:voda, metanol:aceton i metanol:heksan

Slika 26. Iskorištenja ekstrakcija za sustav otapala etanol:acetonitril, etanol:voda, etanol:aceton, etanol:heksan i etanol:etil acetat

7.2 Popis tablica

Tablica 1. Mjere za smanjenje farmaceutika u okolišu^[18]

Tablica 2. Naziv, molekulska formula, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

Tablica 3. Prikaz fizikalno-kemijskih svojstava korištenih farmaceutika

