

Hidrolitička i fotolitička razgradnja hidrosiklorokina u okolišu

Topalović, Ines

Undergraduate thesis / Završni 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:149:388870>

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

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



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ines Topalović

Hidrolitička i fotolitička razgradnja hidrosiklorokina u okolišu

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitne komisije: prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Mirta Čizmić

Zagreb, srpanj 2017.

UNIVERSITY OF ZAGREB
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY
UNDERGRADUATE COURSE

Ines Topalović

**Hydrolytic and photolytic degradation of hydroxychloroquine in
the environment**

FINAL WORK

Supervisor: prof. dr. sc. Sandra Babić

Members of the Test Commission: prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Mirta Čizmić

Zagreb, july 2017.

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



Zahvale

Prije svega, želim iskreno zahvaliti svojoj mentorici, prof. dr. sc. Sandri Babić, što mi je pružila mogućnost izrade završnoga rada na Zavodu za analitičku kemiju, na njenoj strpljivosti te na svim savjetima i ohrabrenjima koje mi je udijelila prilikom njegove izrade.

Zahvaljujem od srca i našem asistentu, mag. chem. Dariju Dabiću, na svemu što je učinio kako bi eksperimentalni dio rada i rezultati bili što bolji. Hvala mu na trudu i znanjima koja je uložio i prenio na nas. Želim mu puno sreće i uspjeha u izradi njegovog doktorskog rada.

Također, zahvaljujem i dragim tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju, Slavici Kos i Tanji Ivančić, na njihovoj pomoći s priborom i kemikalijama te na njihovu vedru duhu.

Od srca zahvaljujem svojoj kolegici i dragoj prijateljici, Dorini Vidović, što mi je pomogla u izvođenju eksperimentalnog dijela, ali i što me već tri godine neumorno trpi sa svim mojim manama i vrlinama, što mi svojim savjetima i osmjehom uvijek popravi dan i pokaže da studiranje nije samo stjecanje znanja, već i pravih prijateljstava. A ja znam da sam svog životnog prijatelja stekla. Želim joj puno sreće i uspjeha sa završnim radom i daljnjim nastavkom studija.

Na kraju, ali ne manje važno, zahvaljujem svojoj obitelji, prijateljima i svima koji su na bilo koji način pripomogli mome studiranju i omogućili da danas budem ovdje gdje jesam. Oni znaju koji su i njima posvećujem ovaj rad.

SAŽETAK

Proizvodnja i potrošnja farmaceutika raste, a zbog toga je i njihova koncentracija u okolišu sve veća. Pod utjecajem različitih čimbenika iz okoliša te ovisno o fizikalno-kemijskim svojstvima samih farmaceutika, dolazi do njihove razgradnje pri čemu mogu nastati toksični produkti. Stoga je veoma bitno promatrati razgradnju farmaceutika u okolišu. Cilj ovoga rada bio je proučiti hidrolitičku i fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina koje pripadaju abiotičkim procesima. Tijek hidrolitičke i fotolitičke razgradnje praćen je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti vezanoj s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD). Hidrolitička razgradnja hidroksiklorokina istražena je u ultračistoj vodi pri tri različite pH-vrijednosti (4, 7 i 9) te je uočeno da hidroksiklorokin ne hidrolizira. Fotolitička razgradnja ispitana je u ultračistoj i izvorskoj vodi te je uočeno da je razgradnja brža u izvorskoj vodi. Osim toga, praćen je i utjecaj pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju i to na dva načina, u puferskim otopinama koje se opiru promjeni pH-vrijednosti i s pH-vrijednostima podešenim napočetku eksperimenta (4, 7, 9 i 10) jer prilikom razgradnje dolazi do promjene pH-vrijednosti. Uočeno je da povišenjem pH-vrijednosti, raste brzina fotolitičke razgradnje, odnosno da se smanjuje vrijeme poluraspada. Također, uočeno je da razgradnjom hidroksiklorokina nastaju dva razgradna produkta.

Ključne riječi: *farmaceutici, hidroksiklorokin, hidrolitička razgradnja, fotolitička razgradnja, tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti, vrijeme poluraspada, razgradni produkti*

SUMMARY

Production and consumption of pharmaceuticals increase and because of that their concentration in the environment is also getting bigger. Under the influence of different environmental factors and depending on physico-chemical properties of pharmaceuticals; pharmaceuticals degrade. Toxic products can arise during degradation of pharmaceuticals so it is very important to examine their degradation. The aim of this work was to examine abiotic processes, hydrolytic and photolytic degradation, of hydroxychloroquine. The rate of hydrolytic and photolytic degradation was monitored by high performance liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD). Hydrolytic degradation of hydroxychloroquine was performed in ultra-pure water at three pH-values (4, 7 i 9) and it was noticed that hydroxychloroquine did not hydrolyze. Photolytic degradation was performed in ultra-pure and spring water and it was noticed that degradation was faster in spring water. Furthermore, the impact of pH-values on photolytic degradation was monitored in two ways: (i) in buffer solutions that resist change of pH-values and (ii) in solutions with a preset pH-values (4, 7, 9 i 10) because during degradation pH-values change. By increasing the pH-value, the rate of degradation was increased and half-life time decreased. During degradation of hydroxychloroquine, formation of two degradation products were observed.

Keywords: *pharmaceuticals, hydroxychloroquine, hydrolytic degradation, photolytic degradation, high performance liquid chromatography, half-life, degradation products*

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Farmaceutici u okolišu	2
2.1.1. Hidroksiklorokin.....	3
2.2. Razgradnja farmaceutika u okolišu	4
2.2.1. Hidroliza.....	4
2.2.2. Fotolitička razgradnja.....	5
2.2.3. Kinetika fotolitičke razgradnje.....	6
2.3. Kromatografija	7
2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC.....	8
3. EKSPERIMENTALNI DIO	12
3.1. Materijali	12
3.1.1. Kemikalije.....	12
3.1.2. Hidroksiklorokin.....	13
3.1.3. Izvorska i ultračista (<i>Milli-Q</i>) voda	13
3.2. Instrumenti	14
3.2.1. Uređaj za pročišćavanje vode.....	14
3.2.2. Uređaj za filtraciju.....	14
3.2.3. Analitička vaga.....	15
3.2.4. pH-metar.....	16
3.2.5. UV/VIS spektrofotometar.....	17
3.2.6. Suntest CPS+.....	18

3.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC).....	18
3.3. Metode rada.....	19
3.3.1. Karakterizacija izvorske vode.....	19
3.3.2. Priprema standardnih otopina hidroksiklorokina.....	19
3.3.3. Hidroliza hidroksiklorokina.....	20
3.3.4. Fotoliza hidroksiklorokina.....	21
3.3.5. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.....	22
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	23
4.1. Karakterizacija izvorske vode.....	26
4.2. Kromatografska analiza.....	26
4.3. Hidrolitička razgradnja hidroksiklorokina.....	27
4.4. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina.....	27
4.4.1. Kinetika fotolitička razgradnja – utjecaj koncentracije i sastava matice.....	28
4.4.2. Kinetika fotolitička razgradnja – utjecaj pH.....	32
4.4.2.1. Puferske otopine.....	34
4.4.2.2. Otopine pH-vrijednosti 4, 7, 9 i 10.....	36
4.4.3. Razgradni produkti.....	38
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA.....	41
ŽIVOTOPIS.....	42

1. UVOD

Farmaceutici, tzv. *nova zagađivala*, spojevi su koji se upotrebljavaju za liječenje ljudi i životinja. Proizvodnja i potrošnja farmaceutika sve više raste zbog starenja populacije, lošijeg načina života i različitih čimbenika koji utječu na zdravlje. Samim time je i koncentracija farmaceutika u okolišu sve veća. Farmaceutici u okoliš dospjevaju na razne načine, najčešće putem ljudskih i životinjskih izlučevina te putem otpadnih voda. Kada dospiju u okoliš, izloženi su utjecaju brojnih faktora, poput Sunčeva zračenja, koji potiču razgradnju farmaceutika. Razgradnja može biti abiotička i biotička. Tijekom razgradnje dolazi do promjene strukture i svojstava početnog spoja te nastanka razgradnih produkata koji mogu biti štetni za okoliš. Stoga se danas velika pozornost pridaje promatranju razgradnje farmaceutika u okolišu. Hidrolitička i fotolitička razgradnja, koje su praćene u ovom radu, pripadaju abiotičkim procesima razgradnje. Hidroliza je abiotički proces razgradnje u kojem dolazi do pucanja kemijskih veza unutar molekule djelovanjem vode. Fotoliza ili fotolitička razgradnja jest abiotički proces razgradnje molekule izložene djelovanju svjetlosti. Većina farmaceutika koji se uzimaju oralno otporni su na hidrolizu, odnosno ne hidroliziraju, tako da je fotoliza primarni način njihove razgradnje u površinskim vodama. Brzina razgradnje farmaceutika ovisi o brojnim čimbenicima, poput intenziteta Sunčevog zračenja, zamućenosti vode, koncentracijama tvari uobičajeno prisutnih u prirodnim vodama (npr. huminske kiseline, kloridi, nitrati) te o koncentraciji samog farmaceutika.

2. TEORIJSKI DIO

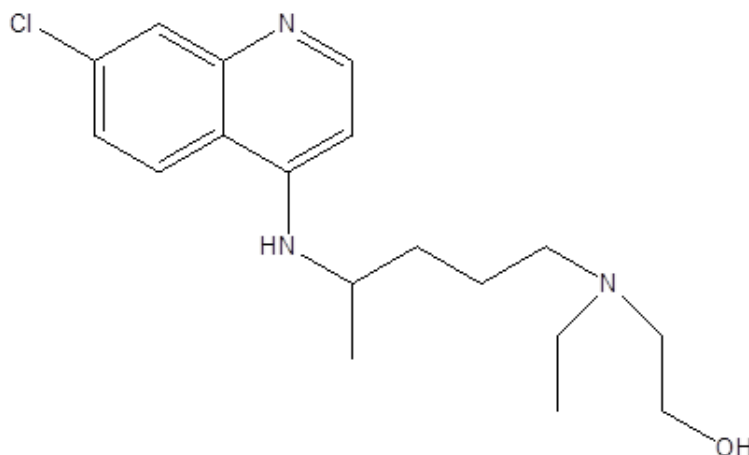
2.1. Farmaceutici u okolišu

Zbog sve većeg razvoja industrije, tehnologija i povećanja potrošnje diljem svijeta, ljudi, životinje i okoliš izloženi su sve većem broju potencijalnih zagađivača, među kojima se, kao tzv. *nova zagađivala*, navode i farmaceutici. Svake godine se samo u SAD-u proizvede preko 2 000 novih kemikalija [1]. Loša demografska slika i starenje populacije, dovode do porasta potrebe za lijekovima, stoga se očekuje i daljnji rast brojki proizvodnje i potrošnje [2]. Što se više lijekova proizvodi i troši, veća je i koncentracija njih samih u okolišu što otežava kontrolu nad njima i stvara sve veću zabrinutost među znanstvenicima, stoga se danas velika pozornost pridaje otkrivanju utjecaja farmaceutika na okoliš. Farmaceutici su spojevi koji se upotrebljavaju za liječenje ili sprječavanje bolesti ljudi i životinja te kao promotori rasta u veterinarskoj medicini [3]. Najčešće su to velike kompleksne molekule ($M=300-1000 \text{ g/mol}$) s nekoliko funkcionalnih grupa. Nazivaju se *novim zagađivalima* jer ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš, a ispuštaju se u količinama koje bi mogle predstavljati potencijalnu opasnost za ekosustav. Osim farmaceutika, u *nova zagađivala* ubrajaju se i sredstva koja se koriste u kućanstvu te sredstva za osobnu higijenu. Nakon što se farmaceutici enteralno ili parenteralno unesu u organizam, apsorbiraju se u krvotok, raspodjeljuju u sva tkiva te dolazi do njihove biopreobrazbe i izlučivanja iz organizma [5, 4]. Osim putem izlučevina, životinjskih i ljudskih, farmaceutici u okoliš mogu dospjeti korištenjem u akvakulturi kao dodataka prehrani te nepropisnim odlaganjem neupotrebljenih farmaceutika ili onih kojima je istekao rok trajanja te putem aktivnog mulja i otpadnih voda. Ako postrojenja za pročišćavanje otpadnih voda nisu prilagođena za uklanjanje farmaceutika te ako uvjeti procesa nisu zadovoljavajući, učinkovitost uklanjanja farmaceutika će biti mala. Samim time, koncentracija farmaceutika u otpadnim vodama ($\mu\text{g/L}$) veća je od koncentracije farmaceutika u podzemnim i površinskim vodama (ng/L). Učinkovitost uklanjanja može se povećati procesima ozonacije i UV oksidacije te primjenom membranskih procesa u postupku tercijarne obrade otpadnih voda. Nakon što dospiju u okoliš, farmaceutici se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava mogu vezati na tlo i sediment ili se djelovanjem različitih čimbenika mogu razgrađivati. Ovisno o čimbenicima koji uzrokuju razgradnju razlikujemo abiotičke i biotičke procese razgradnje. Hidroliza i fotoliza, o kojima će se govoriti i u ovom radu, pripadaju abiotičkim procesima. Mikroorganizmi, poput bakterija i gljivica, potiču biotičku razgradnju. Prilikom razgradnje, dolazi do smanjenja početne koncentracije farmaceutika pri čemu nastaju razgradni produkti. Međutim, znanstvena istraživanja pokazala

su da, prilikom obrade otpadnih voda, može doći i do povećanja koncentracije ako se njihovi metaboliti djelovanjem enzima pretvaraju u početni spoj. Poznavanje fizikalno-kemijskih svojstava poput koeficijenta razdiobe *n*-oktanol-voda (K_{ov}), koeficijenta razdiobe (K_d), konstante ionizacije (K_k), koeficijenta sorpcije na organski ugljik (K_{oc}) važno je zato što upravo ta svojstva određuju hoće li se farmaceutik vezati na tlo i sediment ili će prijeći u vode u okolišu [4].

2.1.1. Hidroksiklorokin

Hidroksiklorokin (HCQ) (slika 1), trgovačkog naziva *Plaquenil*, farmaceutik je koji se oralnim putem uzima za prevenciju i liječenje malarije, reumatoidnog artritisa, lupusa, porfirije (*porphyria cutanea tarda*), Sjörgenovog sindroma i Q groznice. Odobren je u SAD-u 1955. godine i pripada antimalarijskoj i 4-aminokinolinskoj skupini lijekova. Najčešće nuspojave koje se mogu pojaviti nakon kratkotrajnog korištenja HCQ-a su blaga mučnina i grčevi u trbuhu što dovodi do smanjenja apetita, glavobolje, povraćanja; te problema sa srcem. Nakon dugotrajnog korištenja HCQ-a, može doći do pojave raznih kožnih oboljenja, od osipa do psorijaze, gubitka sluha, tjelesne težine, do pojave akni, anemije, itd. Najopasnija nuspojava jest toksičnost za oči. Ljudi koji uzimaju 400 mg i manje HCQ-a dnevno imaju manju vjerojatnost da će zadobiti oboljenje oka, za razliku od onih koji piju ovaj lijek dulje od 5 godina ili imaju kumulativnu dozu veću od 1000 g [6]. Iako mehanizam djelovanja HCQ-a nije poznat, poznata je njegova sposobnost da veže i mijenja molekulu DNK. Također, HCQ djeluje kao inhibitor. Usporava stvaranje plazmodija kod eritrocita te reumatoidnog faktora, stabilizira membrane lizosoma i usporava aktivnost brojnih enzima [7].



Slika 1. Struktura hidroksiklorokina

2.2. Razgradnja farmaceutika u okolišu

Zbog sve veće važnosti i sve veće primjene farmaceutika kod ljudi i životinja, veća je i njihova prisutnost u okolišu, pogotovo u vodama. Farmaceutici se mogu razgraditi na različite razgradne produkte od kojih neki mogu biti i toksični, stoga se sve više pozornosti danas posvećuje upravo utjecaju farmaceutika, ali i njihovih razgradnih produkata na okoliš.

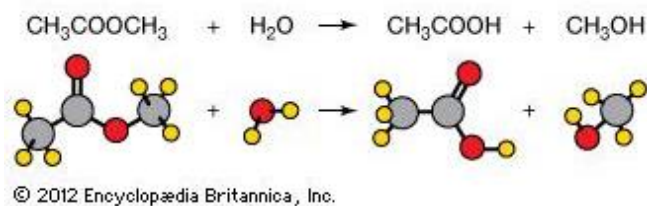
Prilikom razgradnje, početnoj molekuli farmaceutika smanjuje se koncentracija, ona se razgrađuje, odnosno mijenja svoju strukturu te nastaju produkti različitih fizikalno-kemijskih svojstava. Abiotički procesi razgradnje, poput hidrolize i fotolize, ali i biorazgradnja ovise o abiotičkim čimbenicima koji potiču razgradnju farmaceutika, a to su: temperatura, svjetlost, vlažnost, tlak zraka, slanost vode, vjetrovi, radioaktivno zračenje, reljef. Ekološki maksimum je najveći utjecaj nekog čimbenika koji određena tvar ili organizam u prirodi može podnijeti bez da se deformira ili transformira. Sunčevo zračenje je osnovni izvor energije i topline u prirodi. 19% njegove energije gubi se prilikom prolaza kroz atmosferu, 34% se reflektira i vraća u atmosferu, a 47% dopire na Zemljinu površinu i djeluje na organizme, tvari i cjelokupni okoliš. Ako se apsorpcijski spektar neke tvari preklopi sa spektrom Sunčeva zračenja, to zračenje može imati utjecaja na razgradnju te tvari, odnosno, doći će do fotolitičke razgradnje te tvari [8, 9].

Biorazgradnja je proces razgradnje potaknut djelovanjem enzima, odnosno različitih mikroorganizama poput bakterija i gljivica čime se mijenja kemijska struktura tvari [10]. Ovaj proces je poželjan jer se njime organske tvari, poput farmaceutika, razlažu do anorganskih soli, ugljikovog dioksida (CO_2) i vode u prisutnosti zraka. Ako se tvar u potpunosti razgradi, odnosno, ako je mineralizacija potpuna, neće nastati toksični produkti prilikom razgradnje [9].

2.2.1. Hidroliza

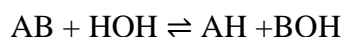
Hidroliza je abiotički proces razgradnje u kojem dolazi do pucanja kemijskih veza unutar molekule djelovanjem vode. Reakcija se najčešće zbiva između iona i molekule vode prilikom čega se mijenja pH-vrijednost otopine. Ako se reakcija zbiva između ioniziranih molekula i vode, razlikujemo 3 tipa hidrolize: hidroliza soli, hidroliza kiselina i hidroliza baza [11].

Hidroliza se može odvijati i između neutralnih molekula i molekula vode, kao što je slučaj kod hidrolize farmaceutika gdje oni kao organske neutralne tvari reagiraju s vodom. Primjer takve hidrolize jest reakcija estera i vode pri čemu nastaju karboksilna kiselina i alkohol (slika 2).



Slika 2. Hidroliza estera [12]

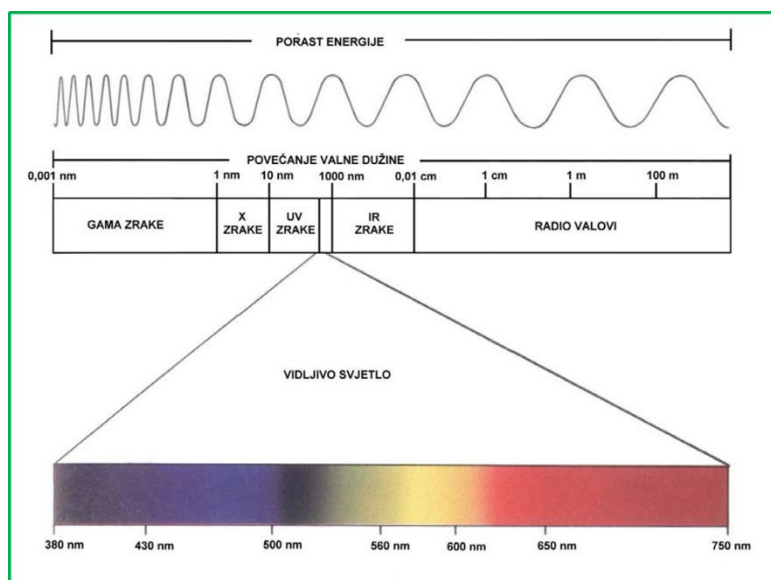
Kemijska reakcija hidrolize može se prikazati kao reverzibilna reakcija:



gdje AH predstavlja tvar koja reagira s vodom koja je označena kao HOH. Reakcije hidrolize važne su za žive organizme, npr. proteini hidroliziraju u aminokiseline, masti u masne kiseline i glicerol, itd. [12].

2.2.2. Fotolitička razgradnja

Ultraljubičasto (UV) zračenje (zrake do 400 nm) čini 1-5%, vidljivo zračenje (zrake 400-800 nm) čini 16-45%, a infracrveno zračenje (zrake preko 800 nm) čini 49-84% spektra Sunčevog zračenja (slika 3).



Slika 3. Spektar Sunčeva zračenja [8]

UV zračenje sve se više koristi u obradi voda otkad je u kasnim 1990-tima otkriveno kako ima veliki deaktivirajući učinak na *Cryptosporidium* oociste koje uzrokuju razne gastrointestinalne bolesti [13]. Dakle, UV zračenje koristi se za dezinfekciju i pročišćavanje voda. Čak i kad se koristi za te svrhe, UV zračenje može razgraditi organske tvari direktnom fotolizom ili fotolabilne tvari apsorpcijom svjetla [14]. Većina UV reaktora može se podijeliti na temelju karakteristika lampe u dvije skupine: monokromatski s niskim tlakom i polikromatski s osrednjim tlakom. Obje vrste lampi sadrže živin plin koji emitira UV zračenje kad je pobuđen elektronima [13]. Većina farmaceutika koji se uzimaju oralno otporni su na hidrolizu, odnosno ne hidroliziraju, tako da je fotoliza primarni način njihove razgradnje u površinskim vodama [14].

Fotoliza ili fotolitička razgradnja jest abiotički proces kidanja kemijskih veza unutar molekule izložene djelovanju svjetlosti. Ako se apsorpcijski spektar te molekule preklapa sa spektrom Sunčevog zračenja, to zračenje će potaknuti fotolizu molekule. Osim o apsorpcijskom spektru spoja, učinkovitost fotolize ovisi i o kvantnom prinosu te o strukturi farmaceutika. Kvantni prinos je omjer količine početne molekule ili nastalog produkta i količine apsorbiranih fotona. Vrijednosti kvantnog prinosa kreću se između 0 i 1, premda su vrijednosti 0,0001 - 0,1 karakteristične za spojeve koji se razgrađuju djelovanjem Sunčeva zračenja. Brzina razgradnje farmaceutika ovisi o koncentracijama tvari uobičajeno prisutnim u prirodnim vodama (npr. huminske kiseline, kloridi, nitrati) te o koncentraciji samog farmaceutika. Osim spomenutih čimbenika, na fotolitičku razgradnju utječu i dubina vode, geografska širina, godišnje doba, vremenski uvjeti te intenzitet Sunčeva zračenja [4].

2.2.3. Kinetika fotolitičke razgradnje

Kemijska kinetika bavi se istraživanjem brzina kemijskih reakcija pa tako određivanjem kinetike fotolitičke razgradnje možemo odrediti kojom brzinom će se određena tvar razgraditi djelovanjem svjetlosti. Brzina reakcije najviše ovisi o temperaturi i koncentracijama tvari koje reagiraju [15]. Većinom su reakcije fotolitičke razgradnje reakcije prvog reda u kojima je brzina kemijske reakcije proporcionalna koncentraciji reaktanata:

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \quad (1)$$

pri čemu je k konstanta brzine reakcije, $[A]$ koncentracija reaktanta, t vrijeme provođenja eksperimenta.

$$\int_{[A]_0}^{[A]} \frac{d[A]}{[A]} = - \int_{t_0}^t k dt \quad (2)$$

$$\ln[A] = -\ln[A_0] = -kt \quad (3)$$

$$\frac{\ln[A]}{[A]_0} = -kt \quad (4)$$

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0,693}{k} \quad (5)$$

$t_{1/2}$ predstavlja tzv. vrijeme poluraspada odnosno vrijeme u kojem je izreagiralo 50% reaktanta.

2.3. Kromatografija

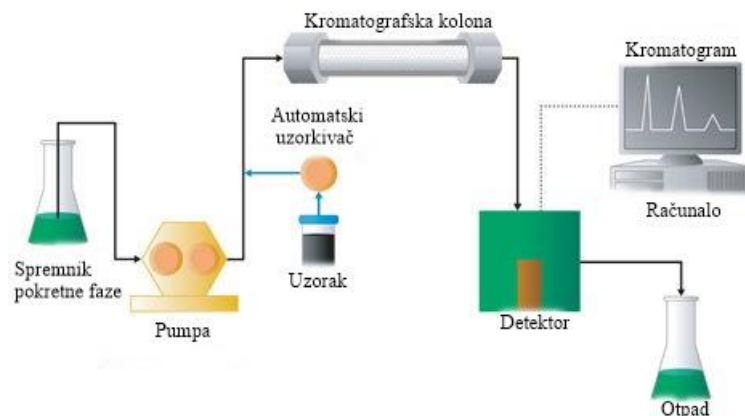
Kromatografija je najučinkovitija separacijska tehnika koja se temelji na selektivnom zadržavanju različitih sastojaka smjese unutar nepokretne faze. Nepokretna i pokretna faza te ispitivani spoj čine kromatografski sustav. Kromatografske tehnike dijele se s obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze na adsorpcijsku, razdjelnu, afinitetnu i kromatografiju isključenjem. Kad je nepokretna faza vezana na inertni čvrsti nosač, ravnoteža se uspostavlja između dviju kapljevina i tada govorimo o *razdjelnoj kromatografiji*. Ako se molekule ispitivane tvari vežu na površinu adsorbensa te se ravnoteža uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, govorimo o *adsorpcijskoj kromatografiji*. Kada zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze dolazi do vezanja različitih funkcionalnih skupina na površini čvrste faze, govorimo o *afinitetnoj kromatografiji*. Kad se razdvajanje molekula odvija zbog razlike u molekulskoj masi i volumenu pri čemu je nepokretna faza materijal definiranih dimenzija i slabih adsorpcijskih svojstava, radi se o *kromatografiji isključenjem*. Osim prema prirodi ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske tehnike mogu se podijeliti i prema sastavu pokretne faze među kojima je tekućinska danas najzastupljenija. Osim *tekućinske kromatografije* u kojoj je pokretna faza kapljevina male viskoznosti, postoje i *plinska kromatografija* gdje je pokretna faza inertni plin te *fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima* kod koje je pokretna faza kapljevina iznad svojih kritičnih vrijednosti temperature i tlaka.

Nepokretna faza je čvrsta tvar, uglavnom porozni zrnasti prašak velike specifične površine koji se modificiranjem može dodatno aktivirati, ili kapljevina na inertnom nosaču. Izbor nepokretne faze ovisi o prirodi ispitivanog spoja, prirodi ravnoteže kromatografskog procesa

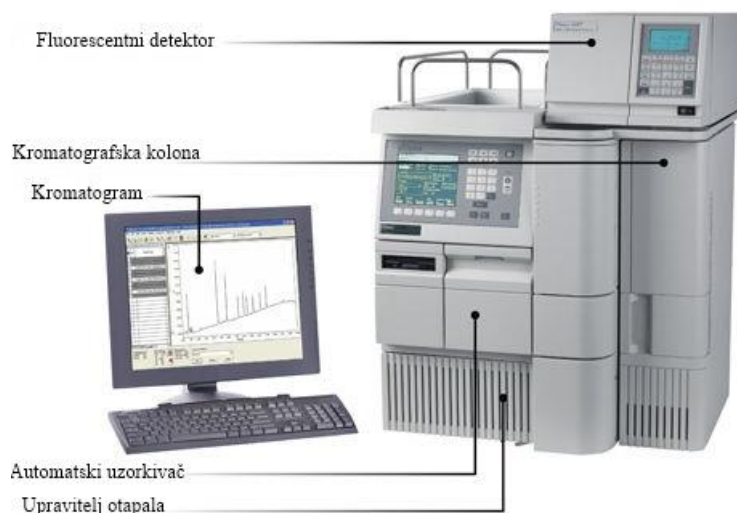
te vrsti veze koja nastaje između ispitivanog spoja i kromatografske podloge. U kromatografiji se od sorbensa najviše koristi silikagel ($\text{SiO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), a od poznatijih su još i aktivni ugljen, grafit, celuloza, hitin, itd. Ako je nepokretna faza gusto pakirana u kromatografskom stupcu, govorimo o *kromatografiji na stupcu*, a ako je nanescena kao tanki homogeni film na inertnu podlogu, tada se radi o *tankoslojnoj kromatografiji*. Tankoslojna i kromatografija na papiru predstavnice su tzv. *plošne kromatografije*. Parametri kromatografskog razdvajanja su: vrijeme zadržavanja otopljene tvari t_R , protok kroz porozni medij i širenje kromatografske zone. Mogućnost razdvajanja dvaju spojeva, odnosno njihovo relativno zadržavanje izražava se *separacijskim faktorom* α [16].

2.3.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – HPLC

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*eng. high performance liquid chromatography – HPLC*) vrsta je kromatografije na stupcu koja se koristi za razdvajanje komponenti iz smjese na osnovi kemijskih interakcija između tvari koja se analizira i nepokretne faze u stupcu. HPLC je oblik tekućinske kromatografije koji se odvija pri višim tlakovima, stoga se često naziva i "tekućinska kromatografija pod visokim tlakom" (*eng. High pressure liquid chromatography – HPLC*), kako bi pokretna faza prolazila kroz nepokretnu fazu [16]. Zbog većih tlakova i oprema je složenija nego za klasičnu tekućinsku kromatografiju [4]. HPLC kromatograf sastoji se od spremnika pokretne faze, pumpe, automatskog uzorkivača, kromatografske kolone, detektora i računala za obradu podataka na kojem na kraju dobijemo kromatogram [16] (slike 4 i 5).



Slika 4. Dijelovi HPLC kromatografa [17]



Slika 5. Tipični HPLC sistem [17]

Pod visokim tlakom, pokretna faza se pumpa kroz stupac, tj. kolonu i analizirana tvar ili smjesa pod pritiskom prolazi kroz stupac. Stupac, odnosno kolona je cijev punjena materijalom sačinjenim od sitnih čestica i zbog toga ima veliku specifičnu površinu. Mali volumen uzorka (μL) unosi se u tok pokretne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizičkih interakcija dolazi do razdvajanja komponenata smjese zbog njihovog različitog vremena zadržavanja koje ovisi o prirodi tvari koja se analizira te sastavu nepokretne i pokretne faze. *Vrijeme zadržavanja otopljene tvari* t_R je vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva i karakteristično je za svaku tvar. Korištenje visokog tlaka povećava linearnu brzinu i daje komponentama manje vremena za zadržavanje što poboljšava kromatografsko razlučivanje. Tijekom prolaska kroz stupac, molekule uzorka dio vremena provode u pokretnoj fazi (*zadržano vrijeme* t_m), a dio u nepokretnoj fazi (*prilagođeno vrijeme zadržavanja* t_R''). Vrijeme zadržavanja je suma zadržanog vremena i prilagođenog vremena zadržavanja. Za poboljšanje kromatografske separacije važan je *faktor zadržavanja* k koji predstavlja omjer prilagođenog vremena zadržavanja i zadržanog vremena. Iz tog faktora može se izračunati vrijeme zadržavanja bilo koje otopljene tvari:

$$t_R = t_m(k+1) \quad (6)$$

Pri čemu je t_m omjer duljine stupca L i prosječne brzine pokretne faze v .

Mogućnost separacije dvaju spojeva, odnosno njihovo relativno zadržavanje izražava se *separacijskim faktorom* α koji predstavlja omjer vremena zadržavanja ili faktora zadržavanja spoja kasnije izlazi iz stupca i onoga koji ranije izlazi. Stoga je separacijski faktor uvijek veći ili jednak jedinici.

Uz zadržavanje, parametri kromatografskog razlučivanja su i protok kroz porozni medij te širenje kromatografske zone. Pokretna faza protječe međuprostorima, odnosno porama sloja nepokretne faze. Eksperimentalno određena prosječna brzina pokretne faze omjer je duljine stupca L i zadržanog vremena t_m , a ovisi o sposobnosti prodiranja pokretne faze kroz pore. U kromatografskim uvjetima, profil brzine većinom je laminaran pa vrijedi Darcyjev zakon:

$$v(x) = (-K / \eta) dP / dx \quad (7)$$

pri čemu je $v(x)$ brzina pokretne faze u točki x , K propusnost stupca, a η viskoznost pokretne faze.

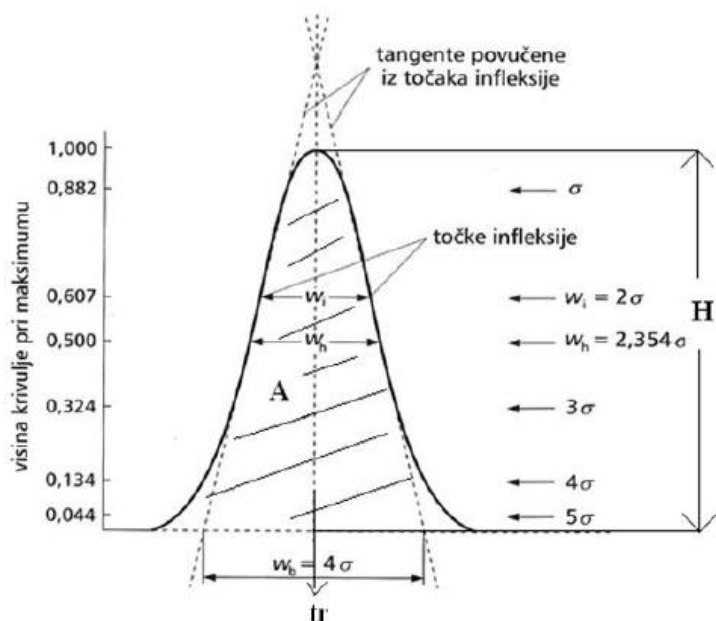
Širenje površine kromatografske zone ukazuje na učinkovitost kromatografske separacije. Glavni je uzrok širenja kromatografske zone otpor prijenosu mase u pokretnoj i nepokretnoj fazi. Koncentracijski profil u nepokretnoj fazi je pomaknut iza ravnotežnog položaja, a u pokretnoj fazi ispred njega i onemogućeno je trenutno uspostavljanje ravnoteže. Drugi uzrok širenja je brzina protoka kroz nepokretnu fazu koja varira, zatim uzdužna, odnosno molekulska difuzija u aksijalnom smjeru koja uzrokuje širenje zone neovisno o brzini protoka pokretne faze i povećava se s vremenom koje otopljena tvar provede u stupcu. Širenje kromatografske zone također uzrokuju nasumična sorpcija i desorpcija molekula tijekom kromatografskog procesa. Širenje kromatografske zone označava se ili kao *broj teoretskih tavana (odsječaka)* N ili kao *visina tavana (odsječaka)* H . Prolaskom uzorka kroz kromatografski stupac, kromatografska zona se širi proporcionalno duljini putovanja ili vremenu i ako pretpostavimo da se koncentracija uzorka raspoređuje po Gaussovoj razdiobi (slika 6), tada se broj teoretskih odsječaka može izraziti ovisno o varijanciji zone u jedinici vremena (σ_t) i vremenu zadržavanja prema izrazu:

$$N = (t_R / \sigma_t)^2 \quad (8)$$

Često se umjesto varijancije zone upotrebljava širina kromatografske krivulje w :

$$N = a (t_R / w)^2 \quad (9)$$

Visina odsječaka H računa se kao omjer duljine stupca L i broja teoretskih odsječaka N [16].



Slika 6. Karakteristična svojstva kromatografske krivulje [16]

Komponente koje izlaze iz stupca nakon eluiranja detektira detektor koji generira električni signal razmjernan intenzitetu neke karakteristike pokretne faze ili tvari koja se eluira. Vrste detektora u HPLC-u jesu: UV-VIS, fluorescentni, elektrokemijski, detektor indeksa loma i spektrometar masa (MS) [18]. Vrlo dobri detektori su oni s nizom dioda (eng. *diode-array detektor* - DAD) koji omogućavaju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis području. Apsorbancija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini. Takvi sustavi nazivaju se HPLC-DAD sustavi, a jedini nedostatak ovog tipa detektora jest da je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu [9].

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

U tablici 1. prikazan je popis kemikalija koje su korištene za izvođenje eksperimentalnog dijela te njihovi proizvođači.

Tablica 1. Popis kemikalija i njihovih proizvođača

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Acetonitril	CH ₃ CN	p.a.	Kemika, Hrvatska
Borna kiselina	H ₃ BO ₃	p.a.	Zorka Šabac, Srbija
Kalijev dihidrogenfosfat	KH ₂ PO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev hidrogenfosfat	K ₂ HPO ₄	p.a.	Fisher Scientific, SAD
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Lachner, Hrvatska
Klorovodična kiselina	HCl	p.a.	Merck, Njemačka
Limunska kiselina	C ₆ H ₈ O ₇ *H ₂ O	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
Mravlja kiselina	HCOOH	p.a.	Orka Lab, Hrvatska
Natrijev dihidrogenfosfat	NaH ₂ PO ₄	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Sumporna kiselina	H ₂ SO ₄	p.a.	Lachner, Hrvatska

3.1.2. Hidroksiklorokin

U tablici 2. prikazana su fizikalno-kemijska svojstva hidroksiklorokina.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva hidroksiklorokina

Generičko ime	Hidroksiklorokin
Vrsta farmaceutika	antimalarik
Molekulska formula	C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O
IUPAC ime	2-({4-[(7-chloroquinolin-4-yl)amino]pentyl})(ethyl)amino)ethan-1-ol
CAS broj	118-42-3
Molarna masa	335,872 g/mol
Topljivost u vodi [7]	0,0261 mg/mL
Talište [7]	89-91 °C
pK _k [18]	7,28 i 9,76

3.1.3 Izvorska i ultračista (*Milli-Q*) voda

Za izvođenje eksperimentalnog dijela, korištene su izvorska i ultračista (*Milli-Q*) voda. *Milli-Q* voda korištena je u eksperimentima hidrolitičke razgradnje, a u eksperimentima fotolitičke razgradnje korištene su obje.

Ultračista voda navodi se kao *Milli-Q* jer je dobivena filtracijom i deionizacijom preko *Milli-Q* pročišćivača vode tvrtke *Millipore Corporation*. Tako dobivena voda je ultračista voda "tipa 1" što znači da prema NCCLS-u zadovoljava određene parametre kao npr.: električna provodnost pri 25 °C manja od 1 μS/cm, ukupni sadržaj krutih tvari 0,1 mg/kg, koncentracija bakterija manja od 10 CFU/mL, itd. [19, 20].

Uzorak izvorske vode uzorkovan je 20. listopada 2016. u 19:45 h na izvoru "Vrelo" u Fužinama (Republika Hrvatska). Uzorku izvorske vode pri 25 °C izmjerena je pH-vrijednost 5,07 i električna provodnost 35,09 μS/cm. Konstanta ćelije koja je korištena iznosila je 0,477 cm⁻¹.

3.2. Instrumenti

3.2.1. Uređaj za pročišćavanje vode

Za provođenje hidrolitičke i fotolitičke razgradnje, uz izvorsku vodu, korištena je i ultračista (*Milli-Q*) voda dobivena iz uređaja *Millipore Simplicity* (slika 7) tvrtke *Millipore Corporation*. Proces pročišćavanja uključuje procese filtracije i deionizacije korištenjem 0,22 μm membranskih filtera, a određuje se koncentracija iona mjerenjem električnog otpora vode pri 25 °C. Kao što je ranije navedeno u ovome radu, ovakvim pročišćavanjem dobije se ultračista voda "tipa 1" određenih karakteristika među kojima je i zahtjevana vrijednost električnog otpora iona veća od 10 $\text{M}\Omega\cdot\text{cm}$.



Slika 7. Uređaj za pročišćavanje vode Millipore Simplicity, Millipore Corporation

3.2.2. Uređaj za filtraciju

Za provođenje fotolitičke razgradnje, uz ultračistu vodu, korištena je i izvorska voda. Uzorak izvorske vode profiltriran je prije provođenja eksperimenata kako bi se uklonile suspendirane čestice koje bi mogle utjecati na samu razgradnju i konačne rezultate. Za filtriranje uzorka izvorske vode, korišten je *PALL Life Sciences* (slika 8) uređaj za filtraciju (Washington, SAD) s polipropilenskim membranskim filtrima (*GH Polypro*, 47 mm, 0,45 μm) pri tlaku od 600 mmHg (slika 8).



Slika 8. Uređaj za filtraciju PALL Life Sciences

3.2.3. Analitička vaga

Premda je za provođenje eksperimentalnog dijela važno imati otopine određenih koncentracija, za pripremu takvih otopina potrebno je što preciznije odvagati uzorke. Iz tog razloga, koriste se analitičke vage, instrumenti koji precizno određuju masu tvari. Najčešći tip analitičke vage je onaj nosivosti 100 g i osjetljivosti 0,1 mg. Analitičke vage smještene su unutar staklenih ormarića koji ih štite od prašine i zračnih struja koje bi mogle poremetiti ravnotežu sustava. Ležajevi analitičkih vaga najodgovorniji su za ravnotežu stoga ih treba čuvati od oštećenja i pažljivo na njih stavljati uzorke za vaganje.

Uzorci koji su korišteni za izvođenje eksperimenata vagani su na analitičkoj vagi *XS204 DeltaRange* (slika 9) tvrtke *Mettler Toledo* (Greifensee, Švicarska). Specifikacije korištene vage su:

1. maksimalni kapacitet: 220 g
2. očitavanje: 0,1 mg
3. minimalna odvaga ($U=1\%$, $s=2$): 8 mg
4. područje tare: 0 – 220 g
5. linearnost: 0,2 mg
6. ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg



Slika 9. Analitička vaga XS204 DeltaRange, Mettler Toledo 15

3.2.4. pH-metar

pH-metar je elektronski instrument koji određuje kiselost ili bazičnost uzoraka mjerenjem pH-vrijednosti. pH-metar je, zapravo, voltmetar koji prikazuje pH-jedinice umjesto volti (V).

Uzorci za pH-metar većinom su u kapljevitom stanju, no, postoje sonde koje omogućavaju mjerenje pH-vrijednosti i u polukrutim uzorcima. Dakle, svaki pH-metar sastoji se od sonde za mjerenje, tj. staklene elektrode koja proizvodi malu voltažu (oko 0,06 V po jedinici pH) i određuje pH-vrijednost kao aktivnost vodikovih iona koji okružuju njezin okrugli završetak. Staklena elektroda je spojena na elektronski metar koji, zapravo, mjeri i prikazuje izmjerenu pH-vrijednost.

U ovome radu, za određivanje pH-vrijednosti izvorske vode i podešavanje pH-vrijednosti za izvođenje fotolitičke razgradnje, korišten je *pH-metar S20 SevenEasy* (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) (slika 10). Ovaj pH-metar također je korišten i za određivanje električne provodnosti izvorske vode. Specifikacije korištenog pH-metra su:

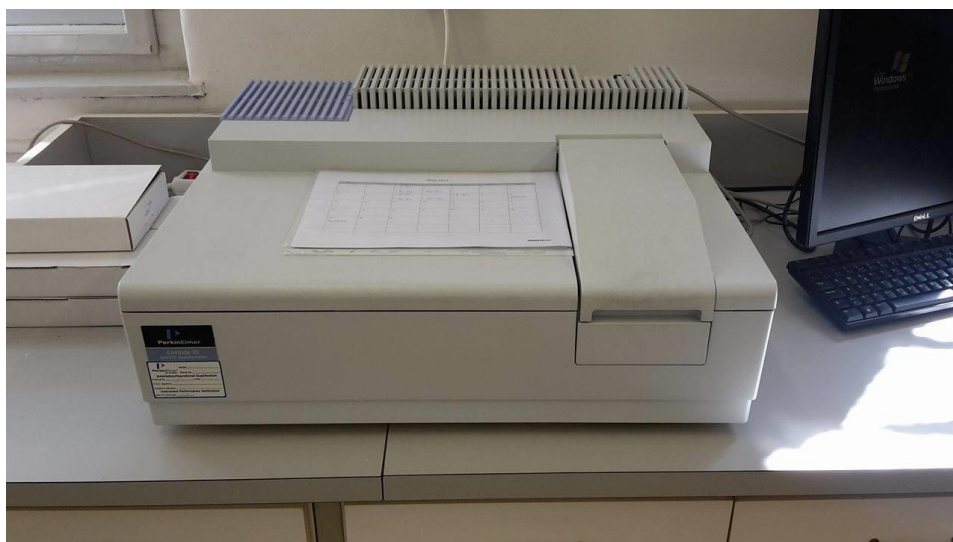
1. raspon vrijednosti: 0 – 14
2. rezolucija: 0,01 pH
3. temperaturni raspon: 5 – 105 °C



Slika 10. pH-metar S20 SevenEasy, Mettler Toledo

3.2.5. UV/VIS spektrofotometar

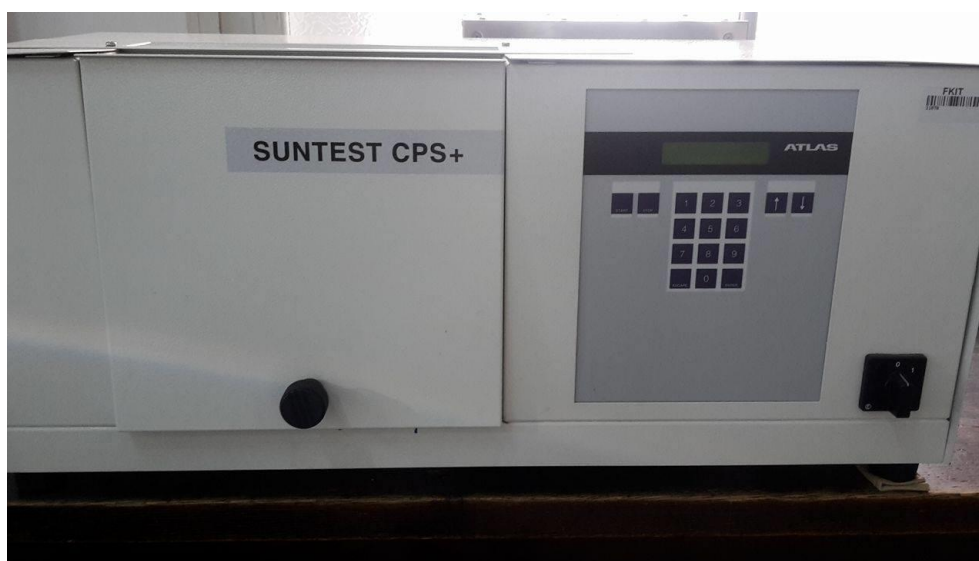
Za određivanje apsorpcijskog spektra hidroksiklorokina korišten je *Lambda 35 UV/VIS Spektrometar* (slika 11) tvrtke *PerkinElmer*. Raspon valnih duljina određivanja je od 190 do 1100 nm. Uređaj se može koristiti za određivanje spektara krutina, praškastih uzoraka, uzoraka u obliku paste te kapljevina. Softver instrumenta je *UV WinLab™*. Instrument odlikuje izuzetnom stabilnošću, jednostavan je za korištenje i sastoji se od halogenih lampi koje je lako zamijeniti.



Slika 11. Lambda 35 UV/VIS spektrometar, PerkinElmer

3.2.6. Suntest CPS+

Za provođenje fotolitičke razgradnje korišten je uređaj *Suntest CPS+* (Atlas, Linsengericht, Njemačka) (slika 12) koji proizvodi umjetno Sunčevo zračenje u rasponu valnih duljina 300 – 800 nm i njime osvjetljava uzorke kako bi došlo do razgradnje. Sustav zračenja čine optički filtri, ksenonova lampa koja je izvor zračenja i ogledala. Sustav se mora čistiti najmanje svakih šest mjeseci jer reflektor mora biti čist kako bi se osiguralo jednoliko osvjetljenje. Funkcije zaslona, odnosno, parametri koji se mogu podešavati su: vrijeme trajanja testiranja, intenzitet zračenja i temperatura ispitne komore.



Slika 12. Suntest CPS+, Atlas

3.2.7. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti korištena je za razdvajanje komponenti prisutnih u smjesi. Korištena je kromatografija obrnutih faza (eng. *reverse phase high performance liquid chromatography* - RP-HPLC) koja koristi nepolarnu nepokretnu fazu i polarnu pokretnu fazu. Kromatografsko određivanje hidroksiklorokina provedeno je na uređaju HPLC-DAD (*Waters 2795 Alliance HPLC System with 2996 PDA Detector*) (slika 13). Uređaj ima detektor s nizom dioda, jedinicu za smještaj i termostatiranje kromatografske kolone, omogućuje miješanje do 4 otapala za pokretnu fazu te podržava protok pokretne faze od 0,050 mL/min do 5,000 mL/min.



Slika 13. HPLC-DAD (Waters 2795 Alliance HPLC System with 2996 PDA Detector)

3.3. Metode rada

3.3.1. Karakterizacija izvorske vode

Električna provodnost i pH-vrijednost izvorske vode izmjerene su na pH-metru *S20 SevenEasy* (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Kapacitet konduktometrijske ćelije određen je u 0,01 mol/dm³ otopini kalijeva klorida (KCl) i iznosio je 0,477 cm⁻¹. Nakon što je izvršeno umjeravanje ćelije, ćelija je isprana ultračistom vodom i premještena u laboratorijsku čašu s uzorkom izvorske vode te je izmjerena električna provodnost izvorske vode 35,9 μS/cm. Nakon toga je provedeno umjeravanje pH-metra s dvije standardne otopine pH-vrijednosti 4 i 7, potom je se izmjerena pH-vrijednost uzorka izvorske vode koja je iznosila 5,07.

3.3.2. Priprema standardnih otopina hidroksiklorokina

Temeljna standardna otopina farmaceutika hidroksiklorokina masene koncentracije 1000 mg/L pripravljena je vaganjem 10 mg uzorka na analitičkoj vagi te otapanjem izvaganog uzorka u 10 mL Milli-Q vode. Po 250 μL te otopine korišteno je za praćenje hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina pri pH-vrijednostima 4, 7 i 9. Iz te temeljne standardne otopine

dalje su pripravljene radne otopine masenih koncentracija 1 mg/L i 10 mg/L koje su korištene za praćenje fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina u izvorskoj i Milli-Q vodi te također u Milli-Q vodi pri različitim pH-vrijednostima (4, 7, 9 i 10).

Temeljna standardna otopina čuvana je u hladnjaku u mraku na temperaturi od 4 °C.

3.3.3. Hidroliza hidrokisklorokina

Preliminarno ispitivanje hidrolize hidroksiklorokina izvršeno je pri tri pH-vrijednosti (4, 7 i 9). Hidrolitička razgradnja praćena je na 50 °C u termostatiranoj miješalici i trajala je 5 dana, odnosno, 120 sati. Uzorci za analizu uzeti su prvi i peti dan. Oni uzorci koji nisu stavljeni u miješalicu, odnosno, za koje je vrijeme hidrolize 0 h, spremljeni su u hladnjak i izvađeni su tek za analizu.

100 mL pufera pH-vrijednosti 4 pripravljeno je od 38,55 mL 0,2 M otopine kalijeva hidrogenfosfata (K_2HPO_4) i 61,45 mL 0,1 M otopine limunske kiseline ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$). 0,2 M otopina kalijeva hidrogenfosfata pripremljena je otapanjem 1741,77 mg kalijeva hidrogenfosfata u 50 mL Milli-Q vode. 0,1 M otopina limunske kiseline pripremljena je otapanjem 2101,4 mg limunske kiseline u 50 mL Milli-Q vode.

100 mL pufera pH-vrijednosti 7 pripravljeno je od 29,63 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) i 50,00 mL 0,1M otopine kalijeva dihidrogenfosfata (KH_2PO_4). 0,1 M otopina natrijeva hidroksida pripremljena je otapanjem 399,97 mg natrijeva hidroksida u 100 mL Milli-Q vode. 0,1 M otopina kalijeva dihidrogenfosfata pripremljena je otapanjem 1360,80 mg u 50 mL Milli-Q vode.

100 mL pufera pH-vrijednosti 9 pripravljeno je od 21,30 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) i 50,00 mL 0,1 M otopine borne kiseline (H_3BO_3) u 0,1M otopini kalijeva klorida (KCl). Korištena je ista otopina natrijeva hidroksida kao i za pufer pH-vrijednost 7. Za pripremu 0,1M otopine borne kiseline u tikvici od 50 mL, odvagano je 309,09 mg H_3BO_3 . Za pripremu 0,1M otopine kalijeva klorida u tikvici od 50 mL, odvagano je 372,68 mg KCl. Za pripremu ovih otopina također je korištena Milli-Q voda.

pH-vrijednosti pufera izmjerene su na pH-metru i ovisno o potrebi namještene su dodatkom kiseline (H_2SO_4 , sumporna kiselina) ili lužine (NaOH, natrijev hidroksid). Mikropipetom je dodano 250 μ L 1000 mg/L otopine hidroksiklorokina u okruglu tikvicu s ravnim dnom od 25 mL na što je, do oznake, dodana otopina pufera 4, 7 ili 9. Otopine hidroksiklorokina u puferima propuhane su argonom kako bi se uklonio sav zrak. Nakon što su propuhane, svaka od tri otopine hidroksiklorokina u puferu podijeljena je u 6 vijalica što je ukupno 18 vijalica.

Od toga je njih 9 stavljeno u miješalicu na temperaturu od 50 °C na 5 dana (vrijeme hidrolize $t_h=120$ h), a drugih 9 vijalica je zamrznuto u hladnjaku (vrijeme hidrolize $t_h=0$ h).

3.3.4. Fotoliza hidroksiklorokina

Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina praćena je na tri načina. Za sve je vrijedio isti intenzitet zračenja 500 W/m² i temperatura 25 ± 2 °C. Svi uzorci su analizirani HPLC-DAD-om kako bi se pratio tijek razgradnje hidroksiklorokina.

1. Premda izvorska voda sadrži čestice koje Milli-Q voda ne sadrži, a koje mogu utjecati na samu razgradnju, prvo je praćena fotolitička razgradnja u izvorskoj i Milli-Q vodi pri različitim koncentracijama hidroksiklorokina kako bi se ustanovilo postoje li i koje su razlike u razgradnji. Pripremljene su radne otopine hidroksiklorokina masenih koncentracija 1 mg/L i 10 mg/L iz temeljne standardne otopine i osvjetljavane su u kvarcnim posudicama. Osvjetljavani su i kontrolni uzorci koji su bili izloženi istim uvjetima osvjetljavanja, međutim, aluminijskom folijom su bili zaštićeni od utjecaja svjetlosti. Kontrolni uzorci korišteni su kako bi se potvrdilo da je razgradnja posljedica samo djelovanja svjetlosti i da ne dolazi do hidrolize. Po 500 µL osvjetljavanih otopina uzimano je u određenim vremenskim intervalima (0 h, 2 h, 3 h, 5 h, 7 h, 580 min, 21 h, 23 h, 25 h, 28 h, 33 h, 45 h i 52 h).
2. Osim utjecaja sastava vode na razgradnju, praćen je i utjecaj promjene pH-vrijednosti. Pripravljene su otopine hidroksiklorokina u puferskim otopinama pH-vrijednosti 4, 7, 9 i 10 masene koncentracije 10 mg/L.
Puffer pH-vrijednosti 4 pripremljen je od 240 mg otopine natrijeva dihidrogenfosfata (NaH₂PO₄) titrirane s 1,5 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH). pH-vrijednost izmjerena je pH-metrom i podešena s 3,5 mL 0,1 M otopine klorovodične kiseline (HCl). Puffer pH-vrijednosti 7 pripremljen je od 270 mg otopine kalijeva dihidrogenfosfata (KH₂PO₄) titrirane s 8,4 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) što je provjereno pH-metrom. Puffer pH-vrijednosti 9 pripremljen je od 124 mg otopine borne kiseline (H₃BO₃) titrirane s 9 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH). pH-vrijednost je izmjerena pH-metrom i namještena s 1 mL 0,1 M otopine klorovodične kiseline (HCl). Puffer pH-vrijednosti 10 pripremljen je od 124 mg otopine borne kiseline (H₃BO₃) titrirane sa 17,5 mL 0,1 M otopine natrijeva hidroksida (NaOH) pri čemu je pH-vrijednost izmjerena pH-metrom i podešena s 1

mL 0,1 M otopine klorovodične kiseline (HCl). Sve puferske otopine pripravljene su u tikvicama od 200 mL. Od toga je po 40 mL svake otopine prebačeno u kvarcne posudice, osvijetljavano i uzimano po 500 µL u određenim vremenskim intervalima (0 h, 2 h, 3 h, 6 h, 7 h, 580min, 21 h, 23 h, 25 h, 28 h, 33 h, 45 h, 52 h, 60 h, 66 h).

Korišteni su, također, kontrolni uzorci kao u prethodnom eksperimentu.

3. Utjecaj promjene pH-vrijednosti pratio se na još jedan način. Pripravljene su otopine hidroksiklorokina masene koncentracije 10 mg/L u otopinama pH-vrijednosti 4, 7 i 9. pH-vrijednosti otopina hidroksiklorokina su podešene dodavanjem sumporne kiseline (H₂SO₄) ili natrijeva hidroksida (NaOH). pH-vrijednosti su izmjerene pH-metrom. Također su korišteni kontrolni uzorci kao u prethodna dva eksperimenta te je po 500 µL od svake otopine, osim kontrolnih koje su zaštićene, uzimano u jednakim vremenskim intervalima kao u prethodnom eksperimentu pod točkom 2.

3.3.5. Analiza tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti

Uzorci hidroksiklorokina nakon hidrolitičke i fotolitičke razgradnje analizirani su kromatografijom obrnutih faza na instrumentu *Waters 2795 Alliance HPLC System with 2996 PDA Detector*. Korištena je kolona *Kinetex Sn C18 100 A* tvrtke *Phenomenex* dimenzija 150 mm x 4,60 mm, veličine čestica 5 µm te veličine pora 100 Å. Temperatura kolone bila je 40 °C. Kontrola instrumenta, dostava podataka i evaluacija izvršene su na softveru *MassLynx V4.1 SCN 714 Waters Inc. software*. Pokretna faza u ovom sustavu bila je 0,1% mravlja kiselina u Milli-Q vodi (A) i 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu (B). Volumen injektiranja bio je 20 µL i korišteno je gradijentno eluiranje (tablica 3.) uz protok 0,5 mL/min. Valne duljine određivanja bile su 219,9 nm i 343,4 nm određene prema apsorpcijskom spektru hidroksiklorokina.

Tablica 3. Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize

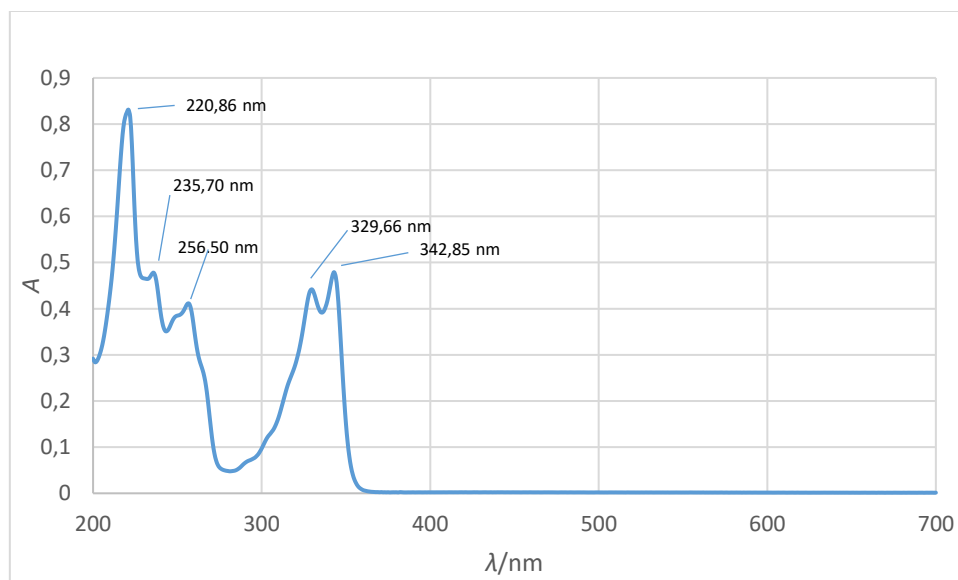
t/min	A/%	B/%
0	94	6
8	94	6
15	50	50
5	94	6

4. REZULTATI I RASPRAVA

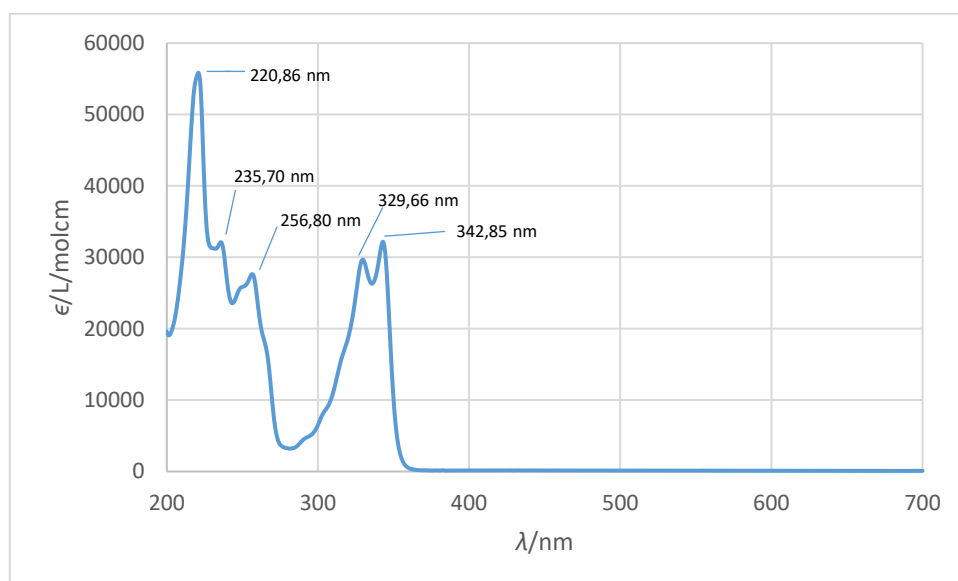
U ovom radu praćena je hidrolitićka i fotolitićka razgradnja farmaceutika hidroksiklorokina jer Sunćevo zraćenje i voda mogu uzrokovati razgradnju farmaceutika kada se nađu u okolišu. S obzirom da prirodne vode sadrže različite ione poput karbonata, klorida i nitrata, naspram ultraćiste vode, fotolitićka razgradnja praćena je u izvorskoj i u ultraćistoj vodi kako bi se vidjele razlike u razgradnji, konkretno u trajanju razgradnje. pH-vrijednost izvorske vode i ultraćiste vode se razlikuje, stoga je praćen i utjecaj pH-vrijednosti na samu razgradnju. Praćene su pH-vrijednosti 4, 7, 9 i 10. Iz tog razloga snimljen je apsorpcijski spektar hidroksiklorokina u ultraćistoj vodi te u otopinama pH-vrijednosti 4, 7, 9 i 10. Apсорpcijski spektri i ovisnosti molarnog apсорpcijskog koeficijenta u ovisnosti o valnoj duljini prikazani su na slikama 14 – 17. Premda Lambert-Beerov zakon ($A = \epsilon \cdot b \cdot c$) daje funkcijski odnos mjerene velićine (apsorbancije (A)) i velićine koja se određuje (koncentracije (c)), prikazan je i odnos molarnog apсорpcijskog koeficijenta (ϵ) i valne duljine (λ) u ultraćistoj vodi i pri različitim pH-vrijednostima (slike 15 i 17). Pikovi najvećeg intenziteta su pri 220,86 nm i 342,85 nm što znaći da se apсорpcijski spektar hidroksiklorokina preklapa sa spektrom Sunćeva zraćenja i to u UV-podrućju njegova spektra (200 - 400nm). Stoga možeme pretpostaviti da će Sunćevo zraćenje imati utjecaj na hidroksiklorokin te uzrokovati njegovu fotolitićku razgradnju. Povišenjem pH-vrijednosti, smanjuje se intenzitet pika na 220,86 nm, a povećava se intenzitet pika na 342,85 nm. Zato su, kad se pratila hidrolitićka razgradnja u ultraćistoj vodi veće pH-vrijednosti od izvorske, kromatografski pikovi hidroksiklorokina veće površine i boljeg oblika bili pri 219,9 nm te su na toj valnoj duljini oćitavane površine ispod kromatografskih pikova. Za oćitavanje rezultata fotolitićke razgradnje korištena je valna duljina 343,4 nm jer su na njoj kromatografski pikovi hidroksiklorokina bili veće površine i boljeg oblika. Valne duljine 220,86 nm i 342,85 nm određene su na spektrofotometru prilikom određivanja apсорpcijskog spektra hidroksiklorokina (slike 14 - 17) stoga se razlikuju od valnih duljina 219,9 nm i 343,4 nm vezanih uz kromatografsko određivanje. Razgradnjom farmaceutika mogu nastati različiti razgradni produkti pri ćemu se koncentracija samog farmaceutika smanjuje, a povećava se koncentracija razgradnih produkata koji mogu duže ostati u okolišu ili se, također, mogu razgraditi u određenom vremenskom intervalu. Razgradnjom hidroksiklorokina nastaju 2 razgradna produkta kojima je u ovome radu praćena promjena koncentracije.

Utjecaj pH-vrijednosti u ovome radu praćen je na dva naćina opisana u eksperimentalnom dijelu, u puferskim otopinama pH-vrijednosti 4, 7, 9 i 10 te u otopinama ćije su pH-vrijednosti

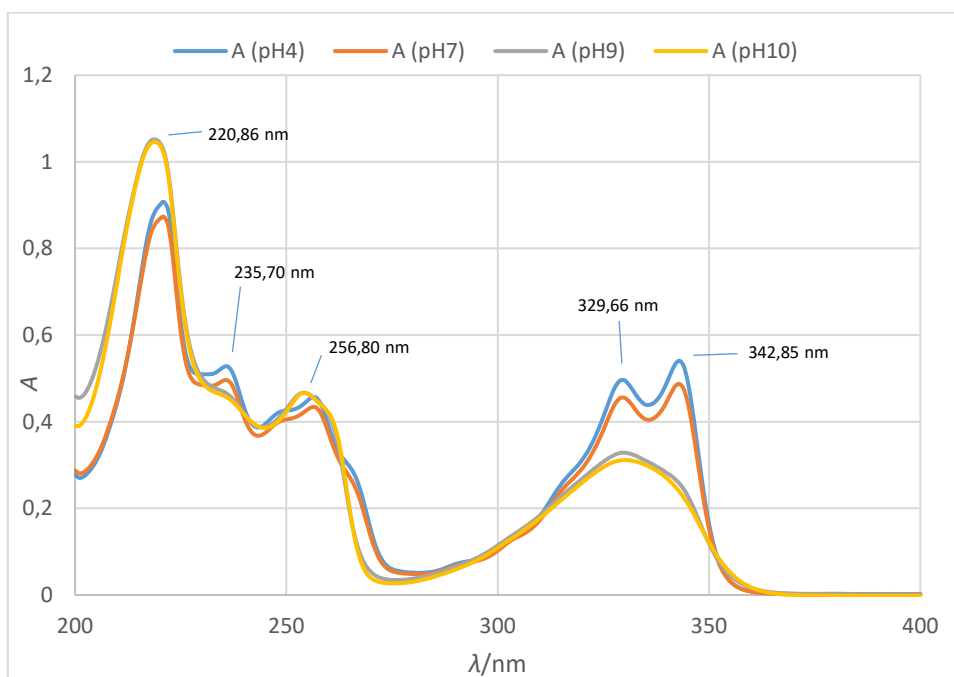
namiještene dodatkom sumporne kiseline (H_2SO_4) ili natrijeva hidroksida (NaOH). Tijekom razgradnje dolazi do promjene pH-vrijednosti početne otopine hidroksiklorokina stoga je utjecaj pH-vrijednosti praćen u puferkim otopinama koje se opiru promjeni pH-vrijednosti i u otopinama kojima je pH-vrijednost namiještena na početku eksperimenta i mijenjala se prilikom razgradnje.



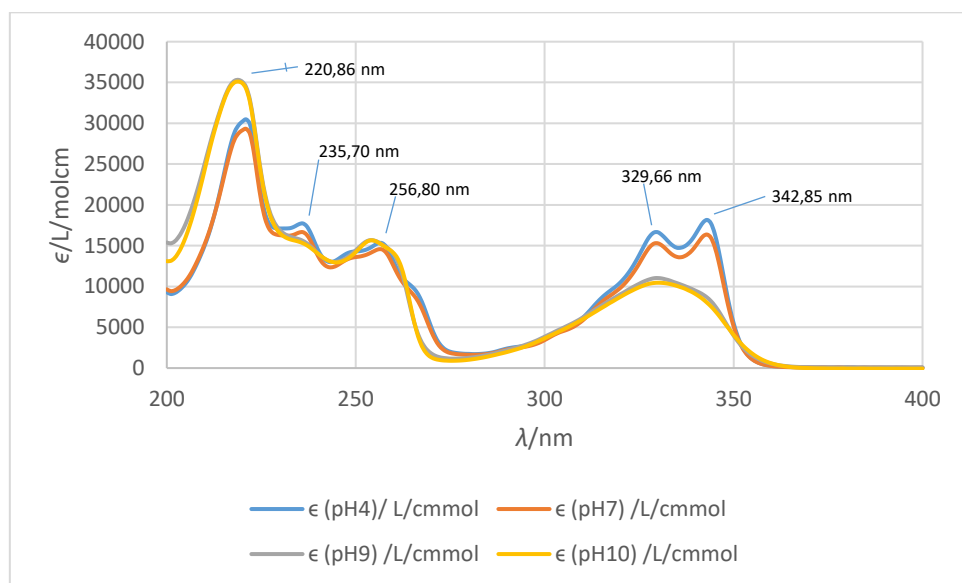
Slika 14. ApSORPCIJSKI SPEKTAR hidroksiklorokina (5 mg/L)



Slika 15. Grafički prikaz ovisnosti molarog apSORPCIJSKOG KOEFICIJENTA o valnoj duljini za hidroksiklorokin u ultračistoj vodi (5 mg/L)



Slika 16. ApSORPCIJSKI SPEKTAR hidroksiklorokina (10 mg/L) pri pH vrijednostima 4,7,9 i 10



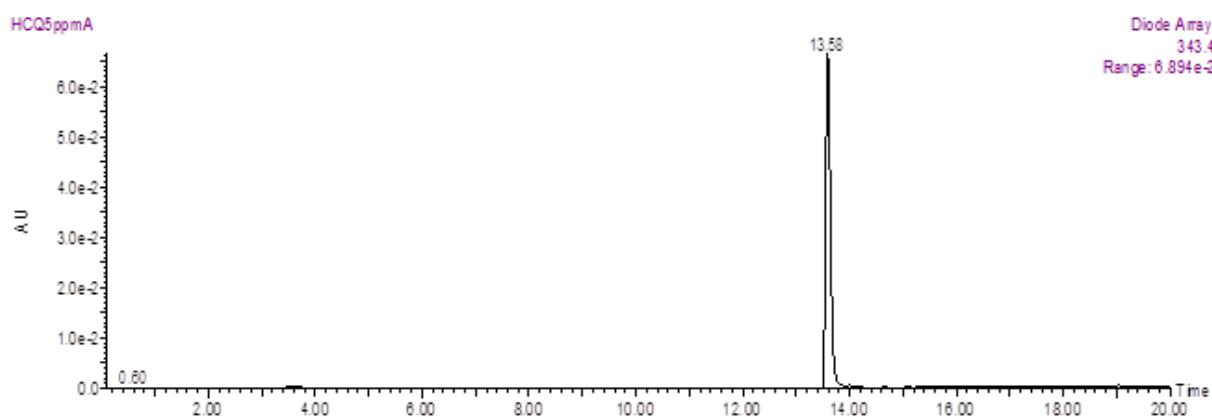
Slika 17. Grafički prikaz ovisnosti molarnog apSORPCIJSKOG KOEFICIJENTA o valnoj duljini za hidroksiklorokin (10 mg/L) pri pH vrijednostima 4, 7, 9 i 10

4.1. Karakterizacija izvorske vode

Uzorak izvorske vode uzorkovan je 20. listopada 2016. u 19:45 h na izvoru "Vrelo" u Fužinama (Republika Hrvatska). Uzorku izvorske vode pri 25 °C izmjerena je pH-vrijednost 5,07 i električna provodnost 35,09 $\mu\text{S}/\text{cm}$. Konstanta ćelije koja je korištena iznosila je 0,477 cm^{-1} . Koncentracija anorganskih iona određen je ionskom kromatografijom: $\gamma(\text{Cl}^-)=1.7 \text{ mg/L}$, $\gamma(\text{NO}_3^-)=7.8 \text{ mg/L}$, $\gamma(\text{SO}_4^{2-})=1.9 \text{ mg/L}$. Koncentracija ukupnog organskog ugljika (eng. *total organic carbon*, TOC) određena je kao NPOC (eng. *non-purgeable organic carbon*) i iznosila je 0.2622 mg/ L.

4.2. Kromatografska analiza

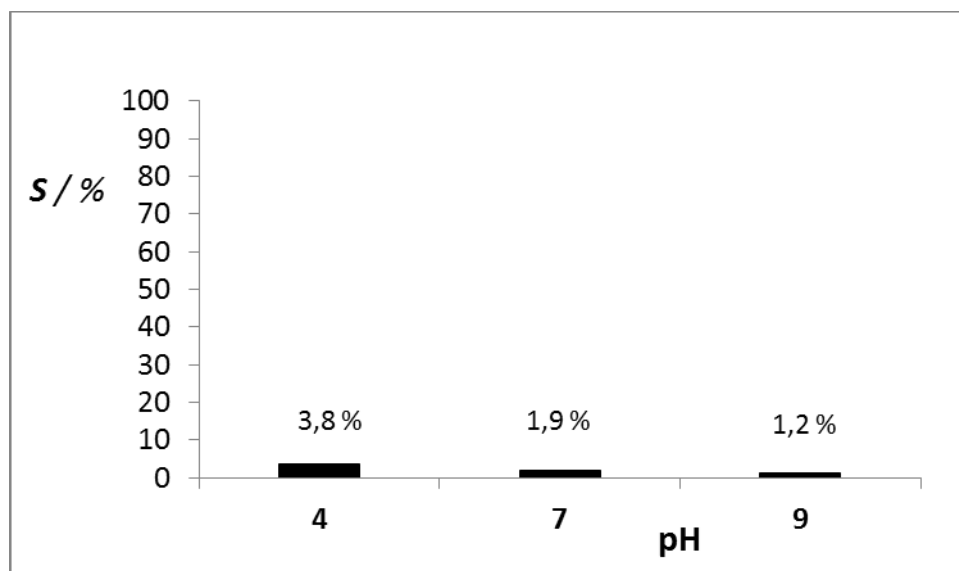
Nakon što su uzorci hidroksiklorokina podvrgnuti hidrolizi ili djelovanju umjetnog Sunčevog zračenja, razgradnja hidroksiklorokina praćena je tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda. Promjena koncentracije praćena je kao promjena površine ispod kromatografskog pika odnosno relativni omjer A/A_0 , pri čemu je A_0 površina ispod kromatografske vrpce početne otopine hidroksiklorokina prije hidrolize ili fotolize, a A je površina ispod kromatografske vrpce hidroksiklorokina nakon određenog vremena (t) trajanja hidrolize ili fotolize. Kromatogram hidroksiklorokina prikazan je na slici 18.



Slika 18. Kromatogram hidroksiklorokina (5 mg/L; 343,4 nm)

4.3. Hidrolitička razgradnja hidroksiklorokina

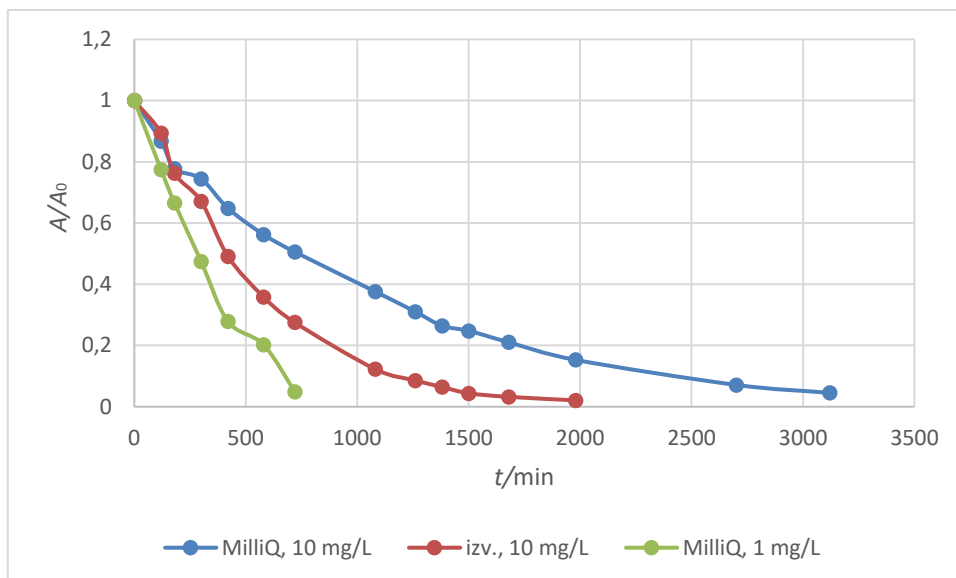
Preliminarno ispitivanje hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina pri pH-vrijednostima 4, 7 i 9 pokazalo je da farmaceutik hidroksiklorokin ne hidrolizira jer je, prema dobivenim rezultatima (slika 19), stupanj hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina (S , %) manji od 10% pri svih ispitivanim pH-vrijednostima. Također, uočeno je da se povećanjem pH-vrijednosti smanjuje stupanj hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina.



Slika 19. Stupanj hidrolize hidroksiklorokina pri pH-vrijednostima 4, 7 i 9

4.4. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina

Fotolitička razgradnja praćena je u izvorskoj i ultraćistoj vodi pri ćemu je koncentracija otopine bile 10 mg/L. Osim toga, praćena je i fotolitićka razgradnja samo u ultraćistoj vodi pri ćemu je koncentracija otopine bila 1 mg/L. Razgradnja je praćena u ultraćistoj i izvorskoj vodi te pri dvije koncentracije HCQ kako bi se uoćio utjecaj razlićitih iona prisutnih u izvorskoj vodi i koncentracije HCQ na brzinu fotolitićke razgradnje. Razgradnjom dolazi do promjene koncentracije hidroksiklorokina, stoga je razgradnja HCQ praćena kao promjena relativnog omjera površine ispod kromatografske vrpce A/A_0 . Prema dobivenim rezultatima, uoćeno je smanjenje koncentracije hidroksiklorokina tijekom razgradnje u sva tri eksperimenta što je prikazano na slici 20.

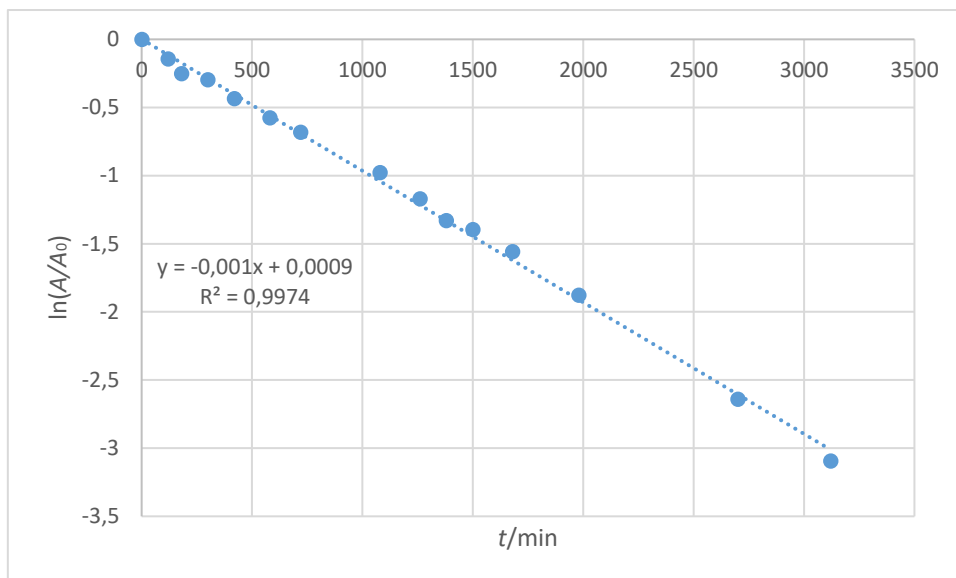


Slika 20. Fotolitička razgradnja hidroksiklorokina (10 mg/L) u ultračistoj i izvorskoj vodi te razgradnja hidroksiklorokina (1 mg/L) ultračistoj vodi

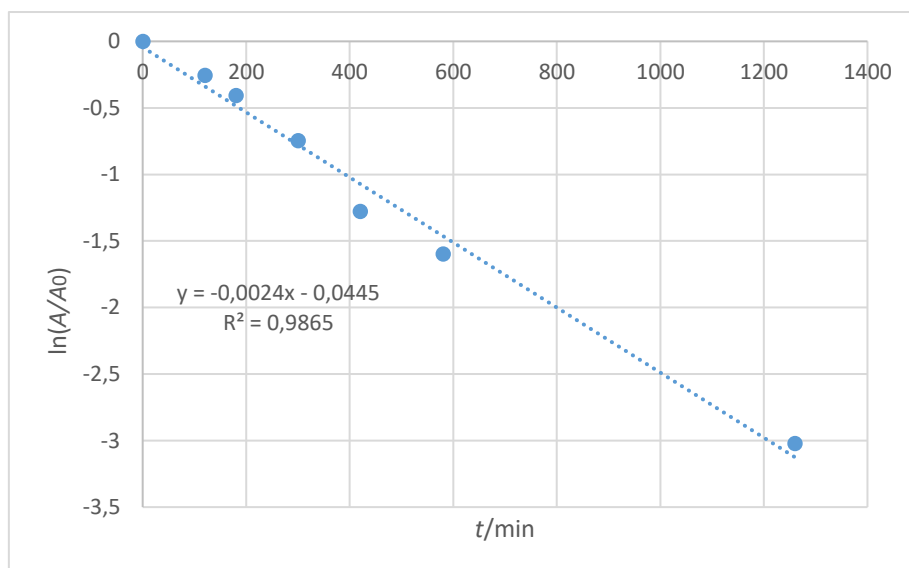
U kontrolnim uzorcima koji su bili zaštićeni folijom od utjecaja umjetnog Sunčevog zračenja, nije došlo do smanjenja koncentracije hidroksiklorokina što je potvrda da je razgradnja isključivo fotolitička te da ne dolazi do hidrolitičke razgradnje hidroksiklorokina.

4.4.1. Kinetika fotolitička razgradnja – utjecaj koncentracije i sastava matice

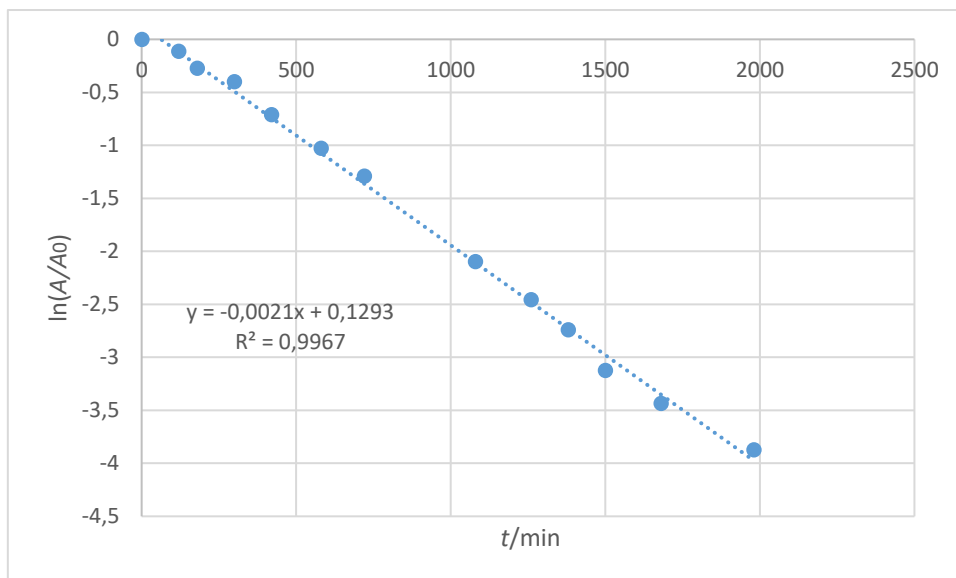
Da bi se odredila kinetika fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina u izvorskoj i ultračistoj vodi, dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost $\ln(A_0/A)$ o vremenu (prema jednadžbi 4) što je prikazano na slikama 21-23.



Slika 21. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina (10 mg/L) u ultračistoj vodi



Slika 22. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina (1 mg/L) u ultračistoj vodi



Slika 23. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina (10 mg/L) u izvorskoj vodi

Iz dobivenih grafičkih prikaza vidljivo je da se fotolitičkom razgradnjom koncentracija hidroksiklorokina smanjuje tijekom vremena i da se ova reakcija može opisati kao reakcija prvoga reda:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \quad (10)$$

pri čemu k (min^{-1}) predstavlja specifičnu brzinu, odnosno konstantu brzine razgradnje.

Vrijeme poluraspada za sva tri slučaja izračunato je prema izrazu (5).

Za sva tri slučaja, koeficijent determinacije (r^2) približno je jednak jedan i veći od 0,98 što znači da je potvrđena linearna ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu.

Nagibi pravaca na grafičkim prikazima 21–23 predstavljaju konstante brzine razgradnje koje su, zajedno s vremenima poluraspada, prikazane u tablici 4.

Tablica 4. Konstante brzine razgradnje hidroksiklorokina i vremena poluraspada

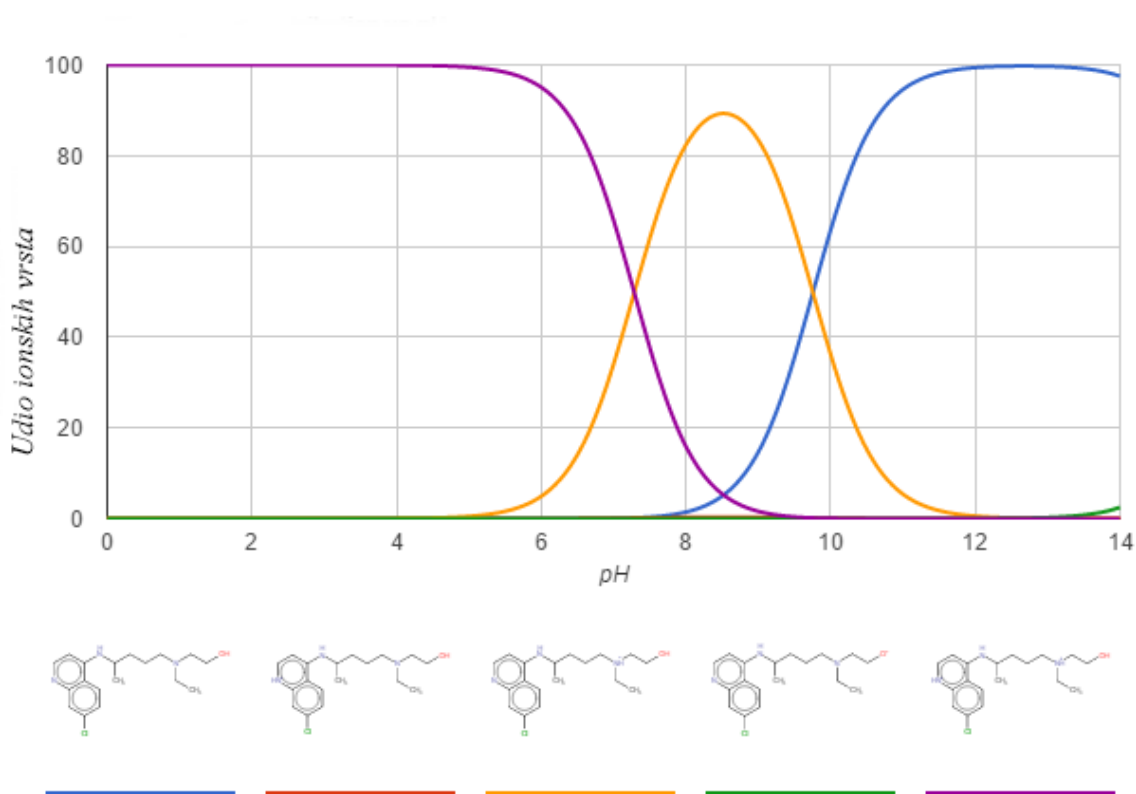
Vrsta otopine	$k(\text{min}^{-1})$	$t_{1/2}(\text{min})$
Ultračista voda (10 mg/L)	0,0010	693,2
Ultračista voda (1 mg/L)	0,0024	288,8
Izvorska voda (10 mg/L)	0,0021	330,1

Najmanja konstanta brzine razgradnje, odnosno najmanja specifična brzina razgradnje ($0,0010 \text{ min}^{-1}$) je u ultračistoj vodi (10 mg/L) za koju je vrijeme poluraspada najveće ($693,2 \text{ min}$). Najveća konstanta brzine razgradnje ($0,0024 \text{ min}^{-1}$) je u 1 mg/L otopini HCQ-a za koju je i vrijeme poluraspada najmanje ($330,1 \text{ min}$). Iz dobivenih rezultata, može se zaključiti da medij, odnosno sastav matice i koncentracija hidroksiklorokina znatno utječu na brzinu razgradnje. Smanjenjem koncentracije hidroksiklorokina, razgradnja se ubrzava. U izvorskoj vodi različitog sastava od ultračiste vode, brzina razgradnje je veća što znači da prisutni ioni, tj. sastav vode utječe na brzinu fotolitičke razgradnje.

4.4.2. Kinetika fotolitička razgradnja – utjecaj pH

S obzirom na to da farmaceutici dospijevaju na različita mjesta u okolišu i svaki taj medij ima određenu pH-vrijednost, praćen je utjecaj pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju farmaceutika hidroklorokina. Praćene su pH-vrijednosti: 4, 7, 9 i 10. Utjecaj pH-vrijednosti praćen je na dva načina: u puferkim otopinama i otopinama u kojima je pH-vrijednost namještena dodatkom kiseline ili lužine.

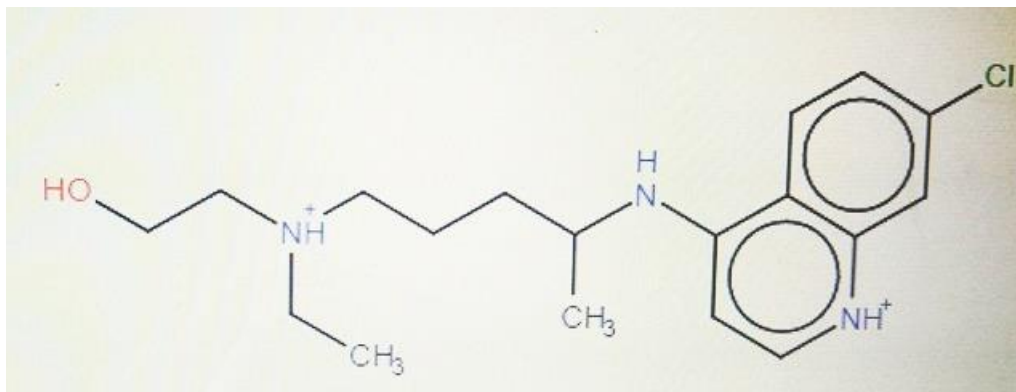
Utjecaj pH-vrijednosti na fotolitičku razgradnju HCQ praćen je s obzirom da HCQ u ispitivanom rasponu pH-vrijednosti može biti prisutan u različitim ionskim oblicima (slika 24):



Slika 24. Raspodjela ionskih vrsta HCQ u ovisnosti o pH [18]

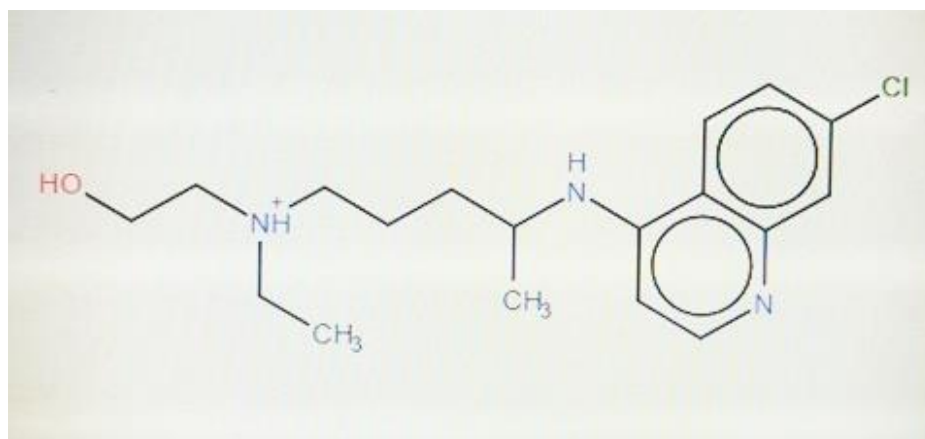
Na slici 25 prikazana je najzastupljenija ionska vrsta pri pH-vrijednosti 4. Udio te vrste smanjuje se s porastom pH-vrijednosti [18]. Kako se može vidjeti na slici 24, do pH 5 dominantna ionska vrsta prisutna u vodenoj otopini je HCQ^{2+} (slika 25). Povećanjem pH-vrijednosti iznad 5 njen udio se smanjuje i raste udio HCQ^+ (slika 26). Pri pH-vrijednosti 7,28, što odgovara pK_{k1} , udio ove dvije ionske vrste je jednak. Udio HCQ^+ raste do približno pH 8,5 nakon čega se smanjuje. Istovremeno prisutna je i neutralna molekula HCQ i njen udio

dalje raste s povećanjem pH. Udjeli ovih dviju vrsta jednaki su pri pH-vrijednosti 9,76, što je jednako pK_{k2} .



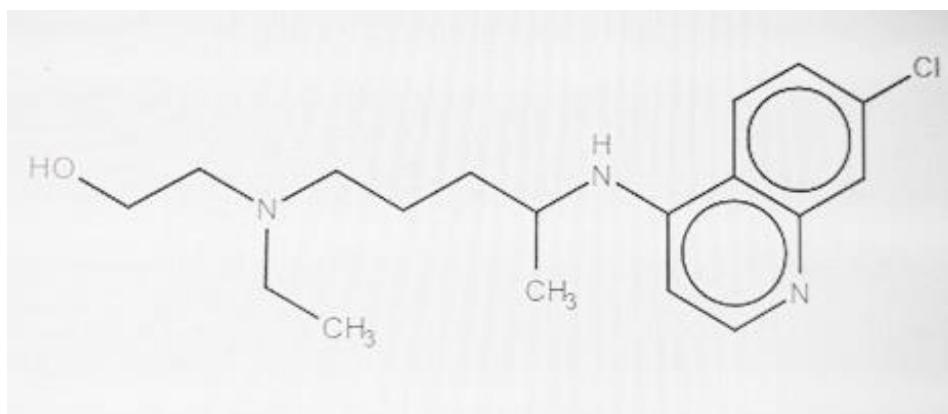
Slika 25. Najzastupljenija ionska vrsta HCQ pri pH-vrijednosti 4, HCQ^{2+} [18]

Porastom pH-vrijednosti, udio ionske vrste sa slike 25 se smanjuje. Pri pH-vrijednosti 7, udio te ionske vrste iznosi 65,76%, a 34,06% čini ionska vrsta prikazana na slici 26 [18].



Slika 26. Druga ionska vrsta pri pH-vrijednosti 7, HCQ^+ [18]

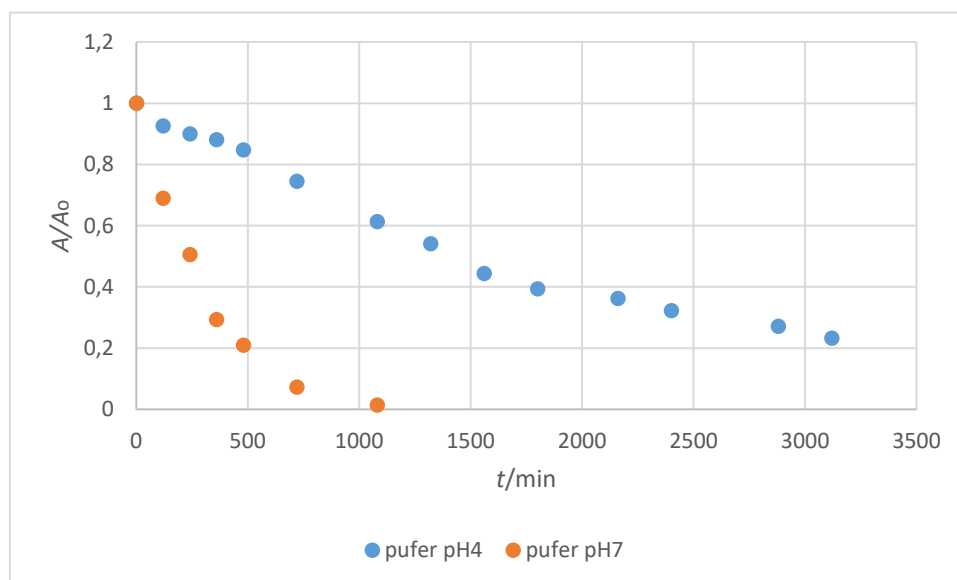
Pri pH-vrijednosti 9, udio ionske vrste sa slike 26 je 83,45%. Daljnjim porastom pH-vrijednosti njen udio se smanjuje. Pri pH-vrijednosti 10, najzastupljenija je ionska vrsta sa slike 27 s udjelom 63,58% [18].



Slika 27. Najzastupljenija ionska vrsta pri pH-vrijednosti 10, HCQ [18]

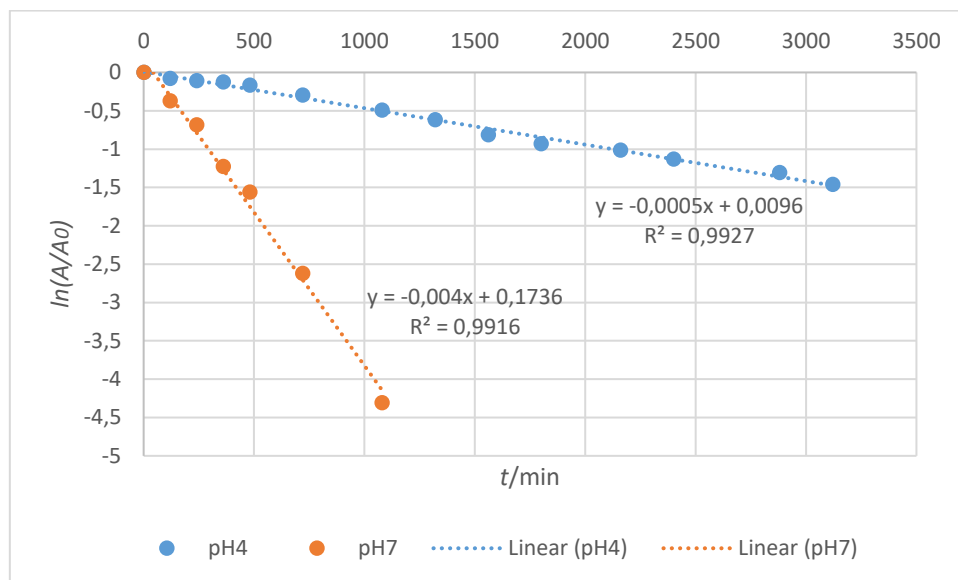
4.4.2.1. Puferske otopine

Na slici 28, prikazan je utjecaj pH-vrijednosti 4 i 7 na fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina u puferskim otopinama, odnosno prikazana je promjena koncentracije hidroksiklorokina tijekom razgradnje. Uočeno je da se tijekom razgradnje smanjuje koncentracija hidroksiklorokina te je brzina razgradnje veća pri pH 7. Za pH-vrijednosti 9 i 10 nije bilo moguće pratiti promjenu koncentracije jer se hidroksiklorokin već nakon 2 sata razgradio te nije bilo kromatografskih pikova pravilnog oblika.



Slika 28. Razgradnja hidroksiklorokina u puferskim otopinama pH-vrijednosti 4 i 7

Da bi se odredila kinetika fotolitičke razgradnje hidroksiklorokina u puferskim otopinama pH-vrijednosti 4 i 7, dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu što je prikazano na slici 26.



Slika 29. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina pri različitim pH-vrijednostima

Konstante brzine fotolitičke razgradnje i izračunata vremena poluraspada prikazani su u tablici 5.

Tablica 5. Konstante brzine razgradnje hidroksiklorokina i vremena poluraspada za puferske otopine pH-vrijednosti 4 i 7

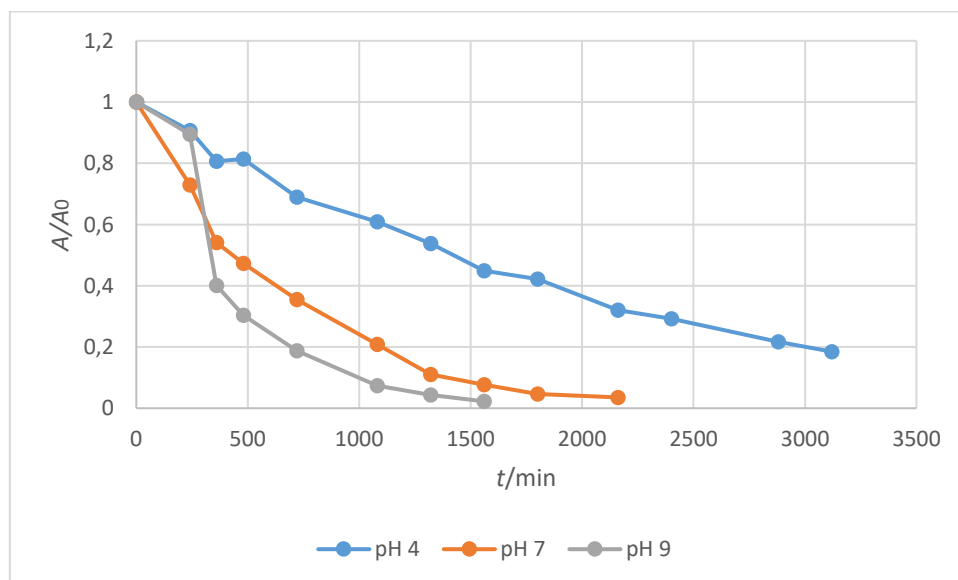
	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
pH 4	0,0005	1386,3
pH 7	0,0040	173,3

Prema dobivenim vrijednostima konstante brzine razgradnje i vremena poluraspada, uočeno je da se povećanjem pH-vrijednosti povećava brzina razgradnje i da je vrijeme poluraspada kraće. Pri različitim pH-vrijednostima, različit je i udio pojedinih ionskih vrsti. Pojedine ionske vrste razlikuju se po svojoj strukturi i po svojstvima. Iz dobivenih rezultata možemo pretpostaviti da je ionska vrsta prisutna pri pH-vrijednosti 7, HCQ^+ (slika 26) podložnija fotolitičkoj razgradnji u odnosu na ionsku vrstu prisutnu pri pH-vrijednosti 4, HCQ^{2+} .

4.4.2.2. Otopine pH-vrijednosti 4, 7, 9 i 10

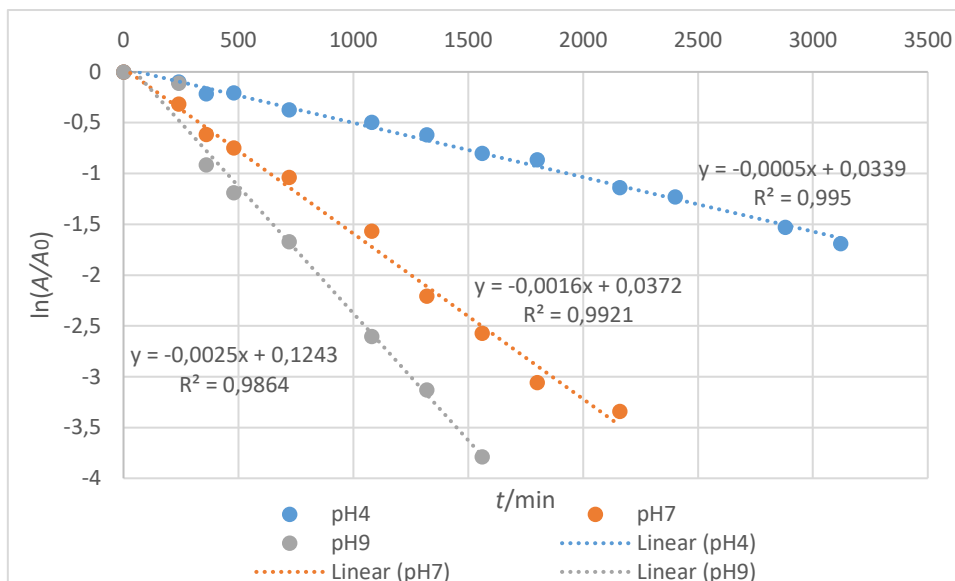
pH-vrijednosti ovih otopina namještene su dodatkom kiseline (H_2SO_4) ili lužine ($NaOH$). pH-vrijednost im je izmjerena prije i nakon fotolitičke razgradnje kako bi se vidjelo dolazi li do promijene pH-vrijednosti premda to nisu puferske otopine koje se odupiru promijeni pH-vrijednosti. Kod otopine početne pH-vrijednosti 4 nije došlo do promjene pH, izmjerena pH-vrijednost nakon fotolitičke razgradnje u trajanju od 3120 min iznosila je 3,99. Kod otopine početne pH-vrijednosti 7 došlo je do smanjenja pH-vrijednosti, izmjerena vrijednost iznosila je 4,68. Također, kod otopine početne pH-vrijednosti 9 uočeno je smanjenje pH-vrijednosti na 4,69. Uočene promjene pH-vrijednosti rezultat su razgradnje hidroksiklorokina. Razgradnja hidroksiklorokina, odnosno promjena njegove koncentracije u otopinama pH-vrijednosti 4, 7 i 9 prikazana je na slici 27. Za razliku od puferske otopine stalne pH-vrijednosti, u otopini s podešenom pH-vrijednosti 9 moguće je pratiti razgradnju hidroksiklorokina, odnosno promjenu koncentracije. Za sva tri slučaja uočeno je da se tijekom razgradnje hidroksiklorokina smanjuje njegova koncentracija.

Fotolitička razgradnja HCQ u otopini s podešenim pH 10 razgradnja je bila izuzetno brza tako da se već nakon 120 min HCQ u potpunosti razgradio.



Slika 30. Razgradnja hidroksiklorokina u otopinama pH-vrijednosti 4, 7 i 9

Da bi se odredila kinetika razgradnje hidroksiklorokina u otopinama pH-vrijednosti 4, 7 i 9, dobiveni rezultati prikazani su grafički kao ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu što je prikazano na slici 31.



Slika 31. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju hidroksiklorokina pri različitim pH-vrijednostima

Konstante brzine fotolitičke razgradnje i izračunata vremena poluraspada prikazani su u tablici 6.

Tablica 6. Konstante brzine razgradnje hidroksiklorokina i vremena poluraspada u otopinama s podešenim pH-vrijednosti 4, 7 i 9

	k (min^{-1})	$t_{1/2}$ (min)
4	0,0005	1386,29
7	0,0016	433,22
9	0,0025	277,26

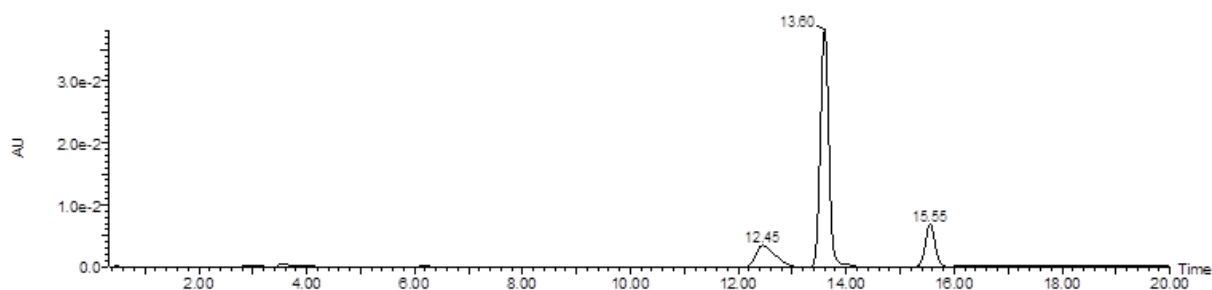
Prema dobivenim rezultatima, konstanta brzine razgradnje se s porastom pH-vrijednosti povećava, a vrijeme poluraspada se smanjuje što znači da porastom pH-vrijednosti, raste i brzina razgradnje hidroksiklorokina. U svim slučajevima koeficijent determinacije (r^2) približno je jednak jedan što znači da je potvrđena linearna ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu.

Usporedbom rezultata za puferske otopine i otopine s podešenim pH-vrijednostima, potvrđeno je da se porastom pH-vrijednosti smanjuje vrijeme poluraspada hidroksiklorokina, odnosno da raste brzina njegove fotolitičke razgradnje. Brzina razgradnje pri pojedinim pH-vrijednostima različita je i zbog prisustva različitih ionskih vrsta. Za razliku od puferskih otopina koje se opiru promjeni pH-vrijednosti, u otopinama s podešenim pH-vrijednostima došlo je do promjene pH-vrijednosti tijekom razgradnje. Također, za razliku od puferske otopine pH-

vrijednosti 9, bilo je moguće pratiti kinetiku razgradnje otopine hidroksiklorokina s podešenom pH-vrijednošću 9.

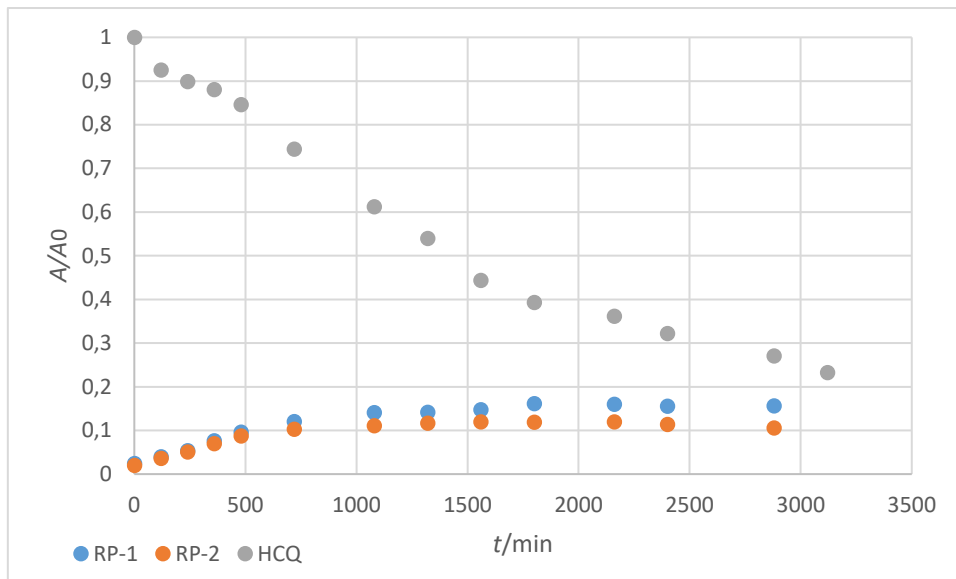
4.4.3. Razgradni produkti

U svim eksperimentima fotolitičke razgradnje uočena su dva razgradna produkta. Promjena koncentracije tih razgradnih produkata tijekom razgradnje HCQ praćena je pri pH-vrijednosti 4 puferne otopine HCQ jer je u toj otopini razgradnja najduže trajala i kromatografski pikovi razgradnih produkata bili su najboljeg oblika. Prvi razgradni produkt (RP-1) pojavljuje se pri $t_R=12,45$ min, a drugi (RP-2) pri $t_R= 15,55$ min (slika 32).



Slika 32. Kromatogram HCQ (10 mg/L) i razgradnih produkata ($t_R= 30$ h; pH = 4; $\lambda = 343,4$ nm;)

Na slici 33 prikazana je promjena koncentracije HCQ i njegova dva razgradna produkta (RP-1 i RP-2) tijekom razgradnje. Koncentracija je prikazana kao relativna površina ispod odgovarajućih kromatografskih pikova, A/A_0 , pri čemu je A_0 površina ispod kromatografskog pika HCQ prije razgradnje, dok je A površina u vremenu (t). Uočeno je da se koncentracija HCQ tijekom razgradnje smanjuje, a koncentracije razgradnih produkata povećavaju, ali u određenom trenutku započinje i njihova razgradnja što upućuje da su i razgradni produkti podložni fotolitičkoj razgradnji.



Slika 33. Promjena koncentracije HCQ i razgradnih produkata pri čemu je A_0 početna koncentracija HCQ

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu promatrana je hidrolitička i fotolitička razgradnja farmaceutika hidroksiklorokina. Hidrolitička razgradnja provedena je u ultračistoj vodi pri tri pH-vrijednosti 4, 7 i 9. Fotolitička razgradnja provedena je u ultračistoj i izvorskoj vodi kako bi se ispitaio utjecaj prisutnosti različitih tvari uobičajeno prisutnih u prirodnim vodama (kloridi, nitrati, huminske kiseline, itd.). Fotolitička razgradnja praćena je u ultračistoj vodi pri 4 različite pH-vrijednosti: 4, 7, 9 i 10 i to na dva načina, u puferskim otopinama i otopinama s pH-vrijednostima podešenim na početku eksperimenta, jer se prilikom razgradnje pH-vrijednost mijenja. Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- farmaceutik hidroksiklorokin ne hidrolizira
- fotolitičkom razgradnjom smanjuje se koncentracija hidroksiklorokina
- fotolitička razgradnja brža je u izvorskoj vodi nego u ultračistoj vodi
- porastom pH-vrijednosti, raste brzina fotolitičke razgradnje, a vrijeme poluraspada se smanjuje
- u otopinama s pH-vrijednostima podešenim na početku eksperimenta došlo je do promijene pH-vrijednosti, odnosno pH-vrijednost se smanjila
- fotolitičkom razgradnjom hidroksiklorokina nastaju dva razgradna produkta
- fotolitičkom razgradnjom hidroksiklorokina koncentracija razgradnih produkata raste

6. LITERATURA

1. D. Lattier, J.M. Lazorchak, F. Fulk, M. Kostich, A look backwards at environmental risk assessment: An approach to reconstructing ecological exposures, u B.W. Brooks i D.B. Huggett (ur.), *Human Pharmaceuticals in the Environment: Current and Future Perspectives*, Springer, New York, 2012., str. 109-138.
2. *Pharmaceuticals in the environment*, izvješće br. 1//2010, European Environment Agency (EEA), Copenhagen, 2010., str. 4-5.
3. M. Periša, S. Babić, Farmaceutici u okolišu, *Kemija u industriji*, 65 (2016.) 471-482.
4. M. Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2015.
5. <http://www.plivazdravlje.hr/aktualno/clanak/16102/Kako-lijek-djeluje-i-kako-se-unosi-u-organizam.html>, veljača 2009.
6. <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxychloroquine>, travanj 2017.
7. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01611>, lipanj 2017.
8. S. Krčmar, D.K. Hackenberger, Ekološki čimbenici, Predavanja iz ekologije životinja (2. predavanje), Odjel za biologiju, Sveučilište J.J. Strossmayera u Osijeku, 2015.,
9. M. Kocijan, Fotolitička razgradnja nitrofurantoina, završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
10. <http://struna.ihjj.hr/naziv/biorazgradnja/11718/>, Institut za hrvatski jezik i jezikoslovlje, 2011.
11. https://chem.libretexts.org/Core/Physical_and_Theoretical_Chemistry/Equilibria/Solub/Solub/Hydrolysis, listopad 2015.
12. <https://www.britannica.com/science/hydrolysis>, rujan 2016.
13. D. Gerrity, S. Snyder, Wastewater and drinking water treatment technologies, u B.W. Brooks i D. B. Huggett (ur.), *Human pharmaceuticals in the environment: Current and future perspectives*, Springer, New York, str. 225-255.
14. R.F. Dantas, O. Rossiter, A. Kardec Ribeiro Teixeira, A.S.M. Simoes, V. Lins da Silva, Direct UV photolysis of propranolol and metronidazole in aqueous solution, *Chemical Engineering Journal*, 158(2) (2010.) 143-147 .
15. https://hr.wikipedia.org/wiki/Kemijska_kinetika, ožujak 2017.
16. M. Kaštelan-Macan M., *Kemijska analiza u sustavu kvalitete*, Školska knjiga 2003.
17. http://www.waters.com/waters/en_HR/How-Does-High-Performance-Liquid-Chromatography-Work%3F/nav.htm?cid=10049055&locale=en_HR, srpanj 2017.
18. <https://chemicalize.com/#/calculation>, srpanj 2017.
19. <https://en.wikipedia.org/wiki/Milli-Q>, veljača 2016.
20. https://en.wikipedia.org/wiki/Purified_water#Laboratory_use, svibanj 2017.

ŽIVOTOPIS

Zovem se Ines Topalović. [REDACTED]

[REDACTED] 2002.-2010. pohađala sam 1. osnovnu školu u Bjelovaru, nakon čega sam upisala jezični smjer Gimnazije Bjelovar. Završila sam srednju školu 2014. godine i upisala preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. 2016. godine radila sam kao demonstrator na Zavodu za opću i anorgansku kemiju na Fakultetu. 2017. godine odradila sam stručnu praksu na odjelu TAPI, R&D, Analitika tvrtke PLIVA d.o.o. u Zagrebu. Govorim engleski, njemački i španjolski jezik, a učila sam i latinski, francuski te češki jezik. Kao potvrdu znanja njemačkog jezika posjedujem Deutsches Sprachdiplom. Trenutno sam glavna urednica službenog glasila Studentske sekcije HDKI-ja "Reaktor ideja". Volonterka sam udruge za djecu s poteškoćama u razvoju "Bjelovarski leptirići".