

Analiza kemoterapeutika u okolišu kromatografskim metodama

Perčić, Jelena

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:149:737531>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Jelena Perčić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Jelena Perčić

**Analiza kemoterapeutika u okolišu kromatografskim
metodama**

DIPLOMSKI RAD

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

Članovi ispitnog povjerenstva:

Izv. prof. dr. sc. Danijela Ašperger,
Izv. prof. dr. sc. Dragana Mutavdžić Pavlović,
Doc. dr. sc. Tatjana Gazivoda Kraljević

Zagreb, srpanj 2016.

Ovaj rad je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-2353 i izrađen je na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu, na Zavodu za analitičku kemiju akademske godine 2015./2016.



Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Danijeli Ašperger na predloženoj temi, uloženom vremenu, stručnom vodstvu, velikoj pomoći i strpljenju pri izradi ovog diplomskog rada.

Također se zahvaljujem tehničarkama Zavoda za analitičku kemiju Slavici Kos i Tanji Ivančić na pruženoj pomoći tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Posebno hvala mojim roditeljima koji su mi bili najveća podrška tijekom studiranja i omogućili mi studiranje. Zahvaljujem se i ostalim članovima obitelji i prijateljima koji su mi bili podrška tijekom svih godina studiranja.

SAŽETAK

Analiza kemoterapeutika u okolišu kromatografskim metodama

Kemoterapeutici su kemijske tvari koje se koriste u liječenju bolesti. Mnogi kemoterapeutici prepoznati su kao potencijalna zagađivala okoliša diljem svijeta. Kemoterapeutici se mogu pronaći u okolišu zbog svoje velike proizvodnje i uporabe. Posljednjih godina njihova potrošnja se povećala zbog čega postaju sve veći problem jer mogu završiti u podzemnim i površinskim vodama, tlu i sedimentu. Na taj način mogu utjecati na zdravlje ljudi i na organizme u vodama. Najčešće se određuju kromatografskim metodama koje omogućuju istovremeno određivanje velikog broja kemoterapeutika, no zahtijevaju sofisticiranu pripravu uzorka. Kemoterapeutici ispitivani u ovom radu su iz grupe antihelminatika ili antiparazitika (albendazol, febantel, prazikvantel), antibiotika (nitrofurantoin, cefdinir), kemoterapeutika (hidroksiklorokin) i antiemetika (metoklopramid).

Cilj ovog rada je optimizacija uvjeta za ekstrakciju kemoterapeutika iz sedimenta metodom raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), odnosno pronaći optimalno ekstrakcijsko otapalo. Ekstrakti su analizirani tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD).

Najbolji rezultati za ekstrakciju kemoterapeutika iz sedimenta dobiveni su čistim otapalom etil-acetatom.

Metoda je validirana određivanjem ponovljivosti, linearnosti, granice detekcije i granice kvantifikacije.

Ključne riječi:

farmaceutici, sediment, ekstrakcija raspršenjem uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD)

ABSTRACT

Analysis of chemotherapeutic agents in the environment by chromatographic methods

Many chemotherapeutic agents have been detected as aquatic pollutants all over the world. Chemotherapeutic agents are expected to be found in environment based on their big production and use. Last few years is increased their consumption. Because of that, they are becoming an increasing problem because they can end up in surface water, ground water, soil and sediment. Thus they can affect on human health and aquatic organisms. Chemotherapeutic agents are usually determined by chromatographic methods that allow the simultaneous determination of a large number of agents but demands a sophisticated sample preparation. Chemotherapeutic agents investigated in this study are from the group anthelmintics (albendazole, febantel, praziquantel), antibiotics (nitrofurantoin, cefdinir), chemotherapeutic agents (hydroxychloroquine) and antiemetics (metoclopramide).

The aim of this work is optimization conditions for extraction of chemotherapeutic agents from sediment by matrix solid-phase dispersion (MSPD). The aim of optimization of method was find the optimal elution solvent. The extract were analyzed by high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD).

The best results for extraction of chemotherapeutic agents from sediments are obtained with ethyl acetate.

The MSPD-HPLC-DAD method was validated by determination of repeatability, linearity, limit of detection and limit of determination.

Key words:

pharmaceuticals, sediment, matrix solid-phase dispersion (MSPD), high-performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC-DAD)

Sadržaj

| | |
|--|-----------|
| 1. UVOD..... | 1 |
| 2. TEORIJSKI DIO | 3 |
| 2.1. Kemoterapeutici..... | 4 |
| 2.1.1. Anthelmintici | 4 |
| 2.1.1.1. Albendazol..... | 4 |
| 2.1.1.2. Febantel..... | 5 |
| 2.1.1.3. Prazikvantel | 5 |
| 2.1.2. Antibiotici | 6 |
| 2.1.2.1. Nitrofurantoin | 7 |
| 2.1.2.2. Cefdinir | 7 |
| 2.1.3. Kemoterapeutici | 8 |
| 2.1.3.1. Hidroksiklorokin..... | 8 |
| 2.1.4. Antiemetici..... | 9 |
| 2.1.4.1. Metoklopramid..... | 9 |
| 2.2. Sediment | 10 |
| 2.3. Priprema uzoraka za analizu | 12 |
| 2.3.1. Klasične metode pripreme uzoraka | 13 |
| 2.3.2. Moderne metode pripreme uzoraka..... | 14 |
| 2.3.2.1. Automatizirana Soxhlet ekstrakcija | 15 |
| 2.3.2.2. Mikrovalna ekstrakcija | 15 |
| 2.3.2.3. Ekstrakcija superkričnim fluidom..... | 16 |
| 2.3.2.4. Tlačna ekstrakcija otapalom | 17 |
| 2.3.2.5. Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu..... | 18 |
| 2.4. Kromatografija | 20 |
| 2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti | 21 |
| 2.5. Validacija..... | 23 |
| 3. EKSPERIMENTALNI DIO | 26 |
| 3.1. Materijali..... | 27 |
| 3.1.1. Sediment [40] | 27 |
| 3.1.2. Kemikalije..... | 29 |
| 3.1.3. Kemoterapeutici | 29 |
| 3.1.4. Sorbens..... | 32 |
| 3.2. Instrumenti, uređaji i pribor..... | 33 |
| 3.2.1. Analitička vaga..... | 33 |
| 3.2.2. SPE kolone | 33 |
| 3.2.3. Aparatura za ekstrakciju..... | 34 |
| 3.2.4. Uparivač (rotavapor) | 35 |
| 3.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)..... | 35 |
| 3.2.6. UV/Vid spektrofotometar..... | 36 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3. Metode rada..... | 37 |
| 3.3.1. Priprava standardnih otopina kemoterapeutika | 37 |
| 3.3.2. Priprava špikanog sedimenata | 37 |
| 3.3.3. Kondicioniranje sorbensa | 37 |
| 3.3.4. Ekstrakcija raspršenja matice uzoraka kroz čvrstu fazu | 37 |
| 3.3.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti | 38 |
| 3.3.6. Validacija | 39 |
| 3.3.6.1. Validacija HPLC-DAD metode | 39 |
| 3.3.6.2. Validacija MSPD-HPLC-DAD metode | 39 |
| | |
| 4. REZULTATI I RASPRAVA | 40 |
| | |
| 4.1. Kromatografsko određivanje kemoterapeutika | 52 |
| 4.2. Optimizacija metode | 55 |
| 4.3. Validacija | 60 |
| | |
| 5. ZAKLJUČAK | 63 |
| | |
| 6. LITERATURA | 65 |

1. UVOD

Lijekovi, njihovi metaboliti i razgradni produkti sve se češće detektiraju u okolišu. Danas se kemoterapeutici proizvode i koriste u velikim količinama. Potrošnja kemoterapeutika u uzlaznoj je putanji, kao i njihovo otpuštanje u okoliš. Ostaci lijekova su u malim koncentracijama detektirani u otpadnim vodama, površinskim vodama, podzemnim vodama, morima i u tlu u velikom broju zemalja. Prisutnost lijekova u okolišu sve je češće predmet znanstvenog interesa i istraživanja, što rezultira većim brojem izvješća o detekciji lijekova u raznim uzorcima iz okoliša. Da bi se mogao procijeniti učinak kemoterapeutika na ljude i okoliš neophodna je analitička metoda koja će omogućiti istovremeno određivanje čitavog niza kemoterapeutika. U 90 % slučajeva koriste se kromatografske metode, ali one zahtjevaju i dobru pripravu uzoraka. Za pripravu uzorka danas se većinom koriste moderne metode koje se uglavnom zasnivaju na ekstrakciji te pružaju bržu i jednostavniju ekstrakciju uz manju potrošnju otapala.

U ovom radu kao metoda ekstrakcije primijenjena je ekstrakcija raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu (MSPD), a analiza pomoću tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC- DAD).

Cilj ovog rada je optimirati metodu ekstrakcije raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu tako da se ekstrakti kemoterapeutika dobiju u što većem iskorištenju sa što manjim utjecajem matice, odnosno pronaći optimalno ekstrakcijsko otapalo.

Za dokazivanje prikladnosti primijenjene metode ekstrakcije i analize ekstraktat provedena je validacija MSPD-HPLC-DAD metode određivanjem ponovljivosti, linearnosti, granice detekcije i granice određivanja.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Kemoterapeutici

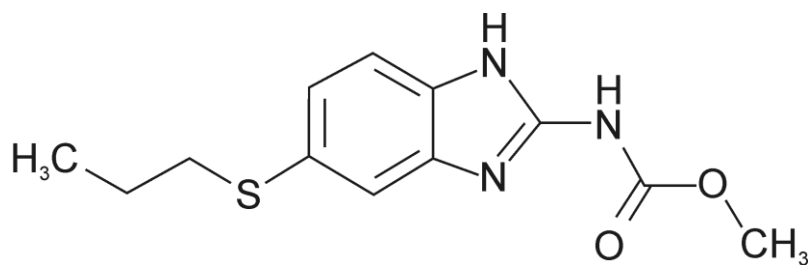
Kemoterapeutici su kemijske tvari koje se koriste u liječenju bolesti.

2.1.1. Antihelmintici

Antihelmintici ili antiparazitici su skupina lijekova koja se koristi u borbi protiv postojećih i razvoja novih parazita, te nalaze veliku primjenu u humanoj i veterinarskoj medicini. Idealan antihelmintik treba imati sljedeće osobine: širok spektar djelovanja, netoksičnost za životinju, brzo izlučivanje, da je jednostavan za primjenu i jeftin. [1] Razvrstani su u osam grupa ovisno o njihovom načinu djelovanja protiv parazita, ali prije svega po njihovim molekulskim strukturama. Podijeljeni su na benzimidazole, difenilsulfide, imidazotiazole, heksahidropirazine, makrocikličke laktone, salicilanilide, tetrahidropirimidine i na druge bez međusobne sličnosti. Benzimidazoli su najveća grupa koja se koristi za liječenje endoparazitskih bolesti domaćih životinja. Netopljivi su ili slabo topljivi u vodi. Sudbina antihelmintičkih lijekova u okolišu jako ovisi o njihovim fizikalno-kemijskim svojstvima. [2] Antihelmintici analizirani u ovom radu su: albendazol, febantel i prazikvantel.

2.1.1.1. Albendazol

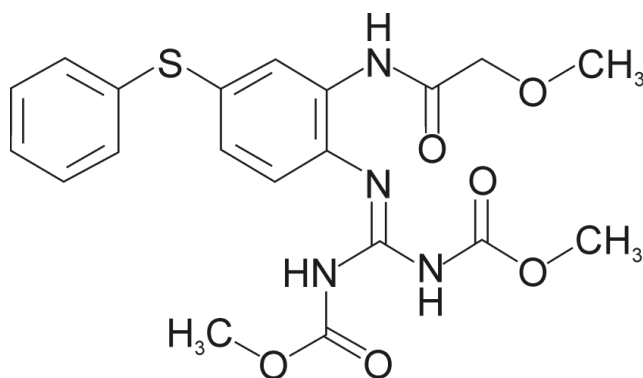
Albendazol spada u grupu benzimidazola koji su otkriveni 1960. [3] Albendazol je razvijen 1973. godine od strane Smith, Kline & French (američka farmaceutska tvrtka) i ima važnu i stalnu ulogu kao antiparazitik kod preživača i ljudi. Ima najširi spektar učinkovitosti iz grupe benzimidazola. Aktivan je protiv raznih oblića, metilja, trakavica i praživotinja kućnih ljubimaca. Albendazol treba koristiti oprezno jer je potencijalno teratogen i njegova uporaba je neobičajeno povezana s toksikozom koštane srži kod pasa. [4] Njegov glavni metabolit je albendazol-sulfoksid. Albendazol i njegovi metaboliti izlučuju se urinom. [5] Slika 1 prikazuje strukturu albendazola.



Slika 1. Struktura albendazola

2.1.1.2. Febantel

Febantel je probenzimidazol, razvijen od strane Bayer 1975. godine. [4] Ima širok spektar antiparazitskog djelovanja. Ima visok stupanj učinkovitosti, dobru granicu sigurnosti i raznovrsnu primjenu. Koriste se kod monogastričnih životinja i preživača. Djeluje na parazite ometanjem njihovog metabolizma bez nuspojava za domaćina. Primjenjuje se oralno, kao krema, oralna suspenzija ili kao medicinska hrana. [6] U jetri se biološki mijenja na aktivne metabolite fenbendazol i fenbendazol sulfoksid. [4] Na Slici 2 dana je njegova struktura.

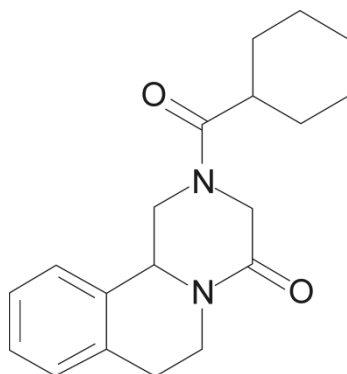


Slika 2. Struktura febantela

2.1.1.3. Prazikvantel

Prazikvantel je pirazinizokinolin koji je dostupan za ljudsku i veterinarsku uporabu protiv raznih parazitskih nametnika. Uveden je 1975. godine i bio je značajna prekretnica u antiparazitskoj kemoterapiji. Vrlo je rasprostranjen na sva tkiva, s višim koncentracijama u jetri, žuči i bubrezima. Lijek se znatno metabolizira, te se brzo izlučuje, prvenstveno u urinu, gdje nije pronađen prvobitni lijek, već su nađeni raznovrsni neaktivni metaboliti. [4] U životinjama i ljudima, infekcija s mnogo različitih trakavica i metilja pozitivno odgovara na

ovaj lijek, dok oblići ostaju nepromjenjeni. Lijek se 80 % veže na proteine plazme. Njegovo vrijeme poluraspada u plazmi iznosi 0,8 do 3 sata, ovisno o dozi, a njegovih metabolita 4 do 6 sati, ali to se može produžiti kod bolesnika s teškom bolesti jetre. Prazikvantel ima sljedeću kemijsku strukturu (Slika 3):



Slika 3. Struktura prazikvantela

(–)Izomer je odgovoran za veći dio antiparazitske aktivnosti lijeka. Deksametazon smanjuje biološku raspoloživost prazikvantela. A pod određenim uvjetima, prazikvantel može povećati bioraspoloživost albendazola. [5]

2.1.2. Antibiotici

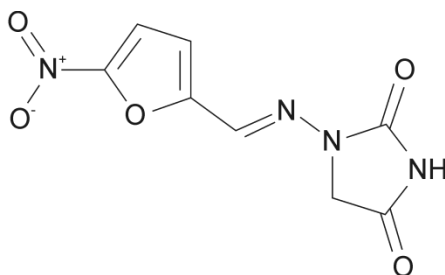
Antibiotici su antimikrobni lijekovi koji se koriste za liječenje infekcija kada se klinički procjeni da je obrana domaćina nedostatna za savladavanje postojeće infekcije. Svrha antibiotske terapije je pomoći obrani domaćina u kontroli i eliminaciji mikroorganizama koji su privremeno ili trajno nadjačali obrambene mehanizme domaćina i uzrokovali infekciju. [7] Antibiotici su jedno od najvećih otkrića moderne medicine, te imaju široku primjenu u humanoj i veterinarskoj praksi. Definiraju se kao organski spojevi koji mogu potpuno uništiti patogene bakterije ili zaustaviti njihov rast ili razmnožavanje. Za učinkovitost u liječenju antibiotici moraju posjedovati selektivnu toksičnost, tj. sposobnost uništavanja bakterija s malo ili nimalo štetnog učinka na domaćina. [8] Antibiotici se značajno razlikuju u fizičkim, kemijskim i farmakološkim svojstvima, u antibakterijskom spektru te u mehanizmu djelovanja. [5]

Ispitivani antibiotici u ovom radu su nitrofurantoin i cefdinir.

2.1.2.1. Nitrofurantoin

Nitrofurantoin spada u grupu nitrofurana, a u praksu je uveden 1952. Otpornost na ovaj lijek je ostao gotovo nepromjenjen od njegova otkrića. [9]

Nitrofurantoin je sintetički nitrofuran, koji se koristi za prevenciju i liječenje infekcija mokraćnog sustava. Njegova strukturna formula je (Slika 4):

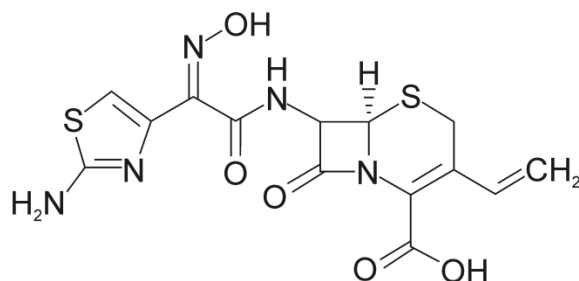


Slika 4. Struktura nitrofurantoina

Nitrofurantoin se brzo i potpuno apsorbira iz probavnog trakta. Lijek u obliku velikih kristala se apsorbira i izlučuje sporije. U plazmi poluživot nitrofurantoina je 0,3 do 1 sat. Oko 40 % se izlučuje nepromjenjeno putem urina. [5]

2.1.2.2. Cefdinir

Cefdinir je sintetiziran 1988. godine. [10] Pripada trećoj generaciji cefalosporina, širokog spektra oralne primjene. Vrlo je učinkovit protiv mnogih gram pozitivnih i gram negativnih bakterija, te se koristi za liječenje upale srednjeg uha, infekcije mekih tkiva, te infekcije dišnih puteva. [11] Biološka raspoloživost mu iznosi između 16 – 21 %, ovisno o dozi. Metabolizam mu je neznatan. Biološki poluraspad traje $1,7 \pm 0,6$ sati. Izlučuje se putem urina. [12] Kemijska struktura cefdinira prikazana je na Slici 5.



Slika 5. Struktura cefdinira

2.1.3. *Kemoterapeutici*

U kemoterapiji kao načinu liječenja tumorskih bolesti koriste se skupine spojeva, tj. kemoterapijska sredstva s različitim mehanizmima djelovanja, a sve u funkciji smanjenja proliferacije i uništavanja zloćudno promijenjenih stanica.

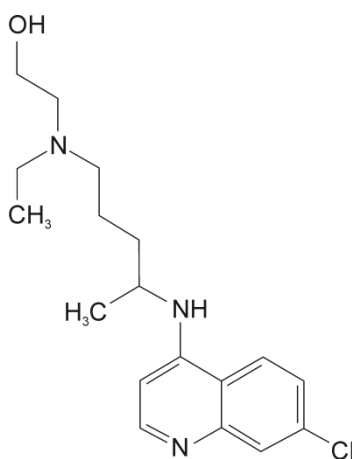
Prema klasičnoj podjeli, kemoterapeutici se dijele u slijedeće skupine: alkilirajuća sredstva, protutumorski antibiotici, inhibitori topoizomeraze (inhibitori topoizomeraze I, inhibitori topoizomeraze II), antimitotički agensi, imunosupresivna sredstva, antimetaboliti (analozi folne kiseline, analozi pirimidina, analozi purina) i ostalo. [13]

Kemoterapeutici su po svojoj prirodi vrlo toksični, a mučnine koje izazivaju izrazito su jake i mogu potrajati danima, čak i tjednima. Nekolicina pacijenata čak odustaje od ovakve vrste terapije karcinoma, jer ne mogu izdržati nuspojave. [14]

Kemoterapeutici (citostatici, antineoplastici) svojim djelovanjem nisu specifični isključivo na tumorske stanice, tj. imaju i citotoksičan učinak i na zdrave stanice domaćina, a najosjetljivije su stanice onih organa i tkiva koje karakterizira brza stanična dioba i proliferacija (krvotvorni sustavi, stanice koštane srži, stanice probavnog sustava, stanice folikula kose). Stoga su najčešće nuspojave kemoterapije leukopenija, neutropenija, anemija, trombocitopenija, proljevi i mukozitis. [15]

2.1.3.1. *Hidroksiklorokin*

Hidroksiklorokin ima slijedeću strukturu (Slika 6):



Slika 6. Struktura hidroksiklorokina

Hidroksiklorokin pripada u grupu 4-amino-kinolin antimalarika, a koristi se od 1957. godine u kliničkoj praksi u liječenju i tretmanu reumatoidnog artritisa. Međutim, pojavljuju se dva

nepovoljna faktora, a to su: sporo pojavljanje terapijskog djelovanja i značajna toksičnost, koji zasjenjuju kliničku nadmoć tog lijeka. [3]

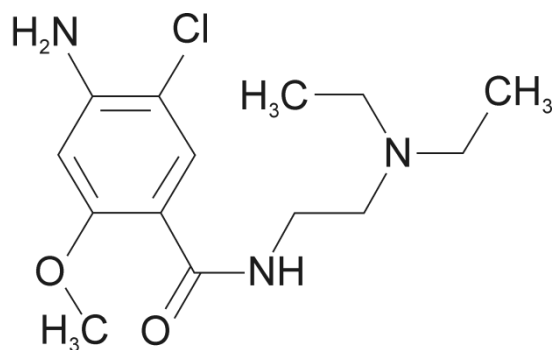
Najčešće nuspojave su blage mučnine i povremeni grčevi s blagim proljevom. Najozbiljnija nuspojava je toksičnost u oku. Biološki poluraspad je 1 do 2 mjeseca. Izlučuje se putem urina. [16]

2.1.4. Antiemetici

Antiemetici koji djeluju na centar za povraćanje, djeluju neovisno o uzroku povraćanja, za razliku od lijekova koji djeluju u kemoreceptornoj zoni okidanja i sprječavaju povraćanja koja su posljedica toksina (uremija, nakon primjene digitalisa, morfina i dr.). Primjena antiemetika je opravdana i poželjna u slučajevima u kojima nije moguće drugačije prekinuti uzrok povraćanja. Biramo ih prema uzroku i tipu simptoma, a za adekvatno zbrinjavanje simptoma često su potrebne njihove kombinacije. [17] Antiemetici se često koriste u kombinaciji s drugim lijekovima i liječnici trebaju biti svjesni mogućih interakcija koje se mogu pojaviti. Njima se kontrolira povraćanje, pogotovo kad obilna i dugotrajna povraćanja mogu dovesti do elektrolitnih ili kiselo-baznih poremećaja ili uzrokuje patnju kod pacijenata, te oni sprječavaju povraćanje. Korištenje antiemetika nije potrebno ako je povraćanje povremeno, a pacijent nije uznemiren, te se lako može postići ravnoteža tekućine i elektrolita. [4]

2.1.4.1. Metoklopramid

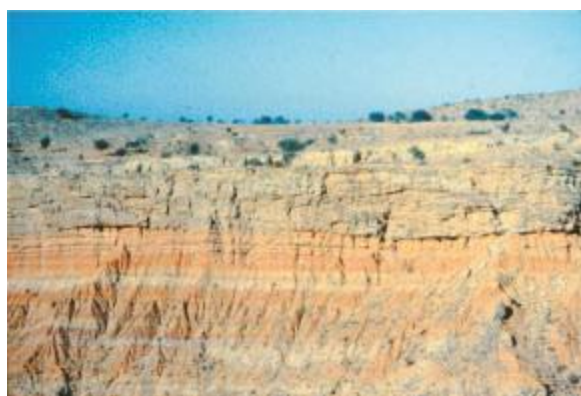
Metoklopramid je antagonist dopaminskih receptora u kemoreceptornoj zoni okidanja i povisuje prag podražljivosti i osjetljivosti te ga ubrajamo u prvu liniju antiemetika. Periferno djeluje na glatke mišićne stanice i povećava tonus donjeg ezofagealnog sfinktera, relaksira antrum, pilorus i bulbus duodenuma, pa stoga povećava peristaltiku i pražnjenje gornjeg dijela gastrointestinalnog sustava. Kod većih doza potreban je oprez, jer može izazvati agitiranost pacijenta i pojavu ekstrapiramidnih nuspojava, posebice kod žena. [17] Kemijska struktura prikazana je na Slici 7. Brzo se apsorbira nakon oralnog uzimanja. Uglavnom se izdvaja u urin, s poluzivotom od 4 do 6 sati. Vrh koncentracije javlja se unutar 1 sata, nakon jedne oralne doze s trajanjem djelovanja 1 do 2 sata. [5] Bioraspoloživost metoklopramida nakon oralnog davanja je oko 48 %. Biološka raspoloživost nakon intramuskularne primjene kod ljudi je 74-96 %. Metoklopramid je fotoosjetljiv i treba biti spremljen u spremnicima otpornim na svjetlo na sobnoj temperaturi. [4]



Slika 7. Struktura metoklopramida

2.2. Sediment

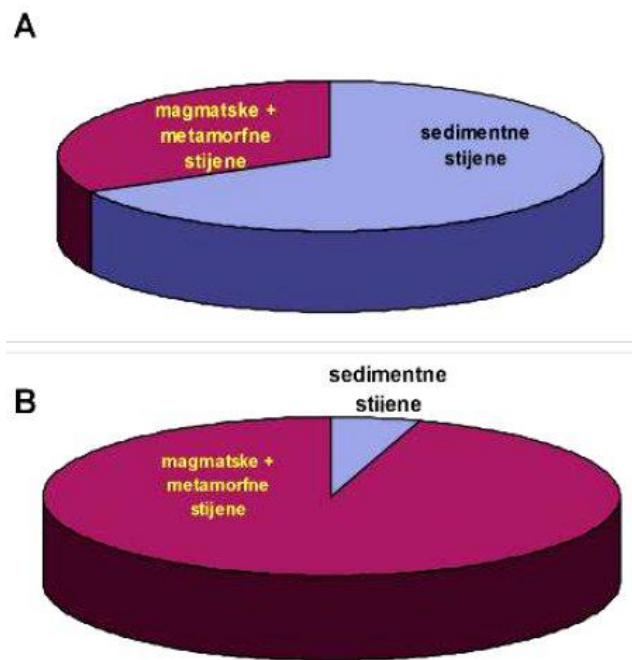
Sediment je bitan, sastavni i dinamični dio naših riječnih slivova. [18] Sediment nastaje trošenjem i biokemijskim ili kemijskim taloženjem. Erozijski, transport i odlaganje sedimenta je pod utjecajem gravitacije, protoka vode, zraka, leda, potresa i gibanja Zemljine površine, vulkanskih erupcija i kretanja izbačenog vulkanskog materijala. [19] U prirodnim i poljoprivrednim slivovima, sediment nastaje trošenjem i erozijom minerala, organskih materijala i tla u uzvodnom području, te erozijom riječnih obala i drugih umetnutih izvora. Budući da brzina protoka površinskih voda pada u nizinskim područjima, preneseni sediment se slegne duž korita i obala procesom sedimentacije (taloženja). Ovo se također događa na poplavnim područjima tijekom poplava, te u rezervoarima i jezerima. [18] Proučavanje reljefnih oblika (morfologija) Zemljine površine zove se geomorfologija. Proučavanje o sedimentu, konkretno o prirodi i podrijetlu sedimenta, zove se sedimentologija. [19] Na Slici 8 prikazan je veliki izdanak sedimentnih stijena.



Slika 8. Veliki izdanak sedimentnih stijena iz Miocene Siwalik Group, sjeverozapadni Pakistan [19]

Sedimentne stijene izgrađuju čak 75 % površinskog kopnenog dijela Zemlje, premda volumno u sastavu litosfere sudjeluju s tek 5 % (Slika 9).

Sedimentne stijene često su slojevite, odnosno najčešći oblik pojavljivanja sedimenta je sloj, koji je odraz istih uvjeta taloženja kroz neko vrijeme u nekom prostoru, te označava jednu fazu sedimentacije. Struktura i tekstura sedimenta najčešće je posljedica transporta i taloženja. Struktura se odnosi uglavnom na veličinu zrnca, a tekstura se odnosi na način slaganja čestica u stijeni. [20]



Slika 9. Zastupljenost sedimentnih stijena na površini Zemlje (A) i u litosferi (B). [20]

Sediment služi kao izvor građevinskog materijala, pijeska za plažu, prehrane u močvari, obogaćivanja tla, te služi kao stanište i hrana za život. Kod previše sedimenta dolazi do ometanja rada kanala, popunjenja rijeka i poplava, prigušenosti grebena te do zamućenja. Kod premalo sedimenta dolazi do erodiranja plaža i riječnih obala, gubitka močvara i razgradnje riječnog profila. [21]

Sediment djeluje kao potencijalni izvor mnogih opasnih kemikalija. Od industrijske revolucije, kemikalije se ispuštaju u površinske vode. Zbog svojih svojstava, mnoge kemikalije se zadržavaju na sedimentu. Onečišćenja mogu razgraditi dijelove sedimenta ili se mogu fiksirati za sediment, čime se smanjuje njegova bioraspoloživost. Na određenoj razini, onečišćenja u sedimentu početi će utjecati na ekološku i kemijsku kvalitetu vode i zakomplicirati upravljanje sedimentom. Na kraju, mogu se pojaviti i učinci poput smanjenog

bogatstva prisutnosti bentonskih vrsta u sedimentu ili smanjeno razmnožavanje ili utjecaj na zdravlje životinja koje konzumiraju zagađene bentonske vrste. Onečišćeni sedimenti ostaju potencijalni izvori koji izazivaju štetan učinak na vodene resurse oslobađanjem onečišćivala u površinske i podzemne vode. [18]

2.3. Priprema uzoraka za analizu

Priprava uzorka je vrlo bitan i osnovni korak u analizi uzoraka. [22]

Analiza uzorka (voda, tlo, sediment, biološki materijali, hrana) obuhvaća pet osnovnih koraka:

- uzorkovanje,
- pripravu uzorka,
- odjeljivanje analita,
- detekciju i
- procjenu mjernih podataka kojom dobivamo informaciju o identifikaciji uzorka i njegovom kvantitativnom sastavu.

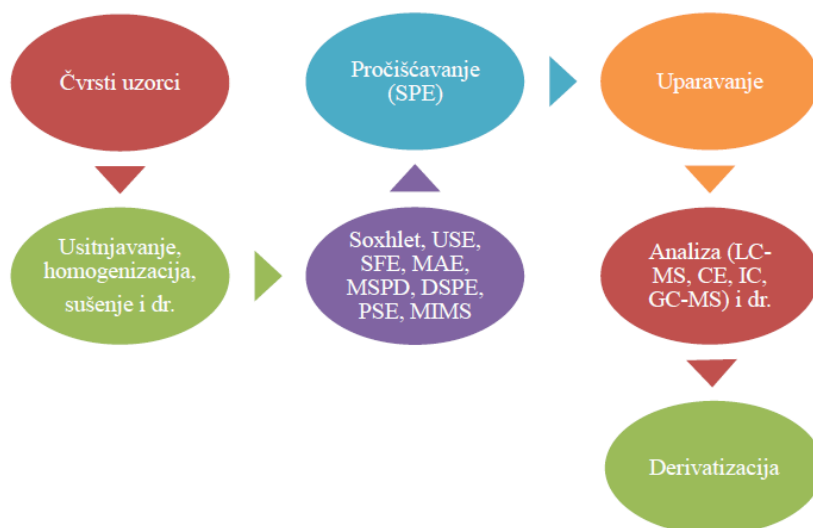
Osnovni princip pripreme uzorka je prevesti realni uzorak u uzorak pogodan za analizu, pri čemu su neizbježne interakcije sastojaka uzorka s okolinom. One ovise o fizikalnim i kemijskim svojstvima analita i matice uzorka pa mogu utjecati na primjenjivost, djelotvornost i ponovljivost postupaka pripreme uzorka. [23]

Priprava uzorka mora biti usklađena s ciljem analize, uzimajući u obzir instrumente kojima će se mjeriti i stupanj željene točnosti.

Pri tom se nastoji:

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

U ovom radu pripremani su čvrsti uzorci za analizu pa je stoga dan naglasak na pripremu čvrstih uzoraka. Mogući postupci pripreve čvrstih uzorka dani su na Slici 10.



Slika 10. Pregled mogućih postupaka pripreve uzorka u čvrstom stanju [24]

Čvrsti uzorci nisu homogeni što zahtjeva puno individualniji i složeniji pristup pripravi uzorka jer se oni prije otapanja moraju usitniti i homogenizirati. Ovisno o vrsti materijala za analizu, uzorak se nakon što je pregledan suši, prosijava i homogenizira. Da bi se mogla provesti pouzdana ekstrakcija, čvrsti uzorak treba usitniti, a ponekad i kemijski razoriti. Homogenizacija čvrstih i suhih uzoraka provodi se mljevenjem. [24]

2.3.1. Klasične metode pripreme uzoraka

Ekstrakcija analita iz uzorka matice zahtjeva pravu kombinaciju otapala i tehnike. Klasične metode ekstrakcije dane su u Tablici 1 kao i njihov princip djelovanja. Većina ovih klasičnih metoda, poput Soxhlet ekstrakcije i ispiranja, postoji više od 100 godina i daju rezultate koji su prihvatljivi većini znanstvenika. Velika većina ovih metoda koristi organska otapala, često u obilatim količinama, ali posljednjih godina nastoji se prilagoditi sustave tako da se smanji upotreba velikih količina uzorka i otapala. [25]

Tablica 1. Klasične metode ekstrakcije čvrstih uzoraka i njihov princip djelovanja [25]

| METODA PRIPREME UZORKA | PRINCIP DJELOVANJA METODE |
|---|--|
| Ekstrakcija čvrsto-tekuće | Uzorak je stavljen u začepljeni spremnik te je dodano otapalo koje otapa željeni analit; otopina je odvojena od uzorka filtriranjem. |
| Soxhlet ekstrakcija | Uzorak je stavljen u jednokratni porozni spremnik (cilindar); otapalo refluksira konstantnim protokom kroz cilindar i ispire analit koji se prikuplja u vruću tikvicu. |
| Homogenizacija (mućkanje) | Uzorak je stavljen u miješalicu, dodano je otapalo te je uzorak homogeniziran sve dok nije sitno usitnjen; otapalo je uklonjeno prije daljnjega rada. |
| Sonizacija ili ultrazvučna ekstrakcije | Sitni usitnjeni uzorak je uronjen u ultrazvučnu kupelj s otapalom i izložen ultrazvučnom zračenju. |

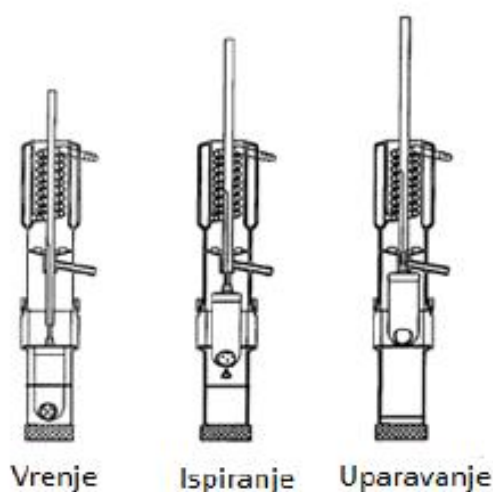
2.3.2. Moderne metode pripreme uzoraka

Moderne metode pripreme uzorka uglavnom se zasnivaju na ekstrakciji. Mogu se podijeliti na metode koje mogu zadržati analit te na one koje omogućuju prijelaz analita u manji obujam drugog otapala. Sve ekstrakcijske metode koriste se principom selektivnoga koncentriranja analita u jednoj fazi, a njihova selektivnost postiže se promjenom radnih uvjeta. Analit se pritom raspodjeljuje između dviju faza u skladu s konstantom raspodjele, temperaturom i relativnim obujmom faza. [24]

U radu uzorak se priprema metodom raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu, koja pripada modernim metodama pripreme uzorka pa je stoga naglasak dan na pripremu uzoraka modernim metodama.

2.3.2.1. *Automatizirana Soxhlet ekstrakcija*

Klasična ekstrakcija iz čvrstih uzoraka ili Soxhlet ekstrakcija je prilično spora metoda pripreve uzorka koja je u primjeni bila do 1980.-ih, kada su je postupno počele zamjenjivati moderne metode. Da bi se smanjili nedostaci metode, razvijen je automatizirani Soxhlet, poznat i kao Soxtec. Slika 11 prikazuje tri koraka Soxtec ekstrakcije: vrenje, ispiranje i uparavanje. Zbog boljeg kontakta između otapala i uzorka, ekstrakcija automatiziranim Soxhletom puno je brža jer je i prijenos mase mnogo bolji. Primjenom Soxteca vrijeme ekstrakcije je smanjeno na 2-3 sata, a obujam otapala s 250-500 mL na 40-50 mL po ekstrakciji. Moguća je i istovremena ekstrakcija više uzoraka. [24]



Slika 11. Tri koraka Soxtec ekstrakcije [26]

2.3.2.2. *Mikrovalna ekstrakcija*

Mikrovalna ekstrakcija (MAE) je metoda u kojoj se mikrovalnom energijom zagrijava otapalo i uzorak, čime se pospješuje prijelaz ispitivanih spojeva iz uzorka u otapalo, kao i mikrovalnom razlaganju uzorka. Ekstrakcija se, kao i razlaganje, automatski kontrolira osjetilima za tlak i temperaturu. Temperatura ekstrakcije je 50-150 °C, a tlakovi 1-5 MPa. To je brza ekstrakcijska metoda (10-20 min) koja troši relativno malo otapala (10-30 mL), a u istom vremenu se može ekstrahirati više uzoraka odjednom. Djelotvornost ekstrakcije je relativno visoka i raste s temperaturom i vremenom. [24]

Priroda otapala ima veliku važnost u MAE. Otapalo bi trebalo biti selektivno i učinkovito otapati analite u uzorku i istovremeno bi trebalo moći apsorbirati mikrovalno zračenje da ne

dođe do prevelikog grijanja čime se izbjegava razaranje spojeva analita. Uobičajena je praksa koristiti binarnu smjesu otapala, gdje samo jedno otapalo apsorbira mikrovalno zračenje. Drugi važni parametri koji utječu na proces ekstrakcije su primijenjena snaga, temperatura i vrijeme ekstrakcije. Osim toga, sadržaj vode u uzorku mora biti pažljivo kontroliran da se izbjegne prekomjerno zagrijavanje, omogućujući ponovljive rezultate. [27]

MAE može biti provedena na dva različita načina, jedan je metoda sa zatvorenim posudom, koja je pod kontrolom (povišenog) tlaka i temperature, a druga metoda je s otvorenim posudom koja se izvodi pod atmosferskim tlakom. Ove metode se zovu tlačna mikrovalna ekstrakcija, PMAE i usmjerena mikrovalna ekstrakcija, FMAE. [28]

Nedostatak mikrovalne ekstrakcije je u nemogućnosti uporabe otapala koja nemaju sposobnost interakcije s mikrovalovima, što ovisi o dielektričnoj konstanti otapala (što je ϵ veća, to je jača interakcija). Drugi nedostatak je manja selektivnost te metode u usporedbi sa ekstrakcijom superkritičnim fluidom. [24]

2.3.2.3. Ekstrakcija superkritičnim fluidom

Ekstrakcija superkritičnim fluidom (SFE) omogućuje određivanje organskih sastojaka u uzorcima vode, tla i sedimenta. Glavne su joj prednosti:

- superkritični fluidi imaju više difuzijske koeficijente i nižu viskoznost od tekućih otapala, što rezultira boljom topljivošću analita te brzom kinetikom reakcije,
- promjenom tlaka i temperature može se utjecati na jakost otapala što je posebno korisno za ekstrakciju složenih uzoraka,
- dotok svježeg fluida je kontinuiran, čime se omogućava kvantitativnost ekstrakcije.

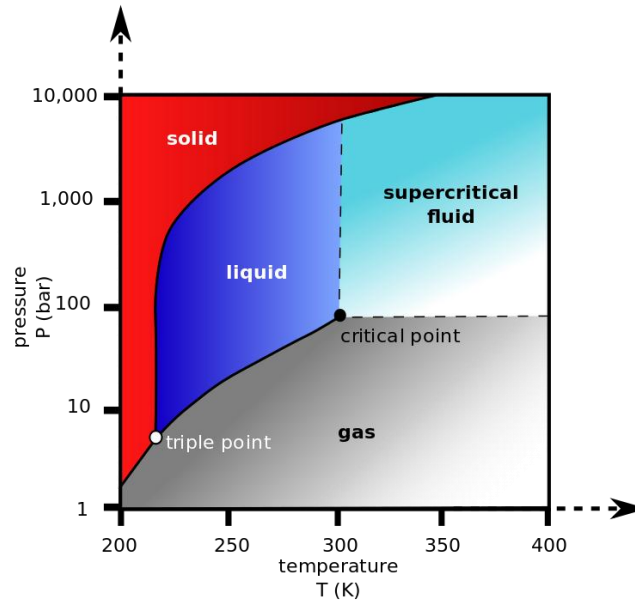
Dodatne su prednosti smanjenje obujma opasnih otapala (5-10 mL), kraće trajanje (30-75 min), manja masa uzorka (2-20 g) te mogućnost povezivanja s tekućinskim i plinskim kromatografom, a dobivene ekstrakte ne treba dodatno pročišćavati ili filtrirati. [24]

SFE postupak je odvajanje jedne komponente (ekstrakta) iz druge (matice) koristeći superkritični fluid kao otapalo za ekstrakciju. Superkritični fluidi su vrlo komprimirani plinovi koji imaju kombinaciju svojstava plinova i tekućina, a mogu dovesti do reakcija, koje je teško ili čak nemoguće postići konvencionalnim otapalima. [29]

Trenutačno se najviše rabi CO₂ jer superkritične uvjete postiže jednostavno, nisko je toksičan, nezapaljiv, visoke je čistoće, a cijena mu je pristupačna. [24]

Fazni dijagram CO₂ dan je na Slici 12. Uvjeti ekstrakcije za superkritični CO₂ su iznad kritične temperature od 31 °C i kritični tlak od 74 bara. [29]

Glavni mu je nedostatak ograničena primjena za ekstrakciju nepolarnih i umjereno polarnih.



Slika 12. Fazni dijagram CO₂ [30]

Velika prednost postupka je u tome što je većina superkritičnih fluida pri sobnim uvjetima plinovita, pa analiti prelaze u otopinu jednostavnim sniženjem tlaka ili uvođenjem u male količine odgovarajućeg otapala. [24]

2.3.2.4. Tlačna ekstrakcija otapalom

Tlačna ekstrakcija otapalom (PSE) automatizirana je metoda koja se temelji na ekstrakciji otapalom pri povišenoj temperaturi, kada otapala pokazuju bolja ekstraktivna svojstva. Porastom temperature (do 200 °C) raste i tlak (do 20 MPa) čime se ostvaruje bolja djelotvornost ekstrakcije uz kraće vrijeme (12-18 min) i manju potrošnju otapala (15-40 mL). Metoda je razvijena pod utjecajem ekstrakcije fluidom u superkritičnim uvjetima. Povišena temperatura smanjuje viskoznost i površinsku napetost otapala, čime se omogućuje njegovo bolje prodiranje u uzorak. Tlačna ekstrakcija otapalom brža je i djelotvornija od ekstrakcije superkritičnim fluidima, jer je neovisna o matici uzorka i o dodatku modifikatora polarnosti. [24]

PSE koristi organska otapala, pri povišenom tlaku i temperaturi kako bi se povećala učinkovitost ekstrakcije. Povišena temperatura ubrzava kinetiku ekstrakcije, a povišeni tlak

zadržava otapalo u tekućem stanju, što omogućava sigurnu i brzu ekstrakciju. Visoki tlak uzrokuje ulazak otapala u pore matice pa bi trebao olakšati ekstrakciju analita. Visoka temperatura smanjuje viskoznost tekućeg otapala, omogućujući bolju penetraciju matice i slabljenje interakcija otopljene tvari-matrice. Također, povišena temperatura poboljšava difuznost otapala što rezultira povećanjem ekstrakcijske brzine. [31]

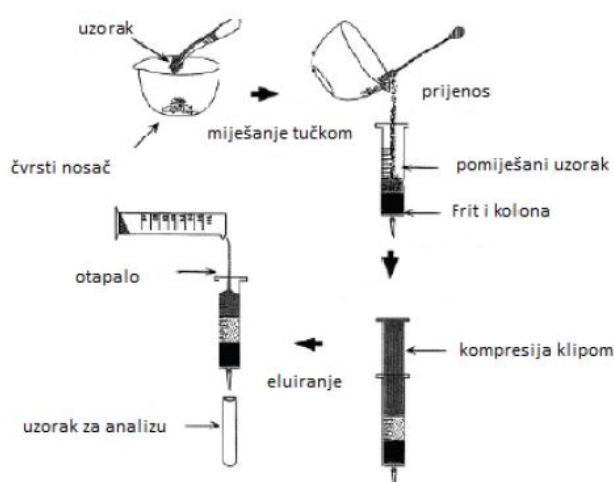
2.3.2.5. *Raspršenje matice uzorka kroz čvrstu fazu*

Metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu, MSPD razvijena je 1989.-te, a tijekom posljednjih godina ova metoda je opet pronašla važno mjesto među pripremnim tehnikama koje se primjenjuju u analizi uzoraka biljaka i hrane (sa i bez sadržaja masti i različitom količinom vode). Ova metoda je pogodna za čvrste, polučvrste i viskozne matice koje često uzrokuju probleme u drugim zajedničkim tehnikama pripreme. [32]

MSPD razvijena je radi pojednostavljenja pripreve uzoraka s visokim udjelom masnoća. Postupak se temelji na miješanju male mase (oko 0,5 g) ispitivanoga uzorka s puno većom količinom čvrstog, praškastog sorbensa (najčešće 4 puta većom od mase uzorka). Tako dobivenim polusuhim praškastim uzorkom pune se kolonice (slične onima za ekstrakciju čvrstom fazom) iz kojih se željeni analiti eluiraju odgovarajućim otapalom. [24]

MSPD je tehnički vrlo slična SPE, ali je separacijski princip potpuno različit. [32]

Slika 13 prikazuje tipične korake u MSPD ekstrakciji.



Slika 13. Koraci u tipičnoj MSPD ekstrakciji [26]

Nekoliko faktora izdvojeno je ispitivanjem njihovih učinaka u MSPD ekstrakciji. To su:

- učinak prosječnog promjera čestica,
- karakter vezane faze,
- korištenje nederivatiziranog silicija ili drugih čvrstih potpornih materijala,
- najbolji omjer uzorka i sorbensa (najčešći omjer je 1:4),
- kemijska modifikacija matice ili smjese matice i sorbensa,
- optimalan izbor eluensa i redoslijed njegove primjene u koloni,
- elucijski volumen,
- učinak uzorka matice.

Glavne prednosti MSPD ekstrakcije su osim što zahtjeva vrlo male količine uzorka i otapala, brza je, jeftina i može se provoditi pod blagim ekstrakcijskim uvjetima (sobna temperatura i tlak) te daje prihvatljivo iskorištenje i selektivnost, a time je smanjeno onečišćenje okoliša i poboljšana je sigurnost radnika. [27]

Metoda raspršenja matice uzorka kroz čvrstu fazu primjenjuje se kao općeniti analitički postupak za pripremu, ekstrakciju i fracioniranje čvrstih, polučvrstih i/ili vrlo viskoznih bioloških uzoraka. Koristi se za izolaciju širokog raspona lijekova, pesticida, prirodno dobivenih sastojaka i drugih spojeva iz širokog niza složenih biljnih i životinjskih uzoraka. [33]

U Tablici 2 dana je primjena MSPD metode.

Tablica 2. Primjena MSPD [34]

| Ciljani spojevi | Uzorak | Disperzni materijal | Omjer uzorak/sorbens |
|---|-----------------------|---------------------|----------------------|
| Životinjska tkiva i hrana životinjskog podrijetla | | | |
| alkilfenol, bisfenol A | Mlijeko, jaja | C18 | 1 : 1 |
| sulfonamidi | Meso | Alumina N – S | 1 : 4 |
| sulfonamidi | Životinjska tkiva | C18 | 1 : 2 |
| tetraciklini | Sir | Kristobalit | < 1 : 4 |
| OCPs, piretroid pesticid | Masna hrana | Celit | 1 : 3 |
| OPPs | Goveđi mišići i jetra | C18 | 1 : 4 |
| Biljke i biljni produkti | | | |
| buprofezin, tetradifon | Propolis | Silika | 1 : 2 |
| karbadoks, olakindoks | Hrana | C18 | 1 : 2 |

Tablica 2. Primjena MSPD [34] (nastavak)

| Ciljani spojevi | Uzorak | Disperzni materijal | Omjer uzorak/sorbens |
|-------------------------------|-----------------------|--|----------------------|
| Fungicidi | Jabuke, banane, grejp | C18 | 1 : 1 |
| Fenolni spojevi | Vino | Silika | 1 : 2 |
| Aflatoksini | Maslinovo ulje | C18 | 1 : 3 |
| Pesticidi | Jabuka i krumpir | MWCNTs | 10 : 3 |
| Uzorci okoliša | | | |
| OCPs | Mulj | Aluminat + Cu | 1 : 3 |
| PAHs | Kanalizacijski mulj | Florisil + Na ₂ SO ₄ | 2 : 10 : 5 |
| PAHs, pesticidi | Tlo | Florisil | 1 : 2 ; 1 : 1 |
| poboparaben, triklosan | Unutarnja prašina | C18 | 1 : 4 |

2.4. Kromatografija

Kromatografija je danas najčešće korištena separacijska tehnika koja mogućnošću svoje modifikacije pruža velike mogućnosti u istraživanju i praksi. Kromatografija se temelji na različitoj sorpciji sastojaka smjese na nekom prikladnom sorbensu. Kromatografski sustav se sastoji od analiziranog uzorka te pokretne i nepokretne faze. Tijekom kromatografskog procesa on se nalazi u dinamičkoj ravnoteži između tih dviju faza. Zbog njihova gibanja narušava se ravnotežno stanje, što uzrokuje putovanje skupine molekula u smjeru gibanja pokretne faze. Nepokretna faza mora biti tako odabrana da je zadržavanje molekula na njoj selektivno, pa različiti sastojci smjese budu uz nju različito dugo vezani, što uzrokuje razdvajanje smjese.

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

- a) Razdjelna kromatografija,
- b) Adsorpcijska kromatografija,
- c) Afinitetna kromatografija,
- d) Kromatografija isključenjem.

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti i na temelju sastava pokretne faze. Tako je pri plinskoj kromatografiji pokretna faza inertni plin, pri tekućinskoj kromatografiji to je kapljevina male viskoznosti, a pri fluidnoj kromatografiji u superkritičnim uvjetima pokretna faza je tekućina iznad svoje kritične temperature i tlaka. Vrste kromatografskih tehnika dane su u Tablici 3.

Tablica 3. Podjela kromatografskih tehnika s obzirom na pokretnu i nepokretnu fazu [35]

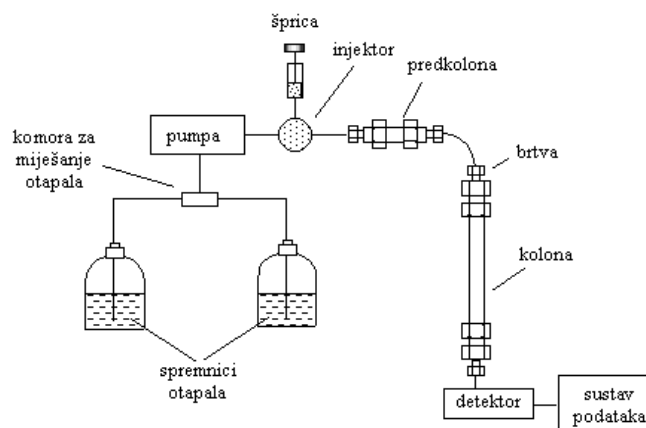
| Pokretna faza | | Nepokretna faza | Metoda |
|---------------------|------|-----------------|--|
| Plin | GC | Tekućina | Plinsko-tekućinska kromatografija, GLC |
| | | Krutina | Plinsko-čvrsta kromatografija, GSC |
| Tekućina | LC | Tekućina | Tekućinsko-tekućinska kromatografija, LLC |
| | | Krutina | Tekućinsko-čvrsta kromatografija, LSC |
| Superkritični fluid | SCFC | Tekućina | Superkritični fluid-tekućinska kromatografija, SCFLC |
| | | Krutina | Superkritični fluid-čvrsta kromatografija, SCFSC |

Informacija o uspješnosti separacije sadržana je u kromatogramu, tj. u zapisku koncentracijskog ili masenog profila sastojka uzorka nakon završenog procesa razdvajanja. Na temelju broja opaženih koncentracijskih profila može se zaključiti o složenosti ispitivanog uzorka. Položaj mrlje ili kromatografske krivulje na kromatogramu pomaže u dokazivanju kvalitativnog sastava uzorka, a na temelju površine kromatografske krivulje, odnosno njezine visine, može se dobiti kvantitativna procjena. [36]

2.4.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

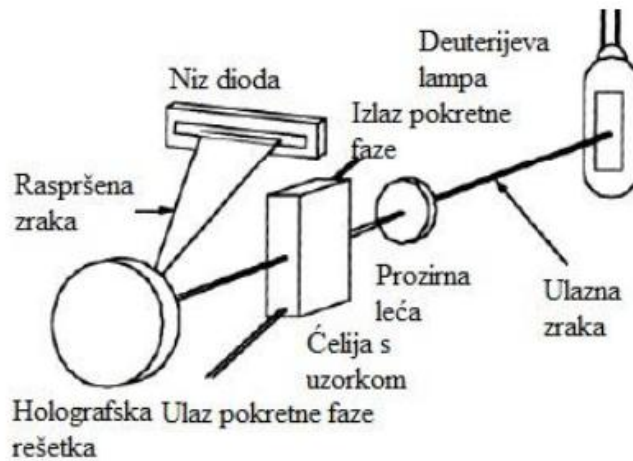
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) visoko je efikasna razdjelna kromatografija koja se u 75 % primjena danas koristi kao kromatografija obrnutih faza. [37]

HPLC se sastoji od osam važnih komponenata: pokretne faze, pumpe, uređaja za unošenje uzorka, kolone, detektora, posude za otpad, računala, integratora ili pisača. Na Slici 14 prikazan je shematski prikaz osnovnog uređaja za tekućinsku kromatografiju. [25]



Slika 14. Shematski prikaz HPLC-a [37]

Otapala koja se koriste kao pokretna faza trebaju biti visoke čistoće i valja ih osloboditi otopljenih plinova ili suspendiranih čestica, npr. pomoću mikroporoznih filtera pod vakuumom. Pumpa služi ubacivanju pokretne faze pod visokim tlakom (do 15 MPa) stalnom brzinom ($0,1 - 10 \text{ mL min}^{-1}$) u kolonu. Uzorak se unosi mikrolitarskom špricom kroz 6-kanalni ventil u sustav za injektiranje tzv. petlju (zapremina 5 do 500 mL) u kojoj se održava tlak. Prebacivanjem ventila otapalo prolazi kroz injektor te sobom nosi uzorak na kolonu. Kolona je najčešće cijev izrađena iz nerđajućeg čelika, duljine 250 a unutarnjeg dijametra 4,6 mm, punjena česticama veličine 5 ili 10 mm. Tako se obično dobiva broj tavana (N) od cca 50000 po metru. Detektori mogu pratiti značajke pokretne faze ili otopljene tvari. U prvom slučaju mjeri se indeks loma ili vodljivost pa je analit odnosno otopljena tvar dokazan neizravno promjenom ovih veličina. U drugom slučaju prate se karakteristike otopljene tvari kao što su apsorpcija u UV/Vis ili IR području, fluorescencija ili struja na elektrodi. Vrlo su dobri detektori s nizom dioda ("*diode-array*") (HPLC-DAD sustavi) koji omogućuju snimanje cijelog spektra eluiranog sastojka u UV/Vis: apsorpcija se snima u ovisnosti o vremenu zadržavanja i o valnoj duljini. [37] Detektor s nizom dioda je prikazan na Slici 15. Svjetlo iz deuterijeve lampe usmjereno je prozirnou lećom da cijeli snop svjetla može proći kroz detektorsku ćeliju na holografsku rešetku. Tako je uzorak podvrgnut svjetlu svih valnih duljina koje dolaze iz lampe. Raspršeno svjetlo od rešetke je fokusirano na niz dioda. Niz može sadržavati stotine dioda i izlaz iz svake diode je redovno odabran računalom i pohranjen na čvrsti disk. Spektar otopljene tvari može se dobiti iz krivulje koja povezuje apsorpciju s valnom duljinom. Jedini nedostatak ovog tipa detektora je da je njegova rezolucija ograničena brojem dioda koje se nalaze u nizu dioda. [38]



Slika 15. Detektor s nizom dioda [38]

2.5. Validacija

Validacija je dokumentirani proces određivanja pogodnosti mjernog sustava za dobivanje korisnih analitičkih podataka. Njome se dokazuje da je mjerni postupak prikladan za namijenjenu svrhu. Validacija analitičkog sustava važan je dio tog procesa s naglaskom na validaciji uzorka i uzorkovanja, validaciji metodologije i validaciji podataka.

Validaciju treba provesti:

- pri razradi i uvođenju nove metode,
- pri promjeni bilo kojeg dijela analitičke metode koja je već bila validirana,
- nakon većih popravaka ili servisa instrumenata pomoću kojih se provodi metoda,
- nakon određenih vremenskih intervala utvrđenih na temelju iskustva ili statističkih pokazatelja.

Svrha validacije uzorka je prihvatiti pojedini uzorak iz cjeline na temelju njegove reprezentativnosti i autentičnosti. Kriteriji su za prihvaćanje uzorka njegova nedvosmislena identifikacija, usklađivanje postupka uzorkovanja sa željenim podatkom kemijske analize te valjan lanac nadzora nad sveukupnim postupkom. Svrha je validacije uzorka prihvatiti pojedini uzorak kao dio populacije, minimizirati dvojbu o autentičnosti uzorka, pružiti mogućnost ponovnog uzorkovanja ako je potrebno te pripremiti uzorke za mjerni proces. O odbacivanju uzorka odlučuje se na temelju spoznaje da sustav uzorkovanja nije bio pod statističkom kontrolom, da su podatci o identifikaciji pogrešni ili nedostatni te kada se posumnja da ispitni uzorak nije dio populacije. Kvaliteta i korisnost informacije uvelike ovise o kvaliteti uzorka.

Validacija metodologije provodi se ispitivanjem izvedbenih značajki metode uzevši u obzir sve vanjske i unutarnje čimbenike koji na njih utječu, nastojeći smanjiti njihov utjecaj.

Provedba validacije dijeli se u tri odvojena, ali međusobno povezana koraka:

1) karakterizacija ispitnog postupka

Za provedbu tog koraka dva su bitna preduvjeta-definirati i opisati koji se specifični zahtjevi postavljaju pri konkretnom određivanju metodom i karakterizirati metodu ispitivanjem njezinih glavnih izvedbenih značajka. To su:

- a) točnost-razlika mjerene i prave vrijednosti,
- b) preciznost-uključuje ponovljivost rezultata koji su dobiveni istom metodom, istim uzorkom i u istim uvjetima te obnovljivost kad je riječ o istoj metodi i uzorku, ali su promijenjeni uvjeti izvedbe,
- c) linearnost-mogućnost da se metodom unutar radnog područja dobije izravno proporcionalna ovisnost mjernih rezultata o koncentraciji analita,
- d) stabilnost analita i standardnih otopina, tj. sposobnost dobivanja istih mjernih rezultata tijekom duljeg vremenskog razdoblja,
- e) selektivnost, odnosno specifičnost metode, pri čemu se pod specifičnošću misli na mogućnost nedvosmislenog određivanja analita u prisutnosti drugih sastojaka uzorka, a pod selektivnošću sposobnost određivanja skupine sličnih sastojaka uzorka,
- f) učinak matice uzorka, odnosno interferencija,
- g) granica određivanja-najmanja moguća koncentracija analita koja se može odrediti uz dopuštenu pogrešku,
- h) granica dokazivanja-najmanja moguća koncentracija analita koja se može detektirati, ali ne i kvantitativno odrediti,
- i) otpornost metode na promjenu radnih uvjeta,
- j) radno područje-interval unutar kojega analitički postupak ima zadovoljavajuću preciznost, točnost i linearnost,
- k) osjetljivost-svojstvo metode da razlikuje male količine analita, a karakterizira je nagib baždarnog pravca,
- l) iskoristivost-svojstvo metode da odredi ukupnu količinu analita.

2) usporedba sa zahtjevima korisnika

Vrlo je važna suradnja između laboratorija koji provodi validaciju i naručitelja kako bi zahtjev bio definiran i razumljiv.

3) izjava o udovoljavanju zahtjevima

Pošto je metoda karakterizirana tako da su određene njezine izvedbene karakteristike, a rezultati uspoređeni sa zahtjevima korisnika, na temelju rezultata validacije piše se izjava o prikladnosti metode za namjeravanu uporabu.

Validacija metode provodi se međulaboratorijskim ispitivanjima, usporedbom s analizom certificiranog materijala, usporedbom s validiranom metodom, sa standardnim otopinama i uzorcima te unutarlaboratorijskim ispitivanjima.

Validacija podataka je proces prihvaćanja ili odbacivanja podataka prije njihova konačnog iskazivanja. Temelji se na dokumentaciji postupaka uzorkovanja i mjernog procesa te statističkoj procjeni mjernih rezultata koja uključuje odbacivanje grubih pogrešaka, određivanje signifikantnosti pojedinih odstupanja mjernih podataka statističkim testovima, analizu varijancije, izbor kalibracijskih postupaka, provedbu regresijske analize i slično.

Analizirati se mogu bilo pojedinačni i slučajno izabrani podaci ili se može obaviti ukupna analiza podataka. O tome odlučuje analitičar koji mora dobro poznavati prirodu problema, konačnu usporedbu podataka pa i očekivani rezultat. [39]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. *Sediment* [40]

Postupak ekstrakcije farmaceutika napravljena je na uzorcima sedimenta sa mjesta Kupirovo koje se nalazi u Ličko-senjskoj županiji. Mehanički sastav sedimenta prikazan je u Tablici 4. **Sediment je okarakterizirani kao pjeskovita ilovača.**

Tablica 4. Mehanički sastav sedimenta

| % krupni pijesak | % (prah, glina) | % glina | % prah | % sitni pijesak | TEKSTURA TLA |
|------------------|-----------------|---------|--------|-----------------|--------------------|
| 10,2 | 0,7 | 0,55 | 0,15 | 89,3 | Pjeskovita ilovača |

Higroskopnost sedimenta, određena po *Mitscherlichu*, prikazana je u Tablici 5. **Teksturna oznaka sedimenta je pijesak.**

Tablica 5. Higroskopnost sedimenta po *Mitscherlichu*

| Uzorak | Masa prazne petrijevke / g | Petrijevka + uzorak / g | Petrijevka + uzorak nakon 24 h sušenja / g | % Hy |
|-----------|----------------------------|-------------------------|--|------|
| Sediment1 | 56,4286 | 61,4291 | 61,2630 | 3,43 |
| Sediment2 | 36,7344 | 41,7350 | 41,5721 | 3,37 |
| Sediment3 | 65,4151 | 70,4150 | 70,2475 | 3,47 |

Na temelju rezultata prikazanih u Tablici 6. možemo zaključiti da je ispitivani sediment **neutralnog do bazičnog karaktera.**

Tablica 6. pH reakcije sedimenta

| Uzorak | pH | | | Klasifikacija sedimenta |
|---|------|------|------|-------------------------|
| Sediment, KCl, neprosijano | 6,93 | 6,93 | 6,93 | Neutralni sediment |
| Sediment, KCl, prosijano | 7,06 | 7,07 | 7,07 | Neutralni sediment |
| Sediment, H ₂ O, neprosijano | 8,19 | 8,19 | 8,19 | Bazični sediment |
| Sediment, H ₂ O, prosijano | 8,01 | 8,02 | 8,02 | Bazični sediment |

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 7 zaključujemo da je suma baza sposobnih za zamjenu vrlo visoka, maksimalni adsorpcijski kapacitet za baze također vrlo visok, a stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa izrazito visok.

Tablica 7. Kapacitet i stanje zasićenosti adsorpcijskog kompleksa

| Sediment | Suma baza sposobnih za zamjenu (<i>S</i>), mmol/100 g tla | Maksimalni adsorpcijski kapacitet za baze (<i>T</i>), mmol/100 g tla | Stupanj zasićenosti adsorpcijskog kompleksa bazama (<i>V</i>), % |
|---------------|---|--|--|
| | 49,7 | 50,03 | 99,34 |
| Klasifikacija | Vrlo visoka | Vrlo visoka | Vrlo visoka |

Udio humusa u sedimentu određen je metodom po *Kochmanu*, a prema dobivenim rezultatima udjela humusa od 1,31 %, **radi se o slabo humoznom sedimentu.**

Određivanjem karbonata ustanovljeno je da uzorak sedimenta sadrži značajan udio karbonata, što je i karakteristika sedimenata s pH-vrijednostima većim od 7 (Tablica 8).

Tablica 8. Određivanje karbonata

| Uzorak | $V(\text{NaOH}) / \text{mL}$ | % CaCO_3 |
|---------------|------------------------------|-------------------|
| Sediment | 37,00 | 25,62 |
| Slijepa proba | 49,80 | / |

3.1.2. *Kemikalije*

U Tablici 9 navedene su kemikalije korištene u eksperimentalnom djelu rada.

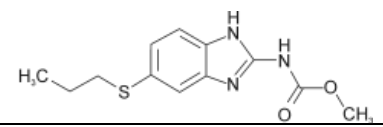
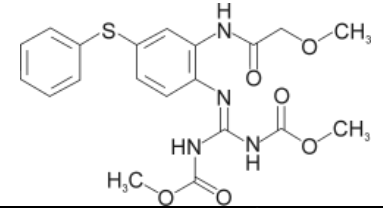
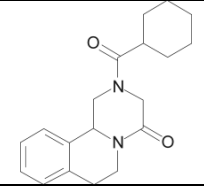
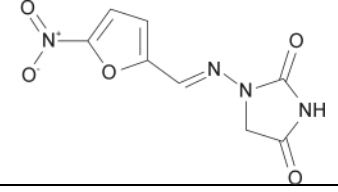
Tablica 9. Naziv, molekulske formule, čistoća i proizvođač korištenih kemikalija

| Naziv | Molekulska formula | Čistoća | Proizvođač |
|-----------------------------|--|---------|----------------------------|
| 1-propanol | CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| 2-propanol | CH ₃ CH ₂ CH ₂ OH | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Aceton | CH ₃ COCH ₃ | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |
| Acetonitril | CH ₃ CN | HPLC | Fisher Chemical, UK |
| Dietil-eter | CH ₃ CH ₂ OCH ₂ CH ₃ | p.a. | Sigma – Aldrich, SAD |
| Diklormetan | CH ₂ Cl ₂ | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Dinatrij-hidrogenfosfat | Na ₂ HPO ₄ | p.a. | Kemika, Hrvatska |
| Etanol | CH ₃ CH ₂ OH | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |
| Heksan | C ₆ H ₁₈ | p.a. | Sigma – Aldrich, SAD |
| Kloridna kiselina, 37 %-tna | HCl | p.a. | Sigma – Aldrich, SAD |
| Kloroform | CHCl ₃ | | Mallinckrodt Chemical, SAD |
| Metanol | CH ₃ OH | HPLC | J. T. Baker, Nizozemska |
| Metanol | CH ₃ OH | p.a. | Sigma – Aldrich, SAD |
| Natrij hidroksid | NaOH | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |
| Etil-acetat | C ₄ H ₈ O ₂ | p.a. | Gram-mol, Hrvatska |

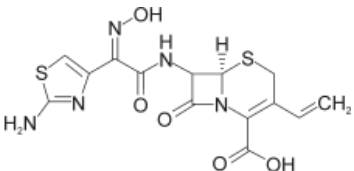
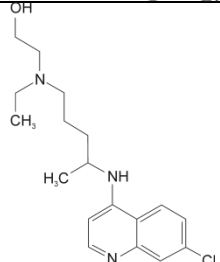
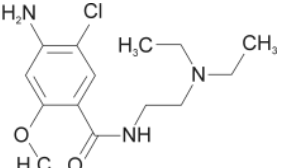
3.1.3. *Kemoterapeutici*

U eksperimentalnom radu ispitivanja su provedena na 7 kemoterapeutika, iz grupe antihelmintika (albendazol, febantel, prazikvantel), antibiotika (nitrofurantoin, cefdinir), kemoterapeutika (hidroksiklorokin) i antiemetika (metoklopramid). Fizikalno-kemijske karakteristike kemoterapeutika korištenih u ovom radu navedene su u Tablici 10.

Tablica 10. Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanih kemoterapeutika

| Kemoterapeutik | Molekulska struktura | CAS broj | Molarna masa, g/mol | Proizvođač | Konstante |
|--|--|------------|---------------------|-------------------------|--|
| Albendazol [C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S] (antihelmintik) |  | 54965-21-8 | 265,33 | Veterina, 99 % | LogK _{ow} = 265,33 S(mg/L) = 3,14 pK _a = 40,76 |
| Febantel [C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S] (antihelmintik) |  | 58306-30-2 | 446,48 | Veterina, ≥99 % | LogK _{ow} = 1,95 S(mg/L) = 33,92 pK _a = 9,48 |
| Prazikvantel [C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂] (antihelmintik) |  | 55268-74-1 | 312,41 | Veterina, ≥99 % | LogK _{ow} = 2,42 S(mg/L) = 88,38 pK _a = - |
| Nitrofurantoin [C ₈ H ₆ N ₄ O ₅] (antibiotik) |  | 67-20-9 | 238,16 | Acros Organics, 98 % | LogK _{ow} = -0,17 S(mg/L) = 1382 pK _a = 9,23 |

Tablica 10. Fizikalno-kemijske karakteristike ispitivanih kemoterapeutika (nastavak)

| Kemoterapeutik | Molekulska struktura | CAS broj | Molarna masa, g/mol | Proizvođač | Konstante |
|--|--|------------|---------------------|--------------------------|--|
| Cefdinir [C ₁₄ H ₁₃ N ₅ O ₅ S ₂] (antibiotik) |  | 91832-40-5 | 395,41 | Sigma Aldrich, ≥ 95 % | LogK _{ow} = 1,47 S(mg/L) = 180,1 pK _a = 3,20; 7,45 |
| Hidroksiklorokin [C ₁₈ H ₂₆ ClN ₃ O] (kemoterapeutik) |  | 118-42-3 | 335,87 | Sigma-Aldrich, ≥ 95 % | LogK _{ow} = 3,03 S(mg/L) = 197,6 pK _a = 7,28; 9,76 |
| Metoklopramid [C ₁₄ H ₂₂ ClN ₃ O ₂] (antiemetik) |  | 364-62-5 | 299,80 | Sigma-Aldrich ≥ 95 % | LogK _{ow} = 1,69 S(mg/L) = 71,25 pK _a = 9,04 |

3.1.4. Sorbens

Ljuske jajeta koje su korištene kao sorbens pripremljene su na Zavodu za analitičku kemiju, Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Najprije su usitnjene u tarioniku nakon čega su mljevene u mlinu za kavu. Slika 16 prikazuje ljuske jajeta.



Slika 16. Ljuske jajeta [41]

Ljuska jajeta ima ponajviše funkciju da štiti embrij kokoši, djelujući kao fizička prepreka za sprječavanje invazije mikroorganizama i regulira izmjenu plina između embrija i vanjskog okruženja. Težina ljuske iznosi otprilike 11 % od ukupne težine jajeta, te sadrži 94 % kalcijeva karbonata, 1 % kalcijeva fosfata, 1 % magnezijeva karbonata, te 4 % organske tvari. Dakle, ljuska jajeta je bogat izvor mineralnih soli, uglavnom kalcij karbonata. [42]. Razine potencijalno toksičnih olova, aluminija, kadmija i žive su vrlo niske. Razine selena, bakra, kroma i stroncija u ljuski jaja mogu se značajno razlikovati ovisno o hrani i okolišu. [43]

3.2. Instrumenti, uređaji i pribor

3.2.1. Analitička vaga

Za vaganje kemoterapeutika, sorbensa i sedimenata, u radu su korištene analitičke vage Mettler Toledo, AB104, Švicarska, prikazana na Slici 17 i Mettler Toledo XA105.



Slika 17. Analitička vaga Mettler Toledo, AB104, Švicarska

3.2.2. SPE kolone

Uzorak sedimenta i sorbensa miješa se u tarioniku da se postigne homogenost uzorka. Uzorak u tarioniku prikazan je na Slici 18.



Slika 18. Tarionik s uzorkom sedimenta i sorbensa

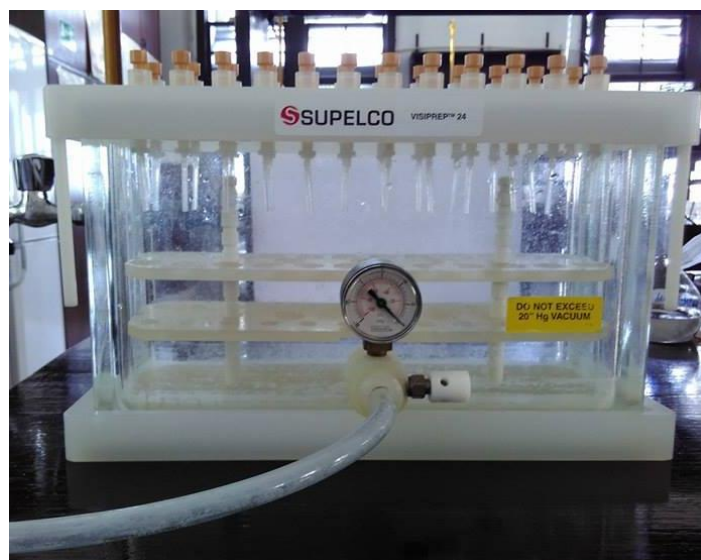
Homogenizirani uzorci nakon miješanja u tarioniku pakirani su u kolone. Korištene su polipropilenske SPE prazne kolone (3 mL) (Slika 19) i 20 µm polietilenski fritovi koji dolaze na dno kolone i vrh uzorka.



Slika 19. SPE kolone

3.2.3. Aparatura za ekstrakciju

Ekstrakcija kemoterapeutika provedena je pomoću aparature za ekstrakciju, VisiprepTM24, Supelco prikazanog na Slici 20, a protok je prilagođen na 1 mL/min.



Slika 20. Supelco VisiprepTM24

3.2.4. Uparivač (rotavapor)

Za uparavanje ekstrakta do suha korišteni su uparivači Büchi Waterbath B-480, Švicarska prikazan na slici 21 i Heidolph Instruments Laborota 4000. Uparavanje uzoraka provedeno je na 40 °C.



Slika 21. Büchi Waterbath B-480

3.2.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC)

Nakon ekstrakcije ekstrakti su analizirani tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti Varian ProStar, Sjedinjene Američke Države koji je prikazan na Slici 22. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti ProStar sastoji se od: automatskog uzorkivača 410, detektora s nizom dioda 330, pumpe 230, boce za pokretnu fazu, boce za otpad i računala preko kojeg se programom upravlja HPLC-om i gdje se nakon analize obrađuju dobiveni podatci. Za analizu je korištena kolona InertSustain™ C18 (GLScienis INC. Japan). Dimenzije kolone su 250 mm x 4,6 mm, a veličina zrnaca je 5 µm.



Slika 22. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti ProStar

3.2.6. UV/Vid spektrofotometar

Za snimanje apsorpcijskog spektra svakog farmaceutika korišten je UV/Vid spektrofotometar PerkinElmer, Lambda 35, Waltham, Massachusetts, Sjedinjene Američke Države.

3.3. Metode rada

3.3.1. Priprava standardnih otopina kemoterapeutika

Standardna otopina smjese kemoterapeutika priprema se vaganjem 5 mg svakog kemoterapeutika i njihovim otapanjem u metanolu HPLC čistoće u tikvici od 100 mL. Masena koncentracija svakog farmaceutika u smjesi je 50 ppm. Pripremljena otopina čuva se u hladnjaku na 4 °C.

3.3.2. Priprava špikanog sedimenata

Osušeni sediment usitni se u tarioniku i prosije kroz sito otvora 2 mm. U posudici za vaganje izvaže se 2 g prosijanog sedimenta, doda se 2 mL standardne otopine smjese kemoterapeutika i 5 mL metanola te se pomiješa laganim kružnim pokretima da se smjesa homogenizira. Dobivena smjesa ostavi se na zraku jedan dan da metanol ishlapi.

3.3.3. Kondicioniranje sorbensa

Prije upotrebe, sorbens se mora kondicionirati, tj. aktivirati. Ljuske jajeta su aktivirane na 160 °C jedan sat prije pranja. Nakon toga se peru tri puta *n*-heksanom, a zatim tri puta metanolom.

3.3.4. Ekstrakcija raspršenja matice uzoraka kroz čvrstu fazu

Izvaže se 50 mg sedimenata i 100 mg aktiviranog sorbensa. Pomiješaju se u tarioniku da se dobije homogeni uzorak kojim se puni MSPD kolona. Na dno kolone i na vrh uzorka stavlja se polietilenski frit pažljivim tlačenjem pomoću klipa šprice.

Kolona s uzorkom priključuje se na aparaturu za ekstrakciju, a protok se prilagodi na 1 mL/min. Kemoterapeutici se ekstrahiraju odabranim otapalom. Provodi se višestruka ekstrakcija da se poboljša iskoristivost ekstrakcije. Svi ekstrakti se zatim uparavaju do suha na uparivaču na vodenoj kupelji na temperaturi od 40 °C. Suhi ostatak se otapa u 1 mL metanola i dobiveni ekstrakt se analizira na HPLC-DAD kromatografskom sustavu.

3.3.5. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

Identifikacija i kvantifikacija kemoterapeutika u ekstraktima analizira se tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Analiziraju se standardna otopina smjese kemoterapeutika, slijepa proba (ekstrahiran je sediment koji nije špikan standardnom smjesom farmaceutika) i ekstrakti. Volumen injektiranja je 30 μL . Tlak je 20-25 atmosfera, a temperatura između 20 i 25 $^{\circ}\text{C}$. Standardna smjesa otopine farmaceutika injektirana je tri puta, slijepa proba jedanput, a svaki uzorak injektiran je dva puta. Prije i nakon analize uzoraka, kolona se pere 65 %-tnim acetonitrilom jedan sat protokom od 0,5 mL/min. Volumen injektiranja acetonitrila je 10 μL . Pokretna faza korištena pri analizi sastoji se od binarne smjese eluensa A (0,01 % mravlja kiselina u vodi) i eluensa B (0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu).

Brzina protoka pokretne faze je 0,5 mL/min, a gradijent pokretne faze prikazan je u Tablici 11.

Tablica 11. Gradijent pokretne faze korišten u analizama

| Vrijeme,min | Protok, mL min ⁻¹ | A, % | B, % |
|-------------|------------------------------|------|------|
| 0,00 | 0,5 | 100 | 0 |
| 2,30 | 0,5 | 92 | 8 |
| 6,00 | 0,5 | 90 | 10 |
| 11,00 | 0,5 | 70 | 30 |
| 15,00 | 0,5 | 40 | 60 |
| 18,00 | 0,5 | 5 | 95 |
| 28,00 | 0,5 | 5 | 95 |
| 28,06 | 0,5 | 100 | 0 |
| 30,00 | 0,5 | 100 | 0 |

Kromatogrami su snimani na pet valnih duljina: 210, 254, 280, 340 i 370 nm. Iz snimljenih kromatograma očitavaju se površine kemoterapeutika iz standardne smjese te iz realnih uzoraka dobivenih špikanjem sedimenta standardnom otopinom kemoterapeutika. Na temelju očitanih površina možemo izračunati iskoristivost ekstrakcije koja se računa kao omjer

površine kromatografske krivulje analita u ekstraktu ($A_{i,E}$) i površine kromatografske krivulje analita u sandardu ($A_{i,STD}$) kako je prikazano izrazom:

$$I / \% = (A_{i,E} / A_{i,STD}) * 100$$

3.3.6. Validacija

U ovom radu provedena je validacija HPLC-DAD i MSPD-HPLC-DAD metoda.

3.3.6.1. Validacija HPLC-DAD metode

Standardna otopina smjese kemoterapeutika (50 ppm) se razrijedi na manje koncentracije (20, 10, 5, 3,5, 1, 0,5 ppm). Pripremljene smjese kemoterapeutika se analiziraju tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti.

3.3.6.2. Validacija MSPD-HPLC-DAD metode

Sediment se našpika sa standardnim smjesama kemoterapeutika (50, 20, 10, 3,5, 1, 0,5 ppm), kako je objašnjeno u poglavlju 3.3.2.. Ekstrahira se s otapalom etil-acetat kao u poglavlju 3.3.4.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Cilj ovog rada je ekstrakcija kemoterapeutika iz sedimenta. U uvodu je spomenuto da postoje mnoge metode ekstrakcije. Za ovaj rad odabrana je metoda raspršenja matice uzoraka kroz čvrstu fazu (MSPD). Kao sorbens korištene su aktivirane ljuske jajeta, kao ekološki prihvatljiv i cijenom dostupan sorbens, a u ranijim istraživanjima [44] pokazivao je vrlo dobre rezultate. Ispitivao se utjecaj otapala na iskorištenje ekstrakcije.

Otapala su odabrana na temelju ranijih istraživanja, koja su navedena u Tablici 12. Prema Tablici 12 odabrane su i valne duljine za snimanje kemoterapeutika, a izbor valnih duljina kod kojih su se integrirali kromatogrami potvrđen je i snimanjem spektara pojedinačnih standardnih otopina ispitivanih farmaceutika na spektrofotometru.

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika

| Albendazole (antihelmintic), CAS: 54965-21-8 | | | | | | |
|---|---|--------------------------------------|--|---|---------------|-------------|
| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
| Svinjsko mišićno tkivo | MSPD, kolona C18, ispiranje s 8 mL heksana, 8 mL acetonitrila. Sušenje pod strujom dušika, suhom ostatku dodati 0,1 mL metanola 0,4 mL 0,017 M H ₃ PO ₄ . Ultrazvučna kupelj (5-10 min), centrifugiranje (17 000g , 5 min), filtriranje. | fotodioda, $\lambda = 200-350$ nm | ODS kolona, (10 μ m, 30 cm X 4 mm id, Micro Pak, Varian, Sunnyvale, CA), 45 °C | 0,017 M H ₃ PO ₄ :acetonitril (6:4, v:v), 1 mL / min | 1990. | [45] |
| Mlijeko | SPE, Lichrosorb RP18 sorbens, ispiranje s 3 mL pufera (0,005 M KH ₂ PO ₄ , pH = 2,3). Eluiranje s 5 mL heksana, 2 mL acetonitril/pufer(0,005 M KH ₂ PO ₄ , pH = 2,3) (75:25, v:v). | UV, $\lambda = 290$ nm | μ -Bondapak C-18, (3,9 x 300 mm; Waters, Milford, USA) | Acetonitril:metanol:fosfatni pufer (770:170:60, v:v:v), 1,0 mL/min | 1998. | [46] |
| Ljudska plazma | SPE, Varian Bond Elut C18 (50 mg, 1 mL spremnik (Varian, Harbor City, CA, USA)), ispiranje s 15 % metanolom, eluiranje s 1 mL 90 % metanolom. Isparavanje na 37 °C u blagoj struji dušika. Dodano 100 μ L mobilne faze, miješenje 15 s, centrifugiranje 2 min | UV, $\lambda = 225$ nm | Waters μ Bondapak™ Phenyl (125 Å, 10 μ m 3,9x300 mm) | 1,25 % trietilamina u voda:metanol:acetonitril (72:15:13, v:v:v), pH 3,1 (s 85 % o-fosforne kiseline), 1,0 mL/min | 2002. | [47] |
| Sediment | 1 mL standardne otopine farmaceutika i 3 mL metanola (preko noći), 15 mL otapala (metanol, etanol, voda, 1-propanol, aceton, diklormetan, dioksan i acetonitril, kombiniranje metanola s acetonitrilom i dioksanom, ultrazvuk, filtriranje | DAD, $\lambda = 210$ nm | Inter Sustain C18, 250 x 4,6 mm, [5 μ m]; Synergi, Fusion –RP 80 A, 150 x 4,6 mm, [4 μ m]; Synergi, Fusion –RP 80 A, 150 x 2,0 mm, [4 μ m]; LiChrospher 100, 125 x 4,0 mm, [5 μ m],; Inter Sustain C18, 2.1 x 50 mm, [2 μ m] | 0,01 % mravlja kiselina u vodi i 0,01 % mravlja kiselina u acetonitrilu, 0,7 mL/min | 2012. | [48] |
| Sediment | 1 mL standardne otopine farmaceutika i 3 mL metanola (preko noći), 15 mL otapala (metanol, acetonitril, voda, etanol, aceton, diklormetan, n-propanol i dioksan), mućkanje (30 min., 30 °C, 200 rpm), filtriranje | DAD, $\lambda = 210$ nm | InertSustain™ C18, (250 mm x 4,6 mm, 5 μ m) | A 0,01 % mravlje kiseline u vodi i B 0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu, 0,7 mL/min. | 2012. | [49] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak I)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|--|---|--------------------|---|--|--------|------|
| Voda | SPE, Strata X, Strata C18, Agilent C8, Oasis HLB, Isolute C28, ispiranje i eluiranje s metanolom, etanolom i acetonitrilom | MS/MS | - | - | 2012. | [50] |
| Sediment | MSPD - ljuške jaja, C18 (oktadecilsilan) i florisil (45 µm, od 60 Å), 1 mL/min, eluiranje ljuški jajeta s 1 mL i 2x2 mL (metanol:voda=80:20), eluiranje C18 (1-propanol:voda=40:60), eluiranje florisila (etanol) | DAD, λ = 210 nm | InertSustainTMC18 - 250 mm x 4,6 mm, 5 µm. | 0,01 % mravlja kiselina u vodi i 0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu, 0,5 mL/min, | 2013. | [44] |
| Ljudska plazma | SPE – unutarnji standard: fenacetin | MS/MS (ESI) | Zorbax XDB-CN kolona | voda s 1 % octene kiseline:metanol (40:60), 1 mL/min. | 2013. | [51] |
| Voda | SPE kolone Strata X, Strata C18, Agilent C8, Oasis HLB, Isolute C18. Kondicioniranje s 5 mL metanola i 5 mL vode, ispiranje s 3 mL vode ili 2 mL mravlje kiseline, eluiranje s 3 mL metanola, 6 mL acetonitrila, 3 mL metanola i 3 mL 5 % amonijaka | MS/MS | Waters Acquity UPLC BEH, C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 µm) | 10 mM amonijakalni pufer i acetonitril, 0,2 mL/min, 35 °C | 2014. | [52] |
| Ljudska plazma | SPE, Phenomenex Strata-X (30 mg/1 mL), kondicioniranje s 1,0 mL metanola (MeOH) i 1,0 mL vode, ispiranje s 1,0 mL 10 % (v:v) MeOH u vodi, eluiranje s 1 mL mobilne faze | MS / MS | Hypurity C18 kolona (50 mm x 4,6 mm, 5 µm), 40 °C | Acetonitril:2,0 mM amonijev acetat, (pH = 5,0 s AcOH) (80:20, v:v), 0,5 mL/min | 2016. | [53] |
| Febantel (antihelmintic), CAS: 58306-30-2 | | | | | | |
| Voda | SPE, Strata-X kolona, kondicioniranje s 5 mL metanola i 5 mL vode, pH (uzorak) = 4,0 (s HCl), 100 mL se prebaci na kolonu, protok 4 mL/min, sušenje 5 min. Eluiranje s 2x5 mL metanola. Uparivanje do suha na rotavaporu (40 °C), otopljen u 1 mL acetonitril:voda (1:1, v/v) | MS–MS | Synergy Fusion C18, (150 mm x 2,0 mm, 4 µm) | 0,1 % mravlje kiseline u MilliQ i 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu, 0,2 mL/min | 2010. | [54] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak II)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|-----------------|---|---|--|---|--------|------|
| - | - | DAD, $\lambda = 254, 280 \text{ nm}$ | Phenomenex kolona, Synergy 4u Fusion-RP (80 Å, 150 x 4,6 mm; 4 µm) | 0,01 % mravlja kiselina u MilliQ vodi i 0,01 % mravlja kiselina u acetonitrilu, 0,5 mL/min | 2010. | [55] |
| Sediment | 1 mL standardne otopine farmaceutika i 3 mL metanola (preko noći), 15 mL otapala (metanol, acetonitril, voda, etanol, aceton, diklormetan, <i>n</i> -propanol i dioksan), mućkanje (30 min., 30 °C, 200 rpm), filtriranje | DAD, $\lambda = 210 \text{ nm}$ | InertSustain™ C18, (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) | 0,01 % mravlje kiseline u vodi i 0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu, 0,7 mL/min. | 2012. | [49] |
| Voda | SPE, Strata X, Strata C18, Agilent C8, Oasis HLB, Isolute C28, ispiranje i eluiranje s metanolom, etanolom i acetonitrilom | MS/MS | - | - | 2012. | [50] |
| Sediment | 1 mL standardne otopine farmaceutika i 3 mL metanola (preko noći), 15 mL otapala (metanol, etanol, voda, 1-propanol, aceton, diklormetan, dioksan i acetonitril, kombiniranje metanola s acetonitrilom i dioksanom, ultrazvuk, filtriranje | DAD, $\lambda = 210 \text{ nm}$ | Inter Sustain C18, (250 x 4,6 mm, 5 µm); Synergi, Fusion –RP 80 A (150 x 4,6 mm, 4 µm); Synergi, Fusion –RP 80 A (150 x 2,0 mm, 4 µm); LiChrospher 100, (125 x 4,0 mm, 5 µm); Inter Sustain C18, (2.1 x 50 mm, 2 µm) | 0,01 % mravlja kiselina u vodi i 0,01 % mravlja kiselina u acetonitrilu, 0,7 mL/min | 2012. | [48] |
| Sediment | MSPD, C18 i florisil, ekstrakcija s 5 mL (te 7 i 9 mL) acetonitrila, 5 % oksalne kiseline (6:4, v/v), (ostala otapala korištena u radu: metanol, etanol, aceton, 1-propanol, 2-propanol, acetonitril, diklorometan i voda, te smjese metanola i acetonitrila s vodom, različite kiseline (oksalna, octena, solna, fosforna i trifluorocetna kiselina)), upareno do suha u vodenoj kupelji (40 °C), otopljeno u 1 mL acetonitril:voda (1:1, v/v) | MS/MS | Synergy Fusion C18 kolona (150 mm x 2.0 mm, 4 µm) | 0,1 % mravlje kiseline u MilliQ vodi i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu, 0,2 mL/min. | 2012. | [56] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak III)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|---|---|---------------------------------------|--|--|--------|------|
| Sediment | MSPD - ljuške jaja, C18 (oktadecilsilan) i florisil (45 μm , od 60 \AA .), 1 mL/min, eluiranje ljuški jajeta s 1 mL i 2x2 mL (metanol:voda=80:20), eluiranje C18 (1-propanol:voda=40:60), eluiranje florisila (etanol) | DAD, $\lambda = 210 \text{ nm}$ | InertSustainTMC18 (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) | 0,01 % mravlja kiselina u vodi i 0,01 % mravlje kiseline u acetonitrilu, 0,5 mL/min, | 2013. | [44] |
| Voda | SPE kolone Strata X, Strata C18, Agilent C8, Oasis HLB, Isolute C18, Kondicioniranje s 5 mL metanola i 5 mL vode, ispiranje s 3 mL vode ili 2 mL mravlje kiseline, eluiranje s 3 mL metanola, 6 mL acetonitrila, 3 mL metanola i 3 mL 5% amonijaka | MS/MS | Waters Acquity UPLC BEH, C18, (2,1 x 100 mm, 1,7 μm) | 10 mM amonijakalni pufer i acetonitril, 0,2 mL/min, 35 °C | 2014. | [52] |
| Praziquante (antihelmintic), CAS: 55268-74-1 | | | | | | |
| Ljudski serum | SPE, C 18 AR, kondicioniranje s 2x1 mL acetonitrila, s 2 x 1 mL destilirane vode, ispiranje s 600 μL acetonitril:voda (25:75, v:v), eluiranje s 2x300 μL acetonitrila | UV-VIS, $\lambda = 210 \text{ nm}$ | Reverzna faza, na bazi celulozne kiralne kolone (Chiralcel OJ-R) | 0,1 M natrij perklorat:acetonitril (66:34, v:v), 0,5 mL/min | 1997. | [57] |
| Plazma psa | SPE, Waters Sep- Pak Vac C18, (100 mg), kondicioniranje s 3 mL metanola, 1 mL vode i 5 mL 100 mM natrijeva karbonata, ispiranje s 5 ml 100 mM otopine natrijevog karbonata, eluiranje s 0,75 mL acetonitrilom:0,2 % (v:v) fosforne kiseline (50:50, v:v) | UV, $\lambda = 220 \text{ nm}$ | Waters Novapak C 18 (4 μm , 150 x 3,9 mm) | Acetonitril:50 mM kalijev dihidrogenfosfat (33:67, v:v), pH 3 (s 20 % fosfornom kiselinom), 1,5 mL/min | 1998. | [58] |
| Voda | SPE, Strata-X kolona, kondicioniranje s 5 mL metanola i 5 mL vode, pH (uzorak) = 4,0 (s HCl), 100 mL se prebaci na kolonu, protok 4 mL/min, sušenje 5 min. Eluiranje s 2x5 mL metanola. Uparivanje do suha na rotavaporu (40 °C), otopljen u 1 mL acetonitril:voda (1:1, v/v) | MS-MS | Synergy Fusion C18, (150 mm x 2,0 mm, 4 μm) | 0,1 % mravlje kiseline u MilliQ i 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu, 0,2 mL/min | 2010. | [54] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak IV)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|-----------------------|--|-------------------|---|--|--------|------|
| Voda | SPE, Strata X, Strata C18, Agilent C8, Oasis HLB, Isolute C28. Ispiranje i eluiranje s metanolom, etanolom i acetonitrilom | MS/MS | - | - | 2012. | [50] |
| Sediment | MSPD, C18 i florisil, ekstrakcija s 5 mL (te 7 i 9 mL) acetonitrila: 5 % oksalne kiseline (6:4, v/v), (ostala otapala korištena u radu: metanol, etanol, aceton, 1-propanol, 2-propanol, acetonitril, diklorometan i voda, te smjese metanola i acetonitrila s vodom, različite kiseline (oksalna, octena, solna, fosforna i trifluorocena kiselina)), upareno do suha u vodenoj kupelji (40 °C), otopljeno u 1 mL acetonitril:voda (1:1, v/v) | MS/MS | Synergy Fusion C18 kolona (150 mm × 2.0 mm, 4 μm) | 0,1 % mravlje kiseline u MilliQ vodi i 0,1 % mravlja kiselina u acetonitrilu, 0,2 mL/min. | 2012. | [56] |
| Voda | SPE kolone Strata X, Strata C18, Agilent C8, Oasis HLB, Isolute C18. Kondicioniranje s 5 mL metanola i 5 mL vode, ispiranje s 3 mL vode ili 2 mL mravlje kiseline, eluiranje s 3 mL metanola, 6 mL acetonitrila, 3 mL metanola i 3 mL 5 % amonijaka | MS/MS | Waters Acquity UPLC BEH, C18 (2,1 x 100 mm, 1,7 μm) | 10 mM amonijakalni pufer i acetonitril, 0,2 mL/min, 35 °C | 2014. | [52] |
| Ljudska plazma | L-L. Uzorcima se dodaje 5 mL etil-acetata, mućaka se 10 min pri 50 okretaja u minuti i centrifugira (4800 g, 4 °C, 10 min). Uparavanje u struji dušika pri sobnoj temperaturi. Ostatak se otopi u 200 μL mobilne faze i miješa 30 sekundi. Doda se 200 μL n-heksana, miješa 15 sekundi i cetrifugira 3 min pri 12 000 g. | UV, λ = 370 nm | ODS kolona II (nehrdajući čelik, 250 x 4,6 mm) (M. Grom, Herrenberg, Njemačka), 30 °C | 5 mM NaH ₂ PO pufer:acetonitril (80:20, v:v), pH 3 (podešen s o-fosfornom kiselinom), 1,0 mL/min. | 1996. | [59] |
| Mlijeko | C18 (Sep-Pak Plus C18), eluiranje s 2,5 mL mobilne faze | kulometrija | Nova-Pak C 18 kolona (150×3,9 mm, 4 μm) | Acetonitril:0,1 M vodena otopina natrij perklorata (28:72), 0,5 % ledene octene kiseline, 1,0 mL/min | 1997. | [60] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak V)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|--|---|--------------------------------|--|--|--------|------|
| Nitrofurantion (antibiotic), CAS: 67-20-9 | | | | | | |
| Životinjsko mišićno tkivo | SPE - 200 mg LiChrolut ® EN, kondicioniranje s 3 mL etil-acetata, a zatim s 3 mL metanola i 5 mL vode, ispiranje s 2,5 mL vode, eluiranje s 3 mL etil-acetata. Upariti u struji dušika, i otopiti s 200 µL mobilne faze | MS-MS | Inertsil ® ODS-3, (150×3 mm ID, 5 µm) spojena s Inertsil ® ODS-3 predkolonom(10×3 mm ID, 5 µm) | Metanol:voda (50:50, v:v) s 10 mMamonijevog acetata, 0,5 mL/min, 25 °C | 2001. | [61] |
| Jetra svinje | SPE, MAX patrone, kondicioniranje s 3 mL metanola, 3 mL voda i 3 mL TRIS pufera, pH 6,3, ispiranje s 2 % -tnim amonijakom u vodi (3 mL) i eluiranje s metanolom (3 mL), miješanje 5 s, upariti na 40 °C u struji dušika, ostatak otopiti u 3 mL vode i miješati 30 s. HLB patrone - 3 mL metanola i 3 mL vode, ispranje s 2 % octene kiseline u 50 % metanolu (3 mL) i eluiranje s 2 % amonijaka u 90 % metanola (3 mL), miješanje 5 s, upariti na 40 °C u struji dušika, ostatak otopiti u 300 µL vodi i 150 µL acetonitrila, mješanje 30 s i filtriranje. | -UV, λ = 275 nm -MS / MS | -Luna C 18 kolona (5 µM, 250 x 4,6 mm), 25 °C -Symmetry C18 kolona, 40 °C | -metanol:acetonitril:0,01 M KH2PO4, pH 7,4 (2,5:37,5:60 (v/v/v)), 0,8 mL/min -1,0 mM amonij acetat pufer (pH 3,5):acetonitril, 0,4 mL/min | 2003. | [62] |
| Urin | SFE, ekstrakcija s 2 mL acetonitrila, uparavanje do suha, ostatak se otopi u 500 µL acetonitrila | UV-VIS, λ = 310 nm | Supelcosil LC-18-DB (250×4,6 mm, 5 µm) | acetonitril: voda (85:15), 0,2 ml/min | 2003. | [63] |
| Meso | SPE, Lichrolut EN, kondicioniranje s etil-acetatom (9 mL), metanolom (3 mL) i destiliranom vodom (9 mL), ispiranje destiliranom vodom (3 mL) i heksanom (3 mL), eluiranje s etil-acetatom (9 mL), uparavanje strujom dušika, otapanje eluenta s 250 µL acetonitril:voda (30:70, v:v) | ESIMS / MS | C18 SymmetryShield LC kolone (15 cm x 2,1 mm id, 3,5 µm) opremljen sa SymmetryShield RP18 predstupcem (1 cm x 2,1 mm id, 3,5 µm) | vodena otopina octene kiseline 0,025 % (v/v) i acetonitril, 0,3 mL/min | 2005. | [64] |
| Kozmetika | Ultrazvuk, acetonitril i metanol (1:1, v:v) | DAD, λ = 365 nm | Kromasil C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), 25°C | Acetonitril:0,4 % octena kiseline (30:70, v:v), 1,0 mL/min. | 2009. | [65] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak VI)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|---|---|--|---|---|--------|------|
| plazma | SPE, Strata-X 33 μm , isprana s 1 mL metanola, 1 mL vode (nakon svakog postupka centrifugiran 1 min pri 1811 g), kondicioniranje uzorka (centrifugiranje 1811 g, 2 min), ispiranje s 1 mL vode (centrifugiranje 1,0 min pri 1811 g), eluiranje s 1,0 mL acetonitril:voda (60:40, v:v) (centrifugiranje 1,0 min pri 1811 g) | LC-MS/MS | BDS Hypersil C18 (100 mm \times 4,6 mm, 5 μm) | Acetonitril:0,25 mmol/L amonij acetat (60:40, v/v), 0,5 mL/min. | 2013. | [66] |
| Cefdinir (antibiotic), CAS: 91832-40-5 | | | | | | |
| Ljudska plazma | Bond Elut SCX (100 mg), kondicioniranje s metanolom (0,2 mL), s destiliranom vodom (1,0 mL), ispiranje s 0,01 N HCl (2 mL), s destiliranom vodom (1,0 mL), eluiranje s 0,2 M Na ₂ HPO ₄ (1,0 mL) | 6AD SPD-10AV, $\lambda = 280 \text{ nm}$ | ODS-80TM kolona (Tosoh, Tokyo, Japan (25 cm x 4,6 mm) | Citratni pufer (pH 2,5):acetonitril, 1,2 mL/min, | 1998. | [67] |
| Ljudska plazma | Proteini uklonjeni s 40 μL 10 % trikloroctene kiseline u vodi, miješanje 1 min, ostavljeno 5 min na sobnoj temp, centrifugiranje 10 min pri 10000g. | MS / MS | RP18 Waters SymmetryShield (5 μm , 50 mm x 2,1 mm) | Metanol:voda:mravlja kiselina (25:75:0,075, v/v/v), 0,2 mL/min | 2006. | [10] |
| - | - | UV/Vis $\lambda = 285 \text{ nm}$ | Lichrospher RP C18 (4 x 250 mm, 5 μ) | 50 mM amonij acetata, (pH 3,0 s 10 %-tnom fosfornom kiselinom):metanol (80:20, v:v). 1 mL/min. | 2006. | [68] |
| - | - | RP-HPLC-UV $\lambda = 286 \text{ nm}$ | Waters RP Spherisorb C18 (250 mm \times 4,6 mm, 5 μm) | voda (pH 3,0 s o-fosfornom kiselinom):acetonitril:metanol, 13:5:2 (v/v/v), (pH 2,0-3,0), 1 mL/min | 2011. | [69] |
| Ljudska plazma | SPE, Sep-Pak Vac C18 kolona (1,0 mL, Waters), kondicioniranje s 2,0 mL metanola, s 5,0 mL vode, ispiranje s 2,0 mL vode, eluiranje s 10,0 mL metanola, 0,10 mL/min | UV, $\lambda = 230 \text{ nm}$ | C18 (150 mm x 4,6 mm, 5,0 μm) | 50 mM fosfatni pufer (pH 5,0):metanol, (0:20, v/v), 1,0 mL/min | 2011. | [70] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak VII)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|--|--|--|---|---|--------|------|
| Ljudska plazma | Tretiranje s 600 μ L etanola, acetonitrila, metanola, 6 %-tne trikloroctene kiseline i njihovih kombinacija, miješanje 5 min, centrifugiranje 10 min pri 2500g na 4 °C | RP-HPLC / UV $\lambda = 285$ nm | Supelco Discovery HS C18 (150 mm \times 4,6 mm, 5 μ m), predkolona Perkin Elmer C18 (30 mm \times 4,6 mm, 10 μ m) | Metanol:acetonitril (50:50, v:v), 0,05 % trifluoroctene kiseline (19:81,v/v), 50 °C, 2,0 mL/min | 2011. | [11] |
| Urin i plazma štakora | Precipitacija proteina pomoću metanola | MS / MS | Synergi 4 μ polar-RP 80A kolona (150 \times 2,0 mm, 4 μ m) | 0,1 % mravlje kiseline u vodi:metanol (65:35, v:v), 0,2 mL/min | 2013. | [71] |
| Hydroxyclozoquine (chemotherapeutic agent), CAS: 118-42-3 | | | | | | |
| Krv i plazma | - | fluorescencija, λ (pobude) = 337 nm | Poli (stiren divenilbenzen) | Metanol:voda s trietilaminom, pH 11 | 1985. | [72] |
| Krv i urin | - | Fluorescencija | - | 0,5 % n-butilamin u metanolu:heksan:metil terc butil eter (1:1:1) | 1988. | [73] |
| Krv i urin | Uzorak, 125 μ L hidroklorokinona, 100 μ L 2 M NaOH, mješanje 5 s, 5 mL dietil-etera, mješanje 1 min, centrifugiranje 5 min pri 1800g. Upariti do suha. 200 μ L 0,01 M trikloroctene kiseline u diklormetanu i 100 μ L 0,25 M DATAAN u trikloroctena kiselina:diklormetan (20:80), mješanje 10 s. 30 min na 45 °C. Dodati 1 mL metanola, mješati 5 s, upariti do suha. Otopiti u 200 μ L metanol:voda (25:75) | UV, $\lambda = 343$ nm | C8 kolona | 0,05 M KH ₂ PO ₄ (pH 3): metanol:etanol:triethylamin (78:22:1:0,08) | 1992. | [74] |
| Serum i krv | L-L, ekstrahiranje metil terc-butyl eterom (MTBE) | fluorimetrija, λ (pobuda) = 215nm | Spherisorb S5SCX (150 mm \times 5 mm i.d.), sobna temperatura | 4.705 g amonij perklorat- 500 mL metanol:voda (98.5:1.5) (pH 8 metanol natrij hidroksid (50mM)), 1,5 mL/min | 1994. | [75] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak VIII)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|---|--|---|---|---|--------|------|
| Serum | Taloženje proteina s 0,33 M perklorne kiseline, centrifugiranje. | MS / MS | HypersilGold C8 | Voda:metanol | 2013. | [77] |
| Limfno tkivo kunića | Krvi dodati 2 mL NaOH, mješanje 2 min, 8 mL kloroforma, mješanje 1 min, centrifugiranje. 1 mL 0,1 M fosfatnog pufera (pH = 5) | $\lambda = 343 \text{ nm}$ | Symmetry C18 (5 μm , 4,6 do 150 mm) | Acetonitril:0.01 M natrij dihidrogen fosfat pufer (pH 3), 14:86 (v/v), 0,5 mL/min | 2013. | [78] |
| Krv | 200 μL krvi i 20 μL st.otopine, mješanje. Taloženje proteina: 400 μL metanola i 50 μL CuSO_4 (3 mM), 2 min mješanja, 10 min centrifugiranja pri 14000 okretaja. | Fluorescencija λ (pobuda) = 320 nm λ (emisija) = 380 nm | XTerra phenyl® kolona (250 \times 4,6 mm, 5 μm ; Waters, MA, USA), 50 °C | glicin pufera/natrij klorida (pH 9,7):metanol (46:54, v/v), 1,2 mL/min | 2015. | [79] |
| plazma | - | UV, $\lambda = 343 \text{ nm}$ | Hypersil C18 kolona (250Å - 6 mm, 5 μm) | Voda:organska smjesa (acetonitril:metanol, 50:50, v/v) (75:25, v/v), s natrij-pentansulfonatom i fosforom kiselinom, pH 3,0 (s ortofosforna kiselina), 2,0 mL/min | 2015. | [80] |
| Metoclopramide (antiemetic), CAS: 364-62-5 | | | | | | |
| štakor | - | UV, $\lambda = 270 \text{ nm}$ | Novapak C18, 4 μm (3,9 \times 150 mm) | Acetonitril (18 %) u 0,02 M amonijevom acetatu koji je sadržavao 0,1 % trietilamin | 1998. | [81] |
| - | - | RP-HPLC–UV, $\lambda = 274 \text{ nm}$ | Hi-Q-Sil C18 kolona (250 mm x 4,6 mm, 5 μm) | acetonitril:voda (25:75), u 0,06 % trietilaminu (pH 4 s ortofosforom kiselinom), 1 mL/min | 2009. | [82] |
| Ljudska plazma | L-L | HILIC/MS/MS | Atlantis HILIC silica kolona | Acetonitril:amonijformat (100 mM, pH 6,5) (85:15, v/v). 0,5 mL/min. | 2009. | [83] |
| - | Otopina se ozrači s fotokemijskim reaktorom | DAD, $\lambda = 273 \text{ nm}$ | Merck LiChrospher ® 60 RP Select B kolona (250 \times 4 mm 5 μm) | Smjesa 14 % acetonitril i 86 % amonij acetat 10 mM vodena otopina se podese na pH 5 s ledenom octenom kiselinom, 1 mL/min | 2009. | [84] |

Tablica 12. Pregled literature prema kojoj su se odabrala otapala i valne duljine za snimanje kemoterapeutika (nastavak IX)

| Uzorak | Priprema uzorka | Detektor | Kolona | Pokretna faza | Godina | Ref. |
|----------------------|---|---|---|---|--------|------|
| Plazma i urin | SPE, kondicioniranje s 1 mL metanola i 1 mL deionizirane vode, neutralni pH, punjenje s 1 mL vodene otopine (50 µg/L) pri pH 8,5, ispiranje s 1 mL acetona, euliranje s 2×1 mL metanol:octena kiselina (10:1, v:v). | UV-VIS, $\lambda = 270 \text{ nm}$ | micro-Bondapak C18 kolona (4,6 mm × 150 mm) | acetonitril (18 %) u 0,02 mol/L amonij acetatu koji sadrži 0,1 % trietilamin, 1,0 mL/min | 2009. | [85] |
| plazma | 0,4 mL plazme i 50 µL st.otopine, mješanje. Zalužiti dodavanjem 100 µL 1 M NaOH, mješanje 30 s, ekstrahiranje s 1 mL etil-acetata, 3 min mješanja, centrifugiranje 5 min pri 14000rpm. Upariti u struji dušika, 45 °C. Ostatak otopiti u 50 µL mobilne faze, centrifugiranje. | LC-ESI-MS | Thermo Hypersil-Hypurity C18 (150 mm x 2,1 mm, 5 µm), 45 °C | 40 mM amonij acetat (pH 3,5):metanol:acetonitril, 75:5:20, 0,24 mL/min | 2010. | [86] |
| - | - | RP-HPLC, $\lambda = 275 \text{ nm}$ | Waters C18 µBondapak (RP), (3,9×300mm) | Acetonitril:20m M kalij dihidrogen fosfatnog pufera (pH 3 s ortofosfornom kiselinom) (40:60), 2 mL/min | 2012. | [87] |
| - | - | RP-UPLC-UV, $\lambda = 273 \text{ nm}$ | Waters X-terra RP18 (150 x 4,6 mm, 3,5 µm), 3 °C | 30 mM monobazični natrij fosfat i 2,3 mM pentan-1-sulfonska kiselina natrijeva sol (pH 3,0 ortofosforna kislina) i acetonitrila, 1,2 mL/min | 2013. | [88] |

4.1. Kromatografsko određivanje kemoterapeutika

Preliminarnim ispitivanjima određivala se prikladna metoda kojom su se tijekom daljnjega rada analizirali dobiveni ekstrakti farmaceutika iz sedimenta tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Koncentracija farmaceutika i smjese farmaceutika su 50 ppm.

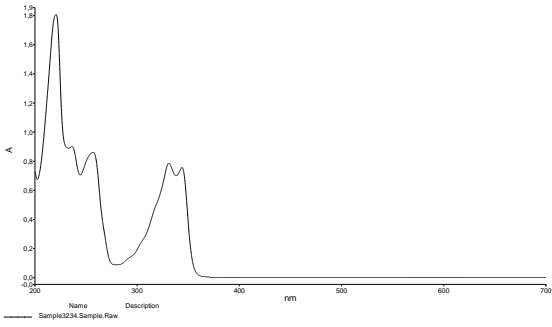
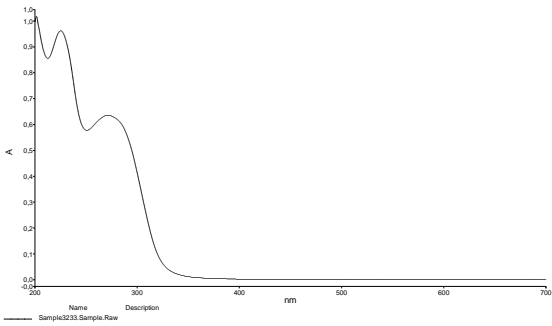
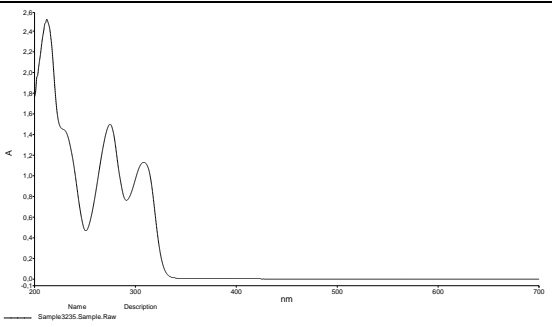
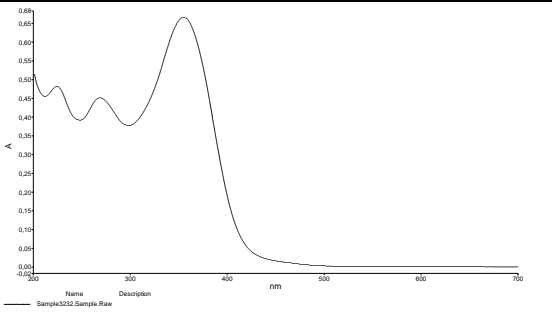
Odabrano je pet različitih valnih duljina (210, 270, 280, 340, 370 nm) za snimanje kemoterapeutika na HPLC-DAD kromatografskom sustavu. U Tablici 13 prikazane su valne duljine pri kojima su očitavane površine kromatografskih krivulja za svaki kemoterapeutik, kod tih valnih duljina su kemoterapeutici imali najveće odzive signala. Također pri identifikaciji kemoterapeutika uz UV/Vid apsorpcijske spektre pomogla su nam i vremena zadržavanja s malim odstupanjima ovisno o uvjetima provođenja ekstrakcije. Vrijeme zadržavanja otopljene komponente označava vrijeme od trenutka unošenja uzorka do vremena maksimalnog odziva za pojedinu komponentu.

Tablica 13. Valne duljine pri kojima su očitavane površine kromatografskih krivulja i vrijeme zadržavanja svakog farmaceutika za koncentraciju od 50 mg/L

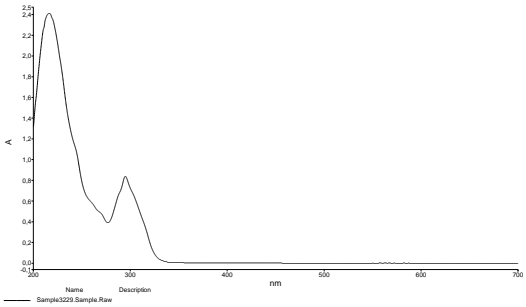
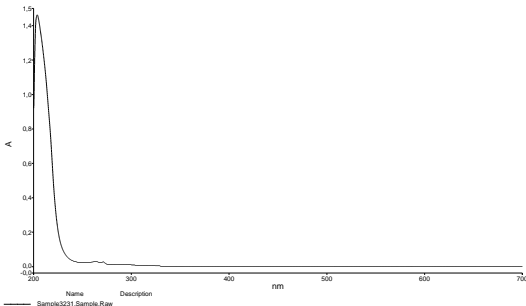
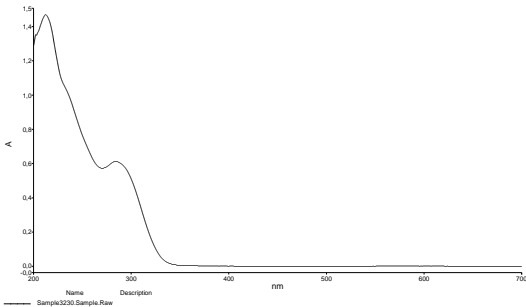
| Kemoterapeutik | λ , nm | t_R , min | A, mAUs |
|------------------|----------------|-------------|---------|
| Hidroksiklorokin | 210 | 17,240 | 2557 |
| Cefdinir | 210 | 20,280 | 4340 |
| Metoklopramid | 210 | 19,427 | 12677 |
| Nitrofurantoin | 370 | 20,813 | 8860 |
| Albendazol | 210 | 22,973 | 16679 |
| Prazikvantel | 210 | 24,360 | 9916 |
| Febantel | 210 | 25,560 | 9135 |

Za lakšu identifikaciju kemoterapeutika koriste se apsorpcijski spektri svakog kemoterapeutika koji su snimljeni na UV/Vid spektrofotometru Perkin Elmer, Lambda 35, spektri su prikazani u Tablici 14. Za snimanje apsorpcijskih spektara farmaceutika korištene su 20 ppm otopine pojedinačnih farmaceutika.

Tablica 14. Apsorpcijski spektri ispitivanih farmaceutika

| Kemoterapeutik | Apsorpcijski spektar |
|------------------|---|
| Hidroksiklorokin |  <p>The graph shows the absorption spectrum of Hydroxychloroquine. The x-axis represents wavelength in nanometers (nm), ranging from 200 to 700. The y-axis represents absorbance (A), ranging from 0.0 to 1.8. There is a sharp peak at approximately 250 nm with an absorbance of about 1.7. A secondary, smaller peak is visible at approximately 350 nm with an absorbance of about 0.8. The absorbance drops to near zero for wavelengths above 400 nm.</p> |
| Cefdinir |  <p>The graph shows the absorption spectrum of Cefdinir. The x-axis represents wavelength in nanometers (nm), ranging from 200 to 700. The y-axis represents absorbance (A), ranging from 0.0 to 1.0. The spectrum shows a broad absorption band starting around 200 nm, peaking at approximately 250 nm with an absorbance of about 0.95, and then gradually decreasing towards longer wavelengths, reaching near zero by 400 nm.</p> |
| Metoklopramid |  <p>The graph shows the absorption spectrum of Metoclopramide. The x-axis represents wavelength in nanometers (nm), ranging from 200 to 700. The y-axis represents absorbance (A), ranging from 0.0 to 2.5. The spectrum features several distinct peaks: a primary peak at approximately 210 nm (A ≈ 2.4), a secondary peak at approximately 260 nm (A ≈ 1.4), and a tertiary peak at approximately 320 nm (A ≈ 1.1). Absorbance is very low for wavelengths above 350 nm.</p> |
| Nitrofurantoin |  <p>The graph shows the absorption spectrum of Nitrofurantoin. The x-axis represents wavelength in nanometers (nm), ranging from 200 to 700. The y-axis represents absorbance (A), ranging from 0.00 to 0.80. The spectrum shows a broad absorption band with a primary peak at approximately 380 nm (A ≈ 0.75) and a secondary peak at approximately 250 nm (A ≈ 0.45). Absorbance is very low for wavelengths above 450 nm.</p> |

Tablica 14. Apsorpcijski spektri ispitivanih farmaceutika (nastavak)

| Kemoterapeutik | Apsorpcijski spektar |
|----------------|---|
| Albendazol |  |
| Prazikvantel |  |
| Febantel |  |

4.2. Optimizacija metode

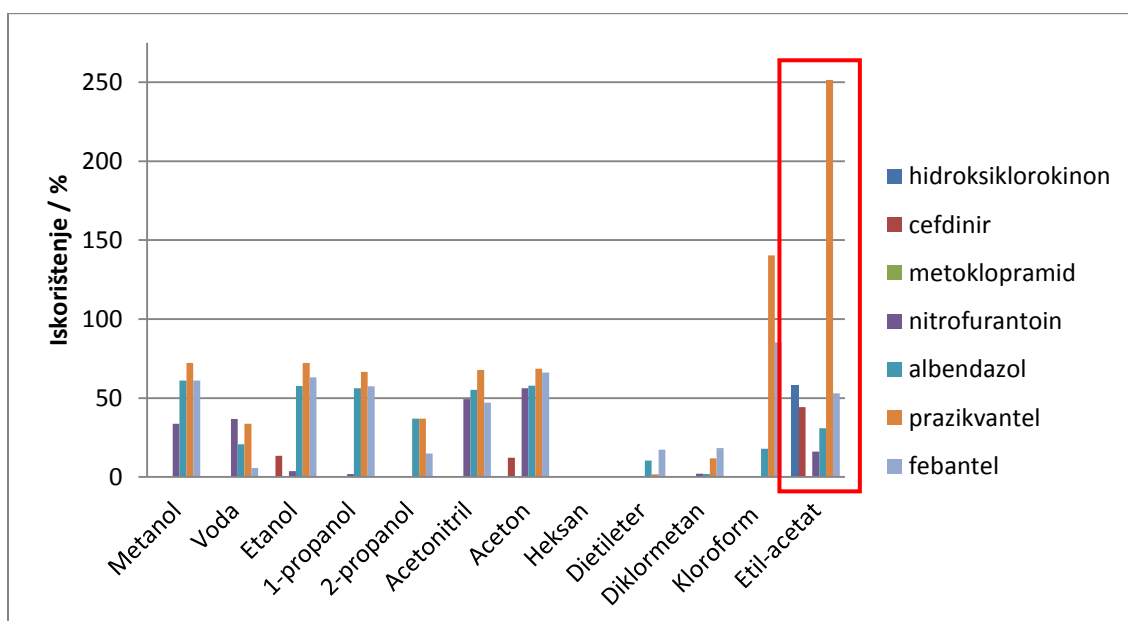
Optimizacija metode raspršenja matice uzoraka kroz čvrstu fazu rađena je obzirom na ekstrakcijsko otapalo. Svi eksperimenti izvedeni su s 3 paralelna uzorka i slijepom probom.

Krenulo se od otapala prema radu S. Prašnički [44]. Stoga je prvo u ovom radu korišteno osam čistih otapala (metanol, voda, 2-propanol, 1-propanol, etanol, acetonitril, aceton, diklormetan) i 3 sustava otapala (metanol:voda=80:20, metanol:voda=50:50, metanol:voda=20:80). U nekim radovima se spominju dietil-eter [74] i heksan [59], [64] te su i oni korišteni kao čista otapala. Pošto se nisu eluirali svi kemoterapeutici, te da se poveća iskorištenje kemoterapeutika koji su eluirani prema referenci [67] odabrani su eluensi za iduće eksperimente. Tako su provedeni eksperimenti eluiranja kemoterapeutika MSPD metodom uzimajući kao eluense metanol, HCl, H₂O i Na₂HPO₄. Kako su aceton i acetonitril pokazali dobre rezultate kao čista otapala provedeni su eksperimenti i s njima u kombinaciji s HCl, H₂O i Na₂HPO₄. Prema radu [78] odradio se eksperiment s kloroformom (kojem je dodan NaOH), H₂O, Na₂HPO₄ i acetonom, te eksperiment s kloroformom kao čistim otapalom. Daljnjim pregledom literature korišteno je kao čisto otapalo i etil-acetat [61], [64] i [86]. Etil-acetat i kloroform su korišteni i u kombinaciji s HCl, H₂O i Na₂HPO₄.

Dakle, 12 eksperimenata podrazumijevalo je ekstrakciju čistim otapalima tako da se prvo eluiralo s 1 mL čistog otapala (metanol, voda, 2-propanol, 1-propanol, etanol, acetonitril, aceton, *n*-heksan, dietil-eter, diklormetan, etil-acetat i kloroform) te ostavilo 5 minuta da se sloj natopi otapalom. Nakon toga se eluiralo još dva puta sa po 2 mL istog otapala. Potom su provedena tri eksperimenata u kojima se eluiralo sa 1 mL smjese otapala (metanol:voda=80:20, metanol:voda=50:50, metanol:voda=20:80) te ostavilo 5 minuta da se sloj natopi smjesom otapalom. Nakon toga se eluiralo još dva puta sa po 2 mL navedenih otapala. U pet eksperimenata eluiralo se sa 1 mL otapala (metanol, acetonitril, aceton, etil-acetat i kloroform) te ostavilo 5 minuta da se sloj natopi otapalom. Nakon toga se eluiralo s još 2 mL 0,01 M HCl, 1 mL H₂O i 1 mL 0,2 M Na₂HPO₄. Kod jednog eksperimenata eluiralo se sa 8 mL otapala (kloroform:NaOH=80:1, 2 mL otapala te ostavilo 5 minuta da se sloj natopi otapalom, te dodalo još 3 puta po 2 mL otapala), 1 mL H₂O, 1 mL 0,2 M Na₂HPO₄ i 1 mL acetona.

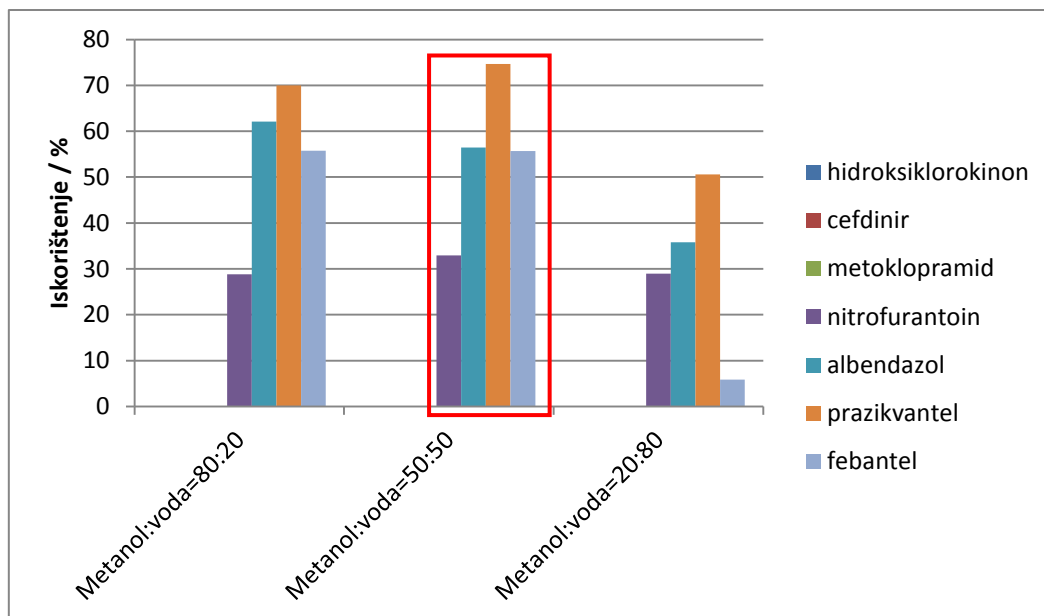
Kako bi se smanjio broj koraka prilikom pripreme uzoraka odnosno da se izbjegne uparavanje uzoraka na rotavaporu isprobano je da li uparavanje ekstrakta ima utjecaj na rezultate. Lošiji rezultati dobiveni su kad nema uparavanja, te je odlučeno da će se u daljnjem eksperimentalnom radu ekstrakti nakon MSPD ekstrakcije uparavati odnosno koncentrirati.

Rezultati eksperimenata sa čistim otapalima prikazani su na Slici 23. Iz dobivenih iskorištenja može se zaključiti da je etil-acetat najbolje čisto otapalo kada se gledaju iskorištenja svih kemoterapeutika. Kod etil-acetata se vide svi kemoterapeutici osim metoklopramid. Naime, metoklopramid je kod svih eksperimenata pokazivao jako velika iskorištenja, tj. pojavljivala su se dva pika, koji se nalaze i kod slijepe probe, što se može objasniti utjecajem matice sedimenta. Također kao dobro otapalo se pokazao i aceton jer daje iskorištenja veća od 50 % za većinu kemoterapeutika, međutim s acetonom se na kromatogramu pojavljuju duple kromatografske krivulje. Među boljim otapalima su još acetonitril i metanol. Najlošijim otapalom pokazao se heksan jer nije uspio estrahirati niti jedan kemoterapeutik.



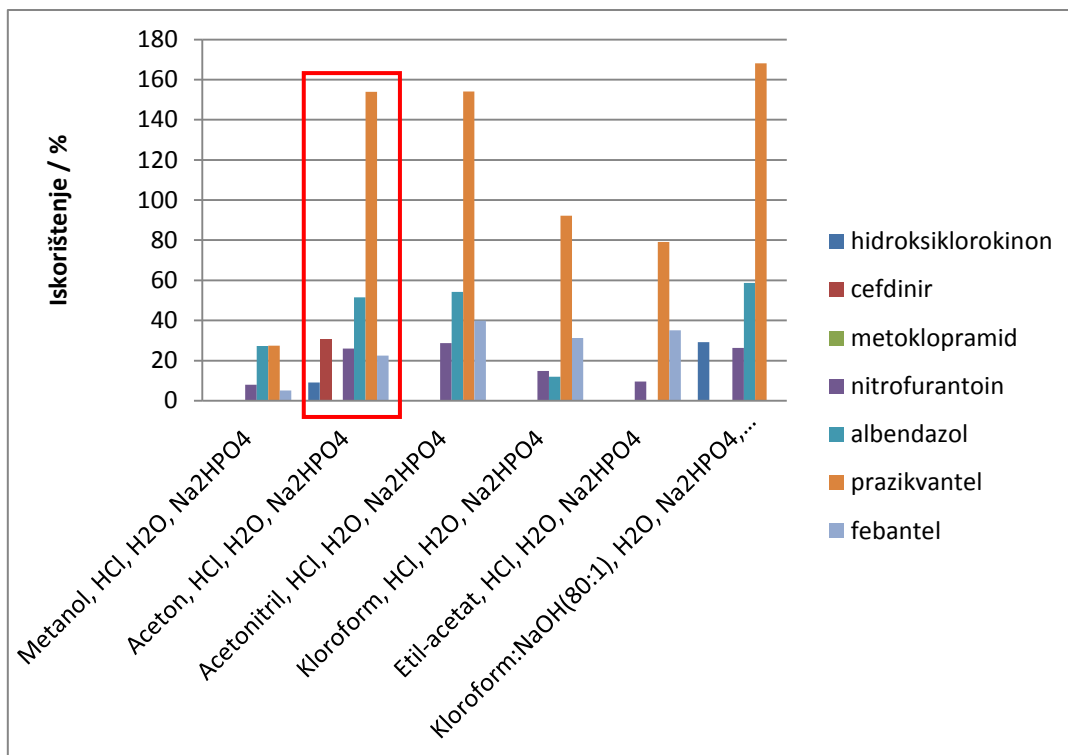
Slika 23. Iskorištenja ekstrakcije sa čistim otapalima

Kod sustava otapala (Slika 24) vidimo smo 4 kemoterapeutika. Podjednako dobri rezultati za ekstrakciju dobiveni su sustavom metanol:voda=80:20 i sustavom metanol:voda=50:50. Sustav gdje je veći udio vode (metanol:voda=20:80) ima manja iskorištenja, što možemo vidjeti i kod čistih otapala da se kod čiste vode dobiju manja iskorištenja nego kao kod čistog metanola.



Slika 24. Iskorištenja ekstrakcije dobivena sustavom otapala metanol:voda u omjerima 80:20, 50:50 i 20:80.

Na Slici 25 prikazani su rezultati ekstrakcije s više različitih otapala. Kod većine eksperimenata prazikvantel je pokazao najveća iskorištenja, veća i od 80 %. Kao najbolji eksperiment za sve kemoterapeutike se pokazao eksperiment s acetonom, kloridnom kiselinom, vodom i dinatrij-hidrogenfosfatom, jer se kod tog eksperimenta vidi šest kemoterapeutika.



Slika 25. Iskorištenja ekstrakcije dobivena s više različitih otapala

Obzirom na sve rezultate i obzirom na iskorištenja (Tablica 15.) te utjecaj matice sedimenta najbolje rezultate dalo je čisto otapalo etil-acetat koji je korišten za validaciju MSPD-HPLC-DAD metode.

Tablica 15. Iskorištenja ekstrakcije za sve eksperimente

| | Iskorištenja (%) | | | | | | |
|---|------------------|----------|---------------|----------------|------------|--------------|----------|
| | hidroksiklorokin | cefdinir | metoklopramid | nitrofurantoin | albendazol | prazikvantel | febantel |
| Metanol | / | / | / | 33,78 | 61,05 | 72,17 | 61,11 |
| Metanol:voda=80:20 | / | / | / | 28,78 | 62,1 | 70 | 55,78 |
| Metanol:voda=50:50 | / | / | / | 32,94 | 56,46 | 74,68 | 55,68 |
| Metanol:voda=20:80 | / | / | / | 28,95 | 35,76 | 50,56 | 5,85 |
| Voda | / | / | / | 36,86 | 20,72 | 33,78 | 5,74 |
| Etanol | / | 13,51 | / | 3,7 | 57,58 | 72,14 | 63,18 |
| 1-propanol | / | / | / | 1,91 | 56,23 | 66,63 | 57,48 |
| 2-propanol | / | / | / | / | 37,06 | 36,91 | 14,92 |
| Acetonitril | / | / | / | 49,41 | 55,15 | 67,8 | 47,09 |
| Aceton | / | 12,17 | / | 56,23 | 57,81 | 68,67 | 66,13 |
| Heksan | / | / | / | / | / | / | / |
| Dietil-eter | / | / | / | / | 10,34 | 1,66 | 17,34 |
| Diklormetan | / | / | / | 2,05 | 1,96 | 11,76 | 18,345 |
| Metanol, HCl, H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ | / | / | / | 7,92 | 27,33 | 27,36 | 5,03 |
| Aceton, HCl, H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ | 9,02 | 30,4 | / | 26,06 | 51,54 | 153,9 | 22,55 |
| Acetonitril, HCl, H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ | / | / | / | 28,78 | 54,31 | 154,11 | 39,84 |
| Kloroform:NaOH(80:1), H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ , aceton | 29,22 | / | / | 26,35 | 58,65 | 168,18 | / |
| Kloroform | / | / | / | / | 17,92 | 140,38 | 85,18 |
| Etil-acetat | 58,35 | 44,35 | / | 16,18 | 30,94 | 251,34 | 52,9 |
| Kloroform, HCl, H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ | / | / | / | 14,91 | 12,04 | 92,12 | 31,21 |
| Etil-acetat, HCl, H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ | / | / | / | 9,56 | / | 79,18 | 35,03 |

4.3. Validacija

Optimiran kromatografski sustav je validiran određivanjem ponovljivosti, linearnosti, granice detekcije i granice kvantifikacije. Validacijski parametri HPLC-DAD ispitivanih kemoterapeutika prikazani su Tablicom 16. Tablicom 17 prikazani su validacijski parametri MSPD-HPLC-DAD ispitivanih kemoterapeutika. Kalibracijske funkcije su određivane za validaciju HPLC-DAD kod sedam koncentracija (50, 20, 10, 5, 3,5, 1, 0,5 ppm) za svaki kemoterapeutik, odnosno kod validacije MSPD-HPLC-DAD kod šest koncentracija (50, 20, 10, 3,5, 1, 0,5 ppm). Iz Tablice 16 vidi se da je ovisnost masene koncentracije o površini kromatografske krivulje linearna i to kroz cijelo koncentracijsko područje ($r^2 > 0,99$). Iz Tablice 17 vidimo da nismo mogli još jednom ekstrahirati metoklopramid, te se nisu mogli odrediti validacijski parametri.

Tablica 16. Validacijski parametri HPLC-DAD ispitivanih kemoterapeutika

| Kemoterapeutik | Jednadžba regresijskog pravca | Koeficijent korelacije (r^2) | Linearno područje (ppm) | LOD (ppm) | LOQ (ppm) |
|------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| Hidroksiklorokin | $y = 60,97x - 95,26$ | 0,9963 | 3,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Cefdinir | $y = 11,16x - 27,97$ | 0,9980 | 3,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Metoklopramid | $y = 207,26x + 1.117,89$ | 0,9970 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Nitrofurantoin | $y = 216,43x - 59,13$ | 0,9999 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Albendazol | $y = 284,14x + 158,08$ | 0,9997 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Prazikvantel | $y = 230,33x + 232,33$ | 0,9991 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Febantel | $y = 264,59x + 95,24$ | 0,9990 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |

Tablica 17. Validacijski parametri MSPD-HPLC-DAD ispitivanih kemoterapeutika

| Kemoterapeutik | Jednadžba regresijskog pravca | Koeficijent korelacije (r^2) | Linearno područje (ppm) | LOD (ppm) | LOQ (ppm) |
|------------------|-------------------------------|----------------------------------|-------------------------|-----------|-----------|
| Hidroksiklorokin | $y = 1,48x + 76,70$ | 0,9296 | 0,5 – 50 | 1,75 | 3,5 |
| Cefdinir | $y = -1,81x + 187,58$ | 0,8407 | 0,5 – 50 | 1,75 | 3,5 |
| Metoklopramid | - | - | - | - | - |
| Nitrofurantoin | $y = 1,66x + 4,59$ | 0,9948 | 3,5 – 50 | 1,75 | 3,5 |
| Albendazol | $y = 4,29x + 262,42$ | 0,9550 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Prazikvantel | $y = 3,77x + 992,68$ | 0,9062 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |
| Febantel | $y = 5,97x + 54,02$ | 0,9522 | 0,5 – 50 | 0,25 | 0,5 |

Preciznost mjerenja ovih metoda provedena je određivanjem ponovljivosti koja je prikazana kao relativno standardno odstupanje (RSD). Za HPLC-DAD su provedena tri mjerenja, odnosno tri puta je injektiran uzorak (30 μ L) u kromatografski sustav. Za MSPD-HPLC-DAD su provedena 3 mjerenja za koncentracije 50, 20 i 3,5 ppm. Rezultati ponovljivosti prikazani su u Tablici 18. Vrijednosti relativnog standardnog odstupanja ukazuju na lošiju ponovljivost rezultata za hidroksiklorokin i cefdinir.

Tablica 18. Ponovljivost ispitivanih kemoterapeutika

| Kemoterapeutik | Koncentracije, ppm | RSD (%) | |
|------------------|--------------------|----------|---------------|
| | | HPLC-DAD | MSPD-HPLC-DAD |
| Hidroksiklorokin | 50 | 2,51 | 12,45 |
| | 20 | 5,82 | 1,99 |
| | 3,5 | 26,57 | 1,84 |
| Cefdinir | 50 | 0,77 | 6,08 |
| | 20 | 1,89 | 1,86 |
| | 3,5 | 18,43 | 2,38 |
| Metoklopramid | 50 | 0,72 | - |
| | 20 | 2,50 | - |
| | 3,5 | 4,54 | - |
| Nitrofurantoin | 50 | 0,07 | 0,46 |
| | 20 | 0,60 | 1,38 |
| | 3,5 | 2,58 | 0,41 |
| Albendazol | 50 | 0,09 | 2,67 |
| | 20 | 0,89 | 1,45 |
| | 3,5 | 0,14 | 1,49 |
| Prazikvantel | 50 | 0,21 | 2,78 |
| | 20 | 0,84 | 3,23 |
| | 3,5 | 0,91 | 0,76 |
| Febantel | 50 | 0,19 | 3,07 |
| | 20 | 0,76 | 1,64 |
| | 3,5 | 0,81 | 4,49 |

5. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenih eksperimenata može se zaključiti:

- 1) Ekstrakcija raspršenjem matice uzoraka kroz čvrstu fazu pogodna je za ekstrakciju većine ispitivanih kemoterapeutika iz sedimenta korištenjem ljuskica jajeta kao sorbensa u omjeru 1:2.
- 2) Najbolji rezultati dobiveni su s čistim otapalom etil-acetatom, 5 mL u 3 obroka (1 x 1 mL, 2 x 2 mL).
- 3) Zbog loših rezultata obzirom na metoklopramid trebalo bi se dalje ispitati neke druge vrste otapala i njihove smjese te utjecaj pH-vrijednosti na ekstrakciju.
- 4) U daljnjim istraživanjima trebalo bi ispitati i utjecaj volumena otapala i omjer mase sediment/sorbens.

6. LITERATURA

1. N. T. Crosby, Determination of veterinary residues in food, Woodhead Publishing Limited, Cambridge England, 2007, str. 240-245
2. A. J. M. Horvat, M. Petrović, S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, S. Pelko, A. D. Mance, M. Kaštelan Macan, Analysis, occurrence and fate of anthelmintics and their transformation products in the environment, Trends in Analytical Chemistry, **31** (2011) 61-84
3. A. Kar, Medical Chemistry, New Age International (P) Ltd., Publishers, New Delhi, 2007, str. 538, 655
4. J. Maddison, Small Animal Clinical Pharmacology, Elsevier Limited, London 2008, str. 208, 216-217, 469, 472-473
5. Goodman & Gilman's, The Pharmacological basis of therapeutics, The McGraw-Hill Companies, Inc., 2001, str. 1026, 1126-1127, 1134-1136, 1143, 1184
6. G. Dusi, V. Gamba, E. Faggionato, Rapid determination of the antiparasitic drugs flubendazole and febantel in feeds by HPLC with ultraviolet detection, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, **38** (2005), 375–379
7. I. Miletić, S. Šegović, I. Anić, Antibiotici u endodonciji, Zavod za endodonciju i restaurativnu stomatologiju, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb: https://www.sfzg.unizg.hr/download/repository/Antibiotici_u_endodonciji.pdf (pristup 30. svibnja 2016.)
8. H. S. Dolliver, Fate and Transport of Veterinary Antibiotics in the Environment, UMI, 2007, str. 8-11
9. M. J. Munoz-Davila, Role of Old Antibiotics in the Era of Antibiotic Resistance. Highlighted Nitrofurantoin for the Treatment of Lower Urinary Tract Infections, Antibiotics **3** (2014) 39-48
10. Z.Chen, J. Zhang, J. Yu, G. Cao, X. Wu, Y. Shi, Selective method for the determination of cefdinir in human plasma using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography B, **834** (2006) 163–169
11. A. Khan, Z. Iqbal, M. I. Khan, K. Javed, A. Khan, L. Ahmad, Y. Shah, F. Nasir, Simultaneous determination of cefdinir and cefixime in human plasma by RP-HPLC/UV detection method: Method development, optimization, validation, and its application to a pharmacokinetic study, Journal of Chromatography B, **879** (2011) 2423–2429
12. Cefdinir: <https://en.wikipedia.org/wiki/Cefdinir>, (pristup 30. svibnja 2016.)

13. M. Starčević, Sinteza novih derivata 7-hidroksikumarina i njihovi biološki učinci na rast ljudskih stanica *in vitro*, Magistarski rad, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, 2011., str 20.
14. H. Neziri, Primjena marihuane u terapijske svrhe – *pro* i *contra*, Diplomski rad, Farmaceutsko-biokemijski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, 2015., str. 38
15. T. Franković, Razvoj i značaj nuspojava u usnoj šupljini kao posljedica primjene sistemskog liječenja kolorektalnog karcinoma, Diplomski rad, Stomatološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, rujan 2015., str. 12
16. Hidroksiklorokin: <https://en.wikipedia.org/wiki/Hydroxychloroquine> (pristup 31. svibnja 2016.)
17. J. Čerkez Habek, Liječenje gastrointestinalnih simptoma u palijativnoj skrbi, Pregledni rad, Klinika za unutrašnje bolesti, Klinička bolnica 'Sveti Duh', Zagreb, Acta Med Croatica, **67** (2013) 241-249
18. Sediment (Contaminated Sediments in European River Basins): <http://sednet.org/about/sednet-2002-2004/#Sediment> (pristup 8. lipnja 2016.)
19. J. S. Bridge, R. V. Demicco, Earth Surface Processes Landforms and Sediment Deposits, Cambridge, University press, 2008, str. 3, 5
20. Interna skripta iz vježbi kolegija Fizička geologija, Prirodoslovno matematički fakultet, Geološki odsjek, Sveučilište u Zagrebu, str. 16: https://www.pmf.unizg.hr/download/repository/Skripta_za_vjezbe_Fizicka_geologija_Minerali_i_stijene.pdf (pristup 8. lipnja 2016.)
21. J. Brils, Sustainable Sediment Management according to SedNet, SedNet (pristup 8. lipnja 2016.)
22. D. Mutavdžić Pavlović, S. Babić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan Macan, Sample preparation in analysis of pharmaceuticals, Trends in Analytical Chemistry, **26** (2007) 1062-1075
23. S. Kim, K. Carlson, LC-MS2 for quantifying trace amounts of pharmaceutical compounds in soil and sediment matrices, TrAC Trends in Analytical Chemistry, **24** (2005) 635–644
24. D. Mutavdžić Pavlović, Analitika okoliša, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, 2012, str. 140.-165
25. F.A.Settle, Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry, Prentice Hall PTR, New Jersey, 1997., str. 26, 149
26. S. Anderson, Soxtec: Its Principles and Applications, 2.poglavlje

27. G. H. Tan, M. K. Chai, Sample Preparation in the Analysis of Pesticides Residue in Food by Chromatographic Techniques, u: M. Stoytcheva, Pesticides - Strategies for Pesticides Analysis, Rijeka, InTech, (2011) 27-52
28. A. Gupta, M. Naraniwal, V. Kothari, Modern Extraction methods for Preparation of Bioactive Plant Extracts, International Journal of Applied and Natural Sciences, **1** (2012) 8-26
29. G. N. Sapkale, S. M. Patil, U. S. Surwasw, P. K. Bhatbhage, Supercritical Fluid Extraction, Int. J. Chem. Sci.: **8** (2010) 729-743
30. Ugljikov (IV) dioksid: https://en.wikipedia.org/wiki/Carbon_dioxide (pristup 13. lipnja 2016.)
31. B. Kaufmann, P. Christen, Recent Extraction Techniques for Natural Products: Microwave-assisted Extraction and Pressurised Solvent Extraction, Phytochem. Anal., **13** (2002) 105–113
32. G. Karasová, E. Brandšteterová, M. Lachová, Matrix Solid Phase Dispersion as an Effective Preparation Method for Food Samples and Plants before HPLC Analysis, Czech J. Food Sci., **21** (2003), str. 219-234
33. S. A. Barker, Matrix solid phase dispersion (MSPD), J. Biochem. Biophys. Methods **70** (2007) 151–162
34. A. L. Capriotti, C. Cavaliere, P. Giansanti, R. Gubbiotti, R. Samperi, A. Laganà, Recent developments in matrix solid-phase dispersion extraction, Journal of Chromatography A, **1217** (2010) 2521–2532
35. D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb 1999
36. M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217-237
37. S. Luterotti, Uvod u kemijsku analizu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, 5. Izdanje, 2012.
38. R. P. W. Scott, Tandem Techniques, John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, 1997. str. 53-54.
39. D. Ašperger, Razvoj kromatografskih metoda za određivanje veterinarskih antibiotika u okolišu, Disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb, ožujak 2017., str. 70-72
40. D. Drljača, Ultrazvučna ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz sedimenta, diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009.

41. Zdravlje i priroda: <http://www.zdravljeipriroda.com/zdravlje/za-zdravlje-zglobova/> (pristup 17. lipnja 2016.)
42. F. S. Murakami, P. O. Rodrigues, C. M. Teixeira de Campos, M. A. S. Silva, Physicochemical study of CaCO₃ from egg shells, *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, **27** (2007) 658-662
43. G. Kalyani, G. B. Rao, B. V. Saradhi, Y. P. Kumar, Equilibrium and kinetic studies on biosorption of zinc onto Gallus Domesticus shell powder, *ARPN Journal of Engineering and Applied Sciences*, **4** (2009) 39-43
44. S. Prašnički, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta raspršenjem matice uzorka kroz čvrstu fazu, Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, rujan 2013.
45. A. R. Long, L. C. Hsieh, M. S. Malbrough, C. R. Short, S. A. Barker, Matrix solid phase dispersion (MSPD) extraction and liquid chromatographic determination of five benzimidazole anthelmintics in pork muscle tissue, *Journal of Food Composition and Analysis*, **3** (1990) 20-26
46. Zs. Romvári, J. Fekete, S. Kemény, G. Pokol, I. Gebefügi, A. Kettrup, Determination of two metabolites of albendazole, albendazole-sulfoxide and albendazole-sulfone in cow's milk using an HPLC method —A systematic approach to optimise extraction conditions, *Chromatographia*, **48** (1998) 777-784
47. D. Kitzman, K. Cheng, L. Fleckenstei, HPLC assay for albendazole and metabolites in human plasma for clinical pharmacokinetic studies, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **30** (2002) 801–813
48. I. Kaselj, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta ultrazvukom, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, rujan 2012.
49. M. Ferenčak, Ekstrakcija farmaceutika iz sedimenta mućkanjem, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, rujan 2012.
50. M. Mitrevski, Optimizacija ekstrakcije čvrstom fazom farmaceutika i njihovih metabolita iz uzoraka vode, Završni rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, rujan 2012.
51. A. Wojnicz, T. Cabaleiro-Ocampo, M. Román-Martínez, D. Ochoa-Mazarro, F. Abad-Santos, A. Ruiz-Nuño, A simple assay for the simultaneous determination of human plasma albendazole and albendazole sulfoxide levels by high performance liquid chromatography in tandem mass spectrometry with solid-phase extraction, *Clinica Chimica Acta*, **426** (2013) 58–63

52. M. Zrnčić, M. Gros, S. Babić, M. Kaštelan-Macan, D. Barcelo, M. Petrović, Analysis of anthelmintics in surface water by ultra high performance liquid chromatography coupled to quadrupole linear ion trap tandem mass spectrometry, *Chemosphere*, **99** (2014) 224-232
53. 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*, (2016) 1-26
54. S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, D. Ašperger, M. Periša, M. Zrnčić, A. J. M. Horvat, M. Kaštelan-Macan, Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography–tandem mass spectrometry (LC–MS–MS), *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, **398** (2010) 1185-1194
55. I. Đurić, Izbor nepokretne faze za određivanje veterinarskih farmaceutika HPLC-DAD metodom, Rektorova nagrada, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2010.
56. D. Mutavdžić Pavlović, T. Pinušić, M. Periša, S. Babić, Optimization of matrix solid-phase dispersion for liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of 12 pharmaceuticals in sediments, *Journal of Chromatography A*, **1258** (2012) 1–15
57. J. Liu, J. T. Stewart, High-performance liquid chromatography determination of praziquantel enantiomers in human serum using a reversed-phase cellulose-based chiral stationary phase and disc solid-phase extraction, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **692** (1997) 141–147
58. G. Morovján, P. Csokán, L. Makranszki, E. A. Abdellah-Nagy, K. Tóth, Determination of fenbendazole, praziquantel and pyrantel pamoate in dog plasma by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **797** (1998) 237–244
59. P. Muth, R. Metz, B. Siems, W. W. Bolten, H. Vergin, Sensitive determination of nitrofurantoin in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography A*, **729** (1996) 251-258
60. T. Galeano Díaz, A. Guiberteau Cabanillas, M. I. Acedo Valenzuela, C. A. Correa, F. Salinas, Determination of nitrofurantoin, furazolidone and furaltadone in milk by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection, *Journal of Chromatography A*, **764** (1997) 243–248

61. A. Leitner, P. Zöllner, W. Lindner, Determination of the metabolites of nitrofurantoin antibiotics in animal tissue by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **939** (2001) 49–58
62. A. Conneely, A. Nugent, M. O’Keeffe, P. P. J. Mulder, J. A. van Rhijn, L. Kovacsics, A. Fodor, R. J. McCracken, D.G. Kennedy, Isolation of bound residues of nitrofurantoin drugs from tissue by solid-phase extraction with determination by liquid chromatography with UV and tandem mass spectrometric detection, *Analytica Chimica Acta*, **483** (2003) 91–98
63. V. Arancibia, M. Valderrama, A. Madariaga, M. C. Zúñiga, R. Segura, Extraction of nitrofurantoin and its toxic metabolite from urine by supercritical fluids. Quantitation by high performance liquid chromatography with UV detection, *Talanta*, **61** (2003) 377–383
64. P. Mottier, S. Khong, E. Gremaud, J. Richoz, T. Delatour, D. Goldmann, P. A. Guy, Quantitative determination of four nitrofurantoin metabolites in meat by isotope dilution liquid chromatography–electrospray ionisation–tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*, **1067** (2005) 85–91
65. Q. Zhang, C. Wang, X. Wang, T. Wu, Q. Ma, Simultaneous determination of nitrofurantoin and furazolidone in cosmetics using high performance liquid chromatography, *Se Pu.*, (2009)
66. D. S. Patel, N. Sharma, M. C. Patel, B. N. Patel, P. S. Shrivastav, M. Sanyal, Quantitation of nitrofurantoin in human plasma by liquid chromatography tandem mass spectrometry, *Acta Pharmaceutica*, **63** (2013) 141-158
67. A. Hishida, K. Ohishi, S. Nagashima, M. Kanamaru, M. Obara, A. Kitada, Pharmacokinetic Study of an Oral Cephalosporin, Cefdinir, in Hemodialysis Patients, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42** (1998) 1718-1721
68. P. B. Shah, K. Pundarikakshudu, Difference spectroscopic and reverse phase HPLC methods for the estimation of cefdinir in pharmaceutical dosage forms, *Short Communication*, **68** (2006) 90-93
69. P. Hamrapurkar, P. Patil, M. Phale, M. Gandhi, S. Pawar, A developed and validated stability-indicating reverse-phase high performance liquid chromatographic method for determination of cefdinir in the presence of its degradation products as per International Conference on Harmonization guidelines, *Pharmaceutical Methods*, **2** (2011) 15-20

70. I. Hussain, Z. A. AL-Othman, K. Saleem, I. Ali, H.n Y. Aboul-Enein, Fast Analysis of Third-Generation Cephalosporins in Human Plasma by SPE and HPLC Methods, **29** (2011) 18-23
71. H. E. Jin, I. B. Kim, C. K. Kim, H. J. Maeng, Determination of cefdinir levels in rat plasma and urine by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry: application to pharmacokinetics after oral and intravenous administration of cefdinir, *Biomed Chromatogr.*, **27** (2013) 1423-1430
72. S. E. Tett, D. J. Cutler, K. F. Brown, High-performance liquid chromatographic assay for hydroxychloroquine and metabolites in blood and plasma, using a stationary phase of poly(styrene divinylbenzene) and a mobile phase at ph 11, with fluorimetric detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **344** (1985) 241-248
73. S. B. Williams, L. C. Patchen, F. C. Churchill, Analysis of blood and urine samples for hydroxychloroquine and three major metabolites by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **433** (1988) 197-206
74. D. R. Brocks, F. M. Pasutto, F. Jamali, Analytical and semi-preparative high-performance liquid chromatographic separation and assay of hydroxychloroquine enantiomers, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **581** (1992) 83-92
75. K. Croes, P. T. McCarthy, and R. J. Flanagan, Simple and Rapid HPLC of Quinine, Hydroxychloroquine, Chloroquine, and Desethylchloroquine in Serum, Whole Blood, and Filter Paper-Adsorbed Dry Blood, *Journal of Analytical Toxicology*, **18** (1994) 255-260
76. L. Wang, R. Y. Ong, T. Chin, W. Thuya, S. Wan, A. L. Wong, S. Chan, P. C. Ho, B. Goh, Method development and validation for rapid quantification of hydroxychloroquine in human blood using liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **61** (2012) 86–92
77. A. K. Füzéry, J. R. Breaud, N. Emezienna, S. Škole, W. A. Clarke, A rapid and reliable method for the quantitation of hydroxychloroquine in serum using turbulent flow liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Clinica Chimica Acta*, **421** (2013) 79–84

78. I. González-Hernández, L. Aguirre-Cruz, J. Sotelo, R. López-Arellano, A. Morales-Hipólito, H. Jung-Cook, Distribution of Hydroxychloroquine in Lymphoid Tissue in a Rabbit Model for HIV Infection, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58** (2014) 584-586
79. Y. Qu, G. Noe, A. R. Breaud, M. Vidal, W. A. Clarke, N. Zahr, T. Dervieux, N. Costedoat-Chalumeau, B. Blanchet, Development and validation of a clinical HPLC method for the quantification of hydroxychloroquine and its metabolites in whole blood, *Future Sci.*, **1** (2015)
80. A. Singh, Roopkishora, C. L. Singh, R. Gupta, S. Kumar, M. Kumar, Development and Validation of Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Hydroxychloroquine Sulphate, *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, **77** (2015) 586
81. M. A. Radwan, Determination of Metoclopramide in Serum by HPLC Assay and Its Application to Pharmacokinetic Study in Rat, *Analytical Letters*, **31** (1998) 2397-2410
82. S. S. Shidhaye, Development and Validation of Stability Indicating HPLC Method for Estimation of Metoclopramide Hydrochloride From A Novel Formulation, *Journal of Pharmacy Research*, **2** (2009) 290-295
83. H. W. Lee, H. Y. Ji, H. Y. Kim, E. Park, K. C. Lee, H. S. Lee, Determination of metoclopramide in human plasma using hydrophilic interaction chromatography with tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, **877** (2009) 1716–1720
84. A. Maquille, J. Habib Jiwan, LC–MS characterization of metoclopramide photolysis product, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry* **205** (2009) 197–202
85. M. Javanbakht, N. Shaabani, B. Akbari-Adergani, Novel molecularly imprinted polymers for the selective extraction and determination of metoclopramide in human serum and urine samples using high-performance liquid chromatography, *Journal of Chromatography B*, **877** (2009) 2537–2544
86. M. Yan, H. Li, B. Chen, X. Liu, Y. Zhu, Determination of metoclopramide in human plasma by LC–ESI-MS and its application to bioequivalence studies, *Journal of Chromatography B*, **878** (2010) 883–887
87. A. Khan, S. B. Naqvi, M. H. Shoaib, R. Yousaf, J. Khan, M. Hanif, A. Madni, Validation and application of RP-HPLC method for the quantification of metoclopramide hydrochloride in oral formulations prepared for IVIVC studies, *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, **25** (2012) 135-140

88. P. Sowjanya, P. Shanmugasundaram, P. Naidu, S. Kumar Singamsetty, Novel validated stability-indicating UPLC method for the determination of Metoclopramide and its degradation impurities in API and pharmaceutical dosage form, *Journal of pharmacy research* **6** (2013) 765-773

ŽIVOTOPIS

Jelena Perčić rođena je 28. 12. 1990. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završila je u Murskom Središću, te je 2005. godine upisala Medicinsku školu Varaždin. Maturirala je 2009. godine te iste godine upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Primijenjena kemija. Za vrijeme fakultetskog obrazovanja odradila je stručnu praksu te stekla iskustvo u primjeni rada u Bioinstitutu d.o.o. Čakovec. Završni rad s temom *Primjena inhibitora kozorije u zaštiti bronce* izradila je na Zavodu za elektrokemiju pod mentorstvom doc. dr. sc. Helene Otmačić Ćurković te ga je 05.09.2014. godine obranila i time stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice Primjenjene kemije. Na istom fakultetu navedene godine upisala je diplomski studij, modul Kemija okoliša.