

Hidrolitička i fotolitička razgradnja metoklopramida u okolišu

Vidović, Dorina

Undergraduate thesis / Završni rad

2017

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:403109>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-06-25**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Dorina Vidović

Hidrolitička i fotolitička razgradnja metoklopramida u okolišu

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Sandra Babić

prof. dr. sc. Irena Škorić

dr. sc. Mirta Čizmić

Zagreb, rujan 2017.

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



SAŽETAK

Dolaskom u okoliš farmaceutici mogu biti podvrgnuti biotičkim ili abiotičkim procesima koji rezultiraju njihovom razgradnjom. Rezultat može biti smanjenje koncentracije 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 farmaceutika metoklopramida. Hidrolitička razgradnja metoklopramida ispitana je u MilliQ vodi pri tri različite pH-vrijednosti 4, 7 i 9. Uočeno je da metoklopramid ne hidrolizira. Fotolitička razgradnja praćena je u MilliQ i izvorskoj vodi te je uočeno da je razgradnja brža u izvorskoj vodi a da temperatura (10 °C i 25 °C) nema značajniji utjecaj na brzinu fotolitičke razgradnje. Također, uočeno je da razgradnjom metoklopramida nastaju tri razgradna produkta.

Ključne riječi: farmaceutici, metoklopramid, hidrolitička razgradnja, fotolitička razgradnja, okoliš, HPLC-MS/MS

SUMMARY

In the environment, pharmaceuticals can be subjected to biotic or abiotic degradation processes. These processes lead to the reduction of pharmaceuticals concentration in the environment and formation of degradation products which may be less or more toxic than the parent molecule. It is important to understand the behavior of pharmaceuticals in the environment in order to assess the possible risk of their presence in soil, water or sediment. Hydrolysis and photolysis are abiotic processes that can significantly affect the process of concentration reduction of pharmaceuticals. Therefore, the aim of this paper was to examine the hydrolytic and photolytic degradation of metoclopramide. Hydrolytic degradation of metoclopramide was monitored in MilliQ water at three different pH-values of 4, 7 and 9. Metoclopramide was not hydrolysed. Photolytic degradation was monitored in MilliQ and spring water and it was observed that degradation was faster in spring water. The impact of temperature (10 °C and 25 °C) on photolytic degradation was also investigated. During degradation of metoclopramide, formation of three degradation products were observed.

Keywords: pharmaceuticals, metoclopramide, hydrolytic degradation, photolytic degradation, environment, HPLC-MS/MS

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	2
2.1 FARMACEUTICI	2
2.2 FARMACEUTICI U OKOLIŠU	2
2.3 RAZGRADNJA FARMACEUTIKA U OKOLIŠU	3
2.3.1 Hidrolitička razgradnja farmaceutika	4
2.3.2 Fotolitička razgradnja farmaceutika	4
2.3.2.1 Kinetika fotolitičke razgradnje.....	6
2.4 METOKLOPRAMID	8
2.5 ANALITIČKE METODE ZA PRAĆENJE FARMACEUTIKA U OKOLIŠU	10
2.5.1 Kromatografija	11
2.5.2 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	13
2.5.3 Spektrometrija masa	15
2.6. STATISTIČKA OBRADA REZULTATA	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO	19
3.1 MATERIJALI	19
3.1.1 Kemikalije	19
3.1.2 Metoklopramid.....	19
3.1.3 Izvorska voda	20
3.2 INSTRUMENTI.....	20
3.2.1 Analitička vaga	20
3.2.2 pH-metar.....	21
3.2.3 Sunset CPS+	22

3.2.4 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa spektrometrom masa	23
3.3. METODE RADA.....	24
3.3.1 Priprema pufera.....	24
3.3.2 Priprema standardnih otopina.....	24
3.3.3 Karakterizacija izvorske vode.....	25
3.3.4 Hidrolitička razgradnja	25
3.3.5 Fotolitička razgradnja	26
3.3.6 Analiza tekućinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	28
4.1 KARAKTERIZACIJA IZVORSKE VODE.....	28
4.2 HIDROLITIČKA RAZGRADNJA	28
4.3 FOTOLITIČKA RAZGRADNJA	29
4.3.1 Utjecaj temperature na brzinu fotolitičke razgradnje metoklopramida	34
4.3.2 Produkti fotolitičke razgradnje metoklopramida.....	37
5. ZAKLJUČAK	39
6. LITERATURA.....	40

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. Zbog svojih fizikalnih i kemijskih svojstava, mnoge od tih tvari završavaju u tlima i sedimentima, gdje se mogu akumulirati i uzrokovati različite posljedice na kopnenim i vodenim organizmima. Naime, farmaceutici se ubrajaju u nova zagađivala, mikrozagađivala, za koje ne postoji zakonska regulativa o njihovom ispuštanju u okoliš. Nakon što dospiju u okoliš, farmaceutici se mogu vezati na čestice tla ili sediment te razgraditi abiotičkim (hidroliza i fotoliza) ili biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) procesima. Rezultat navedenih procesa vodi smanjenju koncentracije početne molekule farmaceutika te nastanku novih spojeva – razgradnih produkata. Nastali razgradni produkti mogu biti više ili manje stabilni i toksični u odnosu na početnu molekulu. Stoga je, kada se proučava prisutnost farmaceutika u okolišu, važno uzeti u obzir ne samo početne molekule farmaceutika nego i produkte razgradnje.

Fotolitička te hidrolitička razgradnja, kao abiotički procesi, mogu biti značajni u smanjenju koncentracije farmaceutika u okolišu. Cilj ovoga rada je proučiti ponašanje farmaceutika metoklopramida pod umjetnim Sunčevim zračenjem te njegovu hidrolitičku stabilnost kako bi se bolje razumjelo njegovo ponašanje i postojanost u okolišu.

2. TEORIJSKI DIO

2.1 Farmaceutici

Lijekovi ili farmaceutici su tvari ili smjese tvari koje u određenim količinama i u određenim uvjetima služe za sprječavanje, ublažavanje i liječenje bolesti u ljudskom ili životinjskom tijelu. Većina farmaceutika koristi se za kontrolu simptoma nekih bolesti, a manji dio njih se koristi za uklanjanje uzročnika bolesti kao što su antibiotici. Osnovna podjela farmaceutika je na prirodne, polusintetske i sintetske.

Razlikuju se lijekovi za unutrašnju i vanjsku uporabu. Primjenjuju se ili lokalno (mazanjem na kožu, ukapavanjem u oči, uho ili nos itd.) ili se uvode u organizam oralno (kroz usta), rektalno (kroz crijevo), supkutano (uštrcavanjem pod kožu), itd.

Negativna posljedica korištenja farmaceutika je njihova prisutnost u okolišu, a samim time i zagađenje okoliša. Ovisno o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima mogu se vezati na tlo i sediment ili razgraditi abiotičkim (hidroliza i fotoliza) ili biotičkim (biološka razgradnja bakterijama i gljivicama) putem [1].

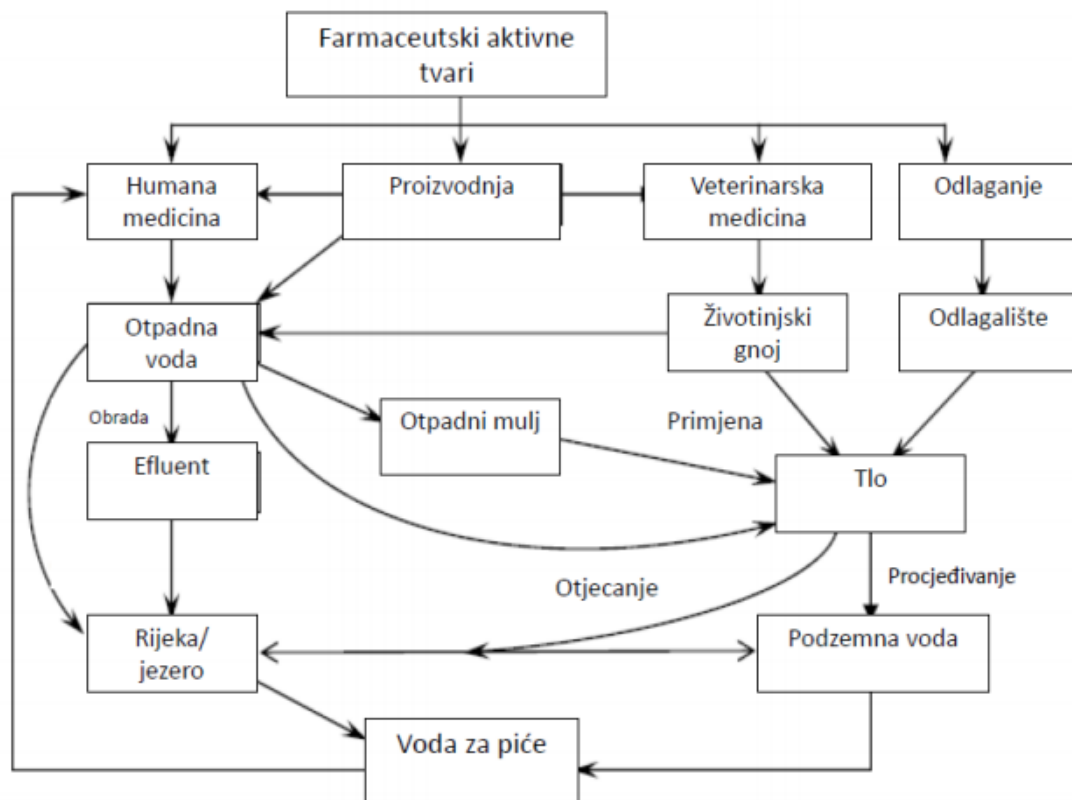
2.2 Farmaceutici u okolišu

Farmaceutici pripadaju novoj skupini zagađivala, mikrozagađivala, koji se svakodnevno koriste. U svijetu postoji oko 4000 farmaceutski aktivnih tvari koje imaju različitu primjenu, a njihova godišnja potrošnja iznosi više od 100000 tona [2].

Nakon primjena, jedan dio farmaceutika u organizmu ljudi ili životinja prolazi kroz različite metaboličke procese pri čemu nastaju metaboliti koji su često polarniji od polaznog farmaceutika. Zbog toga su topljivi u vodi te lako dospijevaju u komunalne otpadne vode. Na **slici 1** prikazani su mogući putevi ulaska farmaceutika u okoliš. Nakon što dospije u okoliš, koncentracija nekog farmaceutika ili metabolita u pojedinom dijelu ekosustava ovisi o njegovoj postojanosti, odnosno otpornosti razgradnji (hidroliza, fotoliza, oksidacija, redukcija ili mikrobiološka razgradnja) te afinitetu vezanja na krute čestice. Neki farmaceutici akumuliraju se u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode gdje su podložne daljnjoj razgradnji. Značajno je i ispuštanje farmaceutika u okoliš putem životinjskih izlučevina koje završavaju u gnojivima koja se koriste za gnojenje poljoprivrednih površina. Međutim uporabom gnojiva koja sadrže farmaceutike oni izravno

ulaze u tlo odakle mogu dospjeti u podzemne i površinske te pitke vode. Također, jedan od načina na koji farmaceutici dopijevaju u okoliš je njihovo korištenje u akvakulturi, kao dodatci prehrani, čime se direktno unose u vodu [3].

Pozitivna uloga djelovanja farmaceutika u ciljanom organizmu nije upitna, no zatekne li se isti u okolišu, u neciljanjoj populaciji vodnih organizama ili organizama na višim karikama prehrambenog lanca, uključujući i ljude, može imati negativan učinak.



Slika 1. Putevi unošenja farmaceutika u okoliš [4]

2.3 Razgradnja farmaceutika u okolišu

Zbog abiotičkih i biotičkih procesa razgradnje farmaceutici u okolišu prolaze različite strukturne promjene. Procesi hidrolize i fotolize su abiotički procesi razgradnje, a razgradnja farmaceutika bakterijama i gljivicama predstavlja biotičku razgradnju.

Razgradnjom se osnovne molekule cijepaju na manje strukturne jedinice pri čemu nastaju razgradni produkti koji mogu imati drugačija fizikalno-kemijska svojstva od početne molekule farmaceutika. No, postoji i mali broj slučajeva kada su produkti razgradnje toksičniji od početne molekule. Također, može doći i do transformacije molekula što podrazumijeva promjene pri kojima ne dolazi do razgradnje osnovne molekule, nego do promjene u strukturi osnovne molekule [5].

2.3.1 Hidrolitička razgradnja farmaceutika

Hidroliza je važna za razgradnju farmaceutika koji su otporni na djelovanje mikroorganizama. Podrazumijeva cijepanje kovalentnih veza molekula u reakciji s vodom, pri čemu nastaju novi spojevi. To obuhvaća ionizaciju molekula vode te razgradnju spoja hidrolizom. Reaktanti (osim vode) i produkti hidrolize mogu biti neutralne molekule (hidroliza organskih spojeva) ili ioni (hidroliza soli, kiselina i baza).

Hidroliza se odvija uz djelovanje kiselina, lužina ili enzima prema jednadžbi:



gdje AB predstavlja ispitivani spoj, a HOH vodu [6].

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 polivinilalkohola ili u takozvanoj reakciji saponifikacije, gdje hidrolizom estera nastaju alkoholi i karboksilne kiseline. Iako se smatra da je to jedna od češćih kemijskih reakcija kojom se farmaceutici razgrađuju u okolišu, vrlo je malo literaturnih podataka o njihovoj hidrolitičkoj stabilnosti [7].

2.3.2 Fotolitička razgradnja farmaceutika

Za farmaceutike koji su pokazali otpornost na hidrolizu i biološku razgradnju, fotolitička razgradnja je važan abiotički proces koji vodi smanjenju njihove koncentracije u okolišu. Do fotolize može doći u površinskim vodama, dok u zamućenim vodama, vodama koja su u sjeni drveća ili spojevi koji su prekriveni sedimentom ili tлом ne dolazi do razgradnje zbog

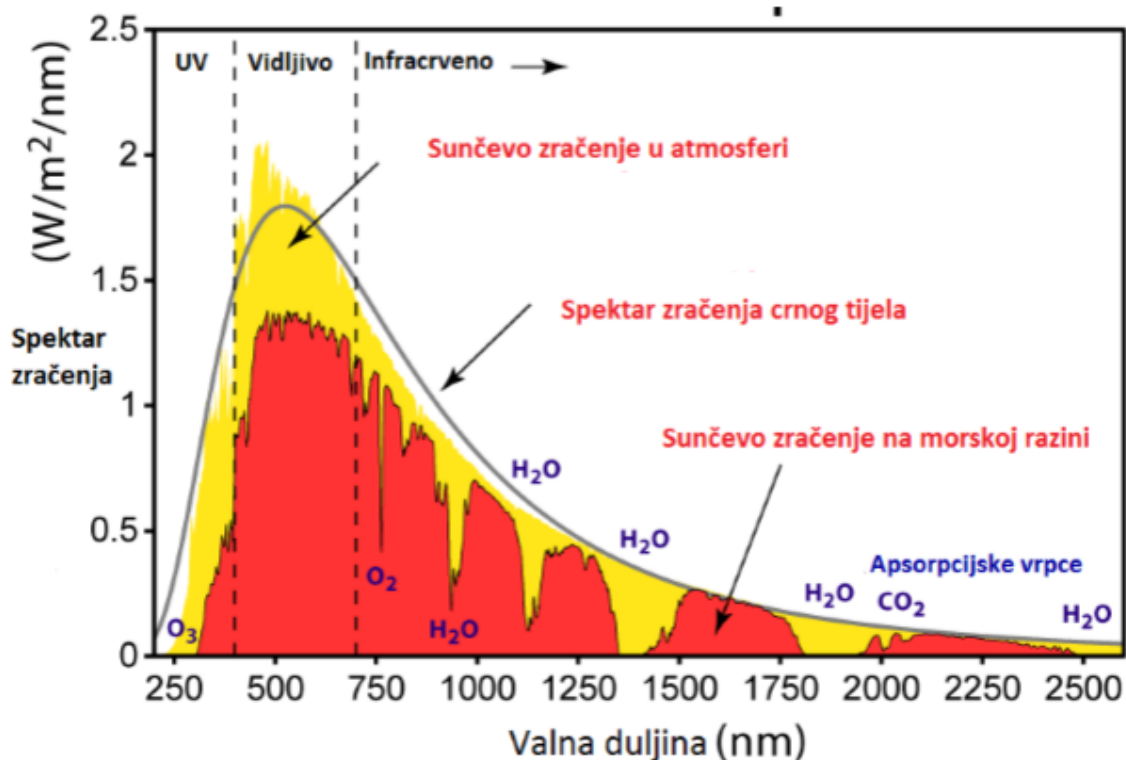
nedostatka Sunčeve svjetlosti. Farmaceutici imaju aromatske prstene, π -konjugirane sustave, heteroatome i druge funkcijske kromoforne skupine koje mogu apsorbirati Sunčevo zračenje. Da bi bili podložni fotolitičkoj razgradnji njihovi apsorpcijski spektri bi se trebali poklapati sa spektrom Sunčeva zračenja.

Učinkovitost fotolitičke razgradnje ovisi o intenzitetu i frekvenciji svjetlosti, godišnjem dobu, vremenskim uvjetima, kvantnom prinosu, strukturi farmaceutika, pH-vrijednosti vode, temperaturi, tvrdoći vode, dubini vode te o koncentracijama pojedinih sastojaka u vodi [5].

Sunčeva svjetlost glavni je izvor energije na našem planetu. Sunčevo zračenje obuhvaća cjelokupni spektar elektromagnetskog zračenja. Na Zemlji, Sunčeva svjetlost se prigušuje i filtrira kroz Zemljinu atmosferu. Zračenje je najveće na gornjoj granici atmosfere, a kako se približava tlu slabi, zbog upijanja i raspršenja na molekulama plinova i primjesa u atmosferi. Jačina zračenja ovisi o klimatskim uvjetima. Za fotolizu farmaceutika značajno je Sunčevo zračenje koje kroz atmosferu dopiye do površine Zemlje. Koliko će biti obasjavanje Zemljine površine Sunčevim zrakama znatno ovisi o godišnjem dobu te o duljini trajanja dana i noći. Tijekom ljeta jače je Sunčevo zračenje i duži je period dana te će Sunčeve zrake jače obasjavati površinu Zemlje što znači da će se razgradnja farmaceutika odvijati brže [8].

Spektar Sunčevog zračenja (**slika 2**), koje dolazi do Zemljine atmosfere, nalazi se u rasponu od 100 nm do oko 1 mm valne duljine. Može se podijeliti u 3 područja:

- **Ultraljubičasto zračenje (UV)** koje je u rasponu valnih duljina 100-400 nm, a sastoji se od UVA, UVB i UVC spektra.
UVC zračenje – područje valnih duljina od 100 do 280 nm
UVB zračenje – područje valnih duljina od 280 do 315 nm
UVA zračenje - područje valnih duljina od 315 do 400 nm
UVC zrake ne prodiru do površine Zemlje jer se apsorbiraju u ozonskom sloju atmosfere, pa Sunčevo zračenje u području ispod 400 nm sadrži 3 – 5 % UV zračenja, kojeg čine UVA i UVB zračenje.
- **Vidljiva svjetlost (VIS)** u rasponu valnih duljina 400-700 nm.
- **Infracrveno zračenje (IR)** u rasponu valnih duljina od 700 nm do 1 mm [9]

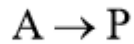


Slika 2. Spektar Sunčevog zračenja [10]

Struktura farmaceutika bitno utječe na fotolitičku razgradnju. Farmaceutici koji pripadaju istoj skupini (imaju sličnu strukturu) mogu se drugačije ponašati tijekom fotolitičke razgradnje. Na fotolitičku razgradnju farmaceutika u prirodnim vodama mogu utjecati tvari uobičajeno prisutne u vodama poput organskih tvari i nitratnih iona. Huminske kiseline su organske tvari koje apsorbiraju Sunčevo zračenje što može uzrokovati sporiju fotolitičku razgradnju farmaceutika. U nekim slučajevima huminske kiseline mogu i ubrzavati fotolitičku razgradnju zbog nastajanja vrlo reaktivnih slobodnih radikala. Nitratni ioni mogu ubrzati fotolitičku razgradnju farmaceutika također nastajanjem vrlo reaktivnih radikala [8].

2.3.2.1 Kinetika fotolitičke razgradnje

Vrijeme poluraspada podrazumijeva vrijeme koje je potrebno da se razgradi pola od početne količine ispitivanog spoja. Možemo ga izračunati ukoliko proučavamo kinetiku fotolitičke razgradnje. Fotolitičke se reakcije uglavnom ponašaju kao reakcije prvog reda te se brzina razgradnje može jednostavno izračunati ukoliko se pretpostavi da se koncentracija ispitivanog spoja smanjuje proporcionalno s vremenom:



gdje je A početni spoj, a P produkt.

Brzina fotolitičke razgradnje jednaka je:

$$v = -\frac{dc_A}{dt} = k \cdot c_A \quad (1)$$

gdje je c_A koncentracija početnog spoja, t je vrijeme provođenja eksperimenta, k je konstanta brzine reakcije.

Integriranjem izraza kojim se opisuje zakon za brzinu reakcije prvog reda dobijemo:

$$c_{A,t} = c_{A,0} \cdot e^{-k \cdot t} \quad (2)$$

Gdje je $c_{A,0}$ početna koncentracija spoja u vremenu $t=0$. Konstantu brzine reakcije moguće je odrediti iz jednadžbe pravca, kao nagib pravca koji prikazuje ovisnost $\ln(c_{A,t}/c_{A,0})$ o t .

Vrijeme poluraspada reakcije prvog reda može se izračunati prema izrazu:

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} \quad (3)$$

Utjecaj temperature na brzinu reakcije povezan je s energijom aktivacije, E_a (J mol^{-1}). To je energija koju je potrebno dovesti molekulama prilikom sudara da bi mogle reagirati. Odnos energije aktivacije, konstante brzine reakcije i temperature dan je Arrheniusovim izrazom:

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} \quad (4)$$

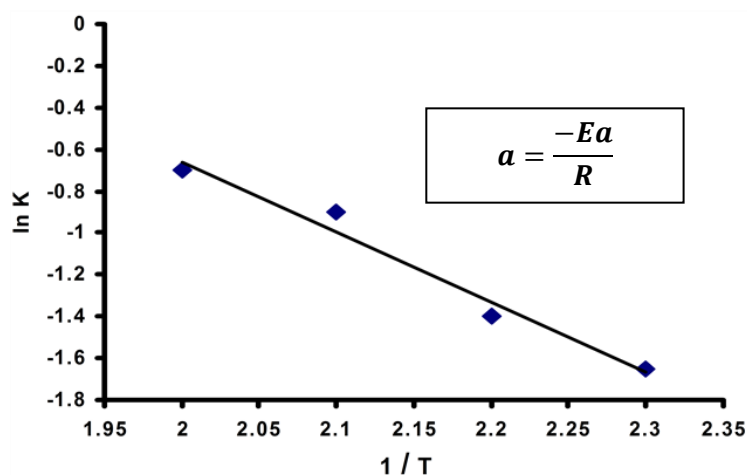
gdje je R opća plinska konstanta ($\text{J mol}^{-1} \text{K}^{-1}$), a T termodinamička temperatura (K).

Uz pretpostavku da se u određenom temperaturnom području energija aktivacije ne mijenja, što je slučaj ako se ne mijenja mehanizam reakcije, moguće je integrirati gornji izraz:

$$\ln k = -\frac{E_a}{RT} + \text{konst.} \quad (5)$$

Energiju aktivacije moguće je odrediti iz nagiba pravca (a) koji pokazuje ovisnost $\ln k$ o $1/T$ [11] (slika 3):

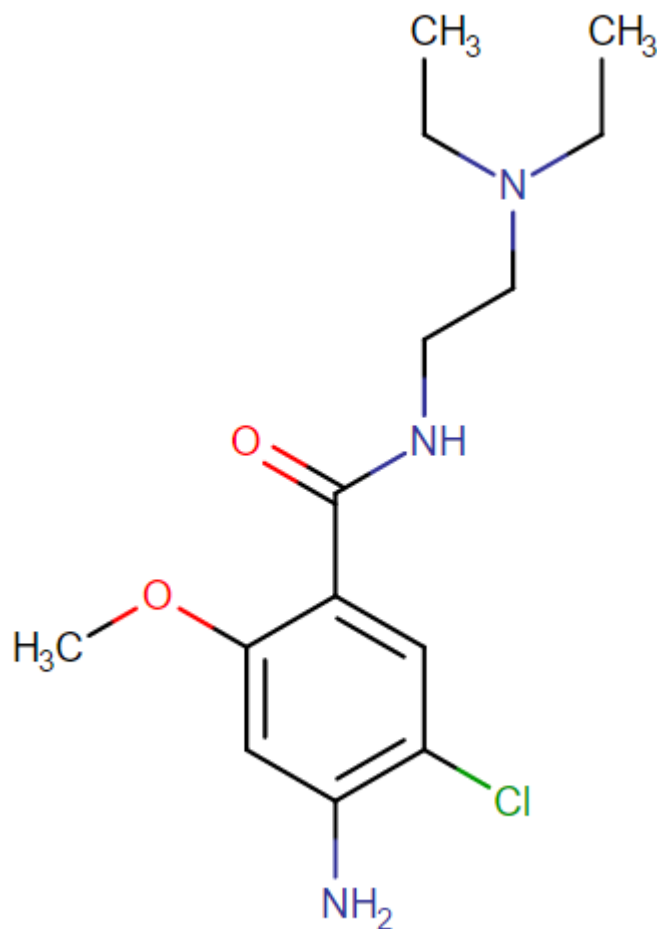
$$E_a = -R \cdot a \quad (6)$$



Slika 3. Ovisnost $\ln k$ o $1/T$ [12]

2.4 Metoklopramid [13]

Metoklopramid (slika 4) je antagonist dopamina D2 koji se koristi kao antiemetik (lijek protiv mučnine i povraćanja). Sinonim za metoklopramid je 2-metoksi-4-amino-5-klor-N,N-(dimetilaminoetil) benzamid. Molekulska masa metoklopramida iznosi $299,80 \text{ g mol}^{-1}$. Konzumira se samo uz liječnički recept. Iz organizma se izlučuje 70-85% putem urina, a 2% putem izmeta.



Slika 4. Strukturna formula metoklopramida

Koristi se za liječenje bolesti gastroezofagealnog refleksa. Također se može koristiti za liječenje mučnine i povraćanja te za pražnjenje želuca. Metoklopramid je koristan za poboljšanje pokretljivosti probavnog sustava, za liječenje dijabetičke gastropareze i za olakšavanje intubacije malog crijeva tijekom radiološkog pregleda. Može se upotrijebiti za liječenje povraćanja uzrokovano kemoterapijom i kao radiosenzitivna sredstva u liječenju karcinoma pluća.

Metoklopramid inhibira opuštanje želučanog mišića koje proizvodi dopamin, čime se ubrzava prolaz u crijevu i pražnjenje želuca sprječavanjem opuštanja želučanog tijela i povećanjem faze aktivnosti antruma (opći izraz za šupljinu ili komoru). Istodobno, ovu akciju prati opuštanje gornjeg tankog crijeva, što rezultira poboljšanom koordinacijom tijela i antruma u želucu i gornjem tankom crijevu. Metoklopramid također smanjuje refluks u jednjak

povećavajući pritisak mirovanja donjeg sfinktera jednjaka i poboljšava uklanjanje kiseline iz jednjaka.

Potrebno ga je konzumirati 30 minuta prije jela bez konzumiranja alkohola. Unosi se u organizam oralno putem tableta i tekućina ili intravenozno putem injekcija.

Nuspojave metoklopramida su gastrointestinalno krvarenje i epilepsija. Bolesnici koji boluju od Parkinsonove bolesti, tumora dojke, bolesnici s oštećenom funkcijom bubrega, osobe s depresijom, starije osobe, djeca do 14 godina starosti i trudnice zahtijevaju posebne mjere opreza prilikom konzumiranja metoklopramida.

2.5 Analitičke metode za praćenje farmaceutika u okolišu

Za identifikaciju i kvantitativno određivanje farmaceutika prisutnih u vrlo niskim koncentracijama u okolišu uglavnom se koriste plinska kromatografija (eng. *gas chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) vezane sa spektrometrijom masa (eng. *mass spectrometry*, MS). Primjena plinske kromatografije za analizu farmaceutika ograničena je zbog njihovih fizikalno-kemijskih svojstava poput polarnosti, nehlapljivosti i nestabilnosti pri povišenim temperaturama. Posljednjih nekoliko godina, HPLC-MS metode sve više zamjenjuju analitičke metode koje koriste detektor s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD) i fluorescentni detektor (eng. *fluorescence detector*, FLD). Fluorescentnim detektorom mogu se postići niske granice dokazivanja ali u nekim slučajevima potrebno je provesti derivatizaciju kako bi se poboljšala fluorescentna svojstva analita, dok je detektor s nizom dioda moguće koristiti za određivanje spojeva koji apsorbiraju u UV/VIS području te kada se analiziraju jako opterećene otpadne vode u kojima su koncentracije farmaceutika relativno visoke. Stoga se spektrometar masa sve više koristi za identifikaciju i kvantitativno određivanje farmaceutika u uzorcima iz okoliša. Uz niže granice dokazivanja i kvantifikacije, HPLC-MS metode omogućuju određivanje molekulske mase farmaceutika kao i utvrđivanje struktura razgradnih produkata [5].

2.5.1 Kromatografija

Kromatografija je separacijska tehnika koja se upotrebljava za razdvajanje, identifikaciju i kvantifikaciju različitih spojeva i grupa spojeva u različitim uzorcima oko nas.

Kromatografske tehnike se koriste u različitim područjima djelovanja ljudi, no njezina najveća primjena je u analizi okoliša (voda, tlo, sediment, zrak). Kromatografski sustav čine nepokretna faza, pokretna faza i ispitivani spoj. Tijekom kromatografskog procesa molekule uzorka prelaze iz pokretne u nepokretnu fazu i obrnuto, pri čemu se uspostavlja dinamička ravnoteža. Pokretna faza, prelazeći preko nepokretne faze, prenosi otopljene tvari, koje se kreću brzinom pokretne faze. Nepokretna faza mora se odabrati tako da zadržavanje molekula u njoj bude selektivno, tj. da različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese. Nepokretna faza je čvrsta tvar ili kapljevina na inertnom nosaču. Neki od primjera nepokretne faze su aluminijev oksid, silikagel, dijatomejska zemlja, škrob, celuloza, različiti ionski izmjenjivači. Kao pokretna faza većinom se primjenjuju organska otapala te smjese organskih otapala i vode.

Postoji više podjela kromatografije koje se temelje na sastavu pokretne faze, obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze te prema načinu izvedbe.

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na temelju sastava pokretne faze:

- plinska kromatografija → pokretna faza je inertni plin
- tekućinska kromatografija → pokretna faza je kapljevina male viskoznosti
- fluidna kromatografija u superkritičnim uvjetima → pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka

Podjela kromatografskih tehnika obzirom na prirodu ravnoteže između pokretne i nepokretne faze:

- razdjelna kromatografija → ravnoteža se uspostavlja između dviju kapljevina, što znači da je i nepokretna faza kapljevina vezana na inertni čvrsti nosač
- adsorpcijska kromatografija → ravnoteža se uspostavlja između kapljevine ili plina u pokretnoj fazi i površine čvrste nepokretne faze, pri čemu se ispitivane molekule izravno vežu na površinu adsorbensa
- afinitetna kromatografija → pri kojoj se na površini čvrste faze nalaze različite funkcionalne skupine s definiranim prostornim rasporedom, a do zadržavanja dolazi

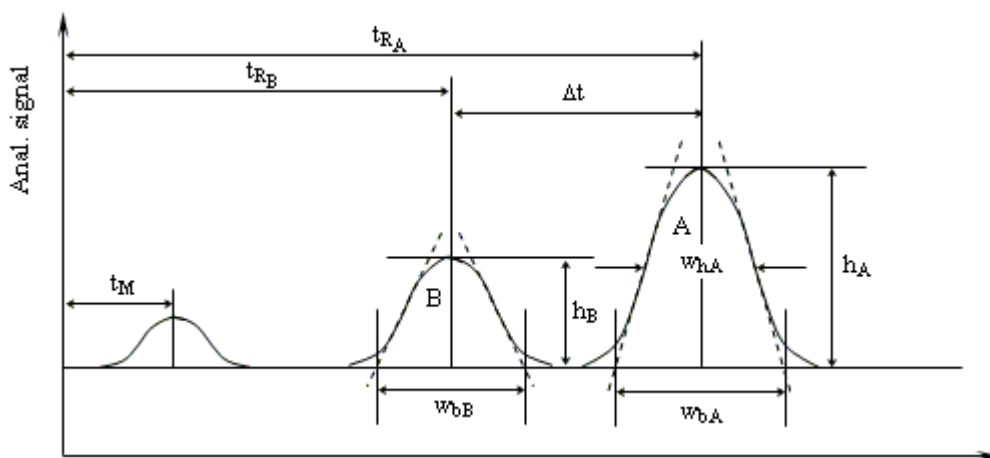
zbog specifičnih interakcija molekula s kemijski vezanim ligandom na površini nepokretne faze

- kromatografija isključenjem → pri kojoj je nepokretna faza materijal s porama definiranih dimenzija i slabo izraženim adsorpcijskim svojstvima, a razdvajanje se molekula zbiva zbog razlike u molekularnoj masi i obujmu

Podjela kromatografskih tehnika prema načinu izvedbe:

- kromatografija na stupcu → nepokretna faza pakirana je u obliku stupca, uzorak koji želimo kromatografski odijeliti i dokazati unosi se u vrlo malom volumenu u pokretnu fazu
- plošna kromatografija → nepokretna faza nanosena je u tankom sloju na inertni čvrsti nosač (npr. staklo), uzorak koji želimo kromatografski odijeliti i dokazati unosi se u vrlo malom volumenu na nepokretnu fazu [14]

Kromatogram (**slika 5**) je grafički prikaz rezultata kromatografskog postupka. Svakoj tvari pripada određena kromatografska vrpca (pik ili vrh) na kromatogramu.



Slika 5. Karakteristična kromatografska krivulja (kromatogram) [15]

Parametri kromatografskog razdvajanja koji utječu na uspješnost kromatografske separacije su: zadržavanje (vrijeme zadržavanja, t_R), protok kroz porozni medij (definiran Darcyjevim zakonom i brzinom pokretne faze), širenje kromatografske zone, (definirano širinom kromatografske zone, w) [14].

Vrijeme zadržavanja, t_R , je vrijeme potrebno da tvar koja se analizira nakon unošenja uzorka stigne u detektor.

Mrtvo vrijeme (zadržano vrijeme), t_M , je vrijeme potrebno da sastojak koji se ne zadržava na koloni prođe kroz kolonu.

Prilagođeno vrijeme zadržavanja, t_R , je razlika između vremena zadržavanja i mrtvog vremena.

Faktor kapaciteta (faktor zadržavanja), k'_A , je pokazatelj duljine zadržavanja spoja na koloni u odnosu na pretpostavku da nema interakcije s nepokretnom fazom [15].

Cilj svake kromatografske separacija je postići što bolju separaciju što se opisuje faktorom razlučivanja, R_s :

$$R_s = 2 \cdot \frac{t_{R2} - t_{R1}}{w_1 + w_2} \quad (7)$$

gdje je:

t_{R1} i t_{R2} – vremena zadržavanja

w_1 i w_2 – širine kromatografskih zona [14]

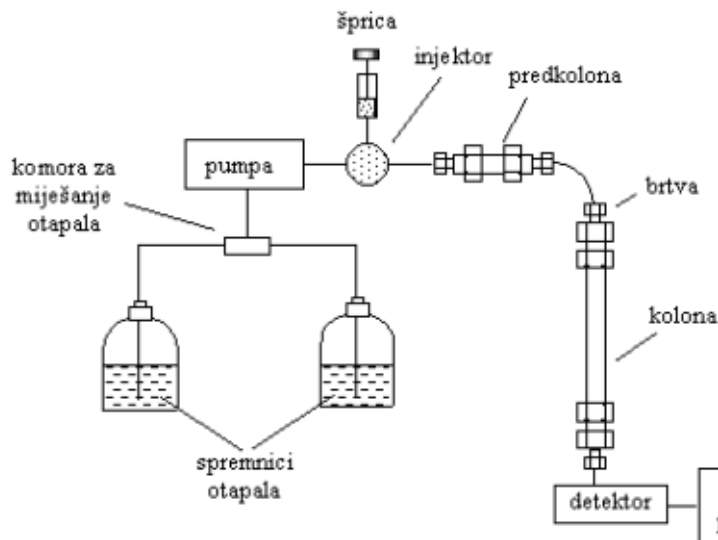
2.5.2 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (eng. *high performance liquid chromatography*, HPLC) je tehnika koja je zastupljena u gotovo svim analitičkim laboratorijima. Uspješno se primjenjuje za odjeljivanje, kvalitativno i kvantitativno određivanje različitih organskih spojeva u kapljevitoj fazi. Njezine izvanredne separacijske sposobnosti i tehnološka unaprijeđenost čine je vrlo korisnom u istraživačkim i analitičkim laboratorijima.

Kao što je već spomenuto u tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretnu fazu mogu činiti različiti sorbensi pa tako imamo adsorpcijsku kromatografiju gdje je nepokretna faza adsorbens i razdjelnu kromatografiju pri kojoj je kapljevinska nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti ima mnoge prednosti kao što su kontrolirani protok pokretne faze, mali promjer kolone i mogućnost korištenja kolone više puta, precizno injektiranje malih volumena uzoraka, osjetljivost detektora za detekciju malih količina analita, visoki stupanj separacije i brza analiza.

HPLC sustav sastoji se od komore za miješanje otapala, pumpe i otplinjača, sustava za unošenje uzorka (injektor), kolone, detektora, te sustava za obradu podataka (**slika 6**). U komori za miješanje otapala umješavaju se otapala za pokretnu fazu. Koriste se uobičajena otapala, čista ili u kombinaciji (npr. voda, metanol ili neko drugo organsko otapalo). Vodena faza može biti i neki pufer, kako bi se poboljšalo razdvajanje. Sastav pokretne faze može biti stalan tokom cijele analize, izokratičan, a moguće je koristiti i gradijentno eluiranje, što podrazumijeva promjenu sastava pokretne faze tijekom eluiranja [16].



Slika 6. Shematski prikaz HPLC sustava [17]

Pumpe visokog pritiska u takvim sustavima moraju zadovoljavati vrlo stroge uvjete: vrlo visoke tlakove, izlaz bez pulsiranja tlaka, širok raspon brzina protoka, ponovljivost protoka od 99,5% ili više te otpornost na koroziju izazvanu različitim otapalima.

Otplinjač uklanja zaostale plinove koji bi zbog stvaranja mjehurića mogli prouzročiti širenje zona eluiranih sastojaka i ometati rad detektora.

Sustav za unošenje uzoraka omogućava unošenje različitih volumena uzoraka u pokretnu fazu. To su automatski uzorkivači koji pojednostavljuju rukovanje sustavom i smanjuju mogućnost pogreške kao posljedice ručnog injektiranja. Omogućuju kontinuirani rad sustava i bitno olakšavaju rad u slučaju analiza velikih serija uzoraka. Još jedna od prednosti je ta što za vrijeme analize nije potrebno biti pored uređaja.

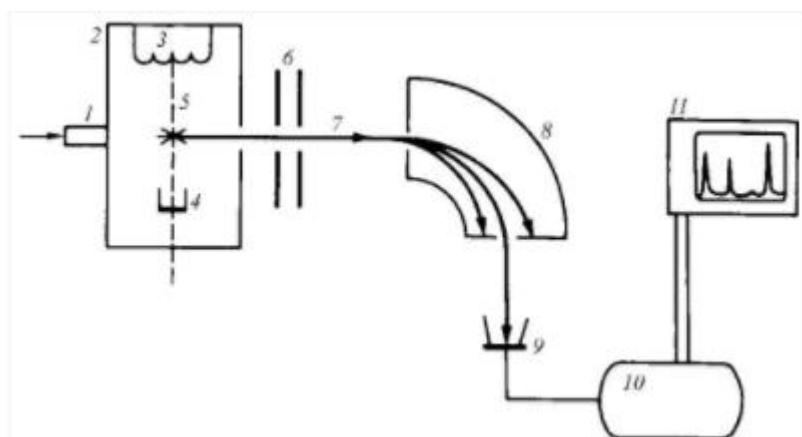
U koloni se odvija sam proces kromatografije. Kolona je obložena čeličnom cijevi. Cijeli sustav može se grijati da bi se poboljšala učinkovitost separacije, ali rijetko na temperaturu višu od 60 °C zbog moguće razgradnje nepokretne faze ili hlapljivosti pokretne faze. Moguće je i postavljanje pretkolone za zaštitu analitičke kolone od zagađenja nečistim uzorcima. Detektor mjeri promjenu određene fizikalne veličine koju uzrokuje prolaz ispitivane tvari kroz mjerno-protočnu ćeliju detektora. Postoji više tipova detektora, a neki od najčešće korištenih su:

- spektrofotometrijski detektori, UV-VIS i detektor s nizom dioda (eng. *diode array detector*, DAD) → mjere apsorpciju zračenja kod određene valne duljine (UV-VIS) ili širokog spektra valnih duljina što rezultira karakterističnim signalom u kromatogramu (DAD)
- spektrometar masa (eng. *mass spectrometry*, MS) → temelji se na ionizaciji atoma ili molekula te njihovom sortiranju i dokazivanju prema omjeru njihove mase i naboja (m/z) [18]

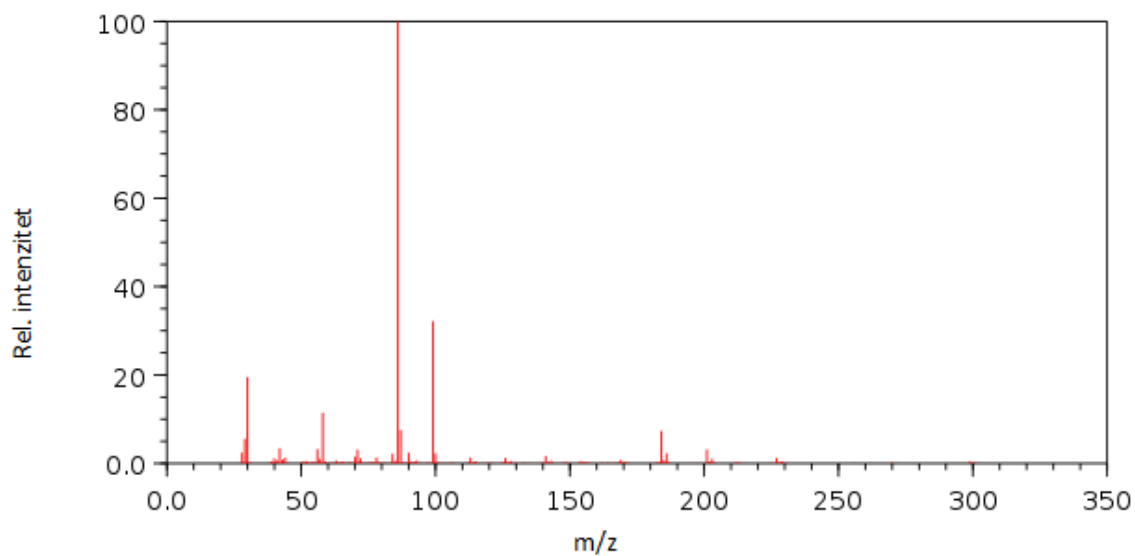
2.5.3 Spektrometrija masa

Spektrometrija masa je analitička tehnika pomoću koje je moguće kvalitativno analizirati molekule. Koristi se za određivanje strukture, detekciju, identifikaciju, kvantifikaciju farmaceutskih molekula, biopolimera i raznih organskih tvari. Spektrometar masa radi s velikom osjetljivošću što znači da je moguće analizirati uzorke u kojima je koncentracija analita mala [19].

Spektrometar masa (**slika 7**), koji radi u visokom vakuumu, sastoji se od 4 osnovna dijela: sustava za unošenje uzorka, ionskog izvora koji razlučuje ispitivani uzorak na ione (uglavnom bombardiranjem atoma ili molekula elektronima) i ubrzava ih u električnom polju, analizatora, koji je uglavnom magnetsko polje, gdje se savijaju putanje različitih iona i tako ih razdvaja na temelju omjera njihove mase i naboja (m/z) te detektora u kojem se ioni detektiraju. Ukoliko se mijenja jakost magnetskog polja mogu se registrirati ioni različitih masa čime nastaje spektar masa (**slika 8**) karakterističan za određeni kemijski spoj [20].



Slika 7. Shematski prikaz spektrometra masa. 1-sustav za unošenje uzorka, 2-ionski izvor, 3-katoda, 4-anoda, 5-elektronski snop, 6-električno polje, 7-ionski snop, 8-magnetsko polje, 9-detektor [20]



Slika 8. Spektar masa metoklopramida [21]

Za analizu složenih smjesa spektrometar masa izravno se povezuje s plinskim ili tekućinskim kromatografom, u kojem se sastojci smjese, prije analize, prvo razdvajaju.

2.6. Statistička obrada rezultata [22, 23]

Prilikom izvođenja statističkih testova postoje određeni koraci kojih se treba pridržavati da bi zaključak bio pouzdan:

1. Postaviti nultu hipotezu (hipoteza koja pretpostavlja da ne postoje statistički značajne razlike između ispitivanih skupina)
2. Izabrati razinu pouzdanosti
3. Odrediti veličinu uzorka
4. Izabrati statistički test za testiranje hipoteze
5. Utvrditi kritičnu vrijednost za odabrani statistički test
6. Prikupiti podatke
7. Izračunati statističku veličinu za odabrani statistički test
8. Donijeti statistički zaključak

F i t testovi su statistički testovi koji služe za uspoređivanje vrijednosti dvaju ili više grupa podataka.

F -testom uspoređujemo varijancije dva niza mjerenja te utvrđujemo postoji li statistički značajna razlika između tih varijanci. Pri tome koristimo se izrazom:

$$F = \frac{s_1^2}{s_2^2} \quad (8)$$

pri čemu je $s_1 > s_2$.

Nakon što se izračuna F -vrijednost, uspoređuje se s kritičnom vrijednošću (koja se očitava iz statističkih tablica). Ukoliko je $F_{izr} > F_{krit}$ nulta hipoteza se odbacuje, a ukoliko je $F_{izr} < F_{krit}$ nulta hipoteza se zadržava.

t -test služi za utvrđivanje postojanja sustavnih pogrešaka. Koristi se u slučajevima kada se uspoređuje srednja vrijednost grupe podataka sa pravom vrijednošću te kada se uspoređuju srednje vrijednosti dvije grupe podataka.

Ukoliko se t -test provodi tako da se uspoređuju eksperimentalno određene srednje vrijednosti s pravom vrijednošću tada se parametar t računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$t = \frac{(\bar{x} - \mu)\sqrt{N}}{s} \quad (9)$$

gdje je \bar{x} srednja vrijednost, N broj mjerenja i s standardno odstupanje.

Dobivena vrijednost uspoređuje se s kritičnom t -vrijednošću, koja se očitava iz statističkih tablica ovisno o broju stupnjeva slobode i željenoj razini pouzdanosti. Ukoliko vrijednost t ne prelazi kritičnu vrijednost ($t_{izr} < t_{krit}$) nulta hipoteza se prihvaća, u suprotnom nulta hipoteza se odbacuje. Prihvaćanje nulte hipoteze podrazumijeva da se razlika između promatrane i prave vrijednosti može pripisati slučajnoj pogrešci.

Ukoliko se t -test provodi tako da se uspoređuju dvije eksperimentalno određene srednje vrijednosti te kada su standardna odstupanja dvije metode bliska tada se parametar t računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{s \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad (10)$$

a standardno odstupanje se računa prema jednadžbi:

$$S = \sqrt{\frac{(N_1 - 1)s_1^2 + (N_2 - 1)s_2^2}{(N_1 + N_2 - 2)}} \quad (11)$$

Ukoliko se t -test provodi tako da se uspoređuju dvije eksperimentalno određene srednje vrijednosti te kada se standardna odstupanja dvije metode značajno razlikuju tada se parametar t računa prema sljedećoj jednadžbi:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2)}{\sqrt{\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}}} \quad (12)$$

a standardno odstupanje se računa prema jednadžbi:

$$v = \frac{\left(\frac{s_1^2}{N_1} + \frac{s_2^2}{N_2}\right)^2}{\left(\frac{s_1^4}{N_1^2(N_1 - 1)} + \frac{s_2^4}{N_2^2(N_2 - 1)}\right)} \quad (13)$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1 Materijali

3.1.1 Kemikalije

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

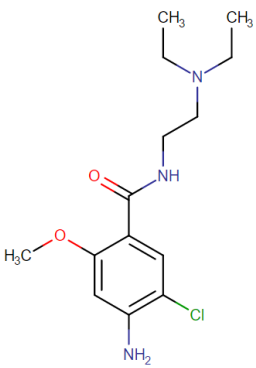
Tablica 1. Popis kemikalija i njihovih proizvođača

NAZIV	MOLEKULSKA FORMULA	ČISTOĆA	PROIZVOĐAČ
Borna kiselina	H_3BO_3	p.a.	Zorka Šabac, Srbija
Kalijev hidrogenfosfat	K_2HPO_4	p.a.	Fisher Scientific, SAD
Kalijev klorid	KCl	p.a.	Lachner, Hrvatska
Limunska kiselina	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	p.a.	Gram-mol, Hrvatska
Natrijev hidroksid	NaOH	p.a.	Alkaloid, Makedonija

3.1.2 Metoklopramid

U **tablici 2** prikazana su fizikalno-kemijska svojstva metoklopramida.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva metoklopramida

Generičko ime	Metoklopramid
Grupa farmaceutika	Antiemetik
Strukturna formula	
Molekulska formula	C ₁₄ H ₂₂ ClN ₃ O ₂
CAS broj	364-62-5
Molarna masa	299,80 g mol ⁻¹
Naziv po IUPAC-u	2-metoksi-4-amino-5-klor-N,N-(dimetilaminoetil) benzamid
Topljivost u vodi, S [13]	0,31 mg mL ⁻¹
pK_k [13]	9,27

3.1.3 Izvorska voda

Za izvođenje eksperimentalnog dijela, korištene su izvorska i MilliQ voda. MilliQ voda korištena je u eksperimentima hidrolitičke razgradnje, a u eksperimentima fotolitičke razgradnje korištene su obje.

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

3.2 Instrumenti

3.2.1 Analitička vaga

Analitička vaga je osjetljiv i skup instrument za precizno određivanje mase tvari. O njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata analize. Najrašireniji tip analitičke vage jest vaga nosivosti 100 g i osjetljivosti 0,1 mg. Nijednu kvantitativnu kemijsku analizu nije

moгуće napraviti bez upotrebe vage jer, bez obzira na metodu koju koristimo, uvijek treba odvagati uzorak za analizu i potrebne količine reagensa za pripravu otopina.

Prilikom izvođenja eksperimenta korištena je analitička vaga XS204 DeltaRange proizvođača Mettler Toledo (Greifensee, Švicarska) prikazana na **slici 9**.

Specifikacije analitičke vage:

- maksimalni kapacitet: 220 g
- očitavanje: 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 9. Analitička vaga XS204 DeltaRange, Mettler Toledo

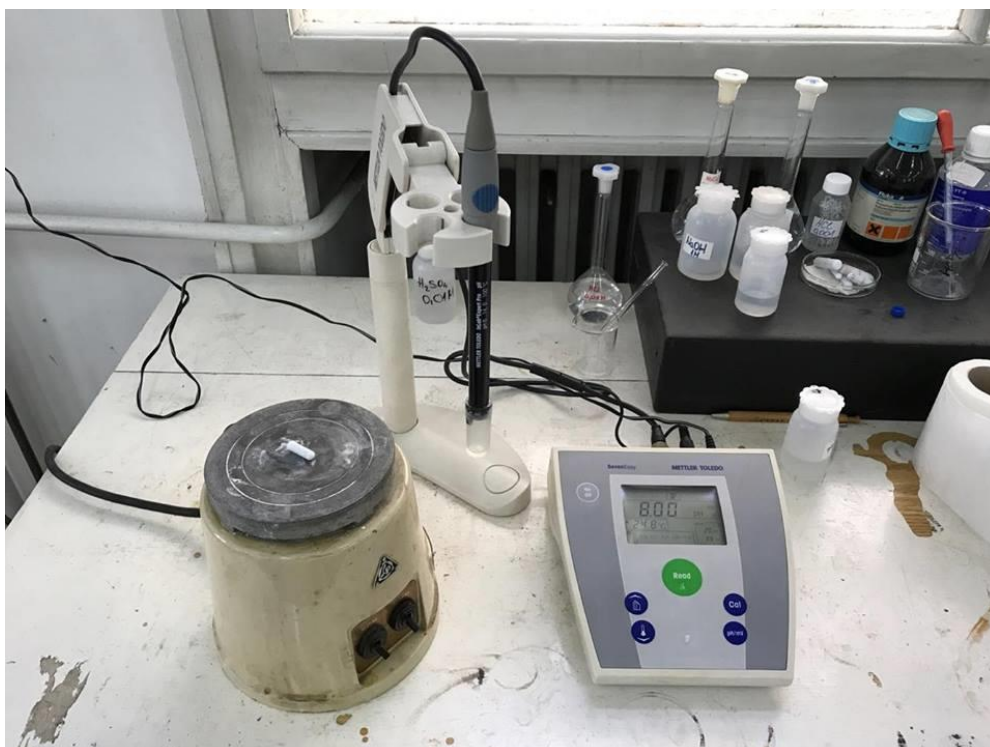
3.2.2 pH-metar

pH-metar je elektronički uređaj za potenciometrijsko određivanje pH-vrijednost tekućih uzoraka. Sastoji se od elektrode koja mjeri pH-vrijednost kao aktivnost vodikovih iona koji okružuju njezin okrugli završetak. Elektroda proizvodi malu voltažu što se mjeri i prikazuje kao pH-vrijednost pomoću pH-metra. Prije mjerenja uređaj je potrebno umjeriti s puferima poznatih pH-vrijednosti (pH 4 i pH 7).

Prilikom izvođenja eksperimenta korišten je pH-metar S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska) prikazan na **slici 10**.

Specifikacije pH-metra:

- raspon vrijednosti: 0 – 14
- rezolucija: 0,01 pH
- temperaturni raspon: 5 °C - 105 °C



Slika 10. pH-metar S20 SevenEasy

3.2.3 Sunset CPS+

Suntest CPS+ (Atlas, Linsengericht, Njemačka) (**slika 11**) 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 zračenja

- vrijeme izlaganja uzorka zračenju



Slika 11. Sunset CPS+

3.2.4 Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti sa spektrometrom masa

Analiza uzoraka provedena je na vezanom sustavu tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – spektrometrija masa (HPLC-MS/MS). Korišten je kromatograf Agilent (Santa Clara, CA, SAD) Series 1200 sa spektrometrom masa s trostrukim kvadripolom Agilent 6410 QqQ (**slika 12**). Uređaj je opremljen termostatiranom komorom za kromatografsku kolonu, vakumskim degazereom, automatskim dodavačem uzoraka i binarnom pumpom.

Upravljanje instrumentom i obrada podataka provedeno je računalom korištenjem programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition for Triple Quad B.01.04 (B84).



Slika 12. Agilent kromatografski sustav Series 1200 sa spektrometrom masa 6410 QqQ

3.3. Metode rada

3.3.1 Priprema pufera

Prilikom ispitivanja hidrolize metoklopramida korištene su otopine pufera pH 4, 7 i 9.

Otopina pufera pH 4 pripremljena je miješanjem 38,55 mL K_2HPO_4 ($c=0,2$ M) te 61,45 mL limunske kiseline, $C_6H_8O_7$ ($c=0,1$ M). Nakon pripreve pufera pH-metrom je izmjerena pH-vrijednost 4,00.

Otopina pufera pH 7 pripremljena je miješanjem 29,63 mL NaOH ($c=0,1$ M), 50 mL K_2HPO_4 ($c=0,1$ M) te 20,73 mL MilliQ vode. Izmjerena pH-vrijednost pufera iznosila je 7,04.

Otopina pufera pH 9 pripremljena je miješanjem 21,30 mL NaOH ($c=0,1$ M), 50 mL H_3BO_3 ($c=0,1$ M) u KCl ($c=0,1$ M) te 28,70 mL MilliQ vode. Izmjerena pH-vrijednost pufera iznosila je 9,00.

3.3.2 Priprema standardnih otopina

Temeljna standardna otopina (TSO) metoklopramida masene koncentracije 1 mg mL^{-1} (1000 mg L^{-1}) pripremljena je vaganjem 20,00 mg uzorka metoklopramida na analitičkoj vagi.

Uzorak je kvantitativno prenesen u odmjernu tikvicu s ravnim dnom od 20 mL te je tikvica nadopunjena do oznake s MilliQ vodom.

Radne standardne otopine metoklopramida korištene za eksperimente hidrolize pripremljene su uzimanjem alikvota od 250 μL TSO mikropipetom koji su preneseni u odmjerne tikvice s ravnim dnom od 25 mL te nadopunjene otopinama pufera pH 4, 7 ili 9 do oznake.

Koncentracija metoklopramida u tako pripremljenim otopinama iznosila je 10 mg L^{-1} .

Za eksperimente fotolize, iz TSO metoklopramida pripravljene su radne standardne otopine masene koncentracije 10 mg L^{-1} uzimanjem alikvota TSO od 500 μL koji je prenesen u odmjernu tikvicu s ravnim dnom od 50 mL. Tikvica je nadopunjena do oznake s MilliQ vodom ili s izvorskom vodom ovisno o eksperimentu. Iz radne standardne otopine u kvarcne posudice preneseno je 40 mL.

Temeljne i radne standardne otopine čuvane su na temperaturi 4 $^{\circ}\text{C}$ u mraku.

3.3.3 Karakterizacija izvorske vode

Električna provodnost i pH-vrijednost izvorske vode izmjerene su na pH-metru S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Greifensee, Švicarska). Kapacitet konduktometrijske ćelije određen je u 0,01 mol dm^{-3} otopini kalijeva klorida (KCl) i iznosio je 0,477 cm^{-1} . Nakon umjeravanja ćelije, ćelija je isprana MilliQ vodom i premještena u laboratorijsku čašu s uzorkom izvorske vode te je izmjerena električna provodnost izvorske vode 35,9 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Nakon toga provedeno je umjeravanje pH-metra s dvije standardne otopine pH-vrijednosti 4 i 7, potom je izmjerena pH-vrijednost uzorka izvorske vode koja je iznosila 5,07.

3.3.4 Hidrolitička razgradnja

Ispitivanja hidrolitičke razgradnje metoklopramida provedeno je prema OECD postupku 111 [24]. Ispitivanje hidrolize farmaceutika provedeno je u inkubatoru 120 sati na 50 $^{\circ}\text{C}$ pri vrijednostima pufera pH 4, 7 i 9. Pripremljene otopine metoklopramida u puferima propuhane su argonom kako bi se uklonio sav zrak. Nakon što su propuhane, svaka od tri otopine metoklopramida u puferu podijeljena je u 6 vijalica što je ukupno 18 vijalica. Od toga je njih 9 (3 za svaki pufer) stavljeno u inkubator na temperaturu od 50 $^{\circ}\text{C}$ na 5 dana (vrijeme hidrolize $t_h=120$ h), a drugih 9 vijalica je zamrznuto u hladnjaku (vrijeme hidrolize $t_h=0$ h).

Prilikom izvođenja eksperimenata hidrolize bilo je potrebno prekriti aparaturu kako bi se spriječila fotolitička razgradnja farmaceutika. Nakon završetka ispitivanja vijale su prenesene na kromatografsku analizu kako bi se utvrdio stupanj hidrolitičke razgradnje.

Nakon 120 sati minimalni stupanj hidrolize mora biti veći od 10 %, inače se smatra da spoj ne hidrolizira.

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

$$S (\%) = \frac{c_0 - c_t}{c_0} \cdot 100 \quad (10)$$

gdje je c_0 početna koncentracija spoja, c_t je koncentracija u određenom vremenu (t).

3.3.5 Fotolitička razgradnja

Pripremljene otopine farmaceutika u kvarcnim posudicama osvjetljavane su na uređaju Sunset CPS+. Tijekom prvog dijela eksperimenta intenzitet zračenja bio je 250 W m^{-2} , a temperatura je održavana na $(25 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$. Također su provedena ispitivanja fotolitičke razgradnje na temperaturi $(10 \pm 2) \text{ }^\circ\text{C}$. Tijekom provođenja eksperimenta, u određenim vremenski intervalima, uzimani su uzorci od $500 \text{ }\mu\text{L}$ pomoću mikropipete te su stavljeni u vijalice za analizu na HPLC-MS instrumentu. U svakom eksperimentu praćena je fotolitička razgradnja na tri paralelna uzorka.

Prilikom pripreme otopina koje su podvrgnute Sunčevom zračenju, pripremljene su i otopine kontrolnih uzoraka. Sastav kontrolnih uzoraka isti je kao i sastav ispitivanih otopina. Kontrolni uzorci također su stavljeni u Suntest ali su aluminijskom folijom bili zaštićeni od zračenja. Kontrolni uzorci služili su za potvrdu da razgradnja ispitivanih otopina nije uzrokovana i drugim procesima, već samo fotolizom.

3.3.6 Analiza tekućinskom kromatografijom vezanom sa spektrometrom masa

Uzorci metoklopramida nakon hidrolitičke razgradnje analizirani su kromatografijom obrnutih faza na instrumentu Waters 2795 Alliance HPLC Sistem s 2996 PDA Detektorom. Korištena je kolona Kinetex C18 tvrtke Phenomenex dimenzija $150 \text{ mm} \times 4,60 \text{ mm}$, veličine čestica $5 \text{ }\mu\text{m}$ te veličine pora 100 \AA . Temperatura kolone bila je $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Kontrola instrumenta, dostava podataka i obrada provedeni su računalnim programom MassLynx V4.1 SCN 714 Waters Inc. software. Pokretna faza u ovom sustavu bila je $0,1\%$ mravlja kiselina u MilliQ vodi (A) i $0,1\%$ mravlja kiselina u acetonitrilu (B). Volumen injektiranja bio je $10 \text{ }\mu\text{L}$, a

protok 0,5 mL min⁻¹. Sastav pokretne faze je od 0 min do 10 min (85 % A i 15 % B). Ukupno vrijeme analize je 10 minuta.

Uzorci metoklopramida nakon fotolitičke razgradnje analizirani su na instrumentu Mass HunterAgilent Series 1200 HPLC sistem spojenim sa spektrometrom masa Agilent 6410. Ionizacija je provedena elektroraspršenjem u pozitivnom modu (ESI+). Korištena je kolona Kinetex C18 tvrtke Phenomenex dimenzija 100 mm x 2,10 mm, veličine čestica 2,6 µm te veličine pora 100 Å. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena su pomoću računalnog programa Agilent MassHunter 2003-2007 Data Acquisition za Triple Quad B.01.04 (B84). Pokretna faza u ovom sustavu bila je 0,1% mravlja kiselina u MilliQ vodi (A) i 0,1% mravlja kiselina u acetonitrilu (B). Volumen injektiranja bio je 5 µL i korišteno je gradijentno eluiranje (**tablica 3**) uz protok 0,2 mL min⁻¹. Ukupno vrijeme analize je 20 minuta. Budući da se radi o gradijentnom eluiranju, prije svakog injektiranja uzoraka potrebno je kolonu prethodno uravnotežiti. Za to je potrebno 7 minuta.

Uvjeti na spektrometru masa:

- temperatura plina: 350 °C
- protok plina: 11 L min⁻¹
- tlak raspršivača plina: 35 psi
- napon kapilare pozitivan: 4000 V

Tablica 3. Sastav pokretne faze tijekom kromatografske analize

t/min	A/%	B/%
0	95	5
6	85	15
12	70	30
20	50	50

4. REZULTATI I RASPRAVA

Dolaskom u okoliš farmaceutici mogu biti podvrgnuti biotičkim ili abiotičkim procesima koji rezultiraju njihovom razgradnjom. Rezultat može biti smanjenje koncentracije 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 farmaceutika metoklopramida.

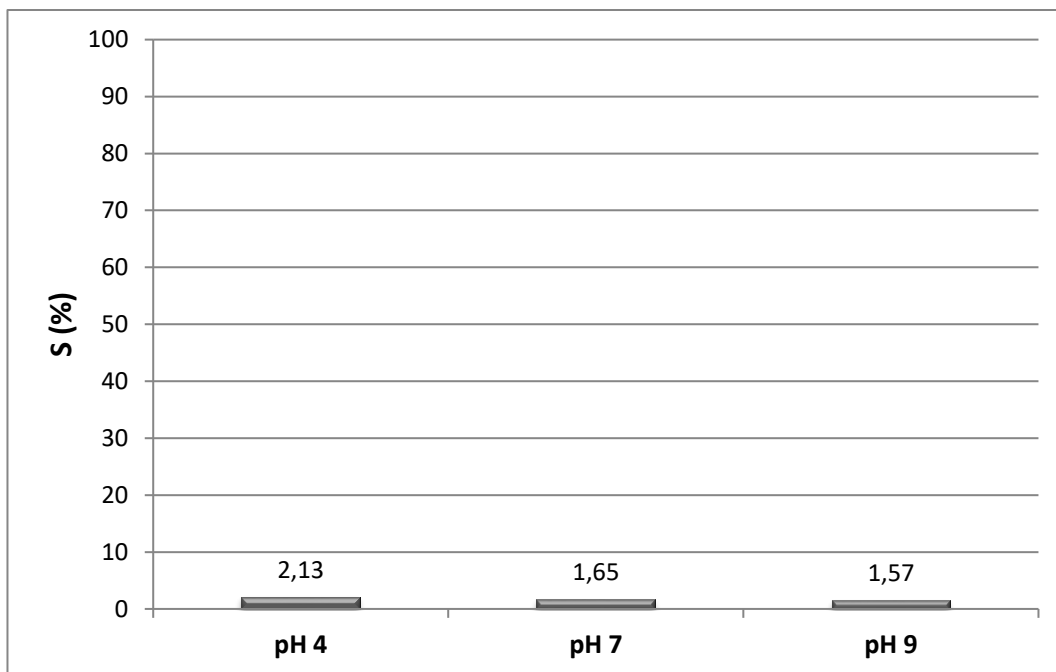
4.1 Karakterizacija izvorske vode

Izvorska voda uzorkovana je 20. listopada 2016. u 19:45 h na izvoru "Vrelo" u Fužinama (Republika Hrvatska). Uzorku izvorske vode pri 25 °C izmjerena je pH-vrijednost 5,07 i električna provodnost 35,09 $\mu\text{S cm}^{-1}$. Konstanta ćelije koja je korištena iznosila je 0,477 cm^{-1} . Koncentracija anorganskih iona određen je ionskom kromatografijom: $\gamma(\text{Cl}^-)=1,7 \text{ mg L}^{-1}$, $\gamma(\text{NO}_3^-)=7,8 \text{ mg L}^{-1}$ i $\gamma(\text{SO}_4^{2-})=1,9 \text{ mg L}^{-1}$. Koncentracija ukupnog organskog ugljika (eng. *total organic carbon*, TOC) određena je kao NPOC (eng. *non-purgeable organic carbon*) i iznosila je 0,2622 mg L^{-1} .

4.2 Hidrolitička razgradnja

Ispitivanje hidrolitičke razgradnje metoklopramida provedeno je na temperaturi od 50 °C u vremenu od 120 sati (5 dana). Razgradnja je ispitana u puferima pH-vrijednosti 4, 7 i 9.

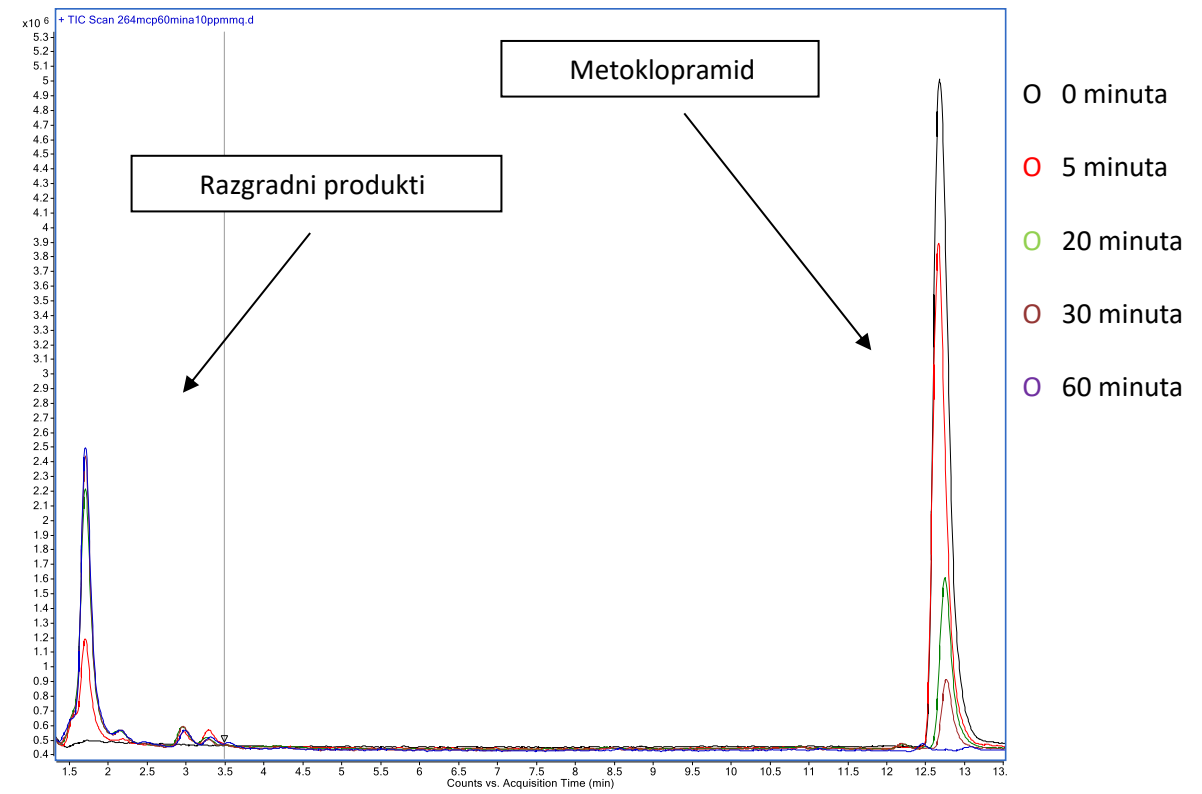
Nakon provedenog eksperimenta maksimalna hidrolitička razgradnja metoklopramida uočena je pri pH 4 i iznosi 2,13% (**slika 13**) što znači da je metoklopramid otporan na hidrolitičku razgradnju pri ispitivanim pH-vrijednostima te nisu provođena detaljnija ispitivanja hidrolitičke razgradnje. Dobiveni rezultati, izraženi kao srednja vrijednost tri paralelna mjerenja, prikazani su na **slici 13**.



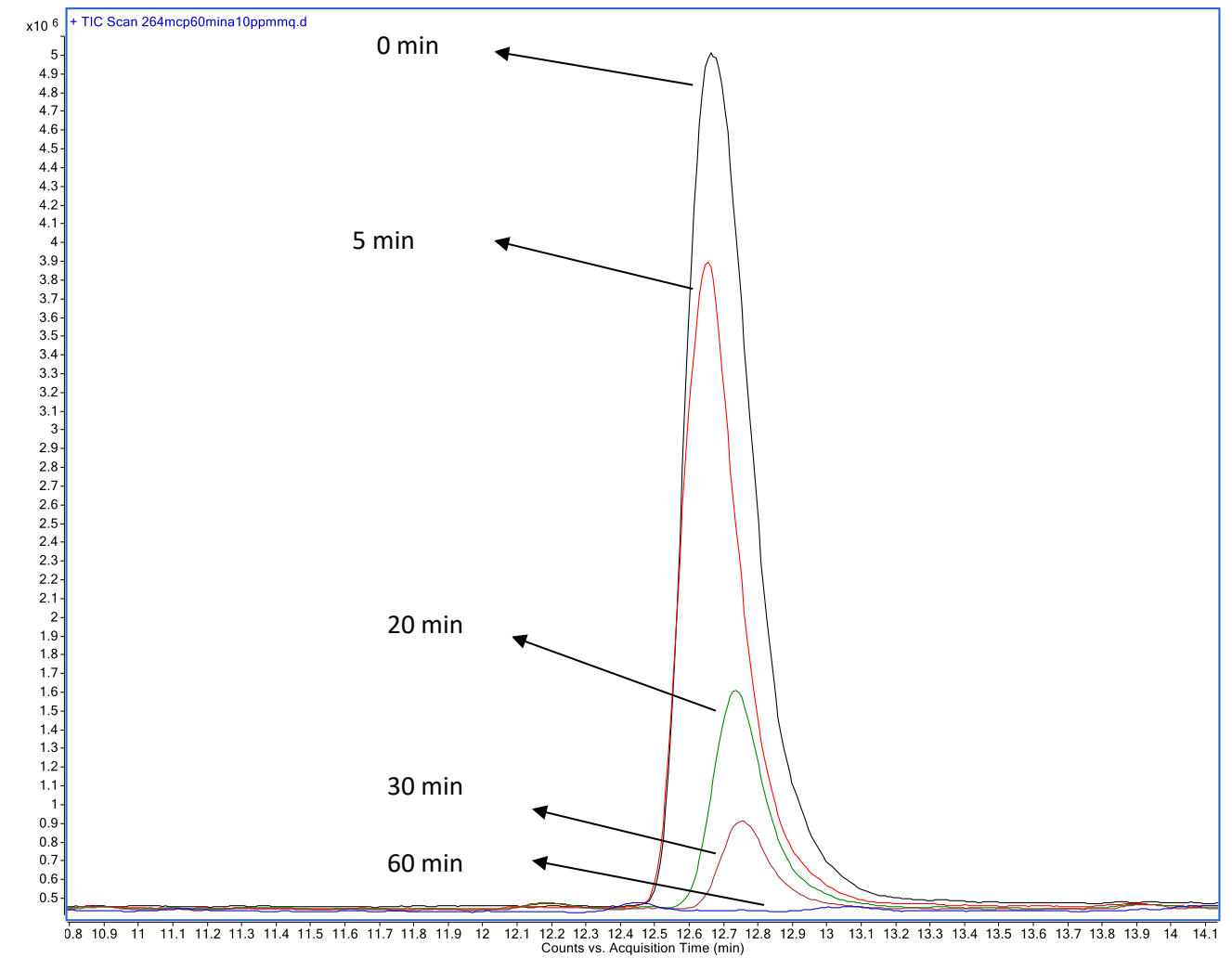
Slika 13. Stupanj hidrolitičke razgradnje metoklopramida pri vrijednostima pH 4, 7 i 9 te pri 50 °C

4.3 Fotolitička razgradnja

Tijek fotolitičke razgradnje metoklopramida praćen je kromatografski, a dobiveni kromatogrami pri različitim vremenima izlaganja umjetnom Sunčevom zračenju, prikazani su na **slici 14**. Kromatografska zona metoklopramida nalazi se na vremenu zadržavanja $t_R = 12,7$ min i može se uočiti njeno smanjenje s povećanjem vremena izlaganja uzorka umjetnom Sunčevom zračenju (**slike 14 i 15**).

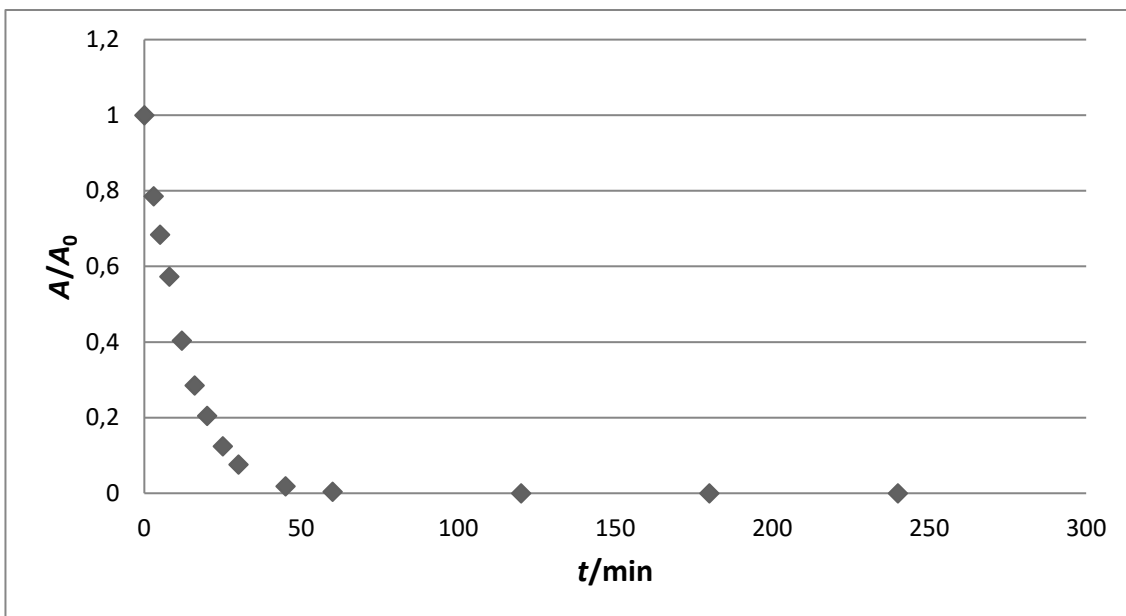


Slika 14. Kromatogram metoklopramida (10 mg L^{-1}) pri različitim vremenima izlaganja umjetnom Sunčevom zračenju

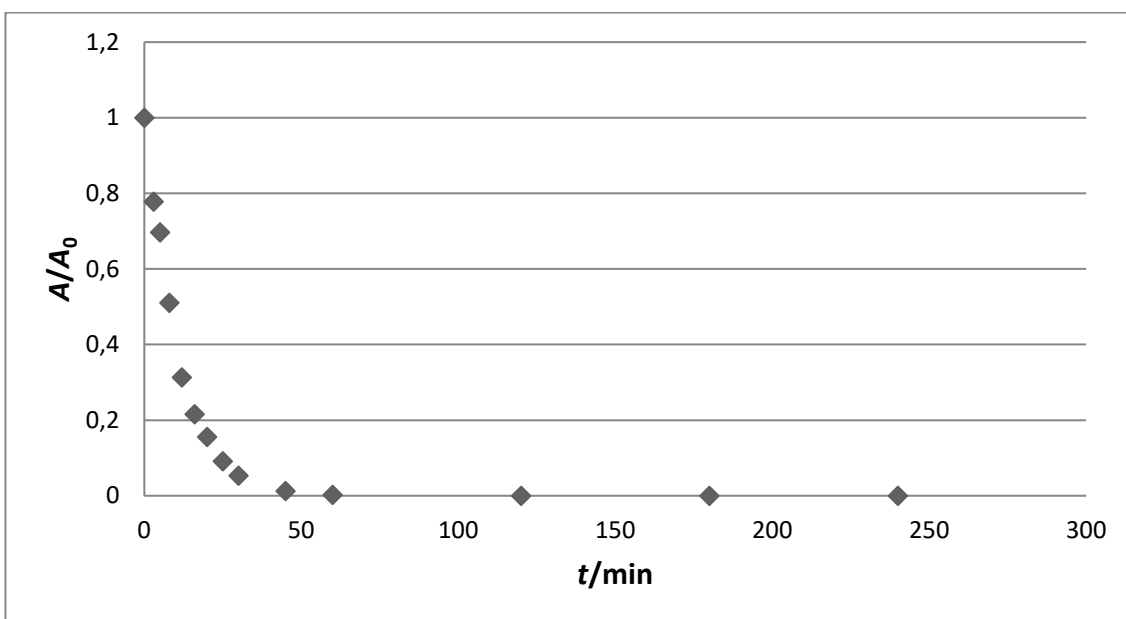


Slika 15. Uvećani prikaz slike 14 za kromatografsku zonu metoklopramida

Na **slikama 16 i 17** prikazana je promjena koncentracije metoklopramida tijekom fotolitičke razgradnje u MilliQ i izvorskoj vodi pri 25 °C. Smanjenje koncentracije praćeno je kao relativna površina ispod kromatografske zone metoklopramida, A/A_0 , gdje je A površina ispod kromatografske zone u vremenu t , a A_0 površina ispod kromatografske zone u vremenu $t=0$.

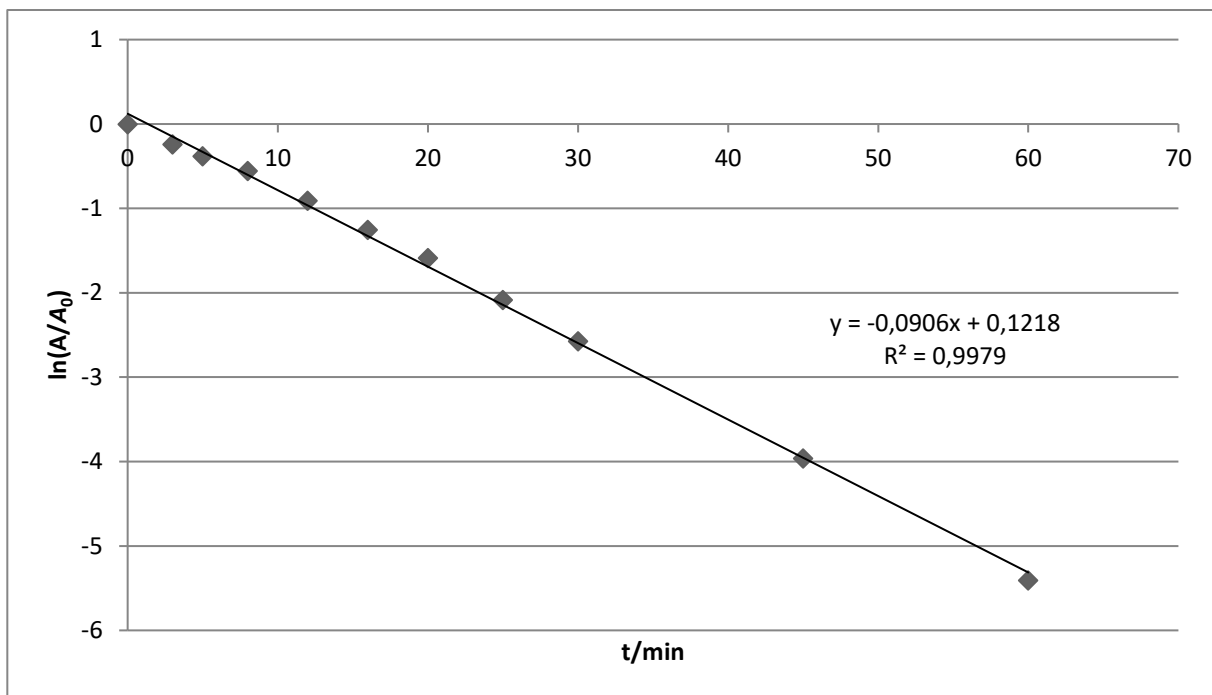


Slika 16. Promjena koncentracije metoklopramida (10 mg L^{-1}) u MilliQ vodi pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$

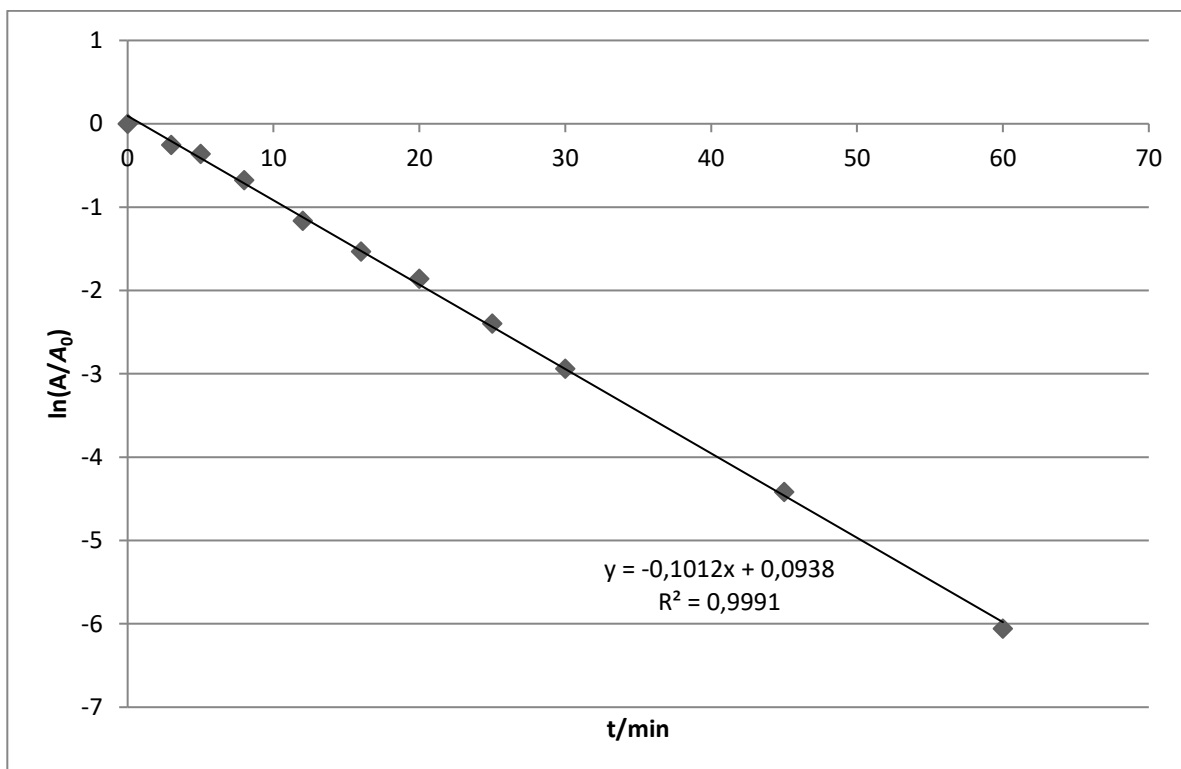


Slika 17. Promjena koncentracije metoklopramida (10 mg L^{-1}) u izvorskoj vodi pri $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Da bi se odredila kinetika razgradnje, grafički su prikazane ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu (slike 18 i 19) te su iz nagiba dobivenih pravaca određene konstante brzine razgradnje metoklopramida u MilliQ i izvorskoj vodi.



Slika 18. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju metoklopramida u MilliQ vodi pri 25 °C



Slika 19. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju metoklopramida u izvorskoj vodi pri 25 °C

Na temelju određenih konstanti brzine razgradnje, pomoću jednadžbe 3, izračunata su vremena poluraspada ($t_{1/2}$). Dobiveni rezultati prikazani su u **tablici 4**.

Tablica 4. Vrijednosti konstanti brzine reakcije, k , i vremena poluraspada, $t_{1/2}$, za metoklopramid pri 25 °C

	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
MilliQ voda	0,0906	7,65
Izvorska voda	0,1012	6,85

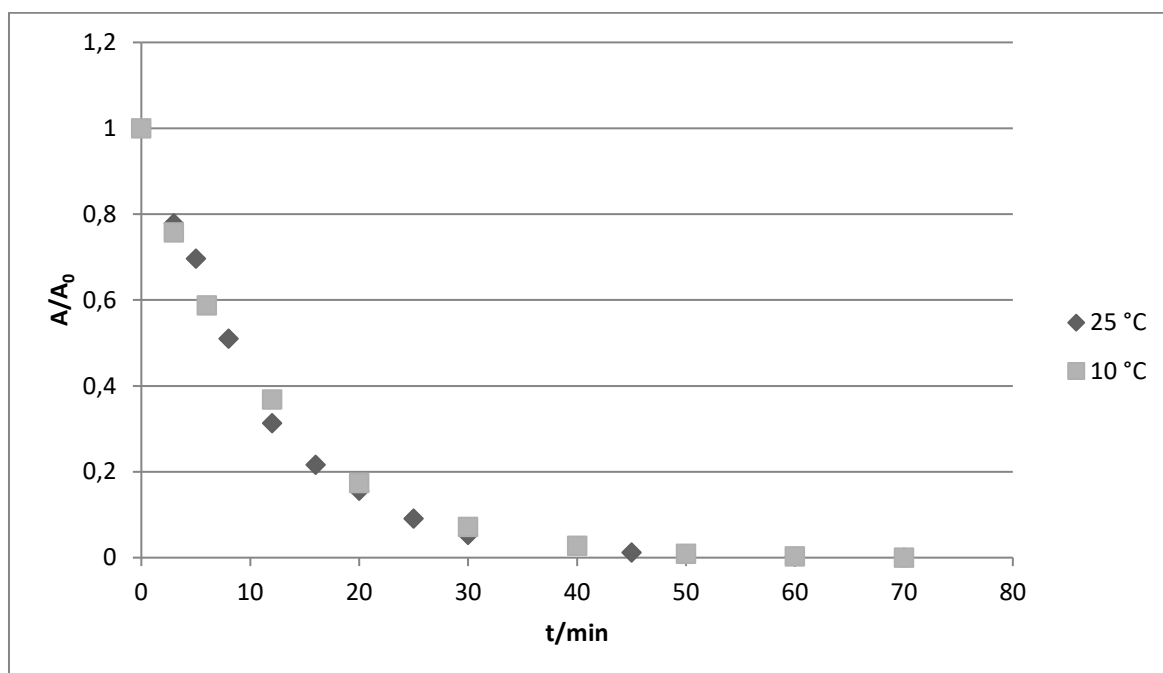
Na temelju izračunatih vrijednosti za konstantu brzine reakcije i vremena poluraspada u izvorskoj i MilliQ vodi možemo reći da je razgradnja metoklopramida pri 25 °C nešto brža u izvorskoj vodi. Razlog tomu mogu biti različite tvari prisutne u izvorskoj vodi, poput huminskih kiselina, koje mogu utjecati na brzinu fotolitičke razgradnje.

Razlika u konstantama brzine reakcije fotolitičke razgradnje metoklopramida u izvorskoj i u MilliQ vodi je vrlo mala. Da bi se provjerilo da li je uočena razlika statistički signifikantna provedeni su F i t -test. Prije provođenja t -testa, F -testom je provjereno da li postoji statistički signifikantna razlika između dva niza mjerenja koje uspoređujemo (MilliQ i izvorska voda). Primjenom tabličnog kalkulatora - Excela izračunate su vrijednosti F_{krit} i F_{izr} te iznose $F_{krit}=0,0526$, $F_{izr}=0,6923$. Vrijednost F_{izr} je veća od F_{krit} te je proveden t -test uz pretpostavku različitih varijancija. Primjenom t -testa izračunata je vrijednost t_{izr} koja iznosi 66,945. Ta vrijednost veća je od kritične vrijednosti $t_{krit}=2,7765$ što znači da je razlika u vrijednostima konstanti brzina reakcije statistički značajna te možemo zaključiti kako različite vrste vode (izvorska i MilliQ voda) utječu na brzinu razgradnje metoklopramida.

4.3.1 Utjecaj temperature na brzinu fotolitičke razgradnje metoklopramida

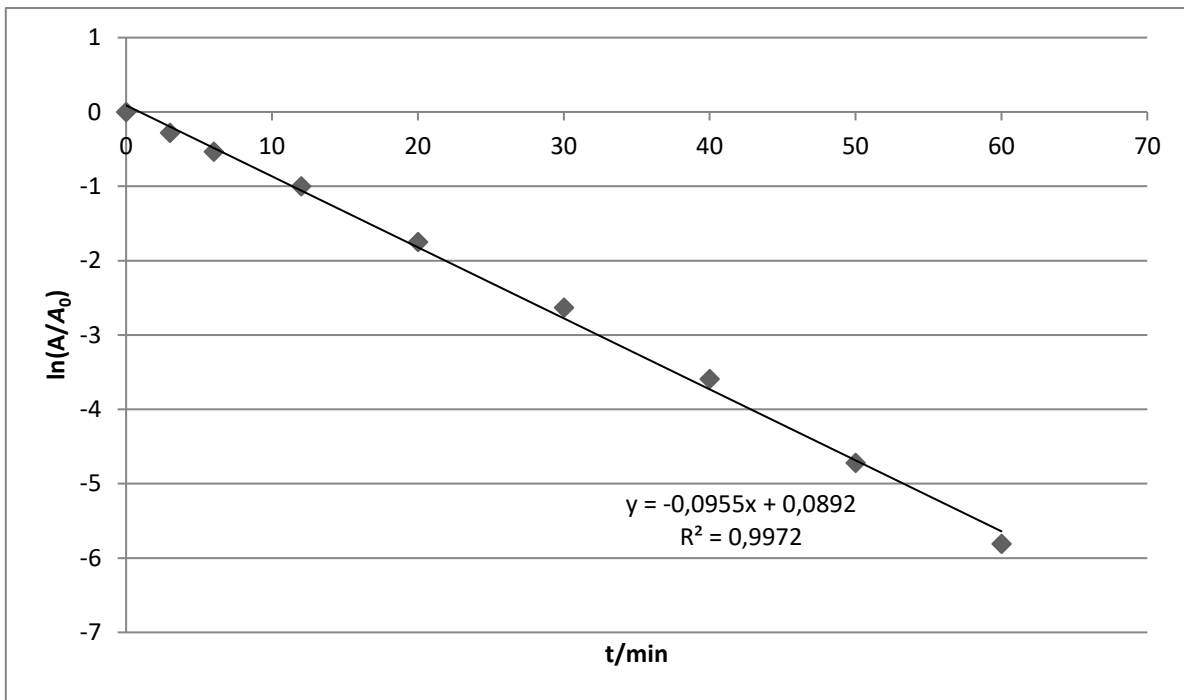
Temperatura voda u okolišu uobičajeno je u rasponu od 0 °C do 35 °C ovisno o godišnjem dobu i dubini vode. Za procjenu rizika za prirodne vode prema preporuci ECHA (*European Chemical Agency*), kao standardni uvjeti u okolišu podrazumijeva se pH-vrijednost 7 i temperatura 12 °C.

U ovom radu ispitana je brzina fotolitičke razgradnje u izvorskoj vodi pri 10 °C i 25 °C. Rezultati su prikazani na **slici 20**.



Slika 20. Promjena koncentracije metoklopramida (10 mg L^{-1}) pri 10 °C i 25 °C u izvorskoj vodi

Također, ispitana je kinetika razgradnje pri 10 °C (**slika 21**).



Slika 21. Ovisnost $\ln(A/A_0)$ o vremenu za fotolitičku razgradnju metoklopramida u izvorskoj vodi pri 10 °C

Izračunate vrijednosti konstanti brzine razgradnje i vremena poluraspada metoklopramida pri različitim temperaturama uspoređene su u **tablici 5**.

Tablica 5. Vrijednosti konstanti brzina reakcije, k , i vremena poluraspada, $t_{1/2}$, za metoklopramid pri 10 °C i 25 °C u izvorskoj vodi

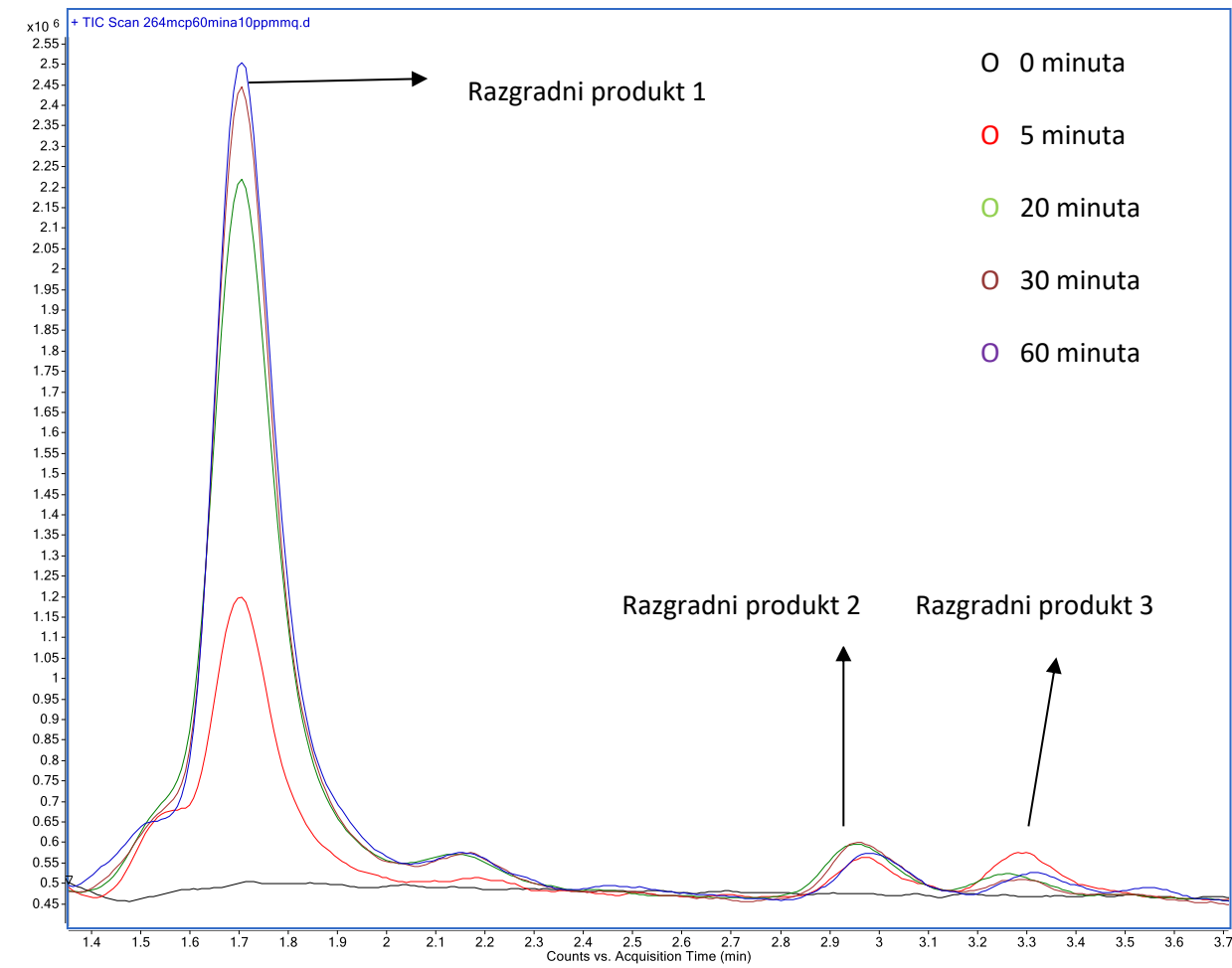
	k (min ⁻¹)	$t_{1/2}$ (min)
Izvorska 10 °C	0,0955	7,26
Izvorska 25 °C	0,1012	6,85

Na temelju izračunatih vrijednosti za konstantu brzine reakcije i vremena poluraspada metoklopramida u izvorskoj vodi pri 10 °C i 25 °C možemo reći da je razgradnja metoklopramida nešto brža pri 25 °C, no ta razlika u konstantama brzine reakcije fotolitičke razgradnje metoklopramida vrlo je mala.

Primjenom tabličnog kalkulatora - Excela izračunate su vrijednosti F_{krit} i F_{izr} te iznose $F_{krit}=19$, $F_{izr}=325,3$. Vrijednost F_{izr} je veća od F_{krit} te je proveden t -test uz pretpostavku nejednakih varijancija. Primjenom t -testa izračunata je vrijednost t koja iznosi 2,9339. Ta vrijednost manja je od kritične ($t_{krit}=4,3026$) te možemo zaključiti kako temperatura nema statistički značajan utjecaj na brzinu razgradnje metoklopramida.

4.3.2 Produkti fotolitičke razgradnje metoklopramida

U svim eksperimentima fotolitičke razgradnje uočeno je nastajanje novih kromatografskih zona na kromatogramu (**slika 14**). Novonastale kromatografske zone upućuju na to da tijekom razgradnje nastaju novi spojevi - razgradni produkti. Uočene su ukupno tri nove kromatografske zone. Promjena površine ispod novih kromatografskih zona tijekom razgradnje metoklopramida praćena je pri temperaturi od 25 °C jer su pri toj temperaturi kromatografske zone razgradnih produkata bile najizraženije. Prvi razgradni produkt pojavljuje se pri $t_R=1,71$ min, drugi pri $t_R= 2,97$ min, a treći pri $t_R= 3,29$ min (**slika 22**).



Slika 22. Uvećani prikaz slike 14 za pikove razgradnih produkata

Na **slici 22** možemo uočiti da se kromatografska zona razgradnog produkta 1 povećava s duljim trajanjem eksperimenta. Kromatografska zona razgradnog produkta 2 raste do tridesete minute, a nakon toga se počinje smanjivati. Kromatografska zona razgradnog produkta 3 raste do pete minute, a nakon toga se počinje smanjivati. Iz ovoga možemo zaključiti da se razgradni produkti 2 i 3 u određenom trenutku počinju razgrađivati što upućuje na to da su i razgradni produkti podložni fotolitičkoj razgradnji.

5. ZAKLJUČAK

U ovome radu ispitana je hidrolitička i fotolitička razgradnja farmaceutika metoklopramida.

Hidrolitička razgradnja provedena je u MilliQ vodi pri tri različite pH-vrijednosti 4, 7 i 9.

Fotolitička razgradnja provedena je u MilliQ i izvorskoj vodi kako bi se ispitaio utjecaj matice uzorka na brzinu razgradnje. Također, ispitan je utjecaj temperature (10 °C i 25 °C) na brzinu fotolitičke razgradnje metoklopramida.

Iz dobivenih rezultata može se zaključiti sljedeće:

- farmaceutik metoklopramid ne hidrolizira pri uvjetima relevantnim za okoliš
- fotolitička razgradnja metoklopramida je brza s vremenom poluraspada manjim od 8 min
- matica uzorka vode utječe na brzinu fotolitičke razgradnje metoklopramida, razgradnja je brža u izvorskoj vodi u odnosu na MilliQ vodu
- temperatura nema značajan utjecaj na brzinu fotolitičke razgradnje metoklopramida
- fotolitičkom razgradnjom metoklopramida nastaju tri razgradna produkta, od kojih su dva također podložna fotolitičkoj razgradnji

6. LITERATURA

1. C. G. Daughton, Pharmaceuticals in the environment: Sources and their management, u: M. Petrović, D. Barcelo, S. Pérez, (ur.), Analysis, removal, effects and risk of pharmaceuticals in the water cycle, Elsevier, Oxford, 2013., str. 37-64.
2. http://www.hdki.hr/_news/36922/Sazetak%20-%20Vrcek.pdf, lipanj 2017.
3. K. Kümmerer, Pharmaceuticals in the environmet, Springer, Berlin, 2008., str. 68-87.
4. G. G. Ying, J. L. Zhao, L. J. Zhou, S. Liu, S., Fate and occurrence of pharmaceuticals in the aquatic environment (Surface Water and Sediment), u: M. Petrović, D. Barcelo, S. Pérez, Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle, Elsevier, Oxford, 2014., str. 453-550.
5. M. Periša, Kromatografsko određivanje fotorazgradnih produkata farmaceutika u okolišu, disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2015.
6. <https://www.britannica.com/science/hydrolysis>, rujan 2016.
7. 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.
8. <http://en.wikipedia.org/wiki/Photodegradation>, travanj 2017.
9. https://hr.wikipedia.org/wiki/Ultraljubi%C4%8Dasto_zra%C4%8Denje, lipanj 2017.
10. M. Mitrevski, Utjecaj sastava matice uzorka vode na fotolitičku razgradnju sulfonamida, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2014.

11. J. Macan, D. Dolar, I. Brnardić, Fizikalna kemija LABORATORIJSKE VJEŽBE, Interna skripta za studente, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2016.
12. <https://www.chem.fsu.edu/chemlab/chm1046course/activation.html>, svibanj 2017.
13. <https://www.drugbank.ca/drugs/DB01233>, svibanj 2017.
14. D. Ašperger, Karakterizacija materijela LABORATORIJSKE VJEŽBE, Interna skripta za studente, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2014.
15. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/0911.htm, srpanj 2017.
16. S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2012.
17. http://free-zg.t-com.hr/Svjetlana_Luterotti/09/091/09131.htm, lipanj 2017.
18. https://www.pmf.unizg.hr/_download/repository/12_AK2_MS_krom.pdf, svibanj 2017.
19. D. J. Burinsky, Mass spectrometry, u: S. Ahuja, N. Jespersen (ur.), Comprehensive Analytical Chemistry, Modern Instrumental Analysis, Elsevier, Amsterdam, 2006., str. 319-396.
20. <http://www.enciklopedija.hr/natuknica.aspx?id=39268>, svibanj 2017.
21. NIST Chemistry WebBook, <http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?ID=C364625&Mask=200>, srpanj 2017.
22. https://www.chem.bg.ac.rs/~dusankam/ORM_10_11/Termin%205_%206%20Statisti%2083ki%20testovi.pdf, srpanj 2017.
23. S. Babić, Kemijska analiza materijala, nastavni materijali, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb 2015.

24. OECD Test No. 111: Hydrolysis as a function of pH, 2004.

ŽIVOTOPIS

Zovem se Dorina Vidović, [REDACTED]
[REDACTED]. 2002.-2010. pohađala sam Osnovnu školu Kraljevica u Kraljevici, nakon čega sam upisala opći smjer Prve riječke hrvatske gimnazije. Završila sam srednju školu 2014. godine i upisala preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. 2016. i 2017. godine radila sam kao demonstrator na Zavodu za fizikalnu kemiju na Fakultetu. 2017. godine odradila sam stručnu praksu u tvrtki DLS d.o.o. u Rijeci. Govorim engleski i talijanski jezik, a učila sam i latinski jezik. Volonterka sam udruge za djecu s poteškoćama u razvoju.