Razgradnja antihelmintika u okolišu: hidroliza i fotoliza

Cvijanović, Andrea

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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:149:780444

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-29**

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrea Cvijanović

RAZGRADNJA ANTIHELMINTIKA U OKOLIŠU: HIDROLIZA I FOTOLIZA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

dr. sc. Mirta Čizmić

izv. prof. dr. sc. Irena Škorić

Zagreb, lipanj 2016.

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

Zahvaljujem se mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na savjetima, pomoći, uloženom vremenu i podršci tijekom studiranja i izrade ovog rada.

Zahvaljujem se asistentici dr. sc. Martini Biošić na velikom trudu, volji i vremenu koje je ulagala kako bi me što više naučila, na savjetima kojima me usmjeravala i na podršci na koju sam uvijek mogla računati.

Zahvaljujem se cijenjenom Mislavu Runje, dipl. ing. koji mi je izašao u susret i uložio puno truda i volje prilikom analiziranja uzoraka.

Zahvaljujem se svim djelatnicima Zavoda za analitičku kemiju na susretljivosti u svakom trenutku, posebno tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić.

Zahvaljujem se svojoj obitelji, prijateljima i mom dragom Karlu na pruženoj ljubavi i podršci tijekom studiranja.

Sažetak

U ovom radu ispitana je hidrolitička i fotolitička razgradnja tri antihelmintika: albendazola, febantela i prazikvantela. Hidrolitička razgradnja navedena tri antihemlintika ispitana je u puferskim otopinama različitih pH-vrijednosti i pri različitim temperaturama. Fotolitička razgradnja farmaceutika ispitana je djelovanjem umjetne Sunčeve svjetlosti u MilliQ vodi, te je ispitan utjecaj aniona (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-} i PO_4^{3-}) u koncentracijama uobičajeno prisutnim u vodama u okolišu.

Rezultati ispitivanja hidrolitičke razgradnje pokazali su drugačije ponašanja sva tri farmaceutika. Prazikvantel se pokazao stabilnim na sve tri ispitivane pH-vrijednosti dok je albendazol stabilan pri pH 4 i 7, a febantel nestabilan pri sve tri pH-vrijednosti. Hidrolitička razgradnja albendazola i febantela ovisi i o temperaturi, te je ona proporcionalna temperaturi. Pri višoj temperaturi hidrolitička razgradnja je brža. U svim ispitivanim uvjetima hidrolitička razgradnja slijedi reakciju prvog reda uz koeficijent determinacije veći od 0,96.

Za farmaceutike podložne hidrolitičkoj razgradnji detektirana su po dva razgradna produkta, međutim potrebna su daljna istraživanja kako bi se odredila njihova točna struktura.

Također, ispitana je izravna i neizravna fotolitička razgradnja febantela i prazikvantela pod utjecajem umjetnog Sunčeva zračenja. Dobiveni rezultati pokazali su da fotolitička razgradnja ne predstavlja važan proces razgradnje s obzirom da su se oba farmaceutika pokazala stabilnim.

Ključne riječi: farmaceutici, antihelminitici, hidrolitička razgradnja, fotolitička razgradnja, kinetika razgradnje, razgradni produkti, HPLC-MS/MS

Abstract

In this work hydrolitytic and photolytic degradation of three anthelmintics: albendazole, febantele and praziquantel were investigated. The hydrolytic degradation of the three antihelmintics was examined in buffer solutions with different pH-values and at different temperatures. Photolytic degradation of pharmaceuticals was investigated under simulated sunlight in MilliQ water, and also the influence of anorganic ions was examined (Cl^-, NO_3^-, SO_4^{2-} and PO_4^{3-}) in concentrations common for environmental water.

Results of hydrolytic degradation showed different behaviour of all three pharmaceuticals. Praziquantel was resistant to hydrolitic degradation at all three investigated pH-values while albendazole has shown to be stable at pH 4 and 7, and febantel was unstable at all three pH-values. The hydrolytic degradation of albendazole and febantel depends on temperature, and it is proportional to temperature. Hydrolytic degradation is faster at higher temperatures. In all cases hydrolytical degradation of albendazole and febantel followed first-order kinetics with the coefficient of determination > 0.96.

Two degradation products were identified for hydroliticaly instabile pharmaceuticals; however, further investigation is needed to determine their exact structures.

Also, direct and indirect photolytic degradation of febantel and praziquantel under simulated sunlight irradiation was investigated. It has been demonstrated that photolytic degradation is not an important degradation process since both investigated pharmaceuticals were stable.

Keywords: pharmaceuticals, anthelmintics, hydrolytic degradation, photolytic degradation, degradation products, degradation kinetics, HPLC-MS/MS

SADRŽAJ

1. Uvod ... 1
2. Opći dio ... 2
2.1. Farmaceutici ... 2
2.2. Antihelmintici ... 3
2.2.1. Albendazol ... 3
2.2.2. Febantel ... 4
2.2.3. Prazikvantel ... 4
2.3. Metabolizam farmaceutika ... 4
2.3.1. Metabolizam albendazola ... 7
2.3.2. Metabolizam febantela ... 8
2.3.3. Metabolizam prazikvantela ... 9
2.4. Farmaceutici u okolišu ... 10
2.5. Sudbina farmaceutika u okolišu ... 11
2.5.1. Biološka razgradnja farmaceutika ... 12
2.5.2. Fotolitička razgradnja farmaceutika ... 13
2.5.3. Hidrolitička razgradnja farmaceutika ... 16
2.6. Tekućinska kromatografija ... 18
2.7. Spektrometrija masa ... 23
2.7.1. Ionizacija uzorka ... 23
2.7.2. Analizator masa ... 25
2.7.3. Spregnuta spektrometrija masa (MS/MS) ... 27
3. EKSPERIMENTALNI DIO ... 29
3.1. Materijali ... 29
3.1.1. Kemikalije ... 29
3.1.2. Farmaceutici ... 29
3.2. Instrumenti ... 32
3.2.1. Analitička vaga ... 32
3.2.2. pH-metar ... 33
3.2.3. Suntest CPS+ ... 34
3.2.4. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa ... 35
3.3. Metoda rada ... 37
3.3.1. Priprema otopina pufera ... 37
3.3.2. Priprema standardnih otopina farmaceutika ... 37
3.3.3. Hidrolitička razgradnja ... 38

3.3.4. Fotolitička razgradnja 39
3.3.5. Analiza tekućinskom kromatografijom 39
3.3.6. Identifikacija razgradnih produkata faramceutika 41
4. REZULTATI I RASPRAVA 43
4.1. Hidrolitička razgradnja 43
4.1.1. Razgradni produkti hidrolitičke razgradnje 49
4.2. Fotolitička razgradnja 53
5. Zaključak 55
6. Literatura 56

1. Uvod

Farmaceutici se danas proizvode i koriste u velikim količinama. Njihova primjena i raznolikost svakim danom sve je veća. U posljednje vrijeme uz humane, povećava se upotreba veterinarskih farmaceutika. Veterinarski farmaceutici osim što se koriste za liječenje, koriste se i kao promotori rasta. Zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava, mnoge od tih tvari ili njihovi biološki aktivni metaboliti završavaju u tlima i sedimentima, gdje se mogu akumulirati i uzrokovati različite posljedice na kopnenim i vodenim organizmima. Naime, farmaceutici se ubrajaju u tzv. „nova zagađivala“ za koje ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. U većini dosadašnjih istraživanja određivane su koncentracije farmaceutika u okolišu kao i njihovih metabolita, ali još uvijek se malo zna o njihovom ponašanju i sudbini u okolišu. Farmceutici ne moraju biti postojani da bi uzrokovali negativne učinke budući da se kontinuirano unose u okoliš ("pseudo postojani"). Nakon dospijevanja u okoliš farmaceutici se zbog različitih fizikalno-kemijskih svojstava vežu na tlo i sediment ili podliježu abiotičkim (hidroliza i fotoliza) ili biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) procesima razgradnje. Rezultat navedenih procesa vodi smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih spojeva. Stoga je, kada se proučava prisutnost farmaceutika u okolišu, važno uzeti u obzir ne samo početne molekule farmaceutika nego i njihove metabolite, kao i produkte razgradnje. Identifikacija produkata razgradnje izuzetno je važna budući da oni mogu biti više ili manje stabilni i toksični u odnosu na početnu molekulu.

Fotolitička te hidrolitička razgradnja, kao abiotički procesi, mogu biti značajni u smanjenju koncentracije farmaceutika u okolišu. Stoga je cilj ovoga rada proučiti ponašanje tri farmaceutika iz skupine antihelmintika (febantel, albendazol i prazikvantel) pod umjetnim Sunčevim zračenjem te njihovu hidrolitičku stabilnost kako bi se bolje razumjelo njihovo ponašanje i sudbina u okolišu.

2. Opći dio

2.1. Farmaceutici

Farmaceutici su kemijski složene organske molekule koje posjeduju različita fizikalno-kemijska i biološka svojstava odgovorna za funkciju lijeka. Vrlo su kompleksna i raznolika skupina spojeva koja se razlikuje prema molekulskoj masi (200 do 1000 Da), kemijskoj strukturi, funkcionalnim grupama (kisele ili bazične) i djelovanju. Karakterizira ih farmakološko i fiziološko djelovanje već pri niskim koncentracijama, specifična biološka aktivnost, ionska priroda, topljivost u vodi te prisutnost u okolišu u niskim koncentracijama [1].

Farmaceutici su molekule proizvedene od strane čovjeka i jedne su od najprisutnijih u okolišu, u kojem su u posljednja dva desetljeća detektirani u različitim uzorcima: voda, tla, sedimenta te komunalnih i industrijskih otpadnih voda. Danas se ubrajaju u tzv. „nova zagađivala“ koja su povećala zabrinutost budući da njihovo ponašanje nije u potpunosti istraženo, a zakonska regulativa o njihovu ispuštanju u okoliš još uvijek nije propisana. U skladu s navedenim, važno je pratiti njihovu prisutnost i ponašanje u okolišu kako bi se spriječili negativni utjecaji na okoliš i ljude. Niz istraživanja potvrdilo je da čak i vrlo niske koncentracije farmaceutika, koje se mogu pronaći u vodenim sustavima, mogu uzrokovati štetne posljedice na čovjeka i vodeni ekosustav [2]. Dosadašanja istraživanja rezultirala su uvođenjem 3 farmaceutika (diklofenak, 17β-estradiol i 17α-etinilestradiol) na tzv. „watch“ listu EU direktive o vodama [3] tj. uvršteni su među spojeve koji će se pratiti na reprezentativnim monitoring postajama svake države članice kako bi se odredio njihov utjecaj na ekosustave i zdravlje ljudi.

Farmaceutski aktivne tvari imaju široku primjenu u humanoj i veterinarskoj medicini, poljoprivredi, biotehnologiji te kozmetici. Budući da igraju važnu ulogu za zdravlje svih živih bića jer sprječavaju širenje bolesti, ublažavaju bol, poboljšavaju kvalitetu života pa čak i spašavaju živote očekuje se da će njihova upotreba kontinuirano rasti zbog porasta broja stanovništva i potrošnje po glavi stanovnika, širenja potencijalnih tržišta, patenata, što stvara potrebu za sve većom proizvodnjom. Prema svome djelovanju i kemijskoj strukturi, farmaceutici se mogu podijeliti na analgetike i protuupalne lijekove, antihistaminike, diuretike, antidepresive, antibiotike, antiepileptike, regulatore masnoća u krvi, regulatore tlaka, hormone, steroide, antitumorske lijekove te β-blokatore.

2.2. Antihelmintici

Antihelmintici su farmaceutici koji djeluju protiv infekcija uzrokovanih parazitima. Koriste se u borbi protiv postojećih i razvoja novih parazita, isključivo iz probavnog trakta. Nalaze veliku primjenu u humanoj i veterinarskoj medicini. Postoje dvije vrste antihelmintika: vermicidi koji isključivo ubijaju crve i vermfugidi koji izbacuju crve iz probavnog trakta. Najčešća podjela antihelmintika je prema kemijskoj strukturi [4, 5]:

- benzimidazoli,
- difenilsulfidi,
- heksahidropirazini,
- imidazotiazoli,
- makrociklički laktoni,
- salicilanilidi,
- tetrahidropirimidini

i ostali.

Antihelmintici analizirani u ovom radu su: albendazol i febantel iz skupine benzimidazola, te prazikvantel iz heksahidropirazinske skupine.

2.2.1. Albendazol

Albendazol je antihelmintik širokoga spektra iz grupe benzimidazola koji su otkriveni 1960. godine [5]. Netopljiv je u vodi, slabo topljiv u metanolu, kloroformu, etil-acetatu i acetonitrilu, a topljiv u dimetilsulfoksidu, jakim kiselinama i jakim bazama [6]. Hidrofoban je zbog čega se slabo apsorbira iz gastrointestinalnog trakta. Albendazol ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u njegova sva tri razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u samim parazitima, smanjeno stvaranje adenozin trifosfata (ATP). Iz probavnog sustava apsorbira se manje od 5% albendazola. Nakon oksidacije u jetri metabolizira u albendazol-sulfoksid i veže se za serumske bjelančevine. Vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$) lijeka iznosi 8,5 sati. Izlučuje se mokraćom [5]. Albendazol se nalazi na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije (World Health Organization's List of Essential Medicines), koja daje popis najznačajnijih lijekova u temeljnom zdravstvenom sustavu.

2.2.2. Febantel

Febantel je probenzimidazol što znači da postaje aktivan tek kada se prevede u svoje aktivne metabolite (benzimidazole). Benzimidazoli su velika skupina lijekova koja se koristi u prevenciji bolesti domaćih životinja. Nakon resorpcije iz crijeva, febantel se u jetri prevodi u djelatne metabolite - fenbendazol i oksfendazol. Koristi se isključivo u veterinarskoj medicini [8].

2.2.3. Prazikvantel

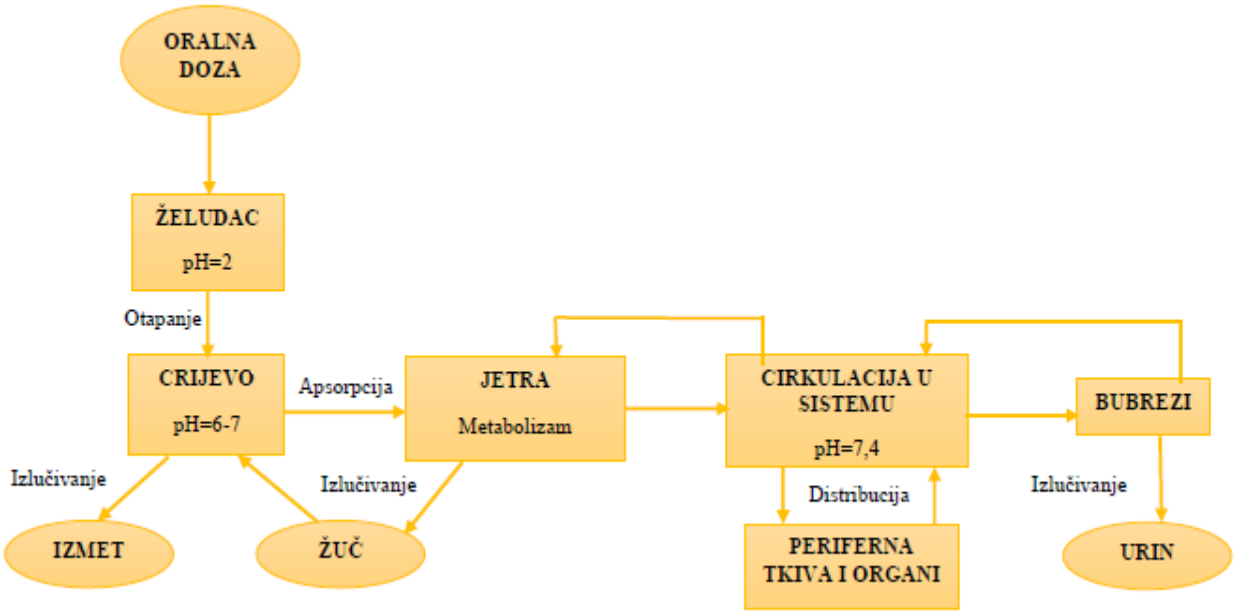
Prazikvantel je anthelmintik koji se ubraja u skupinu heksahidropirazina. Njegov antiparaziski efekt zasniva se na povećanju permeabilnosti membrane parazita za kalcij, posljedica toga su snažne kontrakcije, nakon čega dolazi do paralize muskulature i smrti parazita [8]. Prazikvantel se nalazi na listi ključnih lijekova Svjetske zdravstvene organizacije.

2.3. Metabolizam farmaceutika

Posljednjih godina, došlo je do spoznaje da nisu samo farmaceutski aktivne tvari od velikoga značaja nego i molekule nastale strukturnim promjenama u tijelu čovjeka ili životinja [9]. Farmaceutski aktivna tvar, nakon što dospije u živi organizam podvrgnuta je procesima uklanjanja ili eliminacije. Eliminacija je ireverzibilno uklanjanje farmaceutski aktivne tvari iz organizma i sastoji se od dva procesa, metabolizma i izlučivanja. Dok se proces izlučivanja sastoji od eliminacije kemijski nepromijenjenog lijeka ili njegovih metabolita iz organizma, metabolizam uključuje pretvorbu jednog kemijskog oblika u drugi [10].

Metabolizam farmaceutika je proces u kojem molekule, kada dospiju u živi organizam, prolaze kroz niz biokemijskih reakcija te ga napuštaju u nepromijenjenom obliku, kao polarni metaboliti ili kao smjesa osnovnog spoja i metabolita [11]. Ovaj proces najčešće je uzrokovan enzimima u ljudskom metabolizmu ili mikroorganizmima u crijevima živog bića koji u konačnici pretvaraju manje polarne kemijske molekule u polarnije produkte. Prema tome, metaboliti su spojevi nastali strukturnom promjenom polaznog spoja u organizmu čovjeka ili

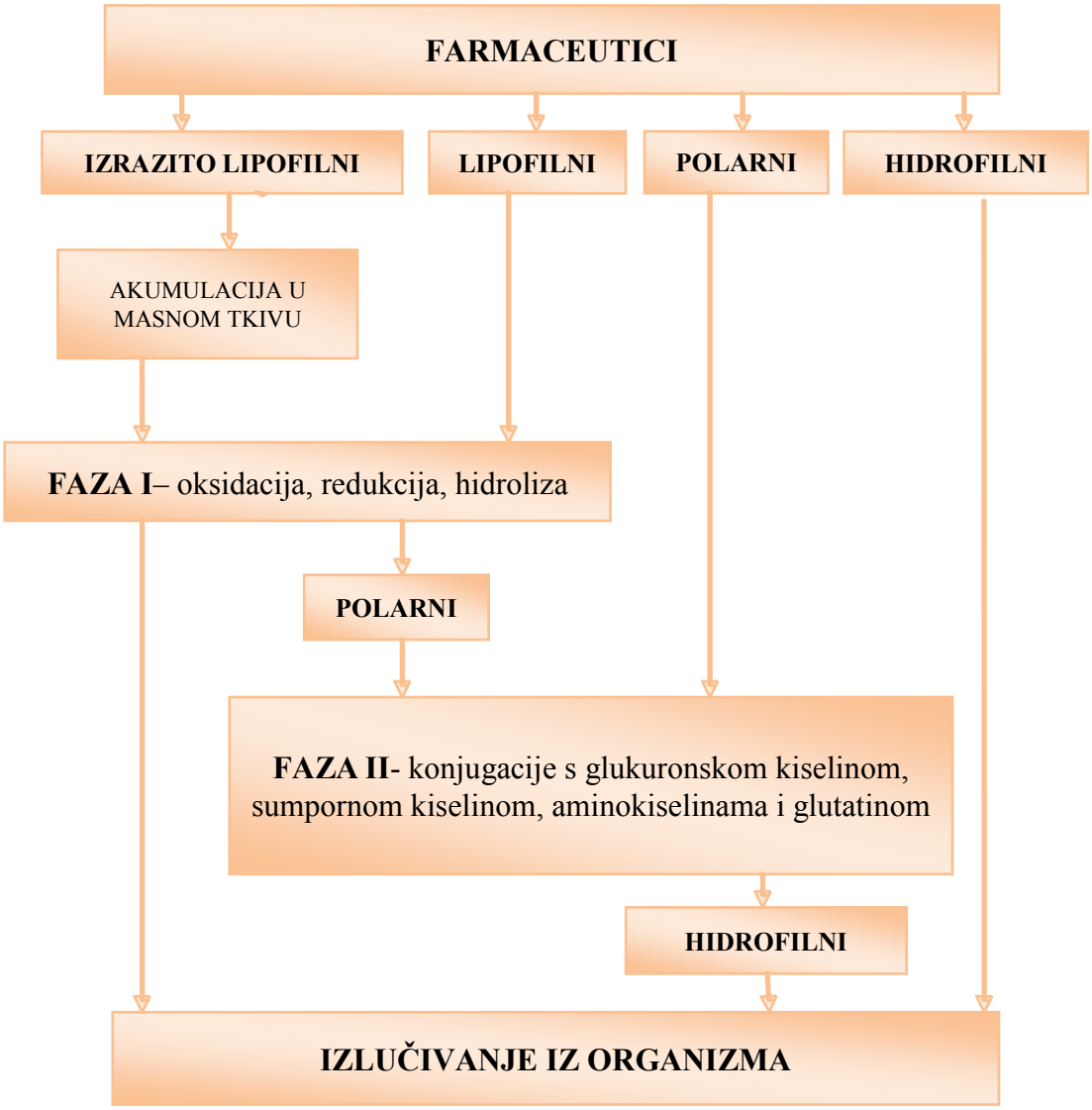
životinja. U pojedinim slučajevima molekula farmaceutika postaje farmakološki aktivna tek kada se metabolizira. Trajanje i intenzitet farmakološke aktivnosti ovise o brzini metabolizma koja je ovisna o vrsti lijeka, starosti osobe itd. Na slici 1 prikazani su procesi i sudbina farmaceutika nakon oralne primjene.



Slika 1. Procesi i sudbina farmaceutika nakon oralne primjene [1]

Metabolizam farmaceutika sastoji se od dvije vrste biokemijskih reakcija koje se najčešće odvijaju jedna za drugom, a podijeljene su u reakcije I. faze i reakcije II. faze (slika 2). Reakcije I. faze su kataboličke reakcije kao što su hidroliza, oksidacija, redukcija, hidroksilacija ili ciklizacija. Produkti ovih reakcija su često kemijski reaktivniji te ponekad toksičniji i kancerogeniji od početnog farmaceutika. Reakcije II. faze su anaboličke (sintetičke) reakcije koje uključuju konjugaciju koja dovodi do stvaranja neaktivnog produkta. Reakcije II. faze su sporije od reakcija I. faze, a u ovu skupinu ubrajaju se reakcije metiliranja, acetiliranja, sulfo-konjugacije itd. Ove reakcije uobičajeno obuhvaćaju uvođenje reaktivne grupe u molekulu farmaceutika, kao što je hidroksilna grupa. Ta se funkcionalna grupa u reakciji konjugacije zamijeni glukuronskom, sulfatnom ili acetilnom grupom čime metabolit postaje dovoljno hidrofilan i topljiv u vodi kako bi se mogao izlučiti iz organizma putem urina [10]. Iako, u nekim je slučajevima potrebna kombinacija obiju vrsta reakcija za

izlučivanje farmaceutika, promjena kemijske strukture molekule samo jednim enzimom dovoljna je da se stvori metabolit koji će se brzo izlučiti iz organizma. Također, ovisno o enzimu odgovornom za reakciju, u većini slučajeva farmaceutiku se povećava polarnost te on u potpunosti ili djelomično gubi farmakološko djelovanje [1].



Slika 2. Shematski prikaz biopreobrazbe farmaceutika

Kao što je vidljivo na slici 2 metaboliti se ne zadržavaju u tijelu čovjeka ili životinje nego se izlučuju putem urina ili izmeta i na taj način dospijevaju u okoliš. Zbog stalne i često nekontrolirane uporabe farmaceutika, koncentracija tih molekula kontinuirano se povećava u okolišu. Farmaceutici kao i njihovi metaboliti lako mogu dospjeti u vodene sustave te se

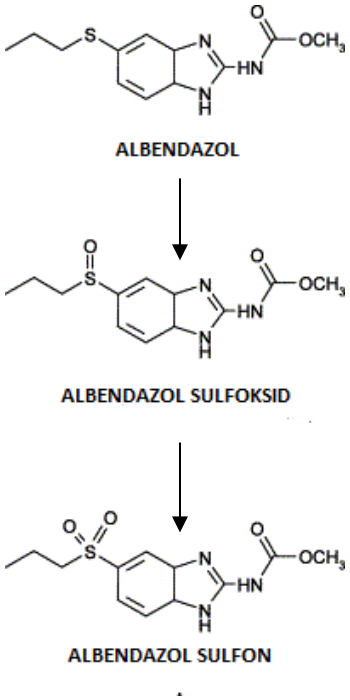
akumulirati u tlu ili sedimentu. Njihova prisutnost u okolišu može imati nepovoljan utjecaj na prirodne ekosustave te pogubne posljedice za sve žive organizme [12].

2.3.1. Metabolizam albendazola

Albendazol posjeduju sulfidnu funkcionalnu grupu koja je podložna oksidaciji, a rezultat toga je oksidacija albendazola u albendazol sulfoksid, glavni aktivni metabolit koji se djelomično oksidira u albendazol sulfon (slika 3). Primarni metabolit albendazol sulfoksid posjeduje antihelmitičku aktivnost te je djelotvornost albendazola pripisana upravo tom metabolitu. Albendazol sulfoksid je topljiviji i učinkovitiji u odnosu na polaznu supstancu. Navedeni sulfoksid sadrži u svojoj kemijskoj strukturi asimetrični centar zbog kojeg su identificirane dvije enantiomerne forme. Nakon oralnog uzimanja, albendazol se vrlo brzo metabolizira oksidacijom sulfidne grupe u sulfoksid i sulfon deacetilacijom karbamatne grupe i nastajanjem 2-aminosulfona. Nastali aktivni metabolit albendazol sulfoksid smjesa je R(+) i S(-) enantiomera. Sulfoksid se dalje pretvara u sulfon koji ne posjeduje antihelmintsku aktivnost [7].

Kod životinja je nastajanje R(+) albendazol sulfoksida katalizirano je mikrosomskom flavin monooksidazom, dok je nastajanje S(-) albendazol sulfoksida katalizirano enzimskim sustavom citokrom P450.

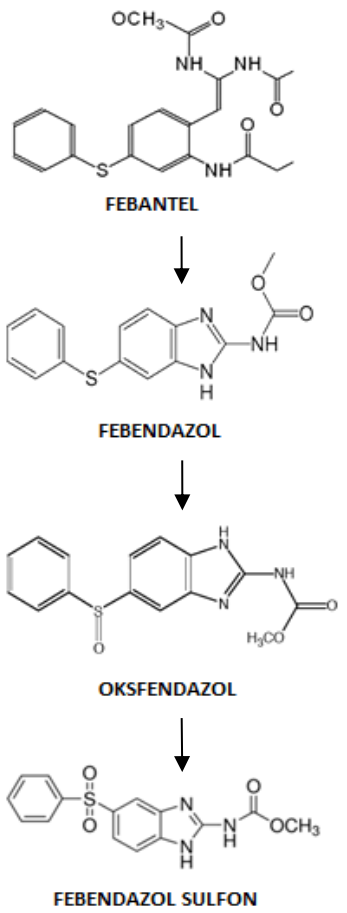
Kod stoke tretirane radioaktivno obilježenim albendazolom, većina ostataka detektirana je u jetri, a manjim dijelom u bubrezima. Kod stoke liječene albendazolom u dozi od 15 mg/kg, ukupni ostatci u jetri varirali su od više od 20 mg/kg jedan dan nakon liječenja do 6 mg/kg 4 dana nakon liječenja te oko 1,2 mg/kg 20 dana nakon liječenja. Kod teladi, 90% ostataka ekstrahirano je iz jetre jedan dan nakon tretiranja s radioaktivno obilježenim albendazolom. Međutim, 4 do 10 dana nakon tretiranja pronađeno je samo 20 do 30% ostataka. Od ukupne količine ekstrahiranih ostataka jedan dan nakon tretiranja, 27% se odnosilo na polazni lijek, a 52% na njegove metabolite (sulfoksid, sulfon i amino-sulfon). Četiri dana nakon liječenja albendazol nije pronađen u tkivima, a njegovi metaboliti činili su 40 do 50% količine ekstrahiranih rezidua [13,14].



Slika 3. Metabolički put albendazola [13]

2.3.2. Metabolizam febantela

Febantel je predlijek, koji se *in vivo* metabolizira u benzimidazolni antihelmintik fenbendazol (slika 4). Polazni lijek fenbendazol sulfid vrlo lako oksidira u sulfoksidni metabolit oksfendazol, koji je isto tako vrlo važan antihelmintik. Sulfoksid se dalje može oksidirati u sulfon, manje aktivan metabolit. Osim njega kao produkt oksidacije na položaju 4 fenolnog prstena nastaje *p*-hidroksifenbendazol za kojeg se smatra da isto tako posjeduje slabu antihelmintičnu aktivnost. Svi se navedeni lijekovi koriste kod liječenja stoke, koza, ovaca, konja i svinja. Studije na životinjama pokazale su da nakon tretiranja s febantelom najzastupljeniji ostatci bili su fenbendazol, oksfendazol i fenbendazol sulfon. Slično kao i kod albendazola odgovarajući ostatci lijeka većinom su pronađeni u jetri i bubrezima, uz manju količinu pronađenu u mišićima i masnom tkivu. Kod stoke liječene oralno febantelom, 90% ostataka ekstrahirano je iz jetre 18 sati nakon liječenja. Od ukupnih ekstrahiranih ostataka, fenbendazol čini 30 do 41%, oksfendazol 4 do 19%, fenbendazol sulfon 14 do 15% te febantel 3 do 6%. Deset dana nakon liječenja, iz jetre je ekstrahirano manje od 25% ostataka, pri čemu je kao najzastupljeniji metabolit pronađen fenbendazol amino-sulfon u udjelu od 12 do 35% od ukupnih ekstrahiranih ostataka [14, 15].



Slika 4. Metabolički put febantela

2.3.3. Metabolizam prazikvantela

Nakon oralne primjene prazikvantel se brzo resorbira, te se većina lijeka metabolizira u inaktivne metabolite pri prvom prolasku kroz jetru, a metaboliti se izlučuju putem urina. Metabolizam prazikvantela je stereo-selektivan. U nekoliko studija provedena je analiza metabolita prazikvantela *in vivo* (miš, štakor i čovjek) i *in vitro* (štakor i humani mikrosomi jetre) [16]. Identificirani metaboliti razlikovali su se ovisno o vrsti bića i analitičkoj metodi, ali su općenito hidroksilacijski produkti koji sadrže jednu, dvije ili tri hidroksilne grupe. Točna struktura većine od tih metabolita i položaj hidroksilne grupe još uvijek je nepoznat. Studija provedena u hepatocitima štakora pokazala je da su glavni metaboliti *cis*- i *trans*-4 hidroksiprazikvantel[16]. Glavni metabolit u čovjeku je *trans*-4-hidroksiprazikvantel. *S*-prazikvantel također stvara dodatni metabolit monohidroksiprazikvantel [17].

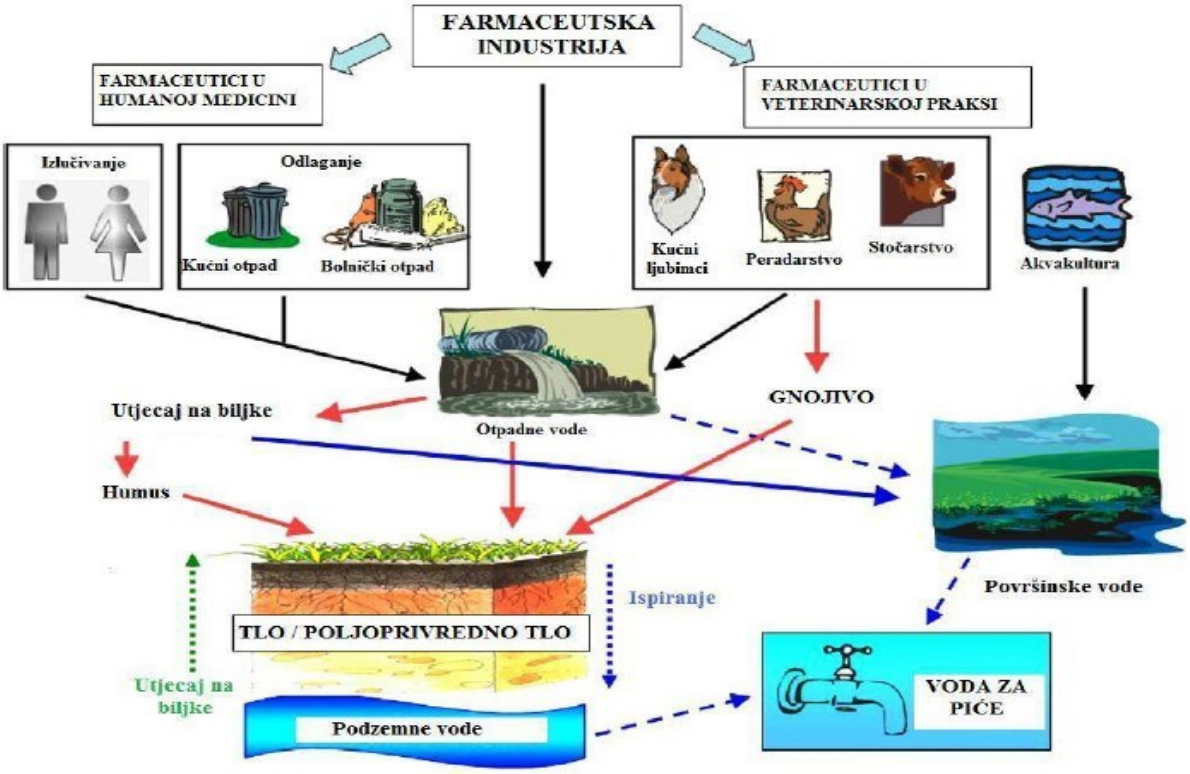
2.4. Farmaceutici u okolišu

Pojava i sudbina farmaceutika kao i proizvoda za osobnu higijenu postala je glavna tema istraživanja u 21.-om stoljeću, ne zbog niskih koncentracija koje su pronađene u okolišu nego zbog same prirode ovih molekula. Brojni eksperimenti provedeni u razvijenim zemljama kao što su SAD, Kanada, Japan, Koreja, Australija te zemlje Europe rezultirali su pronalaskom brojnih spojeva prisutnih u vodenom ekosustavu [18].

Povećana potrošnja farmaceutika u različitim područjima primjene rezultirala je kontinuiranim ispuštanjem ovih molekula i njihovih metabolita u okoliš, što u konačnici uzrokuje njihovo trajno zadržavanje. Procijenjena svjetska potrošnja farmaceutika iznosi više od 100.000 t godišnje te konstantno raste. Razlog otkrivanja sve većeg broja različitih farmaceutika u okolišu je i razvoj naprednih analitičkih instrumenata koji omogućavaju analizu tragova različitih spojeva s vrlo niskom granicom detekcije i kvantifikacije te visokom osjetljivosti [19, 20].

Zbog svojih fizikalno-kemijskih svojstava kao što su npr. hidrofilnost, farmaceutici i njihovi metaboliti imaju sposobnost prolaska kroz sve prirodne filtre i postrojenja za obradu otpadnih voda ugrožavajući tako sustav opskrbe pitkom vodom.

Mogući putevi unosa farmaceutika u okoliš prikazani su na slici 5. Nakon primjene farmaceutici se ne zadržavaju u tijelu čovjeka ili životinje nego se izlučuju putem urina ili izmeta. Kao što je prikazano na slici 5, životinjske izlučevine su veliki izvor farmaceutika u okolišu. Razlog tomu je što većina farmaceutika koji se koristi u veterinarskoj medicini završava u gnojivu za poljoprivredna dobra. Prilikom raspršivanja i nanošenja gnojiva farmaceutici ili njihovi metaboliti prisutni u gnojivu zbog svoje dobre topljivosti predstavljaju prijetnju podzemnim, površinskim te pitkim vodama. Ujedno, zbog velikog razvoja farmaceutske industrije njihov broj i koncentracija u površinskim, podzemnim i otpadnim vodama iz dana u dan se drastično povećavaju. Problem se također javlja pri ispuštanju komunalnih otpadnih voda, a u manjoj mjeri i kod industrijske proizvodnje gdje, zbog nepotpunog uklanjanja u postrojenjima za obradu otpadnih voda, također mogu zagaditi pitke vode što predstavlja značajan put njihova ispuštanja u okoliš. Također, jedan od puteva kontinuiranog unosa i širenja humanih i veterinarskih farmaceutika u okolišu je odlaganje neiskorištenih ili farmaceutika kojima je istekao rok trajanja.



Slika 5. Putevi unošenja farmaceutika u okoliš [21]

Brojna istraživanja pokazala su da farmaceutici i njihovi metaboliti ostavljaju štetne posljedice na vodene i kopnene organizme. Postoje dvije vrste utjecaja farmaceutika na okoliš, a to su kratkoročni i dugoročni. Takvi utjecaji najčešće se proučavaju na organizmima kao što se alge, rakovi i ribe. Dokazano je da 10-15% farmaceutika ima dugoročnu toksičnost za određene biološke vrste, a podaci su dostupni za manje od 15% farmaceutika od ukupnog broja koji dospijevaju u okoliš. Također, veliki problem, osim za vodenu floru i faunu, su dugoročne ekotoksikološke posljedice na čovjeka [22, 23]. Jednom kada se unesu u okoliš, ove molekule mogu biti podvrgnute različitim procesima koji vode njihovoj transformaciji i razgradnji [23].

2.5. Sudbina farmaceutika u okolišu

Sudbina farmaceutika u okolišu ovisi o nizu različitih čimbenika kao što su fizikalno-kemijska svojstva samog spoja te uvjeti u okolišu. Brojni uvjeti u okolišu: klima, pH-

vrijednost, redoks potencijal, komponente u vodi i sedimentu (sastav matice) također utječu na ponašanje ovih molekula u vodenom i kopnenom ekosustavu [1].

Nakon primjene, farmaceutik se izlučuje iz tijela kao osnovna molekula, njegov metabolit ili smjesa osnovne molekule i metabolita. Kao takav dolazi u okoliš u kojem može biti podvrgnut različitim procesima koji mogu rezultirati strukturnim promjenama farmaceutika, pri čemu nastaju novi spojevi različitih fizikalno-kemijskih svojstava te farmaceutske aktivnosti. Ti procesi mogu biti abiotički ili biotički. Biotički procesi obuhvaćaju djelovanje različitih organizama kao što su bakterije, gljivice i alge. Abiotička razgradnja ili razgradnja kemijskim reakcijama najčešće uključuje hidrolizu, fotolizu, oksidaciju i redukciju. Rezultat ovih procesa je smanjenje koncentracije osnovne komponente te nastanak novih spojeva koji mogu imati drugačija fizikalno-kemijska svojstva te biti toksičniji od osnovne komponente. Neki farmaceutici pokazuju izrazitu tendenciju sorpciji na krute matice (tlo, sediment, suspendirane čestice) pa se tako mogu akumulirati u tlu i sedimentu te se time smanjuje njihova farmaceutska aktivnost u okolišu [1, 2].

2.5.1. Biološka razgradnja farmaceutika

Biorazgradnja je vrlo važan proces koji uključuje enzimatske reakcije koje ovise o kemijskoj strukturi spoja. Stupanj razgradnje može se razlikovati i za farmaceutike unutar iste skupine [24]. Rezultat takve razgradnje je djelomična ili potpuna mineralizacija farmaceutika do ugljikova dioksida i anorganskih soli poput sulfata i nitrata.

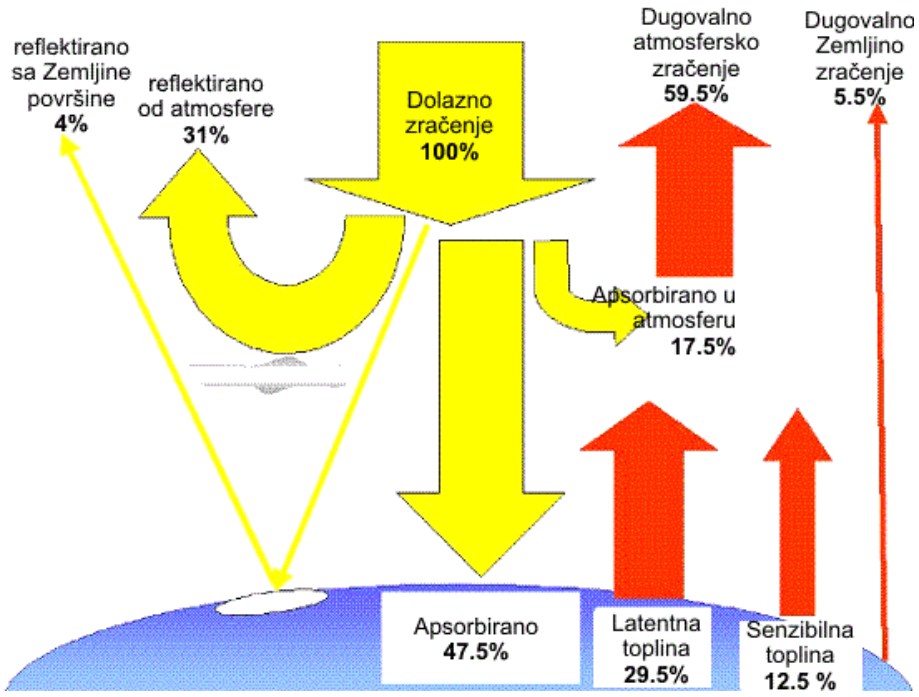
Dvije važne skupine mikroorganizama odgovorne za razgradnju farmaceutika su gljivice i bakterije koje ih koriste za energiju i rast. Dok su gljivice važne za razgradnju u tlu, bakterije su važne u podzemnim i površinskim vodama [25, 26]. Brzina razgradnja ovisi o načinu razgradnje, o koncentraciji farmaceutika, te o tome da li se farmaceutici nalaze u sedimentu ili vodi. Ovakva razgradnja ponekad nije potpuna pri čemu se sam proces zaustavlja prije nego je postignuta potpuna mineralizacija, a rezultat su produkti s različitim toksičnim svojstvima.

2.5.2. Fotolitička razgradnja farmaceutika

Fotolitička razgradnja je značajan proces za farmaceutike koji su pokazali otpornost na hidrolizu i biorazgradnju. Javlja se većinom u površinskim vodama koje su izložene Sunčevoj svijetlosti. Farmaceutici zahvaljujući svojim strukturama imaju sposobnost da apsorbiraju Sunčevo zračenje, ali da bi bili podložni fotolitičkoj razgradnji njihovi apsorpcijski spektri bi se trebali poklapati sa spektrom Sunčeva zračenja [9].

Učinkovitost procesa ovisi o intenzitetu i frekvenciji svijetlosti, godišnjem dobu, vremenskim uvjetima, kvantnom iskorištenju, strukturi farmaceutika, pH-vrijednosti vode, tvrdoći vode, dubini vode, te o koncentracijama pojedinih sastojaka vode [27, 28]. Ovakva razgradnja može biti djelomična ili potpuna, a rezultat su manje ili više stabilni i toksični kemijski spojevi.

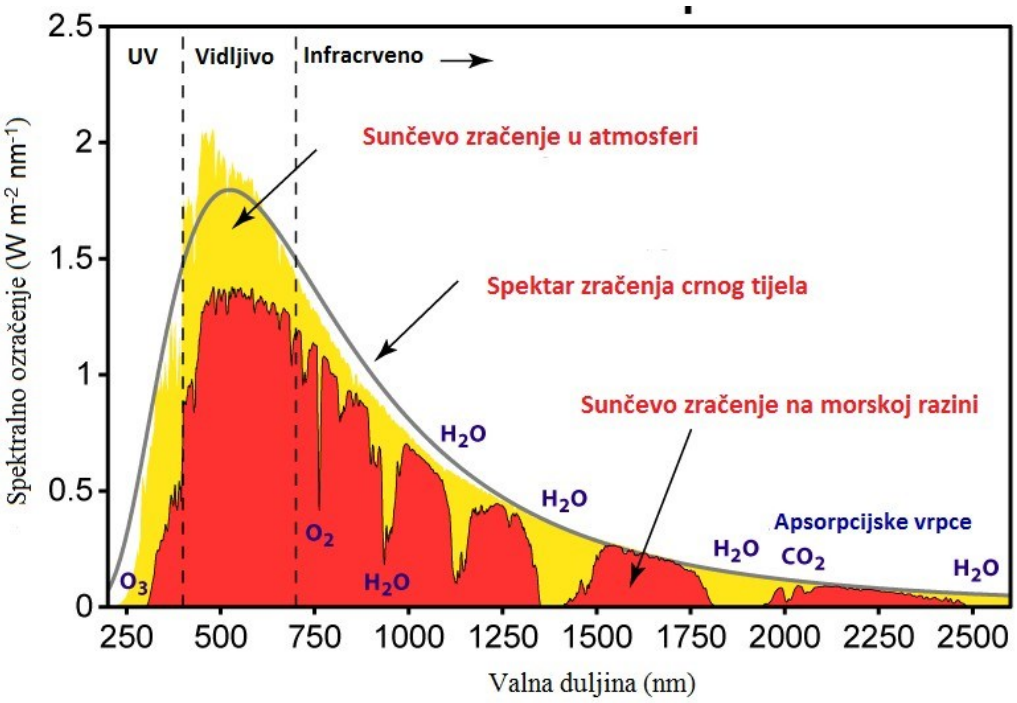
Sunce, odnosno Sunčevo zračenje koje dopire do Zemlje, glavni je izvor energije i života na našem planetu. Jačina tog zračenja razlikuje se ovisno o zemljopisnom položaju, klimatskim uvjetima, dobu godine, dana itd. Zračenje dolazi na Zemlju kao izravno i difuzno (raspršeno) (slika 6). Raspršenje se događa na česticama vode (oblaci) i prašine, te na molekulama plinova u atmosferi (Rayleighovo raspršenje). Udio difuznog zračenja veći je zimi nego ljeti.



Slika 6. Raspodjela Sunčevog zračenja u atmosferi

Za fotolizu farmaceutika značajno je prizemno Sunčevo zračenje, odnosno ono koje kroz atmosferu dospije do površine Zemlje. Ono je, naravno, slabije nego ekstraterestričko (zračenje na ulasku u Zemljinu atmosferu), jer se na putu kroz atmosferu izgubi od 25% do čak 50% energije zbog raspršenja i apsorpcije. Ukupna ozračenost uvelike ovisi o trajanju insolacije (sijanja Sunca), koje se mjeri heliografom. Trajanje insolacije, pak, jako ovisi o godišnjem dobu.

Spektar Sunčevog zračenja (slika 7), koje dolazi do Zemljine atmosfere, nalazi se u rasponu od 100 nm do oko 1 mm valne duljine.



Slika 7. Spektar Sunčevog zračenja

Da bi farmaceutik bio podložan fotolitičkoj razgradnji u okolišu, mora apsorbirati Sunčevu svjetlost, a kod farmaceutika tu sposobnost najčešće imaju aromatski prstenovi [29].

Fotolitička razgradnja može biti izravna ili neizravna. Kod izravne fotolize molekule apsorbiraju Sunčevo zračenje što dovodi do razgradnje molekule. Neizravna fotoliza uključuje tvari koje su prisutne u površinskim vodama (nitratni ioni, željezovi ioni, huminske kiseline, itd.) i koje apsorbiraju Sunčevu svjetlost, te prelaze u pobuđeno stanje stvarajući radikale

(singletni kisik, hidroksil i peroksi radikale) koji uzrokuju fotolitičku razgradnju farmaceutika [20, 30, 31].

Unatoč spoznaji da je fotoliza jedan od značajnijih procesa koji određuje sudbinu farmaceutika u okolišu, do sada nema puno istraživanja indirektne fotolize farmaceutika a još je manje istraživanja fotolitičke razgradnje njihovih metabolita. Ova istraživanja su potrebna da bi se jasno moglo utvrditi što se s njima događa. Vrlo je bitno razumjeti ponašanje farmaceutika u okolišu s obzirom da novi spojevi nastali procesima razgradnje mogu biti toksičniji od početnog spoja te mogu dovesti do negativnih utjecaja na prirodu i ljude.

2.5.2.1. Kinetika fotolitičke razgradnje farmaceutika u okolišu

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

$$\frac{d[c]}{d[t]} = k[c] \tag{1}$$

gdje je c koncentracija početnog spoja, t je vrijeme provođenja eksperimenta, a k konstanta brzine reakcije. Integriranjem izraza (1) dobije se izraz:

$$\ln\frac{c_t}{c_0} = k \cdot t \tag{2}$$

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

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

$$t_{1/2} = \frac{ln2}{k} \tag{3}$$

2.5.3. Hidrolitička razgradnja farmaceutika

Hidroliza je jedan od dva glavna abiotička procesa razgradnje farmaceutika. Važna je osobito za one koji su otporni na razgradnju mikroorganizmima. Ovakva razgradnja podrazumijeva cijepanje kovalentnih veza složenih molekula u reakciji s vodom, pri čemu se vodikovi i hidroksilni ioni spajaju s nastalim produktima. Odvija se uz djelovanje kiselina, lužina ili enzima prema kemijskoj reakciji:

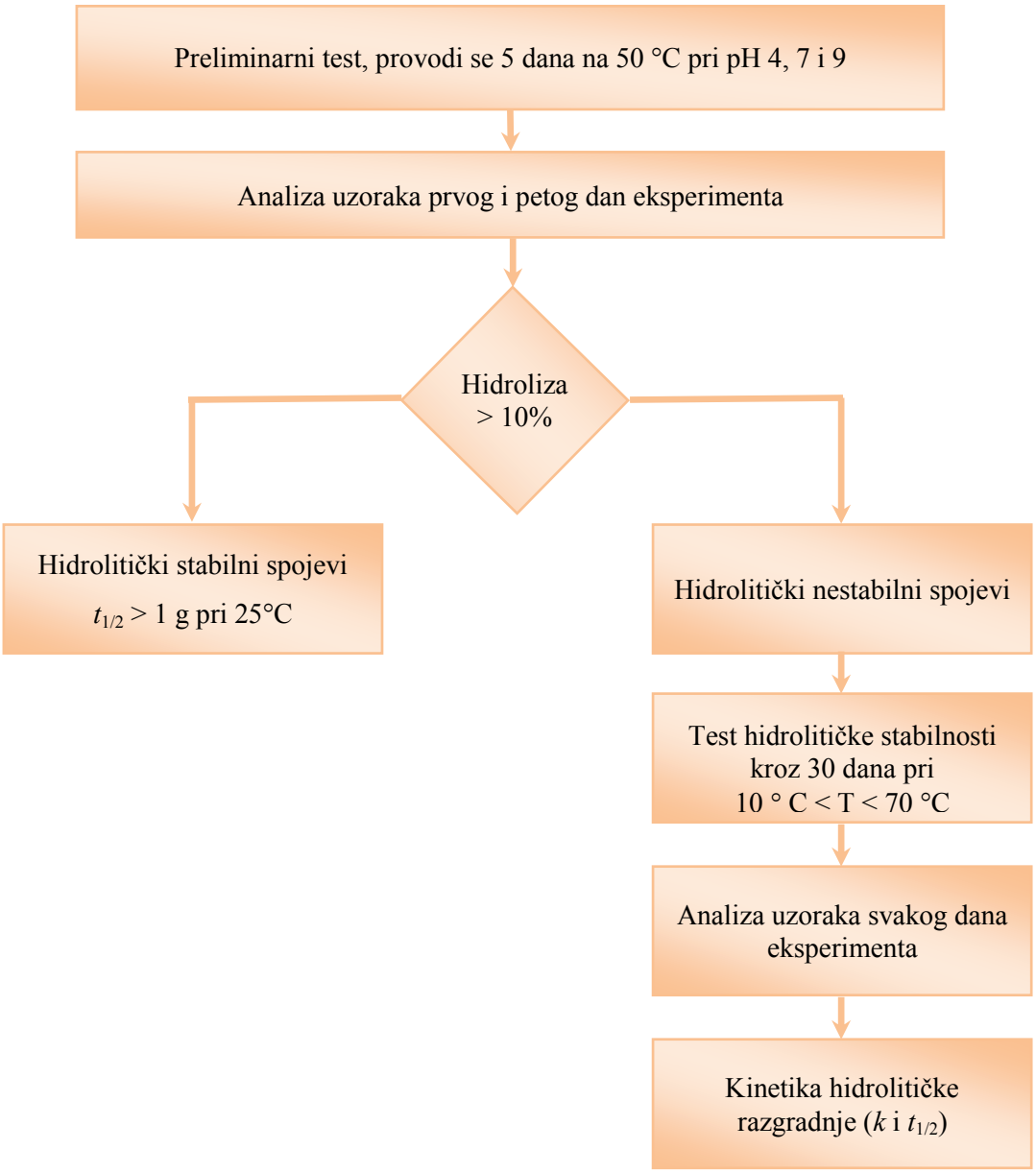
$$\mathrm{AB} + \mathrm{HOH} \leftrightarrow \mathrm{AH} + \mathrm{BOH} \tag{4}$$

gdje HOH predstavlja vodu, AB ispitivani kemijski spoj, a A i B njegove kemijske skupine [23].

Hidroliza je jedan od važnih fizioloških procesa i u organizmu, gdje se, uz djelovanje enzima, bjelančevine razgrađuju na aminokiseline a složeni ugljikohidrati na glukozu i slično. Hidroliza se odvija i u mnogim procesima kemijske industrije, poput proizvodnje polivinil-alkohola ili u takozvanoj reakciji saponifikacije, gdje hidrolizom estera nastaju alkoholi i karboksilne kiseline. Iako se smatra da je to najčešća kemijska reakcija kojom se farmaceutici razgrađuju u okolišu, vrlo je malo literaturnih podataka o njihovoj hidrolitičkoj stabilnosti [34].

Poznati su znanstveni radovi o hidrolitičkoj stabilnosti antibiotika sulfonamida. Znanstvena istraživanja su pokazala da je hidroliza sulfonamida najuspješnija kod pH 4, dok su kod pH 9 hidrolizirali manje od 10%. Nakon izračunavanja vremena poluraspada, zaključeno je da bi na 25 °C sulfonamidi bili stabilni čak godinu dana. Takvo ponašanje bi se moglo objasniti prisutnošću anionskog oblika sulfonamida u lužnatom mediju, koji je manje osjetljiv na hidrolizu od neutralnog ili kationskog oblika. Ovo istraživanje pokazalo je i da je devet od dvanaest ispitanih sulfonamida stabilno pri pH 7, a samo dva pri pH 4, te da se brzina hidrolize ispitivanih tvari povećava s povišenjem temperature [34]. Za razliku od sulfonamida hidrolitička razgradnja se pokazala značajnom kod primjerice penicilina gdje dolazi do otvaranja β-laktamskog prstena [25].

Prema preporukama Europske agencije za medicinu (EMEA) i američke Uprave za hranu i lijekove (FDA), laboratorijska ispitivanja promjena u strukturama farmaceutika, njihove razgradnje ili identifikacije produkata razgradnje (pri različitim temperaturama i pH-vrijednostima) trebala bi se provoditi prema OECD postupku 111 koji je shematski prikazan na slici 6 [34].



Slika 8. Shema procedure OECD 111 [34]

Stupanj hidrolize (S, %) može se izračunati iz jednadžbe:

$$S\ (\%) = \frac{c_0 - c_t}{c_0} \cdot 100 \tag{5}$$

gdje je c_0 početna koncentracija spoja, c_t je koncentracija u određenom vremenu (t) za eksperimente pri određenoj temperaturi i pH-vrijednosti.

2.5.3.1. Kinetika hidrolitičke razgradnje farmaceutika u okolišu

Proučavanjem kinetike reakcije hidrolize moguće je odrediti brzinu razgradnje farmaceutika i vrijeme unutar kojeg će se razgraditi pola od početne količine ispitivanog spoja, tzv. vrijeme poluraspada. Kao i kod fotolitičke razgradnje, hidrolitička razgradnja farmaceutika pripada reakciji prvoga reda koja pretpostavlja da se koncentracija ispitivanog spoja smanjuje proporcionalno s vremenom prema jednadžbi (1). Konstantu brzine reakcije možemo odredi se iz jednadžbe pravca (jednadžba (2)), kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c_t/c_0)$ o vremenu (t). Dok je vrijeme poluraspada moguće odrediti iz izraza (3).

2.6. Tekućinska kromatografija

Kromatografiju je izumio ruski botaničar Cvet početkom 20. stoljeća, kada ju je primijenio za odjeljivanje otopine biljnih pigmenata klorofila i ksantofila prolaskom kroz staklenu kolonu napunjenu usitnjenim kalcijevim karbonatom. Odijeljeni sastojci vidjeli su se na koloni kao obojene vrpce po kojima je onda tehnika dobila ime (grč. *chroma* = boja i *graphein* = pisati). Kromatografske tehnike korist se za odjeljivanje, identifikaciju i kvantitativno određivanje kemijskih sastojaka u složenim smjesama. To je zbirni naziv za sve tehnike razdvajanja sastojaka smjesa u kojima se ono temelji na raspodjeli između pokretne i nepokretne faze.

Kromatografske tehnike dijele se prema agregatnom stanju pokretne faze, prema mehanizmima koji se odvijaju i prema izvedbenoj tehnici. S obzirom na agregratno stanje pokretne faze postoje tekućinska, plinska i fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima.

S obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze, kromatografske se tehnike mogu podijeliti na:

- razdjelnu kromatografiju pri kojoj se ravnoteža uspostavlja između dviju kapljevina,
- adsorpcijsku kromatografiju u kojoj se ravnoteža uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze,
- afinitetnu kromatografiju kod koje se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a vezanje nastaje zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze,
- kromatografiju isključenjem u kojoj je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvom, a razdvajanje se zbiva zbog razlike u molekularnoj masi i obujmu.

Tekućinska kromatografija (eng. *liquid chromatography*, LC) je analitička tehnika razdvajanja komponenata smjese, pri čemu se tvari razdvajaju razdiobom između dvije faze - nepokretne i pokretne tekuće faze. Tekućinska kromatografija može biti u koloni ili na ravnoj plohi.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je suvremena analitička tehnika, vrsta kromatografije na stupcu koja se koristi za razdvajanje komponenti smjese na temelju kemijsko-fizikalnih interakcija između analita koji se analiziraju te tekuće pokretne faze i čvrste nepokretne faze u stupcu. Ovaj oblik kromatografije pogodan je za razdvajanje komponenti smjese koje se zbog niske hlapljivosti ili toplinske nestabilnosti ne mogu analizirati plinskom kromatografijom.

Princip rada HPLC-a je prolazak analizirane tvari ili smjese tvari kroz kolonu (nepokretnu fazu) pumpanjem otapala (pokretne faze) pod visokim tlakom. Mali volumen uzorka unosi se u tok pokretne faze i na temelju specifičnih kemijskih i fizikalnih interakcija dolazi do različitog zadržavanja komponenti smjese. Svaka molekula u kromatografskoj koloni prolazi kroz niz slučajnih koraka sorpcije i desorpcije. Kada molekule prelaze iz jedne faze u drugu preskaču energetsku barijeru pri čemu im je potrebna određena energija. Molekule lakše prelaze energetsku barijeru ako se nalaze u pokretnoj fazi, jer je veza između molekula i pokretne faze uglavnom slabija od veze s nepokretnom fazom. Veličina zrnaca sorbensa nepokretne faze je vrlo bitna, manja zrnca imaju veću aktivnu površinu, ali kroz njih teže prolazi pokretna faza. Temperatura također utječe na razdvajanje na način da viša

temperatura povećava difuzivnost uzorka i smanjuje viskoznost pokretne faze, pa su kinetički parametri bolji. Optimizacija protoka pokretne faze može poboljšati razdvajanje i skratiti vrijeme zadržavanja. Brzina pokretne faze je važan parametar, ako je prevelika nastaju turbulencije i moguće je da se molekule ne uspiju vezati za nepokretnu fazu, a ako je premala, disperzija molekula nastaje i zbog djelovanja difuzije [36].

Potrebno je definirati nekoliko parametara koji su bitni za kvalitetu raspodjele analiziranog uzorka:

- ✓ vrijeme zadržavanje (t_R) - vrijeme od unošenja uzorka u kolonu do pojave sastojka u detektoru smještenom na izlasku iz kromatografske kolone

$$t_R = t_m + t_{R'} \tag{6}$$

gdje je t_m zadržano vrijeme , a $t_{R'}$ vrijeme zadržavanja koje otopljena tvar provede vezana za nepokretnu fazu,

- ✓ zadržano vrijeme (t_M) - vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz nju, tj. vrijeme koje prođe od trenutka unošenja tvari do trenutka njezine detekcije
- ✓ separacijski faktor (α) - pokazuje moć odjeljivanja sastojaka na koloni (uvijek je veći od 1)

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} \tag{7}$$

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

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

$$R_S = \frac{2[t_{RB} - t_{RA}]}{w_A + w_B} \tag{8}$$

gdje je t_{RB} vrijeme zadržavanja jedne komponente, t_{RA} druge, a w_A i w_B su bazne širine pikova prve i druge komponente.

Vrijeme zadržavanja ovisi o prirodi tvari koja se analizira, nepokretnoj fazi i sastavu pokretne faze. Pokretna faza može biti voda, pufer, organsko otapalo (npr. metanol, acetonitril) ili smjesa otapala, pri čemu je bitno da otapala budu visoke čistoće. Eluiranje

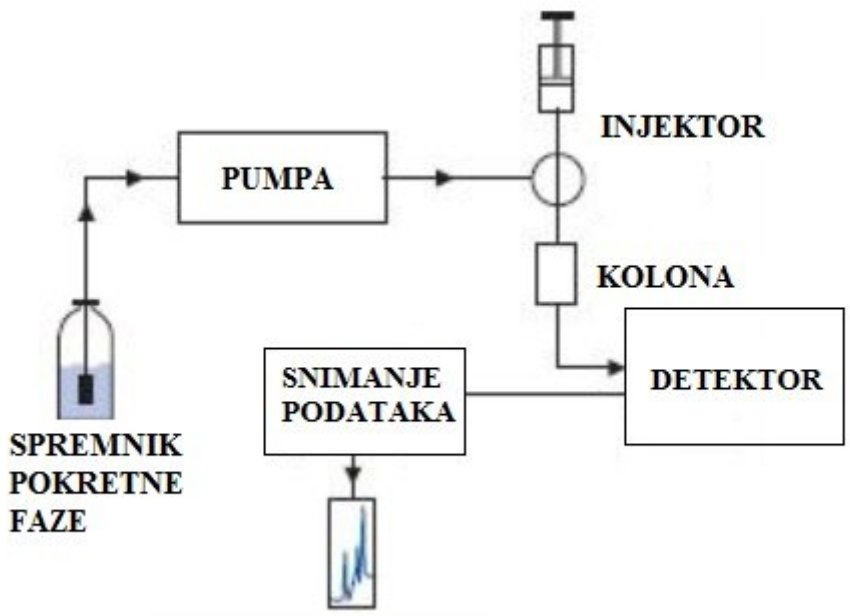
pokretnom fazom može biti izokratno (sastav pokretne faze je cijelo vrijeme isti) ili gradijentno (sastav pokretne faze se mijenja tijekom kromatografskog procesa). Kod gradijentnog eluiranja otapala se moraju potpuno miješati prije ulaska u kolonu. Zbog različitih svojstava otapala može doći do razvijanja plinova, pa postoje odjeljci za miješanje i degaziranje [36].

Uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografske separacije ovisi o duljini kolone, promjeru čestica punjenja, radnom tlaku i temperaturi.

Nakon prolaska kroz kolonu, uzorak dolazi na detektor koji prati svojstva uzorka i na taj način moguće je provesti kvalitativnu i kvantitativnu analizu. Detektori mogu biti UV, spektrometri masa, florescentni, elektrokemijski i slično. Glavna svojstva detektora koja bi svi trebali imati jesu osjetljivost, ponovljivost i stabilnost. Brzi odziv neovisno o protoku i što manja širina kromatografske zone željene su karakteristike detektora.

Glavne komponente svakog uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti su spremnik pokretne faze, pumpa, injektor, kolona i detektor te računalo za prikaz podataka (slika 9) [36]:

- *Spremnik pokretne faze* omogućuje skladištenje dovoljnog volumena otapala za kontinuirani rad sustava (minimalno 500 mL). Cjevčica koja povezuje spremnik i crpku trebala bi imati filter kako bi se spriječilo unošenje čestica iz spremniku u crpku.
- *Pumpa* omogućuje konstantan i kontinuiran protok pokretne faze kroz sustav. Budući da vrlo male čestice u kromatografskoj koloni pružaju otpor pokretnoj fazi, potrebne su pumpe koje rade pri visokim tlakovima. U HPLC sustavima se uobičajeno koriste pumpe s konstantnim protokom. Budući da je pokretna faza najčešće kombinacija dva ili više otapala u različitom omjeru, pumpe omogućuju njihovo kontrolirano miješanje.
- *Injektor* automatski unosi uzorak u struju pokretne faze prije samog ulaska u kromatografsku kolonu.
- *Kromatografsku kolonu* predstavlja metalna cijev unutar koje je smještena nepokretna faza. Dimenzije kromatografske kolone mogu biti različite: 100 – 250 mm duljine, 2,1 – 4,6 mm unutrašnjeg promjera te 3 – 5 μm promjera čestica [39].
- *Detektor* je zadnji dio uređaja, a služi za mjerenje promjena svojstava pokretne faze ili specifičnog svojstva analita.



Slika 9. Shematski prikaz osnovnih dijelova uređaja za tekućinsku kromatografiju visoke djelotvornosti

Ovisno o relativnoj polarnosti pokretne i nepokretne faze moguća je kromatografija normalnih i obrnutih faza.

Kromatografija normalnih faza

Razdvajanje smjese spojeva kod kromatografije normalnom fazom ovisi o interakcijama polarnog analita s polarnom nepokretnom fazom, a pokretna faza je nepolarna. U tom slučaju se homologni ili izomerni spojevi s istom funkcionalnom grupom i sličnim mehanizmom interakcije ne mogu razdvojiti, a nepolarni spojevi bez polarnih funkcionalnih grupa vrlo slabo se zadržavaju na nepokretnoj fazi. Kao nepokretna faza uglavnom se upotrebljava silikagel, a ponekad i aluminijev oksid. Pokretna faza je sustav organskih otapala, kojemu se prema potrebi dodaju voda ili elektroliti zbog podešavanja polarnosti. Na taj način mogu se razdvojiti lipofilni spojevi - ulja, masti i lipidi [36].

Kromatografija obrnutih faza

Kromatografija obrnutih faza uključuje nepolarnu nepokretnu i polaru pokretnu fazu. Koristi se u razdvajanju homolognih i izomernih spojeva slične polarnosti, ali i vrlo polarnih i ioniziranih spojeva koji se zbog vrlo čvrste veze s nepokretnom fazom ne mogu razdvojiti

kromatografijom normalnih faza. Većina biokemijskih spojeva mogu se razdvojiti ovom tehnikom. Nepokretna faza se temelji na silikagelu, ali se zbog smanjivanja njegove polarne moći modificira vezanjem alkilne, arilne, amino, cijano, nitro ili diolne skupine. Pokretna faza je smjesa vode i polarnog organskog otapala (metanola, acetonitrila, tetrehidrofurana). Izbor otapala ovisi o njegovoj moći eluiranja analita, što je povezano s viskoznošću, dielektričnom konstantom i proton-akceptorskim, tj. proton-donorskim svojstvima [36].

2.7. Spektrometrija masa

Vezanjem spektrometra masa s tekućinskom kromatografijom omogućilo je analiziranje složenih uzoraka razdvajanjem i određivanjem pojedinih sastojaka uzorka. Vezani sustav tekućinska kromatografija - spektrometrija masa (engl. *mass spectrometry*, MS) je analitička tehnika koja omogućava kvalitativnu i kvantitativnu analizu organskih i anorganskih tvari, spojeva i smjese spojeva. Prednosti HPLC-MS sustava su niska granica dokazivanja, dobra ponovljivost i mogućnost odvajanja pozadinskog signala (interferencija) od željenog analita. U spektrometru masa neutralne molekule se nabijaju, razdvajaju prema omjeru mase i naboja (*m/z*) i zatim se detektiraju. Grafički prikaz rezultata analize je intenzitet u ovisnosti o *m/z* omjeru.

Spektrometar masa sastoji se od injektora, vakuumskog sustava u kojem je izvor iona, jednog ili više analizatora i sustava za prikupljanje i detekciju iona. Uzorak se injektira u zagrijani spremnik. Tekući uzorak se uparava, čvrsti uzorak ako nije podložan raspadanju injektira se direktno, a plinovi se ne moraju zagrijavati. Upareni uzorak se ionizira, razdvaja i dolazi na detektor. Nakon toga slijedi računalna obrada podataka kako bi se dobile željene informacije [37, 38].

2.7.1. Ionizacija uzorka

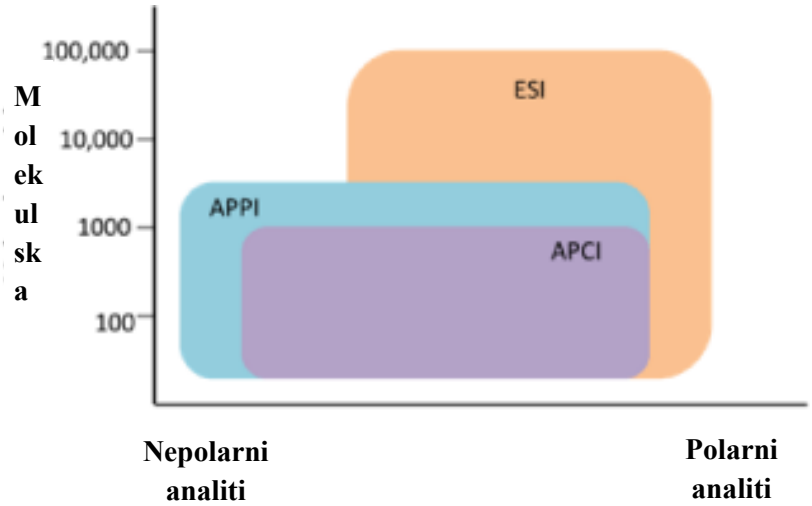
Prvi korak u detekciji analita spektrometrijom masa je ionizacija u parnoj fazi. Ionizacija se odvija izvan vakuumske komore spektrometra masa i gotovo istovremeno dolazi do uparavanja i ionizacije uzorka. Otopina analita prolazi kroz kapilaru i zbog razlike potencijala vrha kapilare i nasuprotne elektrode nastaje fini sprej nabijenih kapljica otopine

analita. Pri velikim protocima ne dolazi do nastanka kapljica, pa se u sustav uvodi dušik koji osigurava stalan nastanak kapljica. Uzorak se približavanjem elektrodi uparava. Ioni se desorbiraju s površine u plinovitu fazu ili se odvoje od molekule uparavanjem. Dolazi do cijepanja nabijenih kapljica i iona analita koji nakon toga dolaze na detektor [37, 38]. Načini ionizacije dijele se prema svojstvu uzorka koji se analizira.

Za hlapljive uzorke: ionizacija elektronima (engl. *electron ionization,* EI), kemijska ionizacija (engl. *chemical ionization*, CI), ionizacija fotonima (eng. *photoionization*, PhI) i ionizacija u polju (engl. *field ionization*, FI). CI i PhI provode se i pri atmosferskome tlaku (eng. *atmospheric pressure chemical ionisation*, APCI i eng. *atmospheric pressure photo-ionisation*,APPhI).

Za nehlapljive uzorke: ionizacija raspršenjem i desorpcija s površina: elektroraspršenjem (engl. *electrospray ionization*, ESI), djelovanjem čestica visoke energije (engl. *fast atom bombardment*, FAB; engl. *secondary ion mass spectrometry*, SIMS), toplinskim raspršenjem (engl. *thermospray ionization*, TSP) i laserom (engl. *laser ionization mass spectroscopy*, LIMS; engl. *matrix-assisted laser desorption ionization*, MALDI).

Primjenjivost nekih tehnika ionizacije ovisno o polarnosti i molekulskoj masi analita prikazana je na slici 10.



Slika 10. Primjenjivost tehnika ionizacije u spektrometriji masa

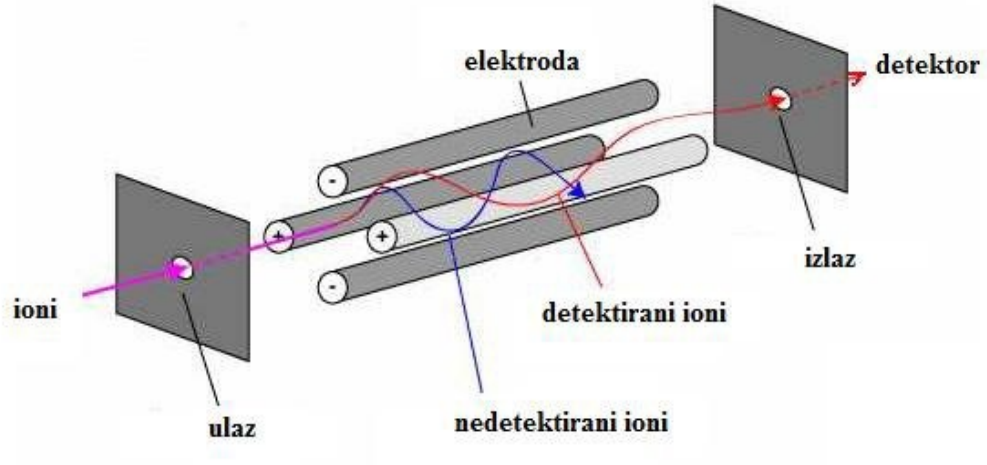
Ionizacija može biti mekša - kada je fragmentacija molekula manja, zanemariva ili je nema- ili tvrđa, kada ionizacijom dolazi do pucanja kovalentnih veza u molekuli i do stvaranja većega broja fragmentnih iona (slika 11).

Slika 11. Usporedba nekih tehnika ionizacije analita u spektrometriji masa [38]

2.7.2. Analizator masa

Nakon uređaja za ionizaciju uzorka slijedi analizator masa, u kojem se čestice razdvajaju zbog svojih karakteristika. Postoji analizator koji mjeri vrijeme preleta (engl. *time of flight*, TOF), magnetni (sektorski), kvadripolni analizator masa, ionska klopka (engl. *ion trape,* IT) i ionsko-ciklotronski rezonantni (engl. *ion cyclotron resonance,* ICR) analizator.

Kvadripolni analizator masa (slika 12) izgrađen je od 4 paralelne elektrode. Suprotne elektrode su povezane s istosmjernim izvorom struje i naponom radiofrekvencije zbog čega ioni mogu izlaziti iz kvadripola svojim specifičnim putanjama. Samo određeni ioni rezoniraju kvadripolnom frekvencijom, dok ostali ioni izvan rezonancije nemaju stabilnu putanju i ne dolaze do detektora. Analizator masa razdvaja ione na temelju omjera *m/z* tako da se računa razlučivanje $R\ (\Delta m/m)$ i moć razlučivanja $RP\ (m/\Delta m)$. Razlučivanje je vrlo bitno za detekciju sličnih kemijskih tvari i o tome ovisi točno mjerenje omjera *m/z* i sposobnost detekcije. Kod komponenti bliske mase, ali različite strukturne formule, naboj iona se procjenjuje prema razmaku pikova. Razmak pika je obrnuto proporcionalan naboju (*z*). Dakle, ako su pikovi udaljeni za 1 *m/z*, ion ima jedan naboj, a ako je udaljenost manja od 1 *m/z* ion ima više naboja. [31]. Glavne prednosti kvadripolnog analizatora su brzina, pristupačnost cijenom i to što nije potrebno stvarati niske tlakove kao kod analizatora s magnetskim sektorom. Negativno je to što moć razdvajanja iona opada s porastom relativne molekulske mase.



Slika 12. Kvadripolni analizator masa [40]

Analizator vremena preleta (engl. *time of flight,* TOF) (slika 13) temelji se na pravilu da brzina iona ovisi o masi iona. Svi ioni koji ulaze u analizator imaju različitu brzinu koja ovisi o njihovoj masi; manji ioni imaju veću brzinu, a veći ioni manju brzinu. Do separacija iona dolazi s obzirom na brzinu iona koji dolaze na detektor u različitim vremenima. Ioni mogu ući aksijalno ili ortogonalno u analizator (engl. *pusher*), on ih sakuplja u određenom vremenu, te zatim istovremeno otpušta, a u trenutku otpuštanja uključuje se mjerenje vremena leta do detektora. Vrijeme leta iona od *pushera* do detektora je između 5-100 μs. Analizatori TOF mogu imati ugrađeno ionsko ogledalo (engl. *reflectron, ion mirror*), koje omogućava da ioni istih masa, a različitih E_k, dođu istovremeno do detektora. Analizatori TOF često se hibridiziraju s kvadripolnim analizatorima, što im daje mogućnost analiza MS/MS. Jednadžbe kojima se može opisati način mjerenja mase u TOF-u:

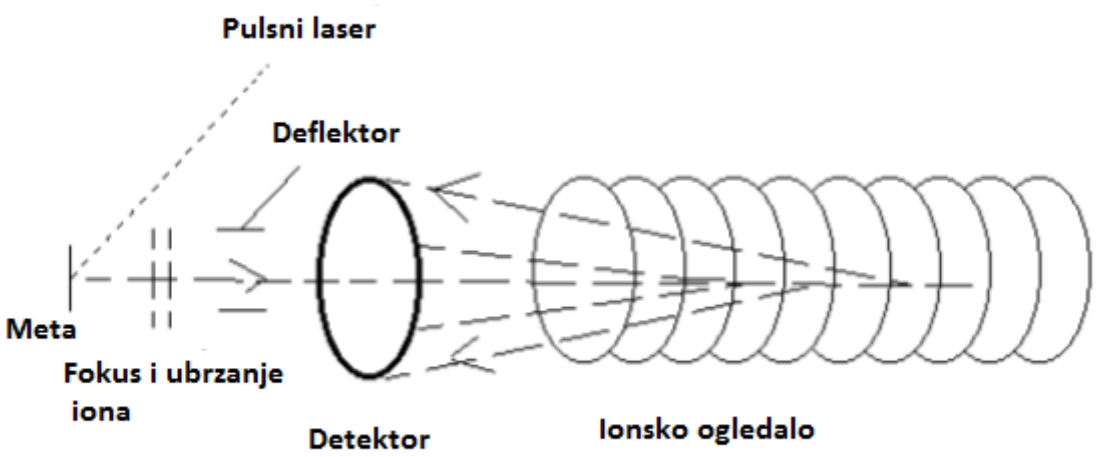
$$\frac{mv^2}{2} = qV \tag{9}$$

$$q = ze \tag{10}$$

$$t = \frac{d}{v} \tag{11}$$

$$\frac{m}{z} = t^2 \frac{(2Ve)}{d^2} \tag{12}$$

pri čemu je m masa iona, v brzina iona, V_e napon, q naboj iona, z ionski broj, e elementarni naboj, d duljina cijevi i t vrijeme leta. Ako pretpostavimo da su napon i duljina cijevi konstantni, m/z ovisi jedino o vremenu leta iona. Da bi se moglo izmjeriti vrijeme leta iona, mora se na samom početku analizatora primijeniti pulsno električno polje koje ima ulogu sakupljanja i guranja iona u analizator u kratkim pulsevima. Rezolucija TOF instrumenata ne prelazi 20.000, na što najveći utjecaj imaju vrijeme formiranja iona, prostorna raspodjela i raspodjela po E_k [32] .



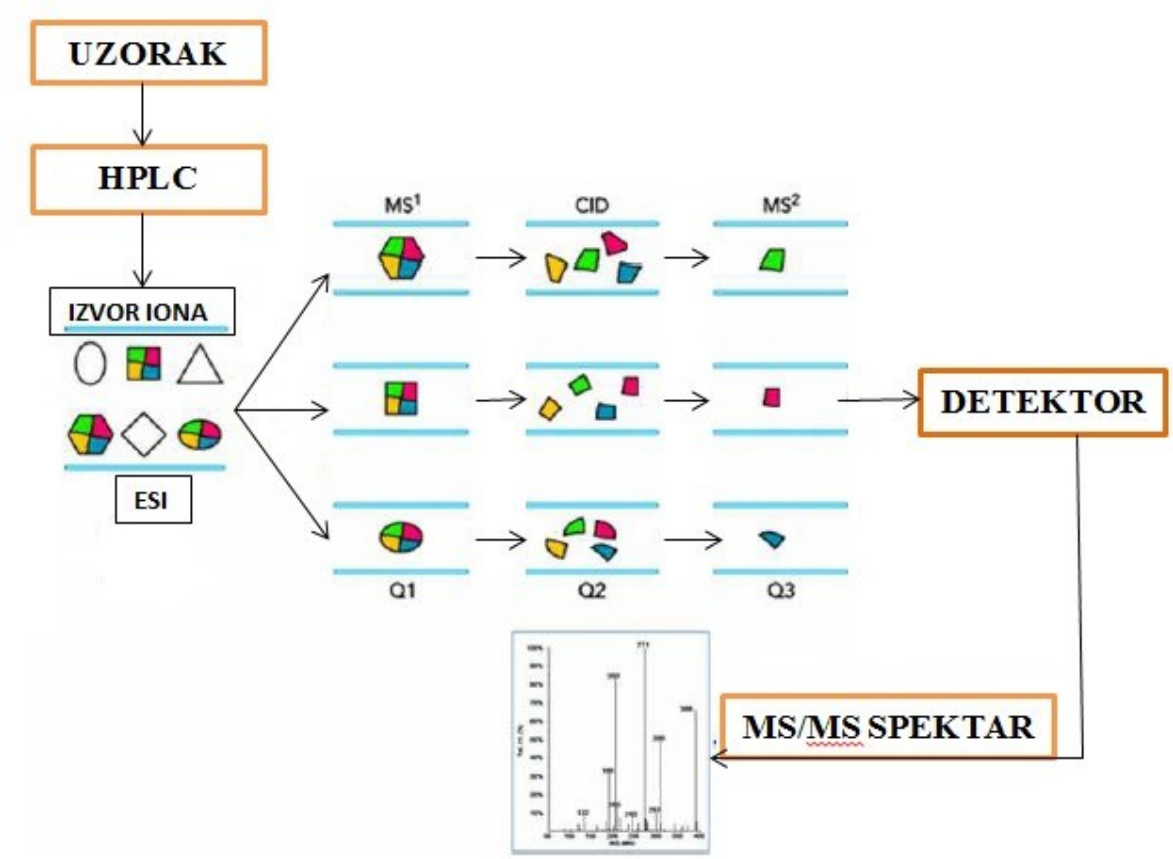
Slika 13. Analizator vremena preleta [41]

2.7.3. Spregnuta spektrometrija masa (MS/MS)

Serijski vezanim spektrometrima masa (MS/MS) moguće je odrediti ionske strukture, energetske i kinetičke interakcije iona s plinovima, fotonima, ionima i elektronima. Najčešće se koristi u farmaceutskoj industriji, istraživačkim ustanovama i kliničkim laboratorijima. Glavne prednosti su velika osjetljivost, manji broj koraka pripreme uzorka, poboljšana separacija, mogućnost dodatne fragmentacije iona i pouzdana kvantifikacija analita pri vrlo niskim koncentracijama [31].

Kod vezanog spektrometar masa središnji stacionarni kvadripol je omeđen s dva prijenosna. Takav razmještaj omogućuje kontroliranu fragmentaciju iona u drugom

kvadripolu. Prije svega, potrebno je odabrati primarni ion iz analita, a taj proces počinje već u izvoru ionizacije jer odabir parametara utječe na količinu iona željenog analita. Nadalje, primarni ion se odabire na prvom kvadrupolu (MS^1) prema omjeru mase i naboja (*m/z*), a drugi ioni koji imaju drugu vrijednost omjera ne prolaze kroz daljnje procese analize. Odabrani primarni ion se razgrađuje u nizu reakcija na drugom kvadripolu (eng. *collision-induced dissociation*, CID - sudarima izazvana disocijacija), dešava se fragmentacija iona. Treći kvadripol (MS^2) omogućava selektivan prolazak samo određenih fragmenata do detektora [37, 38]. Na slici 14 prikazan je vezani sustav HPLC-MS/MS s uvećanim prikazom spregnute spektrometrije masa.



Slika 14. Koraci HPLC analize s dvostrukim spektrometrom masa (HPLC-MS/MS) [38]

Povezivanje HPLC uređaja i MS analizatora masa omogućilo je analizu velikog broja spojeva kao što su nestabilni analit s visokom molekulskom masom, koje nije moguće analizirati s drugim uređajima. Široki izbor nepokretnih i pokretnih faza te detaljna kontrola uvjeta pri analizi omogućava još širu upotrebu ovih analitičkih uređaja.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Popis kemikalija korištenih tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada, njihove molekulske formule, čistoća te proizvođači prikazani su u tablici 1.

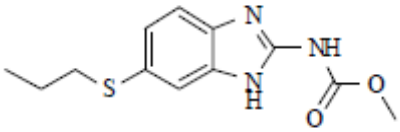
Tablica 1. Popis korištenih kemikalija

Naziv	**Molekulska formula**	**Čistoća**	**Proizvođač**
Kalijev monofosfat	KH_2PO_4	p.a.	Kemika, Hrvatska
Dikalijev fosfat	K_2HPO_4	p.a.	Kemika, Hrvatska
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Lachner, Hrvatska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Borna kiselina	H_3BO_3	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Limunska kiselina	$C_6H_8O_7$	p.a.	Gram-Mol, Hrvatska
Natrijev klorid	NaCl	p.a.	Alkaloid, Makedonija
Natrijev fosfat	$Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev nitrat	$NaNO_3$	p.a.	Kemika, Hrvatska
Natrijev sulfat	Na_2SO_4	p.a.	Zorka Šabac, Srbija
Mravlja kiselina	HCOOH	p.a.	Orka Lab, Hrvatska
Acetonitril	CH_3CN	p.a.	Kemika, Hrvatska

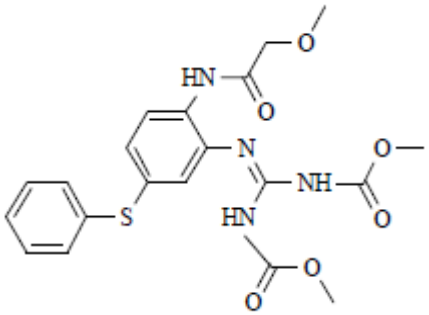
3.1.2. Farmaceutici

U ovom radu ispitana je fotolitička i hidrolitička razgradnja atihelminitka albendazola (ALB), febantela (FEBA) i prazikvantela (PRAZI). Popis farmaceutika i njihova fizikalno-kemijska svojstva prikazani su u tablicama 2, 3 i 4.

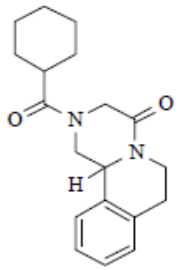
Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva albendazola

Generičko ime	Albendazol (ALB)
CAS broj	54965-21-8
Naziv po IUPAC-u	metil N-[6-(propilsulfanil)-1H-1,3-benzodiazol-2-il] karbamat
Molekulska formula	$C_{12}H_{15}N_3O_2S$
Strukturna formula	
Molarna masa, g/mol	265,33
Konstante	Log *K*ov=3,07 Log *K*oc=2,939 *K*oc=*869,2 L/kg* Točka tališta=209 °C *S*(voda)=*4,402 mg/L*
Proizvođač	Veterina
Čistoća	99%

Tablica 3. Fizikalno-kemijska svojstva febantela

Generičko ime	Febantel (FEBA)
CAS broj	58360-30-2
Naziv po IUPAC-u	N-[-[2,3-bis-(methoxycarbonyl)-guanido]-5-(phenylthio)-phenyl]-2-methoxyacetamide; Dimethyl [2-[2-(2-methoxyacetamido)-4-(phenylthio)phenyl] imidocarbonyl] dicarbamate
Molekulska formula	$C_{20}H_{22}N_4O_6S$
Strukturna formula	
Molarna masa, g/mol	446,48
Konstante	Log *K*ov=1,53 Log *K*oc=1,4468 *K*oc=27,98 L/kg Točka tališta=258,19 °C *S*(voda)=76,92 mg/L
Proizvođač	Veterina
Čistoća	99%

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva prazikvantela

Generičko ime	Prazikvantel (PRAZI)
CAS No	55268-74-1
Naziv po IUPAC-u	(RS)-2-(Cyclohexylcarbonyl) - 1,2,3,6,7,11b hexahydro-4H-pyrazino (2,1-a)isoquinolin-4-one
Empirijska formula	[$C_{19}H_{24}N_2O_2$]
Strukturna formula	
Molarna masa, g/mol	312,41
Konstante	Log K_{ov}=2,42 Log K_{oc}=2,1689 K_{oc}=147,6 L/kg Točka tališta=202,39 °C S(voda)=72,21 mg/L
Proizvođač	Veterina
Čistoća	≥99 %

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument koji se koristi za precizno određivanje mase tvari, a o njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata mjerenja. Najrašireniji tip analitičke vage je vaga nosivosti 100 g i osjetljivosti 0,1 mg. Kvantitativnu kemijsku analizu nije moguće napraviti bez njezine upotrebe jer uvijek je potrebno odvagati uzorak za analizu i odgovarajuće količine reagensa za pripravu otopina, bez obzira na metodu koja se koristi.

U ovom radu korištena je analitička vaga XS204 DeltaRange proizvođača Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska) prikazana na slici 15, slijedećih specifikacija:

- maksimalni kapacitet: 220 g
- očitanje: 0,1 mg
- minimalna odvaga (U=1%, s=2): 8 mg
- područje tare: 0 – 220 g
- linearnost: 0,2 mg
- ponovljivost pri maksimalnom kapacitetu (s): 0,1 mg

Slika 15. Analitička vaga XS204 DeltaRange, Mettler Toledo

3.2.2. pH-metar

pH-metar je uređaj za potenciometrijsko određivanje pH-vrijednosti, koji se sastoji od elektrode koja mjeri pH-vrijednost kao aktivnost vodikovih iona koji okružuju njezin okrugli završetak. Elektroda proizvodi malu voltažu (oko 0,06 V po jedinici pH) što se mjeri i prikazuje kao pH-vrijednost pomoću pH-metra. pH-metar je elektronički instrument koji se koristi za mjerenje pH-vrijednosti (kiselosti ili bazičnosti) tekućih uzoraka (iako postoje posebni uređaji pomoću kojih je moguće mjerenje pH-vrijednosti u polukrutim tvarima). Prije mjerenja pH-vrijednosti uređaj je potrebno umjeriti s puferima poznatih pH vrijednosti (pH 4 i pH 7). Za određivanje pH-vrijednosti pufera korišten je pH–metar S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) prikazan na slici 16. Specifikacije korištenog pH-metra: raspon vrijednosti: 0 – 14, rezolucija: 0,01 pH i -temperaturni raspon: 5 ºC - 105 ºC.

Slika 16. pH-metar S20 SevenEasy

3.2.3. Suntest CPS+

Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht, Njemačka), prikazan na slici 17, je uređaj koji služi za osvjetljavanje uzoraka umjetnim Sunčevim zračenjem u rasponu valnih duljina 300 - 800 nm. Izvor umjetnog Sunčeva zračenja je ksenonska lampa. Parametri koji se mogu podešavati su temperatura, intenzitet lampe i vrijeme izlaganja uzorka Sunčevu zračenju.

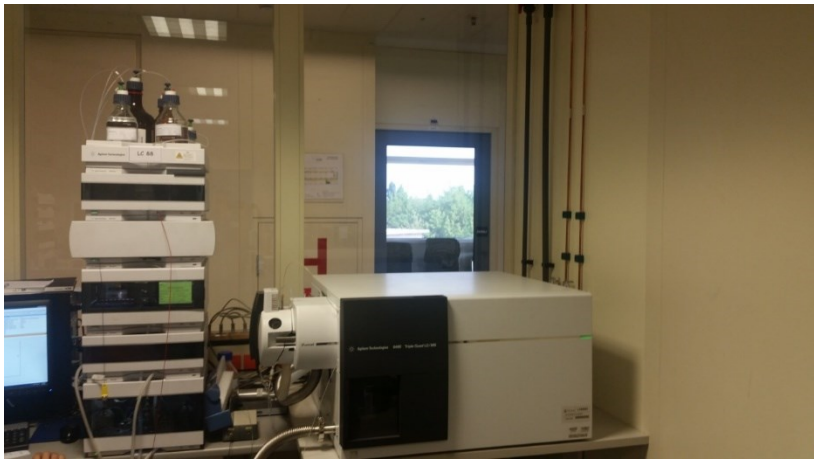
Slika 17. Suntest CPS+

3.2.4. Tekućinski kromatograf vezan sa spektrometrom masa

Analiza uzoraka albendazola i febantela provedena je na UHPLC Agilent Series 1290 uređaju koji ima vakuumski degazer, automatski dodavač uzorka, termostat i binarnu pumpu. Korištena je kolona Agilent punjena s C18 sorbensom Agilent SB-C18. Dimenzije kolone su 50 x 2,1 mm a promjer čestica unutar kolone je 1,8 µm. Za kvantitativnu analizu korišten je UHPLC uređaj spojen sa spektrometarom masa Agilent 6490 Triple Quad MS (slika 18) kojim su detektirani analiti. Ionizacija uzorka provedena je elektroraspršenjem u pozitivnom modu. Za identifikaciju razgradnih produkata ispitivanih analita korišten je UHPLC uređaj spojen sa spektrometrom masa Agilent 6550 QTOF MS (slika 19).

Analiza uzoraka prazikvantela provedena je na sustavu tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti vezane sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom (HPLC-MS/MS). Korišten je HPLC kromatograf Agilent (Santa Clara, CA, SAD) Series 1200 koji se sastoji od vakumskog degazatora, automatskog dodavača uzoraka i binarne pumpe, i Agilent 6410 trostruki kvadripolni spektrometar masa (slika 20).

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa Mass Hunter.



Slika 18. UHPLC Agilent Series 1290 spojen sa spektrometarom masa 6490 Triple Quad MS

Slika 19. UHPLC Agilent Series 1290 spojen sa spektrometar masa 6550 QTOF MS

Slika 20. Agilent kromatografski sustav Series 1200 sa spektrometrom masa 6410 QqQ

3.3. Metoda rada

3.3.1. Priprema otopina pufera

Za praćenje hidrolize febantela, prazikvantela i albendazola korištene su otopine pufera pH-vrijednosti 4, 7 i 9. Otopina pufera pH-vrijednosti 4 pripremljena je miješanjem 38,55 mL 0,2 M otopine dikalijevog fosfata i 61,45 mL 0,1 M limunske kiseline. Otopina pH-vrijednosti 7 pripremljena je miješanjem 29,63 mL 0,1 M otopine natrijevog hidroksida, 50 mL 0,1 M kalijevog monofosfata i 20,73 mL MilliQ vode, dok je pufer pH 9 pripremljen miješanjem 21,30 mL 0,1 M otopine natrijevog hidroksida, 50 mL 0,1 M borne kiseline u 0,1 M KCl i 28,70 mL MilliQ vode. pH-vrijednosti pripremljenih pufera provjerene su pH-metrom i dobivene su sljedeće vrijednosti:

- ✓ 4,20
- ✓ 7,05
- ✓ 8,91

3.3.2. Priprema standardnih otopina farmaceutika

Temeljne standardne otopine (TSO) febantela i prazikvantela, masene koncentracije 1000 mg/L, pripremljene su vaganjem standarda na analitičkoj vagi (10,07 mg febantela, 10,06 mg prazikvantela) koji je zatim kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 10 mL i otopljen u metanolu.

TSO albendazola, masene koncentracije 500 mg/L, pripremljena je vaganjem standarda na analitičkoj vagi (10,01 mg) koji je zatim kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu od 20 mL i otopljen u metanolu.

Temeljne i radne standardne otopine čuvane su u mraku na temperaturi od 4 °C.

Radne standardne otopine febantela i prazikvantela korištene za eksperimente hidrolize, masene koncentracije 10 mg/L, pripremljene su uzimanjem alikvota od 250 µL TSO koji je prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL. Tikvica je nadopunjena do oznake puferima različitih pH-vrijednosti, 4, 7 ili 9.

Radne standardne otopine albendazola korištene za eksperimente hidrolize, masene koncentracije 1 mg/L, pripremljene su uzimanjem alikvota od 50 µL TSO koji je prenesen u odmjernu tikvicu od 25 mL. Tikvica je nadopunjena do oznake puferima različitih pH-vrijednosti, 4, 7 ili 9.

Radne standardne otopine febantela, i prazikvantela korištene za eksperiment fotolize, masenih koncentracija 0,1 mg/L, pripremljene su uzimanjem odgovarajućeg alikvota TSO, stavljanjem u odmjernu tikvicu od 100 mL i naopunjavanjem do oznake. Ovisno o eksperimentu, tikvice su nadopunjene s MilliQ vodom te otopinama fosfata (250 mg/L), klorida (10 mg/L), nitrata (3 mg/L) ili sulfata (10 mg/L).

3.3.3. Hidrolitička razgradnja

Svi eksperimenti hidrolize provedeni su u mraku kako bi se izbjegla mogućnost razgradnje faramceutika pod utjecajem svjetlosti. Alikvoti uzoraka (500 µL) uzimani su u određenim vremenskim intervalima i analizirani LC-ESI(+)-MS/MS-om kako bi se utvrdio tijek hidrolitičke razgradnje i identificirali razgradni produkti.

3.3.3.1. Preliminarna ispitivanja

Preliminarni eksperimenti ispitivanja hidrolitičke stabilnosti albendazola, febantela i prazikvantela provođeni su 5 dana na 50 ± 0,1 °C pri tri različite pH-vrijednosti, 4, 7 i 9. Prema postupku opisanom u OECD 111 priručniku spoj koji se tijekom 5 dana provođenja eksperimenta na 50 °C razgradi manje od 10% smatra se stabilnim i daljnja istraživanja nisu potrebna. Hidrolitička razgradnja od 10% na 50 °C odgovara vremenu poluraspada oko 30 dana što je ekvivalentno vremenu poluraspada od 1 godine na 25 °C.

3.3.3.2. Hidroliza nestabilnih spojeva

Ukoliko se provedbom preliminarnog ispitivanje pokaže da se radi o nestabilnom farmaceutiku (hidrolitička razgradnja veća od 10%), potrebno je provesti test od 30 dana na

različitim temperaturama (20 °C, 40 °C i 60 °C) i pH-vrijednostima pri kojima se pokazao nestabilnim (4, 7 i 9).

3.3.4. Fotolitička razgradnja

Pripremljene otopine farmaceutika (40 mL) u MilliQ vodi, te otopinama fosfata, klorida, nitrata i sulfata osvjetljavane su u posudicama od kvarcnog stakla. Tijekom eksperimenata intenzitet zračenja bio je 500 W/m^2, a temperatura je održavana na (25±2) °C.

Tijekom provođenja svih eksperimenata fotorazgradnje korišteni su i kontrolni uzorci. Oni su imali isti sastav kao i osvjetljavane otopine te su bili izloženi istim uvjetima osvjetljavanja ali zaštićeni od utjecaja svjetlosti (čaše s kontrolnim uzorcima bile su zamotane u aluminijsku foliju). Kontrolni uzorci korišteni su kako bi se potvrdilo da je razgradnja farmaceutika posljedica samo djelovanja svjetlosti, a ne temperature te da ne dolazi do hidrolize. U određenim vremenskim intervalima uzimani su alikvoti osvjetljavanih otopina farmaceutika (250 µL) i analizirani LC-ESI(+)-MS/MS-om kako bi se utvrdio tijek fotorazgradnje.

3.3.5. Analiza tekućinskom kromatografijom

Kromatografsko određivanje albendazola i febantela provedeno je na koloni punjenoj s C18 sorbensom Agilent SB-C18, dimenzija 50 x 2,1 mm, promjera čestica unutar kolone 1,8 µm. Gradijentno eluiranje izvedeno je s pokretnom fazom koja se sastojala od 0.1% mravlje kiseline u acetonitrilu kao organskom fazom i 0.1% mravlje kiseline u vodi kao vodenom fazom. Gradijent pokretne faze prilikom analize febantela i albendazola prikazan je u tablicama 5 i 6.

Tablica 5. Gradijent pokretne faze korišten za analizu febantela tekućinskom kromatografijom

Vrijeme (min)	Udio otapala A (%)
0,00	80
0,30	30
0,50	30
1,00	30
1,50	30
1,51	80

Tablica 6. Gradijent pokretne faze korišten za analizu albendazola tekućinskom kromatografijom

Vrijeme (min)	Udio otapala A (%)
0,00	80
0,30	50
0,50	30
1,00	30
1,01	80
2,00	80

Prije početka analize, kromatografska kolona je kondicionirana. Nakon stabilizacije tlaka u koloni analiza je mogla početi. U kolonu je injektirano 1 µL uzorka. Protok je tijekom analize iznosio 0,35 mL/min. Budući da se radi o gradijentu pokretne faze, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti. Za to je potrebna 1 minuta.

Svaka analiza provedena je pri sljedećim uvjetima izvora iona spektrometra masa:

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

Kromatografsko određivanje prazikvantela provedeno je na koloni Synergi Hydro-RP 100 x 2 mm i promjera čestica punjenja 2,5 µm (Phenomenex, Torrance, Kalifornija, SAD) uz izokratno eluiranje pokretnom fazom koja se sastojala od 0.1% mravlje kiseline u acetonitrilu kao organskom fazom i 0.1% mravlje kiseline u vodi kao vodenom fazom. Sastav od 10% organske faze bio je konstantan tijekom 25 min uz protok od 0,2 mL/min.

Sve analize provedene su ionizacijom uzorka elektroraspršenjem pri pozitivnoj ionizaciji. Uvjeti na spektrometru masa bili su :

- temperatura plina: 250 °C
- protok plina: 11 L/min
- tlak raspršivača plina: 35 psi
- napon kapilare pozitivan: 4000 V

Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa Mass Hunter, odnosno programa MassLynx u slučaju fotolitičke razgradnje albendazola. Određivani farmaceutici identificirani su na temelju spektara masa i vremena zadržavanja iako *m/z* omjer molekulskog iona vrlo često može biti dovoljan za identifikaciju prisutnog analita.

Kvantitativna analiza provedena je integriranjem kromatograma, odnosno očitavanjem površine ispod odgovarajuće kromatografske krivulje za svaku određenu farmaceutski aktivnu tvar u vremenu t=0 i određenom vrmenskim intervalima. Smanjenje koncentracije farmaceutika uslijed hidrolitičke i fotolitičke razgradnje prikazano je grafički kao ovisnost A/A_0 o vremnu (t) pri čemu je A_0 površina ispod kromatografske krivulje u vremenu t=0, a A površina u vremenu t.

3.3.6. Identifikacija razgradnih produkata faramceutika

Kromatografsko određivanje provedeno je na koloni Phenomenx punjenoj s C18 sorbensom Synergy Hydro. Dimenzije kolone su 100 x 2,0 mm a promjer čestica unutar kolone je 2,5 µm. Gradijentno eluiranje provedeno je s pokretnom fazom koja se sastojala od 0.1% mravlje kiseline u acetonitrilu kao organskom fazom i 0.1% mravlje kiseline u vodi kao vodenom fazom. Gradijent pokretne faze prilikom analize febantela i albendazola prikazan je u tablici 7.

Tablica 7. Gradijent pokretne faze

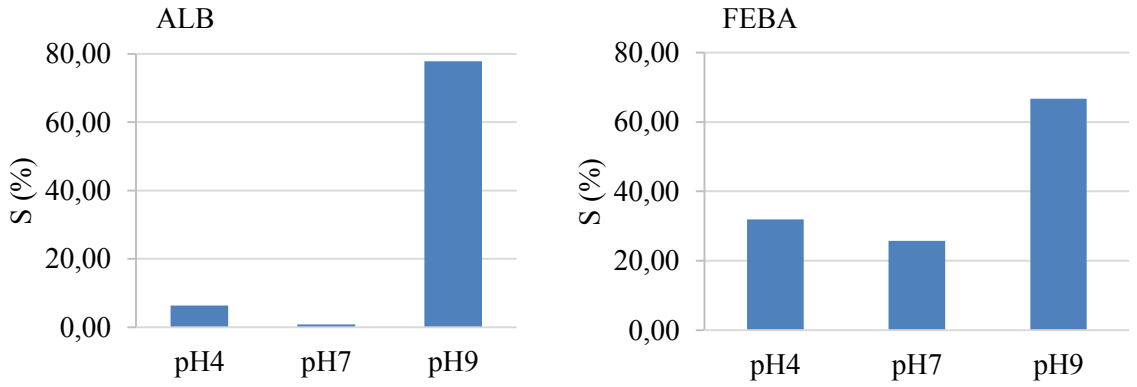
Vrijeme (min)	Udio otapala A (%)
0,00	90
2,00	90
5,00	5
8,00	5
8,01	90
10,00	90

4. REZULTATI I RASPRAVA

Dolaskom u okoliš farmaceutici i njihovi metaboliti mogu biti podvrgnuti biotičkim ili abiotičkim procesima koji rezultiraju njihovom razgradnjom. Rezultat može biti smanjenja koncentracija početnog spoja te nastanak razgradnih produkata koji mogu biti manje ili više toksični od osnovne molekule. Stoga je važno poznavati ponašanje farmaceutika u okolišu kako bi se mogao procijeniti mogući rizik koji je posljedica njihove prisutnosti u tlu, vodama ili sedimentu. Hidroliza i fotoliza su abiotički procesi koji mogu značajno utjecati na proces smanjenja koncentracije farmaceutika. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati hidrolitičku i fotolitičku razgradnju antihelmintika (albendazol, febantel i prazikvantel).

4.1. Hidrolitička razgradnja

Preliminarna ispitivanja hidrolitičke stabilnosti ALB, FEBA te PRAZI provedena su 5 dana na temperaturi od 50 ± 1 °C pri tri različite pH-vrijednosti, 4, 7 i 9. Od tri ispitivana antihelmintika samo se PRAZI pokazao stabilnim na svim ispitivanim pH-vrijednostima, te je njegov stupanj hidrolitičke razgradnje nakon 5 dana na ispitivanoj temperaturi bio je manji od 1%. Rezultati preliminarnih ispitivanja za ALB i FEBA prikazani su na slici 21.



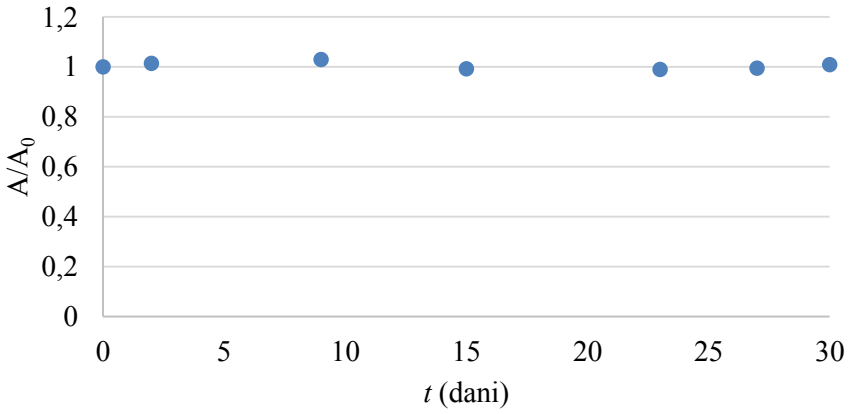
Slika 21. Stupanj hidrolitičke razgradnje ALB i FEBA na tri različite pH-vrijednosti pri 50 °C

Kao što se može vidjeti na slici 21, stupanj hidrolitičke razgradnje ALB pri pH 4, pH 7 i pH 9 iznosio je 6,34 %, 0,84 % i 77,77 % dok je pri istim pH-vrijednostima stupanj

hidrolitičke razgradnje za FEBA iznosio 31,88 %, 25,72 % i 66,73 %. Na temelju rezultata može se zaključiti da je hidrolitička razgradnja FEBA ovisna o pH-vrijednosti s tim da je najizraženija razgradnja postignuta pri pH 9, dok se pri pH 7 FEBA pokazao najstabilnijim. Također, i u slučaju ALB naizraženija hidrolitička razgradnja postignuta je pri najvećoj ispitivanoj pH-vrijednosti, dok se pri pH 4 i pH 7 ALB pokazao stabilnim. S obzirom da je hidrolitička razgradnja ALB na pH 4 i pH 7, te PRAZI na sve tri ispitivane pH-vrijednosti bila manja od 10%, pretpostavlja se da su ispitivani farmaceutici na navedenim pH-vrijednostima pri temperaturi 20 °C stabilni najmanje 1 godinu.

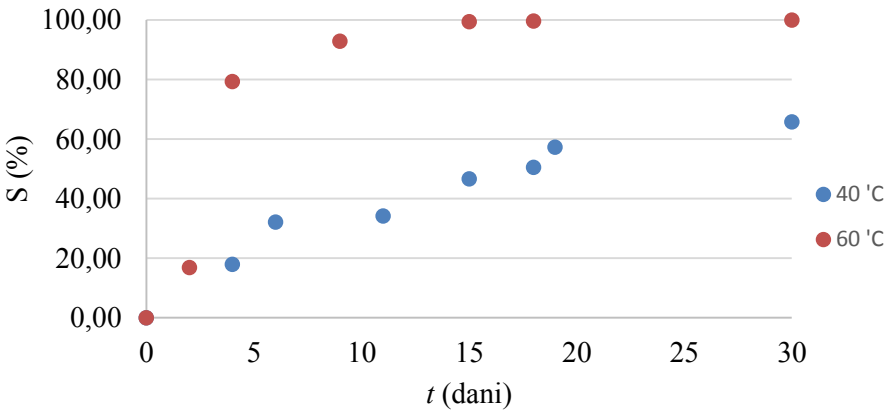
Prema OECD proceduri (poglavlje 2.5.3.) daljnja istraživanja hidrolitičke razgradnje ALB (pH 9) i FEBA (pH 4, pH 7 i pH 9) bilo je potrebno provesti s obzirom da je u preliminarnim istraživanjima hidrolitička razgradanja bila >10%. Daljnja istraživanja su podrazumijevala testove u trajanju od 30 dana na temperaturama od 20 °C, 40 °C i 60 °C pri pH-vrijednostima na kojima su se farmaceutici pokazali nestablinim.

Daljnjim istraživanjima hidrolitičke razgradnje ALB na tri različite temperature pri pH 9 ustanovljeno je da ALB ne hidrolizira na 20 °C što je vidljivo iz primjera ovisnosti A/A_0 o vremenu pri pH 9 prikaznom na slici 22.



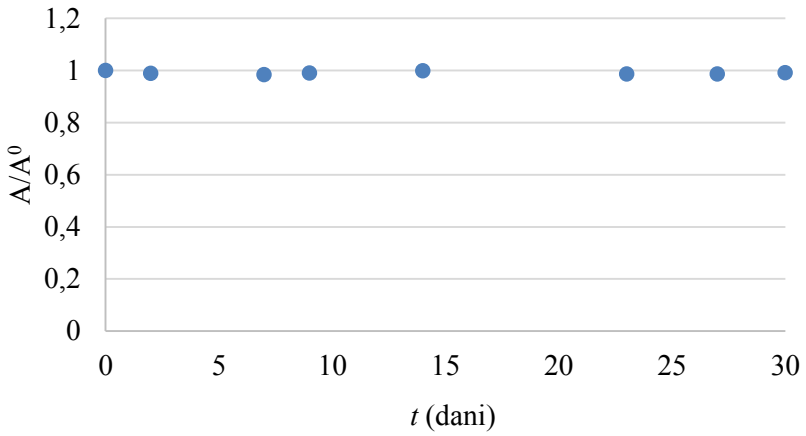
Slika 22. Ovisnost A/A_0 ALB o vremenu pri pH 9 na 20 °C

U usporedbi sa najnižom ispitivanom temperaturom, povećanjem temperature povećava se i stupanj hidrolitičke razgradnje ALB što se može vidjeti na slici 23. Tako je na 40 °C nakon 30 dana postignut stupanj razgradnje od 65,76%, dok je na 60 °C stupanj hidrolitičke razgradnje iznosio 99,97%.

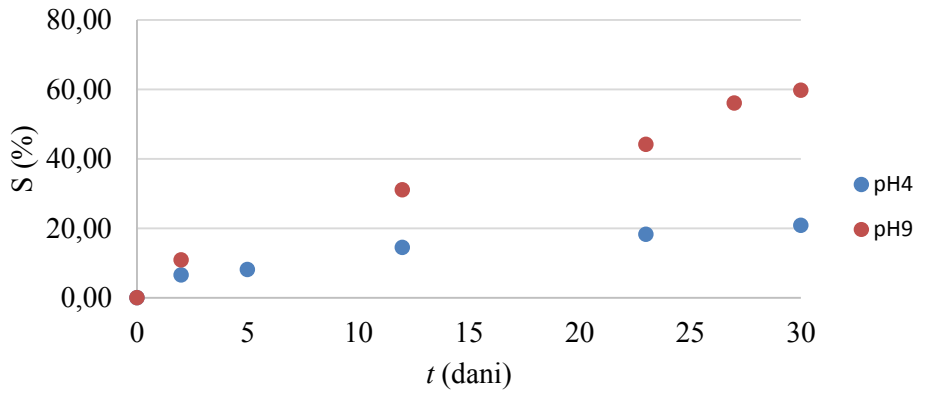


Slika 23. Ovisnost stupnja hidrolize ALB pri pH 9 na 40 °C i 60 °C

U slučaju FEBA daljnja istraživanja provedena su na sve tri ispitivane pH-vrijednosti na 20 °C, 40 °C i 60 °C. Na najnižoj temperaturi ustanovljeno je da FEBA pri pH 7 ne hidrolizira (slika 24), dok na pH 4 i 9 dolazi do hidrolitičke razgradnje što je prikazano na slici 25. Kao što se može vidjeti, na dvije spomenute pH vrijednosti nije došlo do potpune razgradnje FEBA. Hidroliza pri pH 9 je znatno brža nego pri pH 4 te nakon 30 dana iznosi 59,75%, dok stupanj hidrolize pri pH 4 iznosi 20,85%.

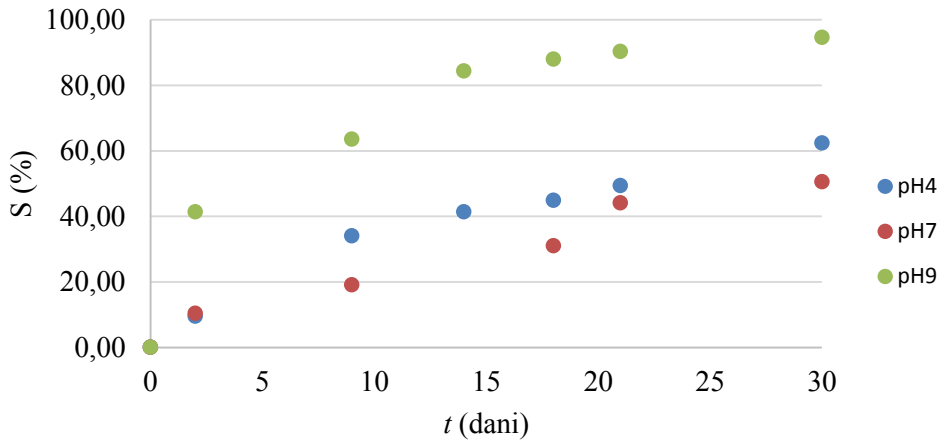


Slika 24. Ovisnost A/A_0 FEBA o vremenu pri pH 7 na 20 °C



Slika 25. Ovisnost stupnja hidrolize FEBA o vremenu pri pH 4 i pH 9 na 20 °C

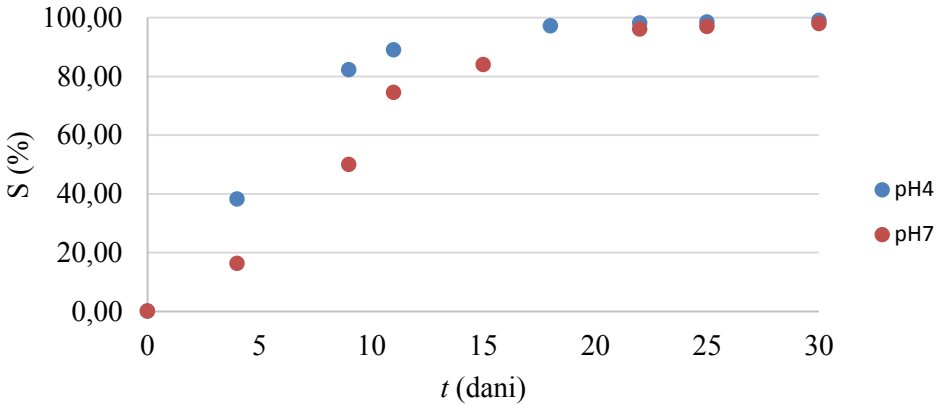
Pri 40 °C, također dolazi do razgradnje FEBA na svim ispitivanim pH-vrijednostima. Iz grafičke ovisnosti stupnja hidrolitičke razgradnje o vremenu, prikazanoj na slici 26, vidljivo je da je hidroliza najbrža pri pH 9, a najsporija pri pH 7. Nakon 30 dana pri pH-vrijednosti 9 razgrađeno je 94,61% FEBA.



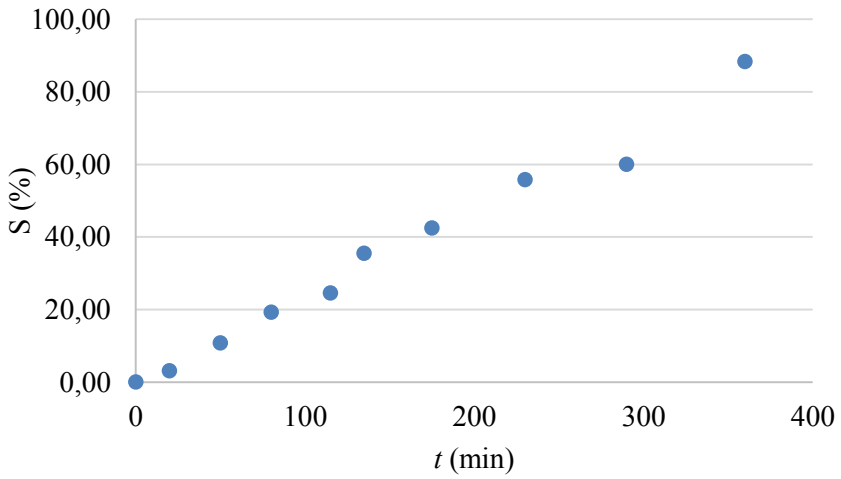
Slika 26. Ovisnost stupnja hidrolize FEBA o vremenu pri pH 4, pH 7 i pH 9 na 40 °C

Prilikom provođenja eksperimenta pri 60 °C dolazi do razgradnje FEBA na svim ispitivanim pH-vrijednostima. Iz grafičke ovisnosti stupnja hidrolitičke razgradnje o vremenu, prikazanoj na slici 27 vidljivo je da dolazi gotovo do potpune razgradnje FEBA pri pH 4 i 7 nakon 20 odnosno 22 dana, te da je razgradnja pri pH 4 brža. U usporedbi sa svim

spomenutim rezultatima kada je hidrolitička razgradnja trajala danima, na pH 9 FEBA izuzetno brzo hidrolizira (unutar nekoliko sati) što se može vidjeti na slici 28.



Slika 27. Ovisnost stupnja hidrolize FEBA o vremenu pri pH 4 i pH 7 na 60 °C



Slika 28. Ovisnost stupnja hidrolize FEBA o vremenu pri pH 9 na 60 °C

Rezultati hidrolitičke razgradnje mogu se opisati reakcijom prvog reda pri kojoj se koncentracija spoja smanjuje proporcionalno vremenu:

$$A = A_0 \cdot e^{-kt} \tag{13}$$

gdje je A_0 površina ispod kromatografske vrpce za početnu koncentraciju spoja, A je površina kromatografske vrpce u određenom vremenu (t), a k (min^{-1}) je konstanta brzine razgradnje. Vremena poluraspada izračunata su prema jednadžbi (3).

Dobiveni rezultati pokazuju da hidrolitička razgradnja ALB (pH 9) i FEBA (pH 4, pH 7 i pH 9) na tri ispitivane temperature slijedi reakciju prvog reda s koeficijentom determinacije (R^2) većim od 0,96 osim u slučaju FEBA pri pH 4 i temperaturi 20 °C s R^2 od 0,89. Dobivene konstante brzine razgradnje (k) farmaceutika pri različitim ispitivanim pH-vrijednostima i temperaturama, te vremena poluraspada ($t_{1/2}$) prikazani su u tablicama 8 i 9.

Tablica 8. Konstante brzine hidrolitičke razgradnje i vremena poluraspada FEBA

T (°C)	k (dan $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (dani)	R^2
	pH 4		
20 °C	0,0070	99,02	0,8998
40 °C	0,0300	23,10	0,9662
60 °C	0,1693	4,09	0,9658
	pH 7		
20 °C	/	/	/
40 °C	0,0231	30,00	0,9666
60 °C	0,1438	4,82	0,9797
	pH 9		
20 °C	0,0285	24,32	0,9813
40 °C	0,0962	7,20	0,9872
60 °C	0,0033[a]	210,05[b]	0,9883

[a] k (min^{-1})
[b] $t_{1/2}$ (min)

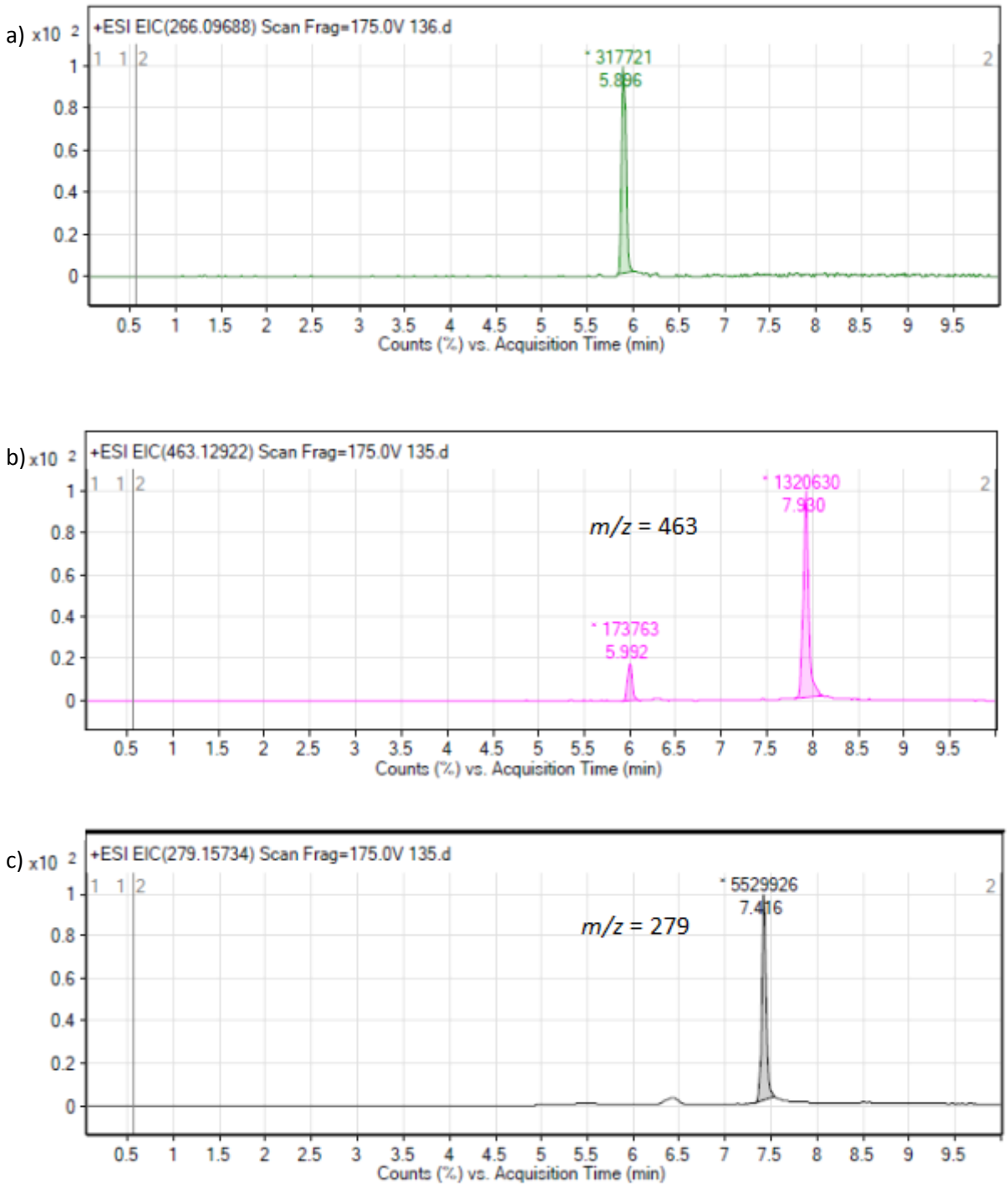
Tablica 9. Konstante brzine hidrolitičke razgradnje i vremena poluraspada ALB

T (°C)	*k* (dan $^{-1}$)	$t_{1/2}$ (dani)	R^2
	pH 9		
20 °C	/	/	/
40 °C	0,0355	19,53	0,9608
60 °C	0,2754	2,52	0,9703

Za oba farmaceutika vrijedi da je konstanta brzine reakcije proporcionalna s temperaturom, a vrijeme poluraspada obrnuto proporcionalno što je vidljivo u tablicama 8 i 9 iz čega slijedi da je za oba farmaceutika razgradnja najbrža pri najvišoj ispitivanoj temperaturi od (60 °C).

4.1.1. Razgradni produkti hidrolitičke razgradnje

Ispitivanjem hidrolitičke razgradnje ALB i FEBA pri tri različite temperature i pH-vrijednosti tijekom vremenskog razdoblja od 30 dana, odnosno 6 h u slučaju FEBA pri vrijednosti pH 9, došlo je do nastajanja novih kromatografskih vrpci, koje nisu bile prisutne u početnom uzorku, što je upućivalo na nastanak razgradnih produkata. Na slici 29a prikazan je kromatogram ALB prije hidrolitičke razgradnje, dok se na slici 29b i 29c mogu vidjeti kromtografske vrpce detektiranih produkata, P1 (*m/z* 463) i P2 (*m/z* 279).

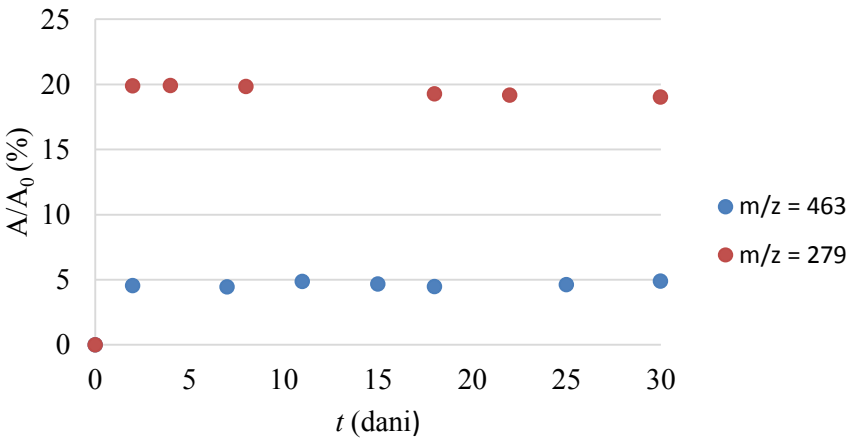


Slika 29. Kromatogram ALB prije hidrolize (a), nastali razgradni produkt *m/z* 463 (b), te razgradni produkt *m/z* 279 nakon 24 h eksperimenta

Kao što se može vidjeti na slici 29, razgradni produkt P2 se nalazi na t_R = 7,416 min dok u slučaju razgradnog produkta P1 javljaju se dvije kromtografske vrpce na t_R = 6,992 i t_R

= 7,930 min što upućuje da je moguće da se radi o izomerima. Kako bi se nadalje odredile strukture navedenih produkata potrebno je provesti fragmentaciju i daljnja istraživanja.

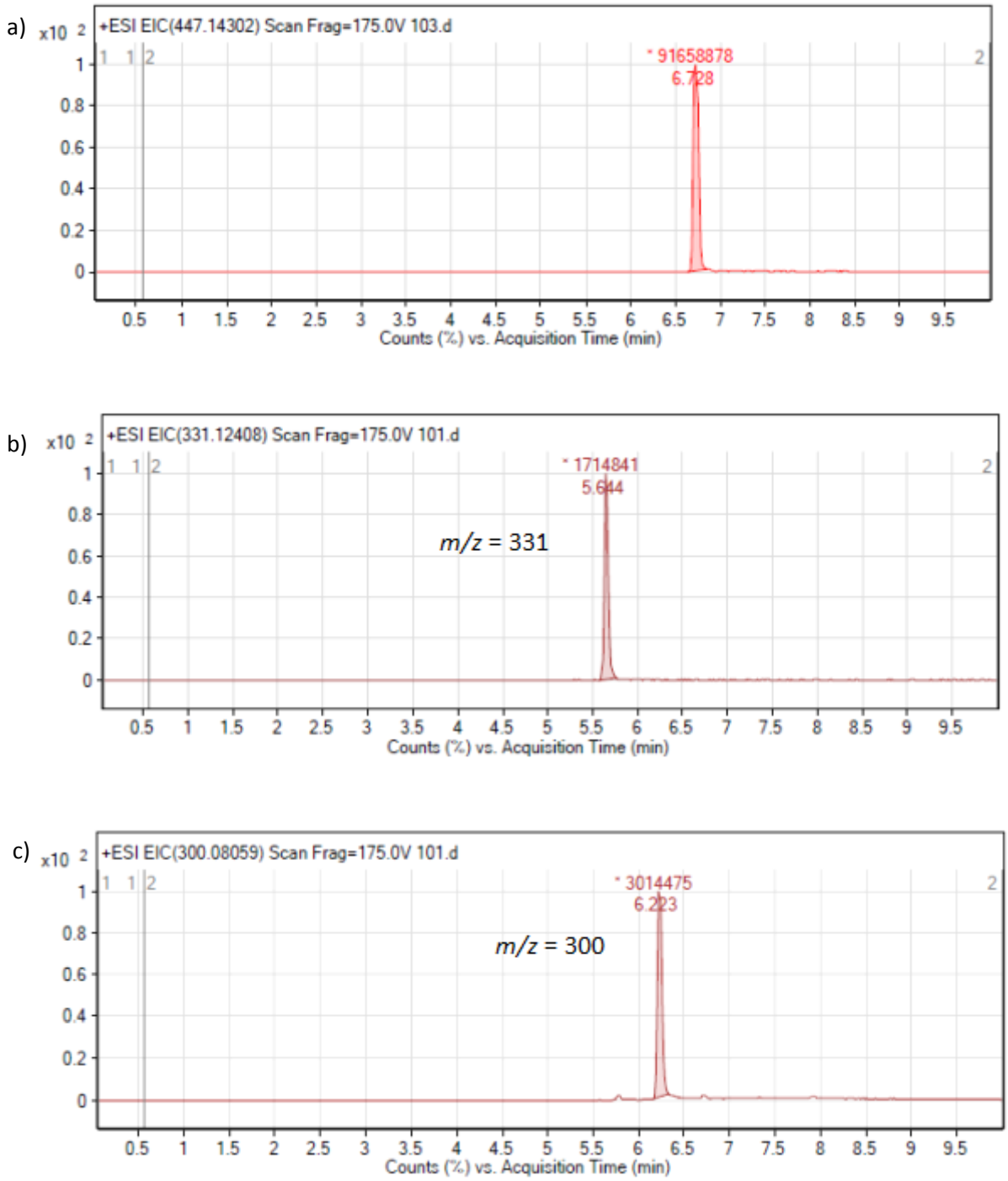
Hidrolitička razgradnja razgradnih produkata prikazana je kao ovisnost omjera površina ispod kromatografskih vrpci nakon određenog vremena (A) i površina ispod kromatografksih vrpci početnog spoja (A_0) o vremenu (t). Na slici 30 vidljivo je nastajanje razgradnih produkata prilikom hidrolitičke razgradnje ALB na temperaturi 60 °C i pH 9. Slični profili za detektirane razgradne produkte dobiveni su i na drugoj ispitivanoj temperaturi.



Slika 30. Nastajanje razgradnih produkata ALB na 60 °C i pH 9

Kao što se može vidjeti na slici 30, koncentracija razgradnih produkata vrlo brzo raste te nakon 1 dana postiže svoju maksimalnu vrijednost koja se ne mijenja do kraja eksperimenta. Tako su, i nakon potpune razgradnje početnog spoja (15 dana), razgradni produkti i dalje prisutni u ispitivanom uzorku.

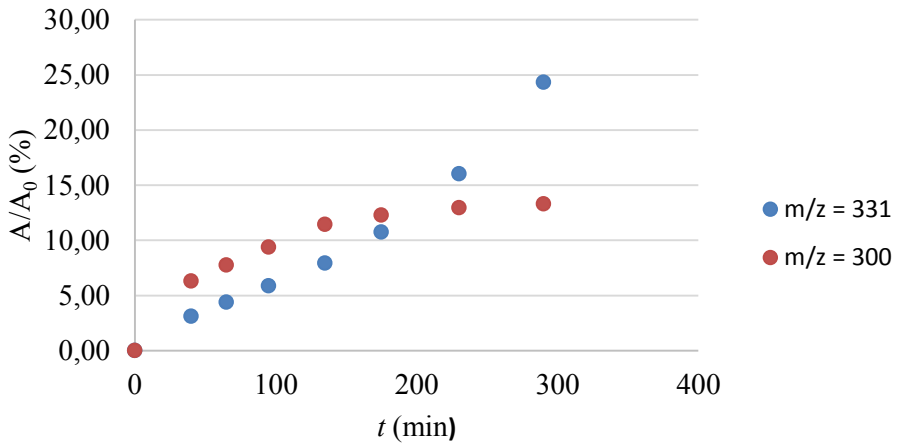
Na slici 31a prikazan je kromatogram FEBA prije hidrolitičke razgradnje, te detektirani razgradni produkti (slika 31b i c).



Slika 31. Kromatogram FEBA prije hidrolize (a), nastali razgradni produkt *m/z* 331 (b), te razgradni produkt *m/z* 300 nakon 24 h eksperimenta

Tijekom hidrolitičke razgradnje FEBA, također su detektirana dva razgradna produkta. Razgradni produkt P3 javlja se na t_R = 5,644 min s *m/z* omjerom 331 dok se drugi razgradni produkt P4 javlja na t_R = 6,223 min s *m/z* omjerom 300. S obzirom da molekulske mase metabolita FEBA, febendazola i febendazol sulfona, iznose 299 i 331, moglo bi se

pretpostaviti da se radi o navedenim spojevima. Međutim da bi se to sa sigurnošću potvrdilo potrebna su daljnja istraživanja. Na slici 32 prikazani su profili razgradnih produkata febantla P3 i P4 na temperaturi 60 °C i pH 9.



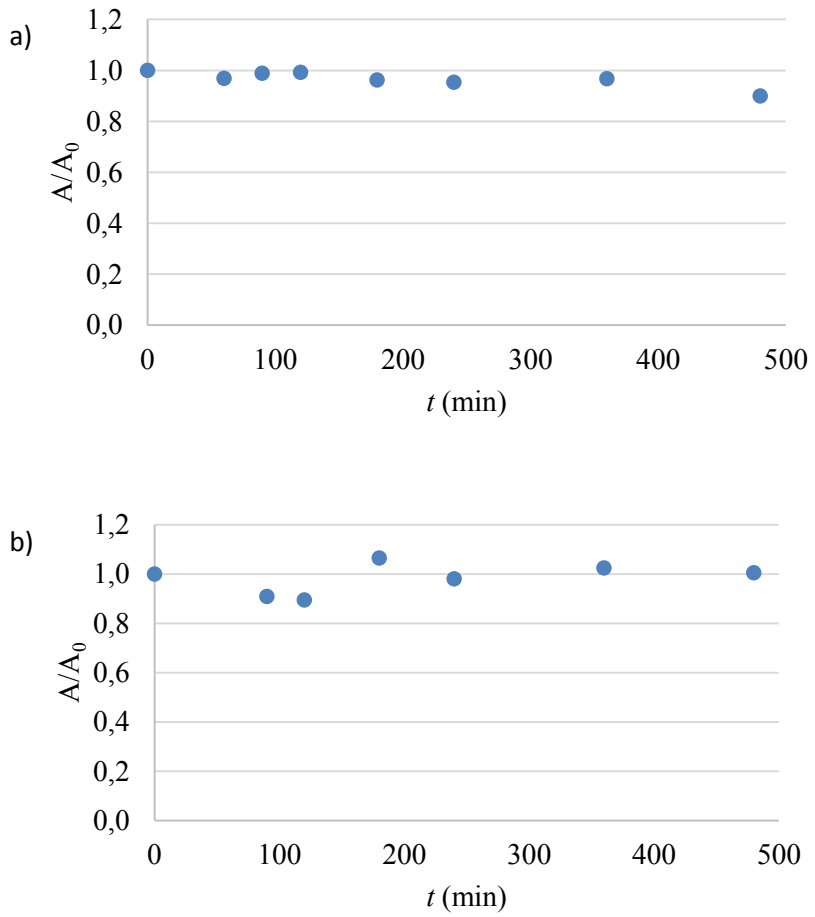
Slika 32. Nastajanje razgradnih produkata FEBA

Koncentracije oba razgradna produkta FEBA rastu s vremenom kako se smanjuje koncentracija početnog spoja.

4.2. Fotolitička razgradnja

Kao što je već navedeno, dolaskom u okoliš farmaceutici podliježu biotičkim i abiotičkim procesima, a rezultat takvih procesa mogu biti spojevi drugačijih fizikalno-kemijskih svojstava u usporedbi s početnim spojem. Uz hidrolizu, značajan abitički porces koji može uzorkovati razgradnju faramceutika je hidroliza.

Stoga je u ovom radu ispitana fotolitička razgradnja antihelmintika. Izlaganjem ispitivanih farmaceutika umjetnom Sunčevu zračenju u MilliQ vodi nije uočeno smanjenje koncentracije FEBA i PRAZI, što se može vidjeti na slici 33 (a i b) te se može zaključiti da FEBA i PRAZI nisu podložni izravnoj fotolitičkoj razgradnji.



Slika 33. Promjena koncentracije FEBA (a) i PRAZI (b) tijekom fotolitičke razgradnje

Dosadašnja istraživanja fotolitičke razgradnje farmaceutika pokazala su drugačije ponašanje u MilliQ vodi [45-48]. S obzirom da se drugačije ponašanje u prirodnim vodama može pripisati različitim sastojcima matice, u ovom radu je istražen utjecaj anorganskih iona, najzastupljenijih u vodama u okolišu (Cl^-, NO^{3-}, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}), na fotolitičku razgradnju FEBA i PRAZI. Ispitivanje neizravne fotolitičke razgradnje je izuzetno značajno u ovom slučaju s obzirom na otporost ispitivanih farmaceutika na izravnu fotolizu. Međutim, i u slučaju FEBA i PRAZI nije uočeno smanjenje koncentracije u prisutnosti ispitivanih iona što upućuje na činjenicu o stabilnosti FEBA i PRAZI tijekom izlaganja umjetnom Sunčevu zračenju.

5. Zaključak

U ovom radu ispitana je hidrolitička i fotolitička razgradnja tri antihelmintika (albendazol, febantel i prazikvantel).

Hidrolitička razgradnja ispitana je pri različitim pH-vrijednostima, 4, 7 i 9 te pri temperaturama od 20 °C, 40 °C i 60 °C. Rezultati su pokazali hidrolitičku stabilnost PRAZI, te stabilnost ALB pri pH 4 i 7. Pri pH 9 dolazi do razgradnje ALB, pri čemu se brzina razgradnje povećava s povećanjem temperature. Za razliku od dva spomenuta farmaceutika, FEBA se pokazao hidrolitički nestabilnim na svim pH-vrijednostima, pri čemu je hidroliza najbrža pri pH 9 dok je pri pH 7 najsporija. Brzina hidrolitičke razgradnje FEBA proporcionalno se mijenja s temperaturom, pa je tako pri 60 °C najbrža razgradnja.

Ispitivanja su pokazala da hidrolitička razgradnja u svim slučajevima slijedi reakciju prvog reda s koeficijentom determinacije većim od 0,96 osim u slučaju FEBA pri pH 4 i temperaturi 20 °C s R^2 od 0,89.

Za oba farmaceutika podložna hidrolitičkoj razgradnji detektirana su dva razgradna produkta: za ALB P1 (*m/z* 463) i P2 (*m/z* 279), te za FEBA P3 (*m/z* 331) i P4 (*m/z* 300). Međutim, potrebno je daljnje istraživanje kako bi se odredila njihova točna struktura.

Ispitivanja direktne fotolitičke razgradnje (MilliQ voda) te utjecaja uobičajeno prisutnih anorganskih iona (Cl^-, NO^{3-}, PO_4^{3-}, SO_4^{2-}) na fotolitičku razgradnju PRAZ i FEBA pokazala su da ovi farmaceutici nisu podložno fotolitičkoj razgradnji u uvjetima reevantnim za okoliš.

Na temelju svih dobivenih rezultata može se zaključiti da, kada ispitivani antihelmintici dođu u vode u okolišu neće doći do smanjenja njihove koncentracije s obzirom da nisu podložni fotolitičkoj ni hidrolitičkoj razgradnji (pH 7 i 20 °C) te njihovo antihelmintičko djelovanje može negativno utjecati na organizme u okolišu. Razgradnja ALB i FEBA može se očekivati u otpadnim vodama pri višim pH-vrijednostima i višim temperaturama. U tom slučaju mogu nastati razgradni produkti čije je strukture i toksičnost potrebno odrediti kako bi se utvrdio njihov utjecaj na ljude i okoliš. Također, potrebno je ispitati fotolitičku razgradnju albendazola.

6. Literatura

[1] M. Petrović, S. Pérez, D. Barcelo, Analysis, removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle, Elsevier, Second edition, 2013.

[2] B. L. Edhlund, Natural water photochemistry: Singlet oxigen production and the degradation of dissolved organic nitrogen and organic pollutants, disertacija, University of Minnesota, 2008.

[3] Directive 2013/39/EU of the European parliament and of the council amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy.

[4] A. Kar, Medicinal chemistry, New Age International (P) Ltd. Publishers, New Delhi, 2007., str. 651-661.

[5] http://www.stetoskop.info/antihelmintici-b13-bs227-p97-nc1-book.htm (travanj 2016.)

[6] A. D. Dayan, Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non-clinical toxicity and pharmacokinetics, *Acta Tropica* **86** (2003) 141–159.

[7] D. M. Rathod, K. R. Patel, H.N. Mistri, A. G. Jangid, P. S. Shrivastav, M. Sanyal, Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for simultaneous determination of albendazole and albendazole sulfoxide in human plasma for bioequivalence studies, *Journal of Pharmaceutical Analysis*, prihvaćen za objavljivanje, doi:10.1016/j.jpha.2016.02.002

[8] http://www.genera.hr/pro/hr/1620/#.VzI3p4SLTcd (ožujak 2016.)

[9] K. Kummerer, Pharmaceuticals in the Environment, Springer, Berlin, 2008.

[10] www.medicinabih.info/2010/12/08/metabolizam-i-eliminacija-lijekova (ožujak 2016.)

[11] K. Jindal, M. Narayanam, S. Singh, Pollution of aqueous matrices with pharmaceuticals, Water and Health, Springer, Berlin, 2014., str. 355–373.

[12] M. S. Diaz-Cruz, M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, **22** (2003) 340-350.

[13] http://web.stanford.edu/group/parasites/ParaSites2005/Albendazole/ (lipanj 2016.)

[14] http://veterina.com.hr/?p=27654 (lipanj 2016.)

[15]http://parasitipedia.net/index.php?option=com_content&view=article&id=2517&Itemid=2790 (lipanj 2016.)

[16] P. Olliaro, P. Delgado-Romero, J. Keiser The little we know about the pharmacokinetics and pharmacodynamics of praziquantel (racemate and R-enantiomer) *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* Advance Access published January 2, 2014.

[17] I. Meister, K. Ingram-Sieber, N. Cowan, M. Todd, M. N. Robertson, C. Meli, M. Patra, G. Gasser, J. Keiser**a,** Activity of Praziquantel Enantiomers and Main Metabolites against Schistosoma mansoni, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **58** (2014) 5466–5472.

[18] H. B. Jayasiri, Pharmaceutically Active Compounds (PhACs): A Threat for aquatic environment, National aquatic resources research and development agency, Crow Island, Šri Lanka, 2013.

[19] W. W. Buchberger, Current approaches to trace analysis of pharmaceuticals and personal care products in the environment*, Journal of Chromatography*, **1218** (2011) 603–618.

[20] K. Kummerer, Antibiotics in the aquatic environment, Part II, *Chemosphere*, **75** (2009) 435–441.

[21] V. Andreu, C. Blasco, Y. Pico, Analytical strategies to determine quinolone residues in food and the environment, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry,* **26** (2007) 534-556.

[22] E. S. Williams, B. W. Brooks, Human pharmaceuticals in the environment, principles, approaches and perspectives, Springer, New York, 2012., str. 167–224.

[23] S. Webb, T. Ternes, M. Gibert, K. Olejniczak, Indirect human exposure to pharmaceuticals via drinking water, *Toxicology Letters*, **142** (2003) 157–167.

[24] J. Wang, P. R. Gardinali, Identification of phase II pharmaceutical metabolites in reclaimed water using high resolution benchtop Orbitrap mass spectrometry, *Chemosphere* **107** (2014) 65-73

[25] K. M. Onesios, J. T. Yu, E. J. Bouwer, Biodegradation and removal of pharmaceuticals and personal care products in treatment systems: A review, *Biodegradation,* **20** (2009) 441-466.

[26] R. Alexy, K. Kummerer, Antibiotics for human use u: T. Reemtsma, M. Jekel (ur.) Organic pollutants in the water cycle – properties, occurrence, analysis, Kroand Environmental relevance of polar compounds, Wiley-VCH, Weinheim, 2006.

[27] D. Prabhakaran, P. Sukul, M. Lamshoft, M. A. Maheswari, S. Zuhlke, M. Spiteller, Photolysis of difloxacin and sarafloxacin in aquoeus systems, *Chemosphere* **77** (2009) 739-746.

[28] S. Mompelat, B. Le Bot, O. Thomas, Occurence and fate of pharmaceutical products and by-products, from resource to drinking water, *Environment International,* **35** (2009) 803-814.

[29] http://en.wikipedia.org/wiki/Photodegradation (travanj 2016.)

[30] E. L. Tong, P. Eichhorn, S. Perez, Y. Wang, D. Barcelo, Photodegradation of azitromycin in various aqueous systems under simulated and natural solar irradiation: Kinetics and identification of photoproducts, *Chemosphere,* **83** (2011) 340-348.

[31] A. G. Trovo, R. F. P. Nogueira, A. Aguera, C. Sirtori, A. R. Fernandez-Alba, Photodegradation of sulfamethoxazole in variuos aqueous media: Persisatence, toxicity and photoproducts assessment, *Chemosphere,* **77** (2011) 1292-1298.

[32] M. Cindrić, A. Marković, A. Horvatić, Spregnute tehnike tekućinski kromatograf – spektrometar masa: osnove metodologije i primjene, *Medicina***, 45** (3) (2009) 218-232.

[33] D. Fatta-Kassinos, M. I. Vasquez, K. Kummerer, Transfromation products of pharmaceuticals in surface waters and wastewater formed durinf photolysis and advanced oxidation processes - Degradation, elucidation of byproducts and assessment of their biological potency, *Chemosphere,* **85** (2011) 693-709.

[34] Q. Bu, B. Wang, J. Huang, S. Deng, G. Yu, Pharmaceuticals and personal care products in the aquatic environment in China: A review, *Journal of Hazardous Materials*, **262** (2013) 189-211.

[35] https://hr.wikipedia.org/wiki/Hidroliza (ožujak 2016.)

[36] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003., str. 217-238.

[37] D. J. Burinsky, Mass spectrometry, *Comprehensive Analytical Chemistry*, **47** (2006) 319-396.

[38] Analitika okoliša, M. Kaštelan Macan, M. Petrović (ur.), Hinus, Zagreb 2013.

[39] M. Kaštelan-Macan, Enciklopedijski rječnik analitičkog nazivlja, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu i Mentor d.o.o., Zagreb, 2014.

[40] http://www.tehnologijahrane.com/analizahrane/maseni-spektrometar (travanj 2016.)

[41] http://www.research.uky.edu/ (svibanj 2016.)

[42] C. Seger, A. Griesmacher, Važni aspekti uspostave dvojne spektrometrije masa u uvjetima rutinskoga kliničkog laboratorija, *Biochemia Medica,* **17** (2007) 29-51.

[43] A. Horvatić, M. Cindrić, Analiza farmaceutskih peptida spektrometrijom masa, *Medicina Fluminensis*, **45** (3) (2009) 258-263.

[44] T. Pisitkun, J. D. Hoffert, M.-J. Yu, M. A. Knepper, Tandem mass spectrometry in physiology, *Physiology,* **22** (2007) 390–400.

[45] N. D. H. Khaleel, W. M. M. Mahmoud, G. M. Hadad, R. A. Abdel-Salam, K. Kummerer, Photolysis of sulfamethoxypyridazine in variuos aqueous media: Aerobic biodegradation and identification of photoproducts by LC-UV-MS/MS, *Journal of Hazardous Materials,* **244-245** (2013) 654-661.

[46] A. G. Trovo, R. F. P. Nogueira, A. Aguera, C. Sirtori, A. R. Fernandez-Alba, Photodegradation of sulfamethoxazole in various aquoeus media: Persistence, toxicity and photoprodustc assessment, *Chemosphere* **77** (2009) 1292-1298.

[47] P. Calza, S. Marchisio, C. Medana, C. Baiocchi, Fate of antibacterial spiramycin in river waters, *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **396** (2010) 1539-1550.

[48] M. J. Garcia-Galan, M. S. Diaz-Cruz, D. Barcelo, Kinetic studies and characterization of photolysis products of sulfamethazine, sulfapyridine and their acetylated metabolites in water under simulated solar irradiation, *Water Research* **46** (2012) 711-7

Životopis

Rođena sam 25. srpnja 1992. godine u Zenici, BiH. Godine 2007. završavam osnovnu školu *„Kiseljak“* u Kiseljaku. Do 2011. godine pohađala sam gimnaziju *„Ivan Goran Kovačić“*, u Kiseljaku. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Kemija i inženjerstvo materijala, upisujem 2011. godine. Preddiplomski studij završil sam 2014. godine obranom završnog rada pod nazivom *„Sorpcija enrofloksacina na pepeo nastao izgaranjem kamenog ugljena“* uz mentorstvo prof. dr. sc. Sandre Babić. Nakon završenog preddiplomskog studija sudjelujem kao demonstrator na vježbama iz kolegije „Kemijska analiza materijala“ u Zavodu za analitičku kemiju. 2016. godine sudjelovala sam na XI. Susretu mladih kemijskih inženjera u Zagrebu s posterom *„Raslojavanje grafita s ciljem dobivanja grafena“* izrađenim pod mentorstvom prof. dr. sc. Marijane Kraljić Roković, na Zavodu za elektrokemiju. Iste godine sudjelovala sam pod vodstvom dr. sc. Martine Biošić na 16. Festivalu znanosti, s radionicom „*Kemija preobrazbe*“. Stručnu praksu odradila sam 2014. godine u Sarajevskom kiseljaku.