

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivona Kaselj

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2012.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Ivona Kaselj

EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ
SEDIMENTA ULTRAZVUKOM

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: Dr. sc. Danijela Ašperger, doc.

Članovi ispitnog povjerenstva: Dr. sc. Danijela Ašperger, doc.

Dr. sc. Sandra Babić, izv. prof.

Dr. sc. Irena Škorić, izv. prof.

Zagreb, rujan 2012.

Ovaj rad je izrađen na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilišta u Zagrebu,
Zavod za analitičku kemiju, akademske godine 2011./2012.

Zahvaljujem se dr. sc. Danijeli Ašperger, doc. na pruženoj prilici da učim pod njezinim mentorstvom, koja mi je ujedno svojim stručnim savjetima, sugestijama i podrškom pomogla pri izradi ovoga rada.

Zahvaljujem se obitelji, prijateljima i svima koji su mi kroz ove tri godine studija na bilo koji način pomogli i bili podrška.

Nisi mi govorio kako da živim...

Živio si i pustio me da gledam kako TI to činiš...

I danas znam da nisam sama...

Ti si kao zvijezda koja vječno sija...

Mom tati

SAŽETAK

EKSTRAKCIJA FARMACEUTIKA IZ SEDIMENTA ULTRAZVUKOM

Aktivne farmaceutske tvari "nova zagađivala" zaokupila su veliku pozornost ekologa i znanstvenika zbog spoznaje o njihovoj opasnosti i negativnim utjecajima na cjelokupni živi svijet. Svijest o prisutnosti lijekova u okolišu, zajedno s nekim dokazanim efektima, sugerira da treba postojati određeni oprez prilikom upravljanja lijekovima kako bi se smanjilo ispuštanje istih u okoliš. Da bi se izbjegle neželjene posljedice potreban je konstantni nadzor i zakonsko propisivanje maksimalnih dopuštenih koncentracija (MDK) ovih tvari u okolišu. U tu svrhu potrebno je razviti metode separacije aktivnih tvari iz realnih uzoraka kao i metode kvalitativnog i kvantitativnog određivanja aktivnih farmaceutskih tvari.

Mogućnost pronalazjenja aktivnih farmaceutskih tvari u prirodnim matricama ovisi o njihovoj stabilnosti, sposobnosti sorpcije, topljivosti i mikrobiološkoj aktivnosti. Farmaceutici koji imaju veliku sposobnost sorpcije ili nisku topljivost u vodi pokazuju tendenciju zadržavanja u krutim prirodnim matricama.

U ovom radu optimirani su uvjeti ultrazvučne ekstrakcije osam farmaceutskih aktivnih tvari (albendazol, febantel, levamisol, lidokain, prokain, tilozin, deksametazon, hidrokortizon) iz sedimenta. Ekstrakcija je provedena čistim organskim otapalima i smjesama otapala kod različitih uvjeta rada ultrazvuka. Separacija i kvalitativna analiza farmaceutika te iskorištenja farmaceutika u ekstraktima određena su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s detektorom s nizom dioda (HPLC – DAD).

Najbolji rezultati ultrazvučne ekstrakcije osam ispitivanih farmaceutika iz sedimenta postignuti su smjesom metanol/acetoni-tril pri temperaturi od 30 °C i vremenu trajanja ekstrakcije 60 minuta.

Ključne riječi: *farmaceutski aktivne tvari, sediment, ultrazvučna ekstrakcija*

ABSTRACT

EXTRACTION OF PHARMACEUTICALS FROM SEDIMENT WITH ULTRASOUND

Recent knowledge of hazard and negative influences of active pharmaceutical ingredients (API) so called emerging contaminants induced interest of many ecologist and scientist. Awareness of the presence of drugs in the environment, along with some proven effects, suggests that there should be some caution when managing medications to reduce emissions into the environment. In order to avoid unintended consequences requires constant supervision and regulation of the legal maximum residue levels (MRL) of these substances in the environment. For this purpose it is necessary to develop methods of separation and methods of qualitative and quantitative determination of active pharmaceutical substances.

Possibility of developing active pharmaceutical substances in natural matrices depends on their stability, ability sorption, solubility and microbial activity. Pharmaceuticals which have a high sorption capacity and low solubility in water tend to retain the solid natural matrices.

In this paper, was optimized ultrasonic solvent extraction of eight pharmaceutically active compounds (albendazole, febantel, levamisole, lidocaine, procaine, thylosine, dexamethasone, and hydrocortisone) from sediment. Separation and qualitative analysis of pharmaceuticals and utilization of pharmaceuticals in the extracts were determined by high performance liquid chromatography with diode array detector (HPLC – DAD).

The best results of ultrasonic solvent extraction for eight examined pharmaceuticals from sediment have been achieved with a mixture of methanol/acetonitrile at 30 °C and 60 minutes.

Key words: *pharmaceutical active substances, sediment, ultrasonic solvent extraction*

SADRŽAJ

	Str.
1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Farmaceutici u okolišu	4
2.2. Podjela ispitivanih farmaceutika	7
2.2.1. Anthelmintici	7
2.2.2. Antibiotici	10
2.2.3. Anestetici	13
2.2.4. Glukokortikosteroidi	15
2.3. Određivanje farmaceutika u okolišu	18
2.3.1. Metode ekstrakcije	18
2.3.1.1. Ekstrakcija otapalom	19
2.3.1.2. Ekstrakcija čvrstom fazom	20
2.3.1.3. Ekstrakcija tekuće – tekuće	21
2.3.1.4. Ekstrakcija fluidom pri superkritičnim uvjetima	22
2.3.1.5. Ekstrakcija mikrovalovima	23
2.3.1.6. Soxhlet ekstrakcija	24
2.3.1.7. Ubrzana ekstrakcija otapalom	25
2.3.1.8. Ekstrakcija ultrazvukom	26
2.3.2. Kromatografske metode analize	29
2.3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti	30
2.3.2.2. Detektor s nizom dioda	31
3. EKSPERIMENTALNI DIO	32
3.1. Materijali	33
3.1.1. Kemikalije	33
3.1.2. Sediment	33
3.1.3. Kolona	35
3.1.4. Pokretna faza	36
3.1.5. Aparature i instrumenti	36
3.1.5.1. Analitička vaga	36
3.1.5.2. Ultrazvučna kupelj	37
3.1.5.3. Tekućinski kromatograf (HPLC)	37
3.2. Metoda rada	38
3.2.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika i uzoraka sedimenta za ultrazvučnu ekstrakciju	38
3.2.2. Ekstrakcija i kromatografska analiza farmaceutika	38
4. REZULTATI I RASPRAVA	40
4.1. Izbor otapala	41
4.2. Izbor vremena trajanja ekstrakcije	44
4.3. Izbor snage i temperature ultrazvučne kupelji	48
5. ZAKLJUČAK	50
6. LITERATURA	52
7. POPIS KRATICA	55
8. ŽIVOTOPIS	57

1. UVOD

1. UVOD

Humani i veterinarski farmaceutici kontinuirano se unose u okoliš većinom kao rezultat proizvodnih procesa, ispuštanjem komunalnih i industrijskih otpadnih voda, odlaganjem neupotrijebljenih farmaceutskih proizvoda ili kao izlučevine. Zbog njihovih fizikalnih i kemijskih svojstava, mnoge od tih tvari ili njihovi biološki aktivni metaboliti završavaju u tlima i sedimentima, gdje se mogu akumulirati i uzrokovati različite posljedice na kopnenim i vodenim organizmima. Osim toga, sve veći problem predstavlja otpornost bakterija na postojeće antibiotike, koja je posljedica sve veće upotrebe antibiotika kod životinja i kod uzgoja riba, te zbog dodavanja gnoja iz stočarskih farmi i mulja iz postrojenja za obradu otpadnih voda na poljoprivredna polja.

Potencijalno štetan učinak farmaceutika i njihovih aktivnih metabolita na okoliš, kao niti njihova ekotoksikološka svojstva nisu dovoljno poznati, pa su oni svrstani u skupinu „novih zagađivala“ za koje zasad nije ozakonjena maksimalna dopuštena koncentracija u okolišu. Spoznaja o njihovoj opasnosti rezultirala je njihovim intenzivnim istraživanjem. Da bi se moglo pratiti njihovo ponašanje u okolišu neophodan je razvoj analitičkih metoda određivanja farmaceutika. Važno je razviti takve metode kojima će se omogućiti određivanje različitih grupa ovih spojeva u jednom koraku.

Svaki analitički proces sastoji se od pet slijednih koraka: uzorkovanje, priprava uzorka, separacija, detekcija i analiza rezultata, te svaki od ovih koraka utječe na kvalitetu dobivenog rezultata. S obzirom da se više od polovice vremena potrebnog za analizu troši na pripravu uzorka, a zbog složenosti uzorka iz okoliša i nemogućnosti izravnog mjerenja analita u takvim uzorcima, potrebno je razraditi postupak njihovog izoliranja iz matice uzorka.

Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kombinirana s UV detektorom (detektor s nizom dioda) pokazala se kao važna analitička metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi farmaceutika. Jedna je od najčešće primjenjivanih i najučinkovitijih metoda kojima se može odijeliti veliki broj farmaceutika. Prije kromatografskog određivanja uzorak je potrebno pripremiti, te je bitno odabrati metodu za aktivno ekstrahiranje aktivnih tvari iz složenih matrica. U ovom radu odabrana je metoda ultrazvučne ekstrakcije zbog jednostavnosti, smanjenja čestica, ubrzanog prijenosa mase tvari i to što ne zahtijeva skupe instrumente.

2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici u okolišu

Farmaceutski aktivni spojevi su složene molekule sa različitim fizikalno-kemijskim i biološkim svojstvima. Farmaceutici se razvijaju i koriste zbog svoje više ili manje specifične biološke aktivnosti, a osobito zbog svoje karakteristične ionske prirode. Farmaceutici se mogu klasificirati prema njihovim učincima, ali i prema kemijskoj strukturi. Normalno, farmaceutski proizvodi i dezinficijensi se klasificiraju prema svojoj terapijskoj svrsi (antibiotici, antihelmintici ili antiparazitici, anestetici, analgetici, antihistaminici). Klasifikacija prema kemijskoj strukturi se uglavnom odnosi na podskupine i aktivne supstance farmaceutika.

U vrijeme kada je održivi razvitak sve važniji, pitanja sigurnosti i zaštite okoliša ugrađena su u gotovo svaku industrijsku aktivnost. [1] Tone farmakološki aktivnih supstanci se godišnje upotrijebi u humanoj medicini za dijagnozu, liječenje i prevenciju bolesti. Farmaceutici su tzv. nova zagađivala i predmet su istraživanja velikog broja znanstvenika. Za veliki broj tih zagađivala nisu poznati ekotoksikološki podaci te opasnosti koje mogu uzrokovati. Uzrok nedostatka podataka o pojavljivanju ovih tvari u okolišu leži, između ostalog, u nedostatku normiranih metoda. Intenziviranje analitičkih i ekotoksikoloških ispitivanja ubrzat će normizaciju određivanja aktivnih farmaceutskih tvari i donošenje zakonskih propisa o njihovoj maksimalnoj dopuštenoj koncentraciji u okolišu. Farmaceutici u okoliš dospjevaju zbog sve veće upotrebe u humanoj i veterinarskoj medicini.

Slika 1 prikazuje glavne putove transporta farmaceutika u okolišu. Najveće količine se u okoliš unose otpadnim vodama iz proizvodnih procesa, životinjskim izlučevinama, nepropisnim odlaganjem lijekova kojima je prošao rok upotrebe, aktivnim muljem kao produktom obrade otpadnih voda zagađenih spomenutim tvarima. Životinjske izlučevine su najveći izvor zagađivanja ovim supstancama. Izlučevine se koriste kao gnojivo na poljoprivrednim površinama. Na taj način farmaceutici i njihovi metaboliti mogu zagađivati podzemne vode ili ući u hranidbeni lanac, ovisno o njihovoj topljivosti i tendenciji sorpcije na krute matrice. Farmaceutici mogu dospjeti u tlo i gnojenjem poljoprivrednih površina aktivnim muljem koji je produkt obrade komunalnih otpadnih voda. U toku obrade farmaceutici se ili sorbiraju na aktivni mulj ili ostaju u otpadnoj vodi kojom dospjevaju u površinske vode. Važan izvor farmaceutika su ribogojilišta, pogotovo zadnjih deset godina zbog upotrebe antibiotika čija se količina izjednačila s količinom potrošnje farmaceutika u humanoj medicini. Farmaceutici se koriste kao dodatak hrani i dodaju se direktno u vodu,

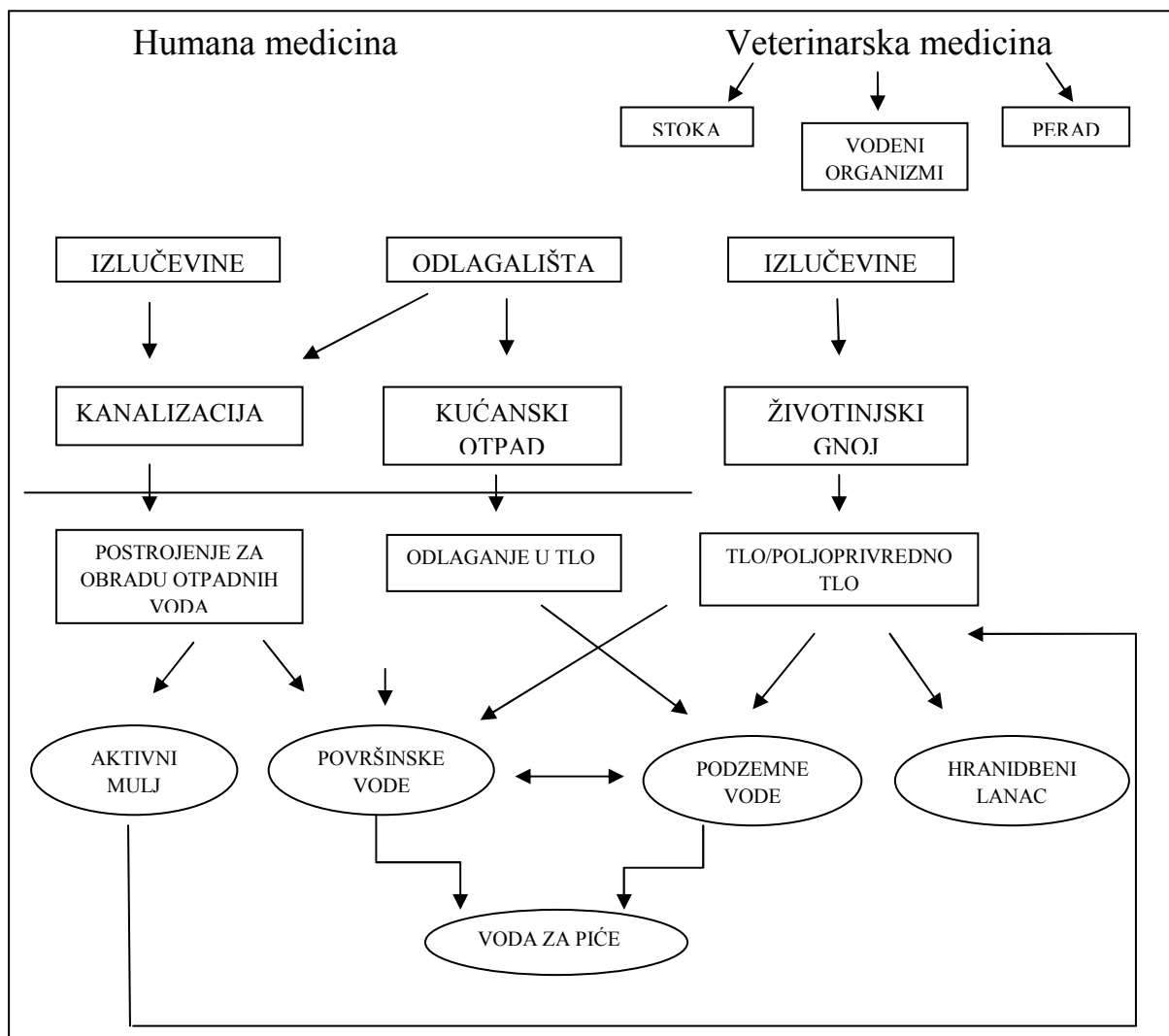
također veliku primjenu nalaze u agrikulturi te tako direktno dospijevaju u vodu i sediment. Zbog kontinuiranog ispuštanja ove tvari i njihovi bioaktivni metaboliti se akumuliraju u tlu i sedimentima, te mogu nepovoljno utjecati na prirodne ekosustave. Ovime se postiže povećanje otpornosti bakterija na farmaceutike što može imati pogubne posljedice za čovjeka i okoliš. [2] Postojanost farmaceutika u sedimentu i tlu ovisi o njihovoj razgradivosti, fotostabilnosti, tendenciji sorbiranja i vezanja te o topljivosti. Farmaceutici koji pokazuju tendenciju sorbiranja na krute matrice akumuliraju se u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode. Farmaceutici se u sedimentima razgrađuju zbog djelovanja sunčeve svjetlosti, mikroorganizama i kemikalija prisutnih u sedimentu. Tendencija razgradnje može se definirati vremenom poluraspada ($t_{1/2}$). Vrijeme poluraspada se obično iskazuje kao vrijeme potrebno da se razgradi pola od ukupno primijenjene količine farmaceutika. Što je dulje vrijeme poluraspada to je veća mogućnost prodiranja zagađivala do podzemnih voda. Lako hlapljivi farmaceutici se prenose u atmosferu. Ako su postojani mogu se naći daleko od mjesta gdje su ispušteni. Osnovna karakteristika te skupine zagađivala je da oni ne moraju biti postojani u okolišu da bi imali negativan utjecaj na njega, jer se svakodnevno unose („pseudo postojani“). Od svih novih zagađivala najviše zabrinjavaju antibiotici, jer se stalnom emisijom određenih količina antibiotika u okolišu razvijaju na antibiotike rezistentni mikroorganizmi. No i ostale tvari iz grupe novih zagađivala zbog svoje slabe razgradivosti mogu dospjeti u okoliš i izazvati neželjene posljedice. [3]

Postojanost farmaceutika u sedimentu i tlu ovisi o njihovoj razgradivosti, fotostabilnosti, tendenciji sorbiranja i vezanja te o topljivosti. Farmaceutici koji pokazuju tendenciju sorbiranja na krute matrice akumuliraju se u tlu i sedimentima, dok se topljive tvari transportiraju u površinske i podzemne vode. Izmjena tvari između tekuće i čvrste faze se može opisati koeficijentom sorpcije K_d , koji se definira kao omjer koncentracije tvari sorbirane na sorbensu i koncentracije tvari u vodi pri uspostavljenoj ravnoteži. Koeficijent sorpcije vrlo je teško odrediti kod nestacionarnih uvjeta koji vladaju u okolišu. Koeficijent sorpcije hidrofobnih organskih tvari ujedno ovisi i o udjelu organskog ugljika u sorbensu. Mjera sorpcije farmaceutika na organsku tvar iskazuje se koeficijentom sorpcije na organski ugljik, K_{oc} , koji se definira :

$$K_{oc} = K_d * 100/w$$

Gdje je w – maseni udio organskog ugljika u sedimentu
 K_d – koeficijent sorpcije

Poznavanje kemijskih svojstava i strukture farmaceutika omogućava predviđanje njihove stabilnosti u okolišu. [2]



Slika 1. Glavni tokovi humanih i veterinarskih lijekova u okolišu [2]

2.2. Podjela ispitivanih farmaceutika

U ovom poglavlju obrađeni su ispitivani farmaceutici po načinu djelovanja, odnosno uporabe u humanoj i veterinarskoj medicini: antihelmintici ili antiparazitici, antibiotici, anestetici i glukokortikosteroidi. Za svaki ispitivani farmaceutik opisana su osnovna fizikalno-kemijska svojstva, koja ovise o njihovoj molekularnoj strukturi.

2.2.1. 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. Bez obzira na visoku učinkovitost ove skupine lijekova u veterinarskoj medicini, u posljednjih deset godina velik broj lijekova iz ove skupine je otkriven i komercijaliziran. Antihelmintici mogu djelovati izazivajući paralizu crva ili oštećujući njegov sekundarni omotač što dovodi do parcijalne digestije ili odbacivanja od imunološkog sustava domaćina. Antihelmintici moraju biti selektivno toksični za parazita. To se postiže ili inhibicijom specifičnih metaboličkih procesa parazita ili farmakokinetičkim osobinama lijeka, koje omogućuju da paraziti budu izloženi višim koncentracijama lijeka nego stanice domaćina. Idealan antihelmintik treba imati sljedeće osobine: širok spektar djelovanja, netoksičnost za životinju, brzo izlučivanje, da je jednostavan za primjenu i jeftin. Najčešća podjela antihelmintika ili antiparazitika je prema kemijskoj strukturi: [4]

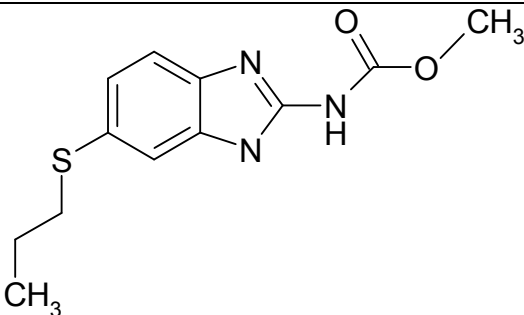
1. Derivati kinolina (prazikvantel),
2. Organofosforni spojevi (dihlorvos, trihlorfon),
3. Derivati benzimidazola (mebendazol, albendazol, flubendazol, febantel),
4. Derivati imidazotiazola (levamisol),
5. Tetrahidropirdini (pirantel-pamoat, oksantel-pamoat),
6. Derivati fenola uključujući salicilamide (niklozamid, klozantel),
7. Derivati piperazina,
8. Makrociklični laktoni (ivermektin).

U ovom radu ispitivani su antihelmintici iz skupine benzimidazola (albendazol i febantel) i imidazotiazola (levamisol). Navedeni farmaceutici se proizvode u Hrvatskoj (Veterina d.o.o.) te nalaze veliku primjenu u veterini.

Albendazol

Albendazol je antihelmintik širokoga spektra iz grupe benzimidazola. Ometa normalni metabolizam parazita i selektivno sprječava ugrađivanje glukoze u njegova sva tri razvojna stupnja. Posljedica toga je potrošnja endogenog glikogena u samih parazita, smanjeno stvaranje adenozin trifosfata (ATP-a). Iz probavnog sustava apsorbira se manje od 5% albendazola. Apsorbirani lijek se u jetri metabolizira u albendazol-sulfoksid i veže za serumske bjelančevine. Vrijeme poluraspada ($t_{1/2}$) lijeka iznosi 8 i pol sati. Albendazol i njegovi metaboliti se izlučuju urinom. [5]

Tablica 1. Karakterizacija i svojstva albendazola

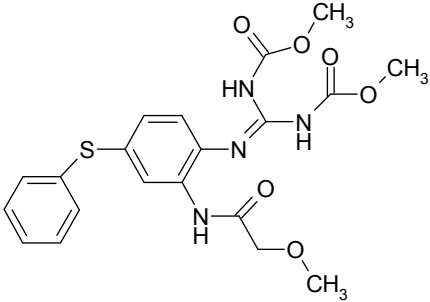
Generičko ime	Albendazol (ALBE)
CAS No	54965-21-8
Naziv po IUPAC-u	metil N-[6-(propilsulfanil)-1H-1,3-benzodiazol-2-il] karbamat
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₁₂ H ₁₅ N ₃ O ₂ S]
Molarna masa, g/mol	265,33
Konstante*	Log Kow=3,07 Sw=46,39 mg/L Log Koc=2,939
Proizvođač	Veterina (99%)

*Opisane u Popisu kratica

Febantel

Febantel (FEBA) je probenzimidazol što znači da postaje aktivan tek kada se prevede u svoje aktivne metabolite (benzimidazole). Benzimidazoli su velika skupina lijekova koja se koristi u prevenciji bolesti domaćih životinja. Najvažniji aktivni metaboliti febantela su fenbendazol, oksfendazol i febantel sulfoksid zbog duljeg vremena poluraspada u odnosu na ostale lijekove iz skupine. Probenzimidazoli pokazuju nešto bolju topljivost u vodi od njihovih aktivnih metabolita. [6]

Tablica 2. Karakterizacija i svojstva febantela

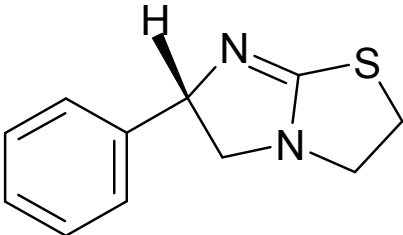
Generičko ime	Febantel (FEBA)
CAS No	58360-30-2
Naziv po IUPAC-u	(<i>N</i> -{5-(feniltio)-2-[2,3-bis-(metoksikarbonil)-gvanidino]-fenil}-2-metoksiacetamid)
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₂₀ H ₂₂ N ₄ O ₆ S]
Molarna masa, g/mol	446,48
Konstante*	Log K_{ow} =1,53 Sw =76,92 mg/L Log K_{oc} =1,4468
Proizvođač	Veterina (99%)

*Opisane u Popisu kratica

Levamisol

Levamisol je antihelmintik i imunomodulator koji pripada klasi sintetičkih imidazotiazolnih derivata. Otkriven je na institutu Janssen Pharmaceutica u Belgiji u obliku racemata (tetramisol). Prvotna namjena u humanoj medicini je u borbi protiv parazitskih crvnih infekcija, raka debelog crijeva te melanoma glave i vrata maternice. Većina postojećih komercijalni derivata nalazi primjenu u veterini, pogotovo kod goveda, svinja i ovaca. [7]

Tablica 3. Karakterizacija i svojstva levamisola

Generičko ime	Levamisol (LEVA)
CAS No	14769-73-4
Naziv po IUPAC-u	(S)-6-fenil-2,3,5,6-tetrahidroimidazo[2,1-b][1,3]tiazol
Strukturna formula	
Empirijska formula	$[C_{11}H_{12}N_2SxHCl]$
Molarna masa, g/mol	204,29
Konstante*	Log Kow=2,87 Sw=1116 mg/L Log Koc=1,8775
Proizvođač	Veterina ($\geq 99\%$)

*Opisane u Popisu kratica

2.2.2. Antibiotici

Antibiotici su jedno od najvećih otkrića moderne medicine, te imaju široku primjenu u humanoj, veterinarskoj i stočarskoj praksi. Definiiraju 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. Suvremena medicina snažno se oslanja na uporabu ovakvih kemijskih agensa u borbi protiv velikog broja zaraznih bolesti. Antibiotici se mogu primjenjivati peroralno i parenteralno. Peroralna primjena koristi se u liječenju lakših, a parenteralna u liječenju teških infekcija imunokompetentnih organizama. Infekcije imunodeficientnih jedinki liječe se bez obzira na težinu infekcije parenteralnim davanjem antibiotika. [8]

Jedna od mnogih podjela antibiotika je ona na bakteriostatske i baktericidne. Bakteriostatska sredstva zaustavljanjem rasta i razmnožavanja mikroba omogućuju vlastitim obrambenim snagama organizma da lakše suzbije infekciju, dok baktericidna sredstva izravno ubijaju mikrobe i mogu izliječiti infekciju i kada se bolesnikov organizam ne može sam braniti. Budući da granica između ta dva tipa djelovanja često ovisi o koncentraciji lijeka (manje koncentracije zaustavljaju rast, dok veće ubijaju mikrobe), samo razvrstavanje ima smisla ako se obavlja uz koncentracije koje se mogu postići u krvi i tkivima bolesnika.

Antibiotici se dalje mogu klasificirati prema kemijskoj strukturi, mikrobiološkom podrijetlu ili prema načinu djelovanja.

Antibiotici mogu imati usko, prošireno ili široko antimikrobno djelovanje. Tako se antibiotici uskog spektra djelovanja primjenjuju za točno određene vrste Gram pozitivnih ili Gram negativnih bakterija. Antimikrobno djelovanje antibiotika proširenog spektra koristi se u suzbijanju Gram pozitivnih bakterija i točno određenih vrsta Gram negativnih bakterija. Antibiotici širokog spektra koriste se u suzbijanju i Gram pozitivnih i Gram negativnih bakterijskih vrsta.

Prema kemijskoj strukturi antibiotike svrstavamo u: sulfonamide, diaminopirimidine, β -laktame, fluorokinolone, tetracikline, makrolide, linkozamide, aminoglikozide, glikopeptide i ostale antibiotike.

Antibiotici imaju različito djelovanje na bakterijsku stanicu, odnosno antibiotici mogu:

- inhibirati sintezu stanične stijenke mikroorganizma, aktiviranjem enzima koji kida veze peptidoglikana u staničnoj stijenci patogena;
- mogu utjecati na sintezu proteina, pri čemu dolazi do prekida normalne aktivnosti ribosoma;
- mogu baktericidno djelovati na sintezu nukleinske kiseline bakterijske stanice, izravnom degradacijom DNK i RNK molekule, ili djelovanjem na enzim koji upravljaju replikacijom DNK.

U veterini se koriste za liječenje primarnih i sekundarnih infekcija dišnog i probavnog sustava domaćih životinja. Antibiotici dospjećem u sediment mogu izazvati antibiotsku otpornost što rezultira negativnim djelovanjem na ljudsko zdravlje. Danas, uporaba antibiotika sve više raste. Razlog je što antibiotici u nekim slučajevima djeluju brzo i učinkovito pa se stoga koriste i u situacijama kada to nije preporučljivo (kod virusnih infekcija gdje su gotovo bez ikakvog učinka). Takva primjena dovodi do nastanka otpornosti što uvelike smanjuje njihovu učinkovitost kod pojave težih infekcija. [9]

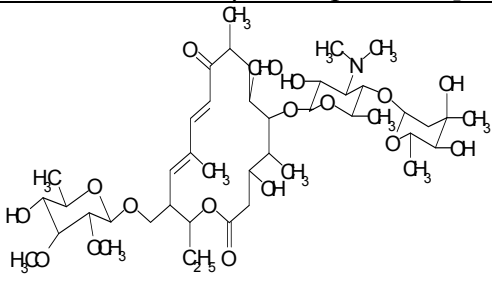
Ispitivani antibiotik u ovom radu je tilozin iz skupine makrolida koji se također proizvodi u Hrvatskoj (Veterina d.o.o.).

Tilozin

Tilozin je makrolidni antibiotik širokog područja djelovanja. Izoliran je iz aktinomicete *Streptomyces fradiae* pronađene u uzorku tla na Tajlandu. Ima širok spektar djelovanja na Gram pozitivne organizme i ograničen spektar na Gram negativne organizme.

Tilozin se koristi u veterinarskoj medicini za liječenje bakterijskih infekcija u širokom spektru vrsta i ima visoku granicu sigurnosti. Primjenu nalazi u suzbijanju i liječenju kroničnih upala dišnih puteva (kompleks CRD-aerosacculitis) u tovnih pilića, purica te u suzbijanju i liječenju dizenterije svinja i drugih infekcija u svinja izazvanih mikroorganizmima osjetljivim na tilozin. [10]

Tablica 4. Karakterizacija i svojstva tilozina

Generičko ime	Tilozin
CAS No	1401-69-0
Naziv po IUPAC-u	[(2 <i>R</i> ,3 <i>R</i> ,4 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,9 <i>R</i> ,11 <i>R</i> ,12 <i>S</i> ,13 <i>S</i> ,14 <i>R</i>)-12-{{[3,6-dideoksi-4- <i>O</i> -(2,6-dideoksi-3- <i>C</i> -metil- <i>α</i> -ribo-heksapiranosil)-3-(dimetilamin)-β- <i>D</i> -glukopiranosil]oksi}-2-etil-14-hidroksi-5,9,13-trimetil-8.16-dioksi-11-(2-oksoetil)oksacikloheksadeka-4,6-dien-3-il]metil 6-deoksi-2,3-di- <i>O</i> -metil-β- <i>D</i> -alopiranozid]
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₄₆ H ₇₇ N ₀ O ₁₇ x C ₄ H ₆ O ₆]
Molarna masa, g/mol	916,10
Konstante*	Log K_{ow} =1,63 S_w =0,5065 mg/L Log K_{oc} =0,2050
Proizvođač	Veterina (≥99%)

*Opisane u Popisu kratica

2.2.3. Anestetici

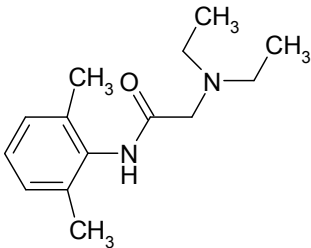
Anestetici su skupina lijekova koja uzrokuje gubitak svijesti. Koriste se u suvremenoj praksi anestezije. Anestetici se značajno razlikuju po svojim kemijskim, fizikalnim i farmakološkim svojstvima, te kemijskim aktivnim skupinama i kemijskim reakcijama kojima podliježu. Dijelev se na opće anestetike, koji uzrokuju reverzibilan gubitak svijesti i lokalne, koji uzrokuju reverzibilan gubitak osjećaja u ograničenom dijelu tijela. Lokalni anestetici se razvrstavaju na estere (kokain, prokain, tetrakain, klorokokain) i amide (lidokain, mepivikain, prilokain, bupivakain). Međutim, ovi lijekovi imaju i djelovanje na kardiopulmonarni sustav, jetru i bubrege, odnosno mogu izazvati oštećenja ovih sustava pa je zato presudan odabir kombinacije, vrste i naravno doze anestetika za svakog pojedinog pacijenta. [11]

U ovom radu ispitivani anestetici su lidokain (amid) i prokain (ester) koji pripadaju skupini lokalnih anestetika.

Lidokain

Lidokain je lokalni anestetik i antiaritmik. Njegovo dvojako djelovanje proizlazi baš iz činjenice da je svestrani blokator natrijevih kanala. Blokadom natrijevih kanala (ionski kanali koji propuštaju električki nabijene ione natrija) na površini živaca on djeluje kao lokalni anestetik, a blokadom natrijevih kanala u srcu on se iskazuje kao antiaritmik. Hoće li lidokain djelovati kao lokalni anestetik ili kao antiaritmik ovisi o načinu primjene. Primjerice, kada se lidokain daje lokalno, u tkivo ili pored živaca, pogotovo u kombinaciji s adrenalinom on djeluje kao lokalni anestetik. Međutim, ukoliko se primjeni intravenozno tada djeluje kao antiaritmik. U veterinarskoj medicini lidokain se koristi u liječenju kratkoročnih aritmija prisutnih kod životinja. [12]

Tablica 5. Karakterizacija i svojstva lidokaina

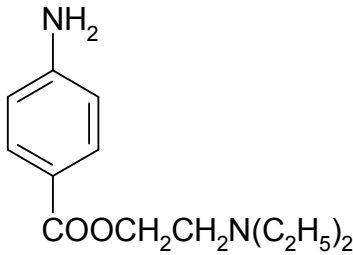
Generičko ime	Lidokain
CAS No	137-58-6
Naziv po IUPAC-u	2-(dietilamino)- <i>N</i> -(2,6-dimetilfenil)acetoamid
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₁₄ H ₂₂ N ₂ O]
Molarna masa, g/mol	234,43
Konstante*	<p>Log K_{ow}=1,66</p> <p>S_w=237,7 mg/L</p> <p>Log K_{oc}=2,1840</p>
Proizvođač	Veterina (≥98%)

*Opisane u Popisu kratica

Prokain

Prokain je lokalni anestetik iz skupine amino estera. Koristi se prije svega kako bi se smanjila bol intramuskularne injekcije penicilina te također u stomatologiji. Djeluje uglavnom kao blokator natrij kanala. Danas se prokain rjeđe koristi zbog veće učinkovitosti ostalih lokalnih anestetika, posebno lidokaina. Velika prednost u odnosu na ostale anestetike je što smanjuje krvarenje. [13]

Tablica 6. Karakterizacija i svojstva prokaina

Generičko ime	Prokain
CAS No	59-46-1
Naziv po IUPAC-u	2-(dietilamino)etil 4-aminobenzoat
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₁₃ H ₂₀ N ₂ O ₂ xHCl]
Molarna masa, g/mol	236,31
Konstante*	Log K_{ow} =2,14 Sw =4261 mg/L Log K_{oc} =1,9562
Proizvođač	Veterina (≥97%)

2.2.4. Glukokortikosteroidi

Glukokortikosteroidi su skupina steroidnih hormona koji se vežu na glukokortikoidni receptor koji je prisutan u gotovo svakoj stanici kralježaka. Naziv glukokortikosteroida

(glukoza+kora+steroid) proizlazi iz njihove uloge u regulaciji metabolizma glukoze, sinteze u kori nadbubrežne žlijezde i njihove strukture steroida. Koriste se u medicini za liječenje bolesti uzrokovanih velikom aktivnošću imunološkog sustava: alergije, astma, autoimune bolesti i sepsa. Glukokortikosteroidi spadaju u skupinu najučinkovitijih i najprimjenjivanih protuupalnih lijekova. Dije se na prirodne i sintetičke glukokortikosteroide koji primjenu nalaze u liječenju poremećaja sustava žlijezda s unutarnjim izlučivanjem te imaju veliki utjecaj na fiziološki sustav. Oni imaju svojstvo smanjivanja imunološkog odgovora organizma. To znači da imaju jako protuupalno i imunosupresivno djelovanje. [14] Glukokortikoidi prirodnog podrijetla su kortizon i kortizolon (hidrokortizon). Njihovo glukokortikoidno djelovanje je slabije od djelovanja polusintetskih i sintetskih glukokortikoida. Prirodni kortikosteroidi osiguravaju uvjete za važne životne funkcije i opće dobro tako da održavaju razinu šećera u krvi, krvni tlak i mišićnu snagu te sudjeluju u nadzoru ravnoteže natrija, kalija i vode u tijelu. [15] U ovom radu ispitivani su deksametazon (sintetički) i hidrokortizon (prirodni) glukokortikosteroidi. Za navedene spojeve često puta nisu dostupni podaci o fizikalno-kemijskim svojstvima.

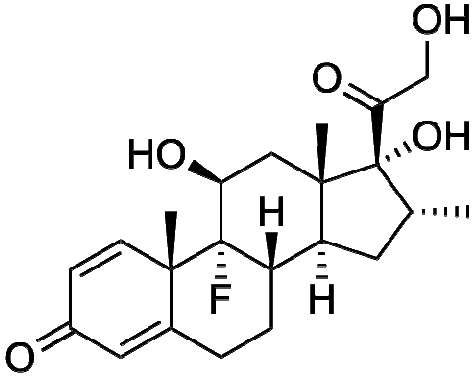
Deksametazon

Deksametazon je potencijalni sintetički predstavnik glukokortikoidne klase steroidnih hormona. Koristi se u liječenju mnogih autoimunih bolesti, prilikom upalnih procesa, smanjuje djelovanje imunološkog sustava te sprječava alergijske reakcije. Također se koristi kao terapijsko sredstvo u veterinarskoj praksi za liječenje širokog spektra bolesti metabolizma, šoka, stresa i upalnih poremećaja u domaćih životinja. I premda je njegova upotreba prije svega terapijska, u nekim europskim zemljama glukokortikoidi se ilegalno koriste kao promotori rasta. [14]

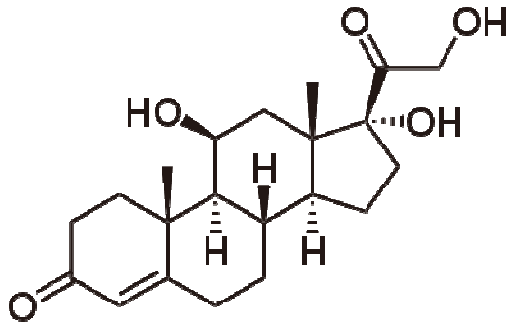
Hidrokortizon

Kortizol, poznatiji više kao hidrokortizon je steroidni hormon, točnije glukokortikoidni hormon. Njegove osnovne funkcije su povećanje razine šećera u krvi kroz glukoneogenezu, potiskuje imunološki sustav te sudjeluje u metabolizmu masti, proteina i ugljikohidrata. Različiti oblici sintetičkih kortizola se koriste za liječenje raznih bolesti, prvenstveno upala. [16]

Tablica 7. Karakterizacija i svojstva deksametazona

Generičko ime	Deksametazon
CAS No	50-02-2
Naziv po IUPAC-u	(11 β ,16 α)-9-fluoro-11,17,21-trihidroksi-16-metilpregna-1,4-dien-3,20-dion
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₂₂ H ₂₉ FO ₅]
Molarna masa, g/mol	392,461

Tablica 8. Karakterizacija i svojstva hidrokortizona

Generičko ime	Hidrokortizon
CAS No	50-23-7
Naziv po IUPAC-u	(11 β)-11,17,21-trihidroksipregn-4-an-3,20-dien
Strukturna formula	
Empirijska formula	[C ₂₁ H ₃₀ O ₅]
Molarna masa, g/mol	362,460

2.3. Određivanje farmaceutika u okolišu

U humanoj medicini godišnja potrošnja lijekova prelazi nekoliko tisuća tona s oko sto tona samo u Njemačkoj. Potrebno je naglasiti da ovaj podatak ne uključuje lijekove koji se uzimaju bez recepta i ilegalnu potrošnju lijekova. Oko tri tisuće različitih spojeva se koriste kao sastojci medicinskih proizvoda u ljudskoj i veterinarskoj medicini i obuhvaćaju širok spektar različitih kemijskih struktura. Fizikalno-kemijska svojstva (dobra topljivost u vodi i slaba razgradivost) nekih farmaceutika omogućuju njihov prolaz kroz sve prirodne filtre i postrojenja za obradu voda, te na taj način ugrožavaju sustav opskrbe pitkom vodom. Zbog velikog broja spojeva kojima treba dodati ogroman broj izlučenih metabolita potrebno je razviti veliki broj analitičkih metoda za određivanje navedenih tvari u okolišu. Činjenica da farmaceutici nisu na listi zagađivala, rezultirala je slabijim istraživanjima o njihovoj prisutnosti u okolišu. Stoga se analitičke metode njihova određivanja u složenim matricama poput otpadnih voda i posebice sedimenta tek odnedavno razvijaju. Važno je razviti takve metode analize kojima će se omogućiti određivanje različitih grupa ovih spojeva u jednom koraku. U nastavku su opisane metode ekstrakcije i kromatografske metode analize kao važne analitičke metode u kvantitativnoj i kvalitativnoj analizi farmaceutika. [3]

2.3.1. Metode ekstrakcije

Kemijska analiza kompleksnih uzoraka često zahtijeva odvajanje analita od matrice uzorka, odnosno ekstrakciju. To je operacija potpunog ili djelomičnog odvajanja smjese tvari na temelju različitih topljivosti u pojedinim otapalima. Efikasnost ekstrakcije ovisi o polarnosti otapala ili smjese otapala. Moguće je povećati selektivnost raspodjelom uzorka između dvaju nemješljivih tekućina u kojima analit i njegova matrica imaju različitu topljivost. U idealnom slučaju postupak ekstrakcije trebao bi biti jednostavan, brz, jeftin, trebao bi dati kvantitativne analitičke rezultate bez gubitaka ili razgradnje analita i trebao bi dati otopinu analita koja je dovoljno koncentrirana da se može izravno mjeriti bez potrebe za koncentriranjem. Izbor metode ekstrakcije ovisi o strukturi, molekularnim masama, polarnosti, topljivosti, pK_K -vrijednostima i drugim svojstvima komponenti koje želimo izolirati ili razdvojiti. [17]

2.3.1.1. Ekstrakcija otapalom

Otapanjem cijelog ili dijela uzorka u odgovarajućem otapalu jedna je od najraširenijih tehnika pripreme uzorka za plinove, tekućine ili krutine. To je ravnotežni separacijski proces potpunog ili djelomičnog odjeljivanja smjese tvari koje imaju nejednaku topljivost u različitim otapalima kada željenu tvar ekstrahiramo iz tekuće faze (ekstrakcija tekuće-tekuće). Ekstrakcija otapalom može se provesti i kada se ispitivani analiti nalaze u čvrstoj matrici i tada govorimo o ekstrakciji čvrsto-tekuće. [18]

Proces ekstrakcije sastoji se od više koraka. Prvi korak je dovođenje uzorka u kontakt s otapalom za ekstrakciju. Za vrijeme mirovanja odvija se proces difuzije. Difuzija je molekularni mehanizam prijenosa tvari, te podrazumijeva migraciju jedne vrste čestica tvari unutar smjese koja se sastoji od dvije ili više komponenata. Do prijenosa dolazi zbog razlike koncentracija, sve dok nije nastupilo ravnotežno stanje. Brzina difuzije često određuje brzinu kojom se odvija cijeli proces. Kod tekućih uzoraka taj stupanj uglavnom ne predstavlja problem. Međutim, kod čvrstih uzoraka interakcijska energija između komponenata uzorka, odnosno između matrice i analita, mora biti nadjačana da bi se analit ekstrahirao u otapalo. Analit mora imati veći afinitet prema otapalu nego prema matrici u kojoj se nalazi. Željena komponenta se otapa u otapalu, te otapalo koje sadrži analit difundira natrag kroz uzorak. [17] Izbor otapala za ekstrakciju je ključan stupanj, te ovisi o vrsti i svojstvima analita koji se želi ekstrahirati. Prilikom izbora potrebno je uzeti u obzir:

- polarnost otapala;
- poželjno je da je vrelište otapala što niže kako bi se, po završetku postupka ekstrakcije, olakšalo smanjenje volumena ekstrakta uparavanjem;
- otapalo ne smije reagirati s matricom, te mora biti stabilno (povišena temperatura, svjetlost);
- poželjno je da otapalo ima malu viskoznost;
- poželjno je da je izabrano otapalo nezapaljivo, neškodljivo za analitičara i okoliš;
- otapalo mora biti dostupno u dovoljnim količinama;
- cijena kemikalija;
- pogodnost za ponovnu upotrebu.

Zatim slijedi separacija otapala s analitom od matrice uzorka. Odjeljivanje faza provodi se uglavnom taloženjem, dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem. Posljednji stupanj je

uklanjanje otapala i analiza željene komponente. Uklanjanje otapala se većinom izvodi destilacijom, kristalizacijom ili uparivanjem. [17]

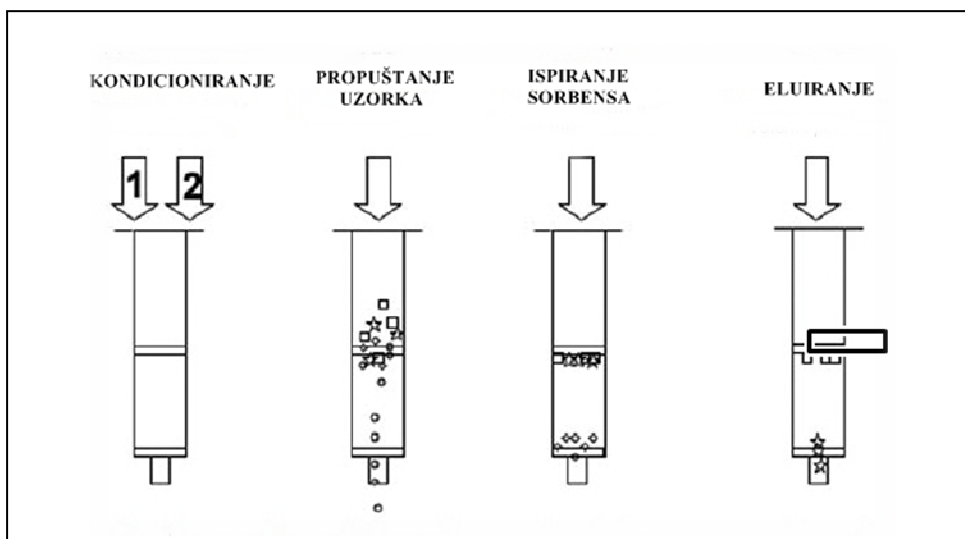
Vrijeme potrebno za ekstrakciju ovisi o topljivosti komponente u otapalu, temperaturi ekstrakcije, površini krutog uzorka izloženog otapalu, viskoznosti otapala i drugim čimbenicima. Iz tih razloga pogodno je provođenje ekstrakcije pri višim temperaturama zbog ubrzavanja procesa ekstrakcije, jer dolazi do povećanja brzine otapanja komponente, kao i brzine difuzije komponente u volumen otapala. Ipak, temperature rijetko prelaze 100 °C jer tada uglavnom dolazi do razgradnje analita ili ekstrakcije nepoželjnih tvari. Budući da je brzina prijenosa mase direktno proporcionalna površini čvrstog uzorka, to se prije ekstrakcije uzorak usitnjava do određenog stupnja i homogenizira. Viskoznost otapala mora biti dovoljno niska da otapalo može lako proći u pore čvrste faze. [18]

2.3.1.2. Ekstrakcija čvrstom fazom

Ekstrakcija čvrstom fazom (*Solid Phase Extraction*, SPE) je postupak ekstrakcije spojeva koji su otopljeni ili suspendirani u tekućoj smjesi. Načelo toga ekstrakcijskog postupka, koji posljednjih deset godina zbog brzine, efikasnosti, selektivnosti i mnogo manjeg potroška štetnih otapala iz analitičke uporabe istiskuje ekstrakciju tekuće-tekuće, posebno kad je riječ o koncentriranju tragova analita i uklanjanju interferencija, sastoji se u propuštanju velikog volumena uzorka kroz reaktivni sorbens smješten u mikrokolonama ili diskovima. Ekstrakcija čvrstom fazom nalazi primjenu kod koncentriranja analita, uklanjanja interferirajućih supstanci, te promjene matriksa analita. [19]

SPE se sastoji od četiri osnovna koraka (slika 2):

1. Kondicioniranje kolone, tj. solvatacija sorbensa pri čemu se kolona ispire odgovarajućim otapalom i priprema za interakciju s analitom.
2. Propuštanje uzorka kroz čvrstu fazu pri čemu dolazi do vezanja analita na površini sorbensa, tj. retencije.
3. Ispiranje sorbensa odgovarajućim otapalom, pri čemu se ispiru interferencije, a analit ostaje vezan za čvrstu fazu.
4. Eluiranje analita (desorpcija analita) odgovarajućim eluensom.



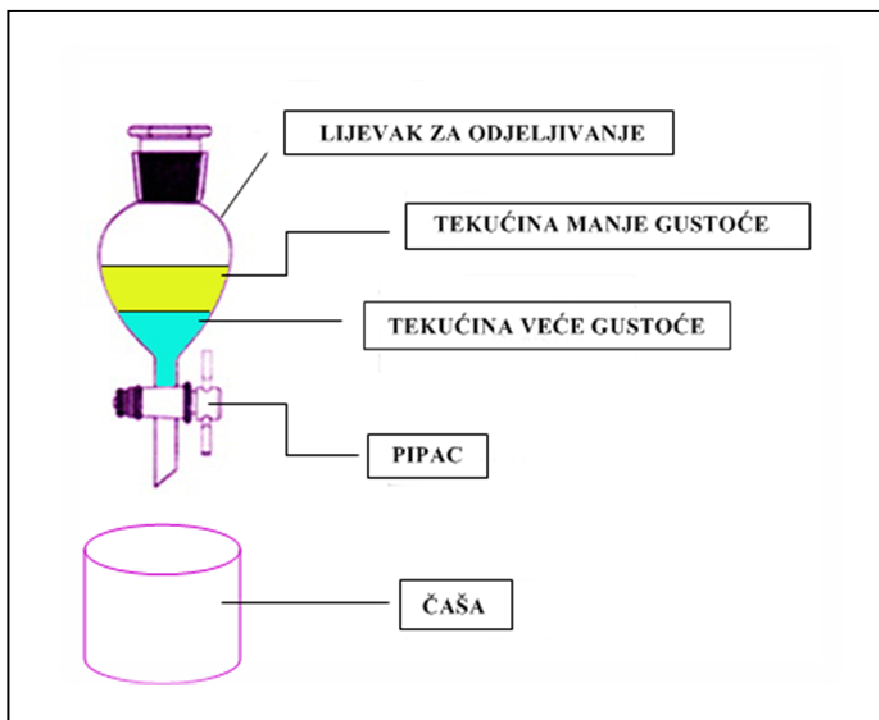
Slika 2. Ekstrakcija čvrstom fazom [19]

2.3.1.3. Ekstrakcija tekuće-tekuće

Konvencionalna ekstrakcija tekuće-tekuće važna je i vrlo česta separacijska tehnika za velik raspon analita. Provodi se u lijevcima za odjeljivanje i najčešće je vezana uz različite nedostatke kao što je nastajanje emulzije, slabo odjeljivanje faza, nizak stupanj automatizacije te veliki ljudski rad. Danas je ta metoda osuvremenjena uvođenjem u rad posebno pripremljenih kolona punjenih anorganskim materijalima (npr. diatomajska zemlja) širokih pora na koji se nanose vodeni ekstrakti i raspoređuje u obliku tankog filma. [19]

Postupak ekstrakcije sastoji se od nekoliko koraka (slika 3):

- a) pripravi se otopina uzorka u pogodnom otapalu;
- b) pomoću kemijske reakcije (kompleksiranje, podešavanje pH) uspostavi se maksimalna razlika u topljivosti između dviju faza;
- c) doda se drugo nemiješajuće otapalo da se uspostavi dvofazni sustav;
- d) miješa se u zatvorenom spremniku (lijevak za odjeljivanje) do uspostavljanja ravnoteže;
- e) razdvoje se faze.



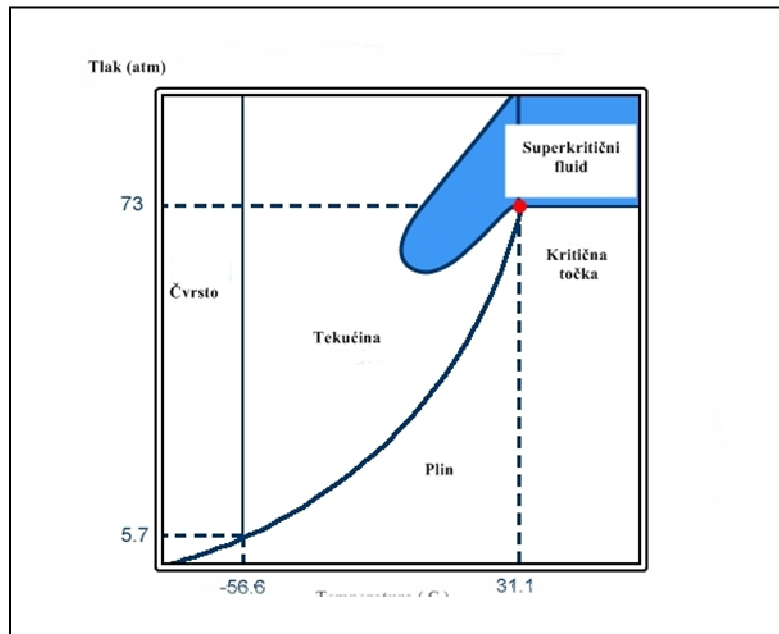
Slika 3. Ljevak za odjeljivanje [20]

2.3.1.4. Ekstrakcija fluidom pri superkričnim uvjetima

Novija metoda ekstrakcije je ekstrakcija fluidom pri superkričnim uvjetima. Pri temperaturama i tlakovima višima od kritičnih fluidi pokazuju mnogo bolja ekstrakcijska svojstva jer kroz čvrstu fazu mogu prolaziti poput plinova, a analit otapaju kao otapala. Najčešće se rabe ugljikov dioksid zbog niske toksičnosti, nezapaljivosti, kompatibilnosti s obradom prehrambenih proizvoda te kemijske stabilnosti. Dodavanjem modifikatora superkričnom fluidu (npr. metanol) njegov polaritet se mijenja, radi čega dobiva veću selektivnu snagu separacije. Ekstrakcija sa superkričnim CO₂ idealna je za ekstrakciju prirodnih proizvoda iz biljnih materijala i preporuča se za ekstrakciju termolabilnih komponenata, kada je zahtijevana niska temperatura.

Superkrični fluidi zamjenjuju organska otapala, kao što su *n*-heksan, diklormetan, kloroform, i dr. Prednost ove metode ekstrakcije je njezina brzina koja se postiže zbog velikog koeficijenta difuzije i male viskoznosti fluida. Selektivnost fluida može se mijenjati promjenama tlaka i u manjoj mjeri temperature, što omogućuje prilagođavanje uvjeta ekstrakcije prema tipu analita. Budući da su većina superkričnih fluida pri sobnim uvjetima plinovi, analiti se jednostavnim otpuštanjem tlaka ili uvođenjem u malu količinu odgovarajućeg otapala dobivaju u otopini. Nadalje, fluidi su inertni, čisti, netoksični i jeftini,

pogotovo najčešće upotrebljavani ugljikov dioksid čije superkritične uvjete (slika 4) nije teško postići ($T_c = 31\text{ °C}$, $p_c = 7,4\text{ Pa}$). [19]



Slika 4. Fazni dijagram za CO₂ [21]

2.3.1.5. Ekstrakcija mikrovalovima

Upotreba dielektričnog zagrijavanja u laboratorijima, koristeći mikrovalove započela je kasnih 70-tih, te je prvo upotrijebljena u prehrambenoj industriji. Dielektrično zagrijavanje ovisi o sposobnosti materijala da apsorbira mikrovalnu energiju i pretvori je u toplinu. Mikrovalovi zagrijavaju cijeli volumen uzorka simultano i oštećuju vodikove veze potičući rotaciju dipola. Kretanje otopljenih iona povećava penetraciju otapala u matriks te na taj način potiče otapanje. Postoje dvije vrste komercijalno dostupnih sustava mikrovalne ekstrakcije, a to su ekstrakcija u zatvorenim posudama pri kontroliranom tlaku i temperaturi, te u mikrovalnim pećnicama pri atmosferskom tlaku. Sistem mikrovalne ekstrakcije u zatvorenim posudama se općenito koristi za ekstrakciju pri uvjetima niske ili visoke temperature ekstrakcije. Tlak u posudi bitno ovisi o količini i vrelištu otapala. Mikrovalna ekstrakcija omogućuje smanjenje vremena ekstrakcije i količine potrebnog otapala za ekstrakciju. Upotrebom mikrovalnog zračenja može se izbjeći i razgradnja uzorka zbog visoke temperature, a energija mikrovalova olakšava desorpciju analita iz matrice. Loša svojstva mikrovalne ekstrakcije su: [22]

1. Potreba za razdvajanjem ekstrakta od uzorka dekantiranjem, filtriranjem ili centrifugiranjem.

2. Hlađenje ćelije za mikrovalnu ekstrakciju nakon ekstrahiranja na sobnu temperaturu, čime se gubi dosta vremena koje se dobiva ovom metodom ekstrakcije.

Nedavni razvoj mikrovalnih instrumenata omogućio je dobru kontrolu tlaka i temperature, čime se postižu precizni i ponovljivi uvjeti (slika 5). [21]

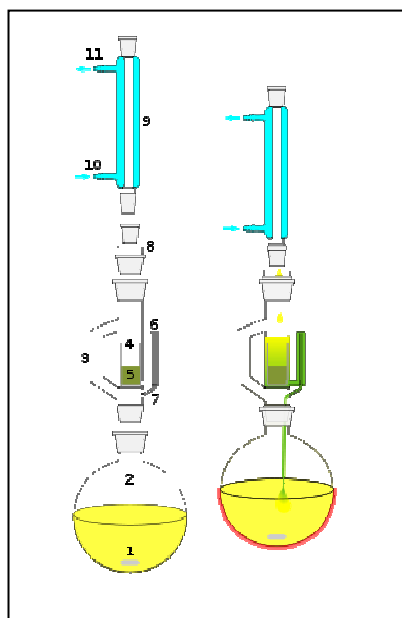


Slika 5. Uređaj za mikrovalnu ekstrakciju [23]

2.3.1.6. Soxhlet ekstrakcija

Soxhlet ekstrakcija nazvana je po Baron Von Soxhlet-u koji je ovu metodu uveo u 19. stoljeću. Bila je najčešće korištena metoda ekstrakcije sve do 1980. godina kad su se pojavile moderne metode ekstrakcije. Postupak provođenja Soxhlet ekstrakcije (slika 6):

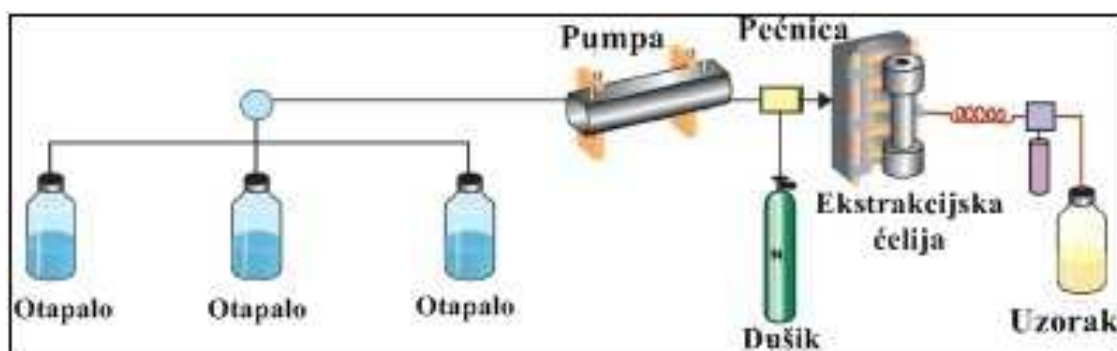
U aparaturi kruži grijano otapalo za ekstrakciju iz tikvice okrugla dna kroz uzorak smješten u stakleni ili celulozni cilindar u gornjem dijelu aparature. Pare otapala kondenziraju se u hladilu smještenom na vrhu i kaplju dolje na uzorak te ekstrahiraju analit iz uzorka. Kako se aparatura puni otapalom tako se puni i sifonska cijev a kad se ona napuni, otapalo iz gornjeg dijela odlazi u tikvicu. Otapalo se zagrijava i ciklus se nastavlja. Nedostaci ove metode su velike količine otapala potrebne za ekstrakciju, dugo vrijeme same ekstrakcije (između 12 i 48 sati), te potreba za koncentriranjem otopine analita nakon ekstrakcije. Uz to Soxhlet ekstrakcija je iscrpna metoda ekstrakcije, te se uz analit često ekstrahiraju i interferencije pa je ekstrakt nakon Soxhlet ekstrakcije potrebno dodatno pročišćavati. [24]



Slika 6. Soxhlet ekstrakcija [25]

2.3.1.7. Ubrzana ekstrakcija otapalom

Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu moderna je metoda ekstrakcije predstavljena od kompanije Dionex Inc. (Sunnyvale, CA SAD) 1995 godine. Uzorak (često pomiješan sa sredstvom za sušenje) smješten je u ekstrakcijskoj ćeliji od nehrđajućeg čelika koja je pod tlakom, zagrijava se i puni otapalom za ekstrakciju (slika 7). Velika učinkovitost ekstrakcije postiže se uporabom organskog otapala u tekućoj fazi na temperaturama iznad temperature vrelišta otapala. Povišena temperatura povećava brzine difuzije, topljivosti analita i time ubrzava ekstrakciju. Ekstrakcijska ćelija od nehrđajućeg čelika može raditi na temperaturama do 200 °C i tlakovima do 20 MPa. Glavni nedostaci metode su što je nakon ekstrakcije potrebno dodatno čišćenje ekstrakta i što je kod visokih temperatura moguća razgradnja nestabilnih analita. [23]



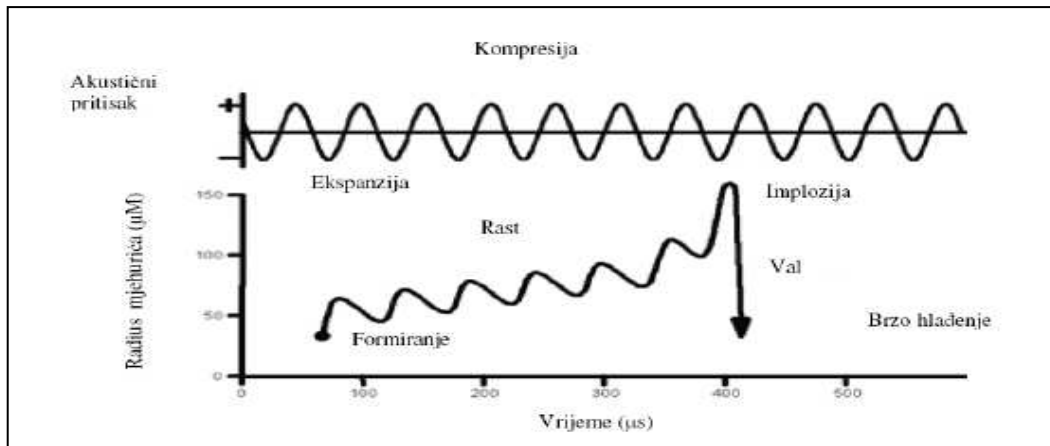
Slika 7. Ekstrakcija uz povišeni tlak i temperaturu [25]

2.3.1.8. Ekstrakcija ultrazvukom

Ultrazvučna ekstrakcija jednostavan je postupak koji uključuje uporabu zvučnih valova kako bi se ekstrahirao uzorak uronjen u organskom otapalu. Poželjnije je koristiti zvučnu probu iako se može koristiti i ultrazvučna kupelj. Uzorak s odgovarajućim otapalom stavlja se u ultrazvučnu kupelj. Ultrazvučna ekstrakcija osigurava djelotvorniju ekstrakciju od mućkanja u tikvici i Soxhlet ekstrakcije. Uzrok povećanoj djelotvornosti ultrazvučne ekstrakcije je mnogo bolji kontakt između čvrste tvari i otapala. Ultrazvuk je po definiciji zvuk iznad gornje granice čujnosti za normalno ljudsko uho. Ljudsko uho čuje frekvencije titraja između 20 Hz i 20 kHz. Titraji ispod 20 Hz nazivaju se infrazvukom, a titraji iznad 20 kHz ultrazvukom. To široko područje se uglavnom dijeli na dva područja koja određuju potencijalnu primjenu ultrazvuka. Ako je primijenjena frekvencija visoka, govorimo o dijagnostičkom ultrazvuku niske energije (1 do 10 MHz), a ako je frekvencija niska, govorimo o ultrazvuku visoke energije (20 do 100 kHz). Dijagnostički ultrazvuk ne uzrokuje fizičke niti kemijske promjene u svojstvima medija na koji je primijenjen. Koristi se u medicini, prehrambenoj industriji, laboratorijima i industrijskim istraživanjima gdje rješava različite zadatke u pripremi uzoraka, kontroli kvalitete, te znanstvenim istraživanjima. Ultrazvuk visoke energije izaziva kavitacije, koje mogu uzrokovati fizičke promjene materijala te određene kemijske reakcije na materijalima na kojima je primijenjen. Ima široku primjenu u mnogim granama industrije, te se koristi za čišćenje, bušenje, lemljenje, ubrzavanje kemijskih reakcija, emulgiranje, flotaciju, homogenizaciju, ekstrakciju, kristalizaciju, oksidaciju itd. [26]

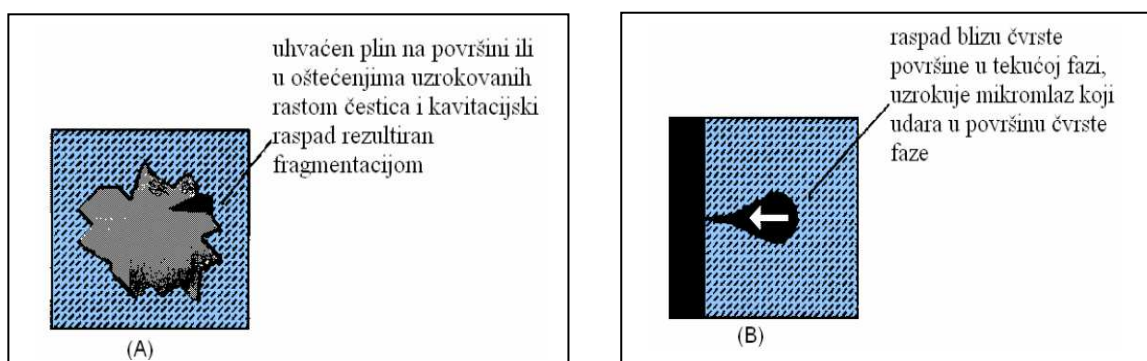
Za razliku od elektromagnetskih valova, ultrazvuk se ne može širiti kroz vakuum, nego se prenosi kroz neku tvar koja posjeduje elastična svojstva: tekućinu, krutinu, plin. Prilikom širenja zvučnog vala kroz tekući medij nastaju longitudinalni valovi što dovodi do izmjeničnih ciklusa kontrakcije i ekspanzije. Ekspanzijom se molekule udaljavaju, a kompresijom približavaju, pri čemu dolazi do lokalizirane promjene tlaka u otopini. Mjehurići rastu uslijed difuzije para u njihovu unutrašnjost, te uvijek u fazi ekspanzije malo više narastu nego što se smanje tijekom faze kompresije. Kada mjehurići dosegnu kritičnu veličinu ne mogu učinkovito apsorbirati energiju, odnosno energija ultrazvuka nije dovoljna da bi se zadržala plinska faza, te u mjehurićima dolazi do brze kondenzacije. Kritična veličina mjehurića ovisi o primijenjenoj frekvenciji i mediju koji se tretira. Mjehurići implodiraju u manje od mikrosekunde, te se kondenzirane molekule sudaraju velikom brzinom pri čemu nastaju šok valovi. Ovi šok valovi uzrokuju vrlo visoke temperature (do 5500 K) i tlakove (do 100 MPa), što dovodi do mijenjanja fizikalno kemijskih svojstava lokalnih molekula. Zbog

toga, u bilo kojem vremenu temperatura tekućine jednaka je sobnoj temperaturi, te se ovaj fenomen zbog toga naziva i „hladno vrenje” (slika 8). Sposobnost ultrazvuka da izazove kavitacije ovisi o karakteristikama ultrazvuka (frekvenciji, intenzitetu), svojstvima proizvoda (viskoznosti, gustoći i površinskoj napetosti) i okolnim uvjetima (temperaturi, tlaku i vlažnosti). [27]



Slika 8. Usporedba ciklusa kompresije i ekspanzije sa formiranjem, rastom i implozijom kavitacijskog mjehurića [26]

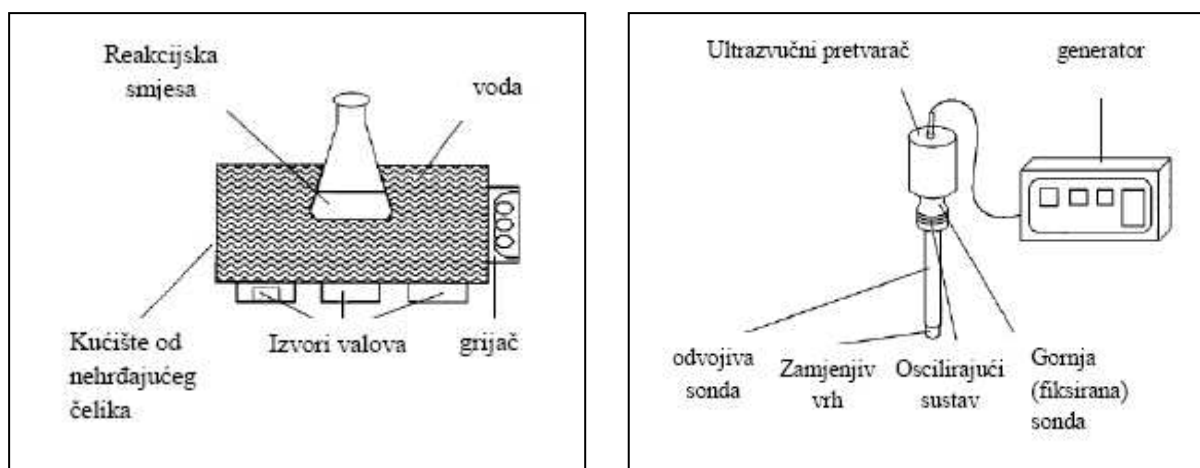
Kada kavitacija nastane u tekućini u blizini čvrste površine implozija mjehurića se bitno razlikuje od simetrične, sferične implozije samo u tekućini. Prisutnost čvrste površine narušava pritisak ultrazvučnog vala te je implozija mjehurića u blizini površine asimetrična. Posljedica je stvaranje mikromlaza tekućine usmjerenog prema površini koji se kreće brzinom od približno 400 km/h. Mikromlaz, kao i udarni val implozije erodiraju površinu čvrstog uzorka (slika 9). [27]



Slika 9. Kavitacijski efekti na površini čvrsto-tekuće: (A) implozija kavitacije u poru čvrstog uzorka; (B) implozija kavitacije blizu površine čvrste čestice [26]

Ultrazvuk visokog intenziteta može se stvoriti na različite načine, pokretanjem tekućine, mlazom plina ili na najčešće upotrebljavan način pomoću električne snage. Generator pretvara napon istosmjerne struje u visoke frekvencije od približno 25 kHz (25000 ciklusa po sekundi) električne energije. Električna ili mehanička energija se pretvara u energiju zvuka pomoću ultrazvučnih pretvarača. Takvi elektroakustični sustavi su uglavnom piezoelektrični ili rijetko magnetnostriktivni pretvornici. Uređaji za ultrazvučnu ekstrakciju prikazani su na Slici 10. [18]

Ultrazvučne kupelji se često koriste u laboratorijima jer su lako dostupne i relativno su jeftine. Obično su elementi pretvornika smješteni na dnu spremnika, te oni prenose vibracije direktno tekućini koja je u spremniku. Glavnina ultrazvučnih kupelji radi na frekvenciji od 20-40 kHz, iako postoje izvedbe i u višem frekvencijskom području. Prednosti postupka ultrazvučne ekstrakcije su njena relativna brzina, jednostavnost, smanjenje čestica, ubrzani prijenos mase tvari i to što ne zahtijeva skupe instrumente, a nedostaci veliki volumen otapala i moguća potreba višekratne ekstrakcije. Ekstrakti se nakon završene ekstrakcije moraju filtrirati. Ultrazvučna ekstrakcija je vrlo učinkovita kod izoliranja analita iz različitih vrsta uzoraka. Vrlo visoke temperature i tlakovi koji povećavaju topljivost i ubrzavaju prijenos tvari pozitivno utječu na ekstrakciju. Za ekstrakciju farmaceutika iz sedimenta u ovom je radu izabrana ultrazvučna ekstrakcija zbog navedenih prednosti pri kontroliranim uvjetima temperature i ultrazvučne snage.[18]



Slika 10. Shematski prikaz uređaja za ultrazvučnu ekstrakciju: a) Ultrazvučna kupelj; b) Ultrazvučna sonda [23]

2.3.2. Kromatografske metode analize

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 sorbentu. 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. [28] Nepokretna faza je čvrsta tvar ili kapljevina na inertnom nosaču. Izbor nepokretne faze uvjetovan je prirodom ispitivanog spoja, prirodom ravnoteže kromatografskog procesa i vrstom veze koja nastaje između ispitivanog spoja i kromatografske podloge. Stoga je izbor sorbenta jedan od glavnih čimbenika u kromatografskom procesu.

Kromatografske tehnike mogu se podijeliti na temelju sastava pokretne faze na:

- plinsku kromatografiju,
- tekućinsku kromatografiju,
- fluidnu kromatografiju pri superkritičnim uvjetima.

Čimbenici koji utječu na kromatografski proces su:

- energetska barijera,
- veličina i geometrijski oblik zrna sorbenta koji tvori nepokretnu fazu,
- temperatura sustava,
- brzina pokretne faze,
- priroda veze,
- količina ispitivanog spoja.

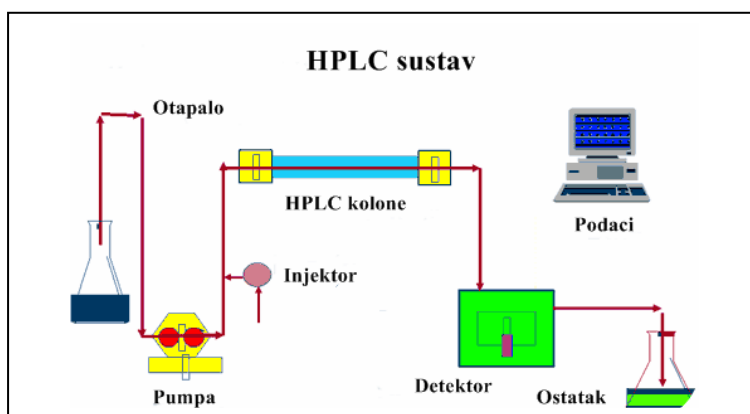
U tekućinskoj kromatografiji pokretna faza je kapljevina, a nepokretnu fazu mogu činiti različiti sorbenti. Može se podijeliti na :

- adsorpcijsku kromatografiju, pri kojoj je nepokretna faza čvrsti adsorbens,
- razdjelnu kromatografiju, pri kojoj je kapljevinska nepokretna faza nanosena na čvrsti inertni nosač.

Da bi postigli razdvajanje željene smjese, potrebno je odabrati pogodan sustav otapala koji čini pokretnu fazu. Uz pretpostavku da je pokretna faza konstantnog sastava i brzine, učinkovitost kromatografskog stupca pri tekućinskoj kromatografiji ovisi o dimenzijama stupca i veličini čestica punjenja. Na razdvajanje smjese također utječe temperatura, osobito kada je riječ o otopinama male molekularne mase. Povišena temperatura poboljšava difuzivnost uzorka i reducira viskoznost pokretne faze, pa se time poboljšavaju kinetički parametri ali se mijenja selektivnost stupca. Optimiranjem brzine protoka može se značajno poboljšati razdvajanje željene smjese te smanjiti vrijeme zadržavanja. Tekućinska kromatografija pogodna je metoda za odjeljivanje smjesa koje se zbog niske hlapljivosti ili toplinske nestabilnosti ne mogu analizirati plinskom kromatografijom. [29]

2.3.2.1. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti(HPLC)

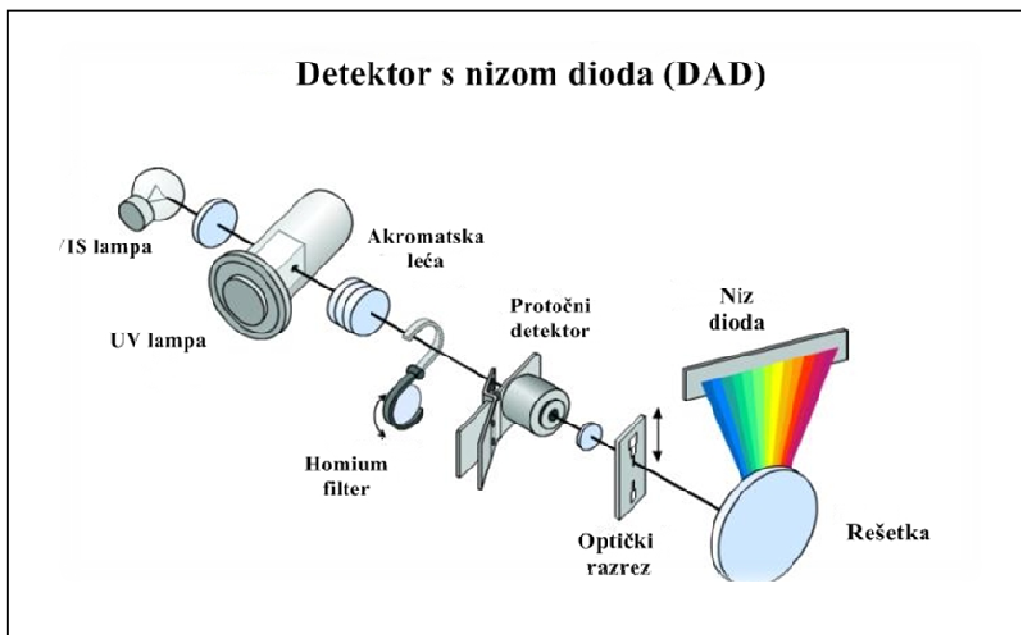
Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (HPLC) je visoko efikasna metoda sa sposobnošću da analizira, odijeli i/ili očisti gotovo svaki uzorak. Jedna je od najviše primjenjivanih i najučinkovitijih metoda kojom se može odijeliti veliki broj farmaceutika. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti kombinirana s UV detektorom ili s detektorom s nizom dioda (slika 11) pokazala se kao važna analitička metoda u kvalitativnoj i kvantitativnoj analizi farmaceutika. Prednosti HPLC metode su višekratna upotreba kolona, automatsko unošenje uzorka, skraćeno trajanje analize te detekcija i kvantifikacija koje se mogu postići upotrebom kontinuiranih protočnih detektora. Zbog primjene visoko osjetljivih detektora dovoljne su nanogramske količine uzorka, a omogućeno je visoko razlučivanje sastojaka smjese. Ove prednosti omogućuju točnost i preciznost rezultata analize. Snaga i korisnost tekućinske kromatografije visoke djelotvornosti očituje se u velikom rasponu dostupnih načina sorpcije i mogućnošću promjene kemijske prirode analiziranog spoja. [30]



Slika 11. Tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti [31]

2.3.2.2. Detektor s nizom dioda (DAD)

Upotreba detektora s nizom dioda, koji omogućuje dobivanje punih UV-VIS spektara u rasponu od 200-600 nm, dala je novu dimenziju HPLC analizi uzoraka. Detektor s nizom dioda sastoji se od polikromatora i niza dioda. Svaka dioda neovisno mjeri intenzitet zračenja određene valne duljine koja pada na nju. Polikromatsko zračenje koje dolazi iz izvora prolazi kroz uzorak te kroz ulaznu pukotinu dolazi do polikromatora. Na polikromatoru se raspršuje i ozračuje niz dioda. Fotodiode pretvaraju elektromagnetski podražaj u električni signal. Na taj način omogućeno je istovremeno snimanje cijelog spektra valnih duljina u vremenu jedne sekunde, što je vrlo važno kod kromatografije gdje uzorak putuje s otapalom kroz detektor. [31] Broj fotodioda varira u ovisnosti o proizvođaču i modelu detektora ali u upotrebi su uglavnom detektori sa 512 i 1024 fotodiode. Signali iz pojedinih dioda daju spektar analiziranog analita. Spektar se dobiva istovremeno tako da upotreba detektora s nizom dioda (DAD) pridonosi identifikaciji analiziranog uzorka. Detektor s nizom dioda može raditi na prikupljanju podataka na jednoj i više različitih valnih duljina dajući kromatogram ili istovremeno preko spektra jednog ili više analita u tijeku analize. [32]



Slika 12. Shematski prikaz detektora s nizom dioda (DAD) [33]

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Tablica 9. Kemikalije korištene tijekom eksperimenta

	Naziv kemikalije	Čistoća	Proizvođač
1.	metanol (MeOH)	p. a.	J. T. Baker, Nizozemska
2.	etanol (EtOH)	p. a.	Kefo, Ljubljana
3.	acetone (ACO)	p. a.	T. T. T. , Sveta Nedjelja
4.	acetonitril (ACN)	p. a.	Kemika, Zagreb
5.	<i>n</i> – propanol (n - PrOH)	p. a.	Kemika, Zagreb
6.	komplekson III. (KIII.)	p. a.	Gram – mol, Zagreb
7.	diklormetan (DKM)	p. a.	Kemika, Zagreb
8.	1,4 – dioksan	p. a.	Merck, Darmstadt

3.1.2. Sediment

Optimizacija postupka ekstrakcije farmaceutika napravljena je na uzorcima sedimenta sa mjesta Kupirovo koje se nalazi u Ličko-senjskoj županiji. Mehanički sastav sedimenta, prikazan je u tablici 10. Sediment je okarakteriziran kao pjeskovita ilovača.

Tablica 10. 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*, prikazan je u tablici 11. Teksturna oznaka sedimenta je pijesak.

Tablica 11. 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	70,4154	70,2475	3,47

Na temelju rezultata prikazanih u tablici 12. možemo zaključiti da je ispitivani sediment neutralnog do bazičnog karaktera.

Tablica 12. 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, H₂O, neprosijano	8,19	8,19	8,19	bazični sediment
sediment, H₂O, prosijano	8,01	8,02	8,02	bazični sediment

Prema rezultatima prikazanim u tablici 13. 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 13. Kapacitet i stanje zasićenosti adsorpcijskog kompleksa

Sediment	Suma baza sposobnih za zamjenu (<i>S</i>)	Maksimalna adsorpcijski kapacitet za baze (<i>T</i>)	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 14.).

Tablica 14. Određivanje karbonata

UZORAK	V(NaOH)/ mL	% CaCO₃
sediment	37,00	25,62
slijepa proba	49,80	/

3.1.3. Kolona

Tijekom izvođenja eksperimenta korištene su različite kolone u svrhu pronalaska optimalne kolone za provedeni eksperiment.

Inter Sustain C18, 250 x 4,6 mm, [5 μm], GL Science Inc. Japan

Synergi, Fusion –RP 80 A, 150 x 4,6 mm, [4 μm], Phenomix, USA

Synergi, Fusion –RP 80 A, 150 x 2,0 mm, [4 μm], Phenomix, USA

LiChrospher 100, 125 x 4,0 mm, [5 μm],

Inter Sustain C18, 2.1 x 50 mm, [2 μm], GL Science Inc. Japan.

3.1.4. Pokretna faza

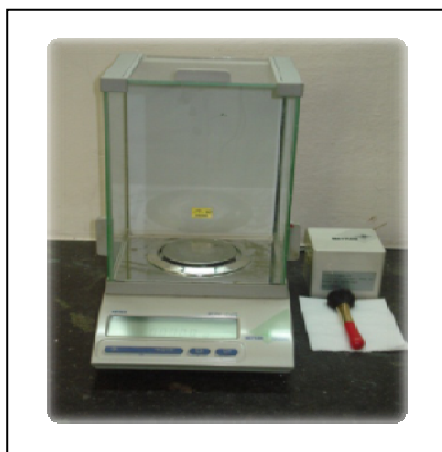
Tablica 15. Gradijent pokretne faze korišten u analizi [34]

Vrijeme/min	Volumen pokretne faze A/%	Volumen pokretne faze B/%
0	100	0
2,30	92	8
6,00	90	10
11,00	70	30
15,00	40	60
18,00	5	95
28,00	5	95
28,10	100	0
30,00	100	0

3.1.5 Aparature i instrumenti

3.1.5.1. Analitička vaga

Analitička vaga je instrument za precizno određivanje mase tvari. O njezinoj ispravnosti i preciznosti ovisi točnost rezultata analize. U radu je korištena analitička vaga Mettler Toledo, Švicarska, model AB104, prikazan na slici 13.



Slika 13. Analitička vaga korištena tijekom izvedbe eksperimenata

3.1.5.2. Ultrazvučna kupelj

Ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz sedimenta provedena je u ultrazvučnoj kupelji SONOREX DIGITAL 10 P, Bandelin, Berlin, Njemačka, prikazana na slici 14. Ultrazvučna kupelj je programibilna, tj. omogućuje podešavanje temperature kupelji, vremena trajanja ekstrakcije i snage ultrazvuka te pohranjivanja do 10 programa s različitim postavkama eksperimentalnih uvjeta. Maksimalna temperatura koju je moguće podesiti iznosi 80 °C, vrijeme od 1-99 minuta, a maksimalna snaga 1200 W.



Slika 14. Ultrazvučna kupelj korištena tijekom provedbe eksperimenata

3.1.5.3. Tekućinski kromatograf (HPLC)

Dobiveni ekstrakti analizirani su tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti Varian ProStar 500 (Walnut Creek, California, USA), prikazanog na slici 17.

Instrument se sastoji od:

ProStar 330 detektora s nizom dioda (DAD);

ProStar 230 tercijarne pumpe;

ProStar 410 uređaja za automatsko dodavanje uzoraka;

ProStar 500 termostatiranog držača kolone;

Osobnog računala s Varian-ovim računalnim programom STAR 5.2. koji upravlja računalom, prikuplja i obrađuje podatke.



Slika 15. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti, Varian ProStar 500, s detektorom s nizom dioda (HPLC-DAD)

3.2. Metoda rada

3.2.1. Priprema standardnih otopina farmaceutika i uzoraka sedimenta za ultrazvučnu ekstrakciju

Pripremljena je temeljna standardna otopina koncentracije 50 ppm sljedećih farmaceutika; lidokain, levamisol, febantel, albendazol, tilozin, deksametazon, hidrokortizon i prokain. Vagano je po 5 mg navedenih farmaceutika i otapano u metanolu HPLC čistoće te čuvano u hladnjaku u tikvici od 100 mL. Sediment tla "Kupirov izvor" usitnjen je u tarioniku, prosijan, te su vagane dvije odvage od 5 g i 1 g u plastičnim bočicama.

3.2.2. Ekstrakcija i kromatografska analiza farmaceutika

Odvage uzorka sedimenta od 1 g i 5 g stavljene su u plastične bočice, dodan je 1 mL pripremljene standardne otopine farmaceutika i 3 mL metanola i ostavljeno preko noći da ishlapi. U bočice je zatim dodano 15 mL otapala te su bočice smještene na ultrazvuk i namješteni su uvjeti rada ultrazvuka (temperatura, vrijeme i snaga). Dobiveni ekstrakti profiltrirani su kroz stožasti filter papir (plava vrpca) a potom prebačeni u HPLC viala koje su

stavljene na kromatografsku analizu (Varian ProStar 500). Kao pokretna faza korišteni su 0,01% mravlja kiselina u vodi i 0,01% mravlja kiselina u acetonitrilu. U kromatografski sustav injektirano je redosljedom: standardna otopina smjese farmaceutika, slijepa proba i potom ekstrakti. Volumen injektiranih ekstrakata iznosio je 30 μ L. Svaki uzorak injektiran je tri puta nakon čega je kolona isprana propuštanjem acetonitrila. Kromatogrami su snimljeni pri valnim duljinama: 210 nm, 254 nm, 285 nm i 295 nm.

Nakon kromatografske analize rezultati su očitani a potom obrađeni u programskom paketu Microsoft Office Excel 2007. Prilikom očitavanja rezultata za identifikaciju ispitivanih farmaceutika na kromatogramima korišteni su apsorpcijski spektri dobiveni snimanjem standardnih otopina svih osam farmaceutika na spektrofotometru.

Rezultati koji su dobiveni nakon obrade kromatograma su površine kromatografske krivulje za svaki ispitivani farmaceutik koji je detektiran i identificiran pomoću vremena zadržavanja t_R (min) i apsorpcijskog spektra. Učinkovitost ekstrakcije procijenjena je s obzirom na površinu kromatografske krivulje ispitivanih farmaceutika za otopinu standarda, jer je ona proporcionalna s količinom analita u uzorku.

Učinkovitost ekstrakcije praćena je kao iskorištenje, $I\%$, koja je izražena kao omjer površine kromatografske krivulje analita u ekstraktu ($A_{i,USE}$) i površine kromatografske krivulje analita u standardu ($A_{i,STD}$):

$$I = \frac{A_{i,USE}}{A_{i,STD}} \times 100\%$$

4. REZULTATI I RASPRAVA

Ispitivani farmaceutici u ovome radu (2.2.) proizvode se u Hrvatskoj, samim time predstavljaju problem ako dospiju u okoliš te se u zadnjih par godina provode istraživanja u svrhu njihovog određivanja u okolišu. Uzorci su također, ispitivani na Zavodu za analitičku kemiju, međutim, ispitivanja nisu davala zadovoljavajuće rezultate te se ovim eksperimentima nastojalo doći do boljih uvjeta ekstrakcije farmaceutika iz sedimenta. Prva su provedena kromatografska ispitivanja s ciljem pronalaska najbolje nepokretne faze, tj. kolone. Ispitivane su navedene kolone u poglavlju 3.1.3., a najbolja separacija ispitivanih farmaceutika postignuta je na koloni InertSustain TM C18 (250mm x 4,6mm, 5mikrom) GL Sciences Inc. Japan. Injektirano je uvijek 30 μ L uzoraka i standardne otopine, sastav pokretne faze tijekom analize prikazan je u tablici 15, a protok pokretne faze je 0,7 mL/min. Sva ispitivanja su provedena na sedimentu "Kupirovo", čija su osnovna fizikalna svojstva navedena u poglavlju 3.1.2. Obzirom da se radi o realnom uzorku, pri ekstrakciji se može očekivati i značajan utjecaj matice. Da bi se lakše identificirali ispitivani farmaceutici na kromatogramima, prethodno su na spektrofotometru snimljeni njihovi apsorpcijski spektri. Iz apsorpcijskih spektara određene su i valne duljine maksimuma apsorbancije kod kojih su kvantificirani pojedini farmaceutici: albendazol, febantel, levamisol i lidokain kod 210 nm, deksametazon i hidrokortizon kod 254 nm, tilozin kod 285 nm i prokain kod 295 nm. Dodatni parametar za identifikaciju ispitivanih farmaceutika su njihova vremena zadržavanja (vrijeme za koje se supstanca eluira/izlazi) te ona iznose za: albendazol ($t_R=20$ min), febantel ($t_R=24$ min), levamisol ($t_R=17$ min), lidokain ($t_R=1$ min), deksametazon ($t_R=22$ min), hidrokortizon ($t_R=21$ min), tilozin ($t_R=18$ min) i prokain ($t_R=19$ min) s odstupanjima od 0,5 do 1 minute ovisno o uvjetima provođenja eksperimenta.

4.1. Izbor otapala

Pregled napravljenih eksperimenata prema uvjetima rada ultrazvučne kupelji za različita čista otapala:

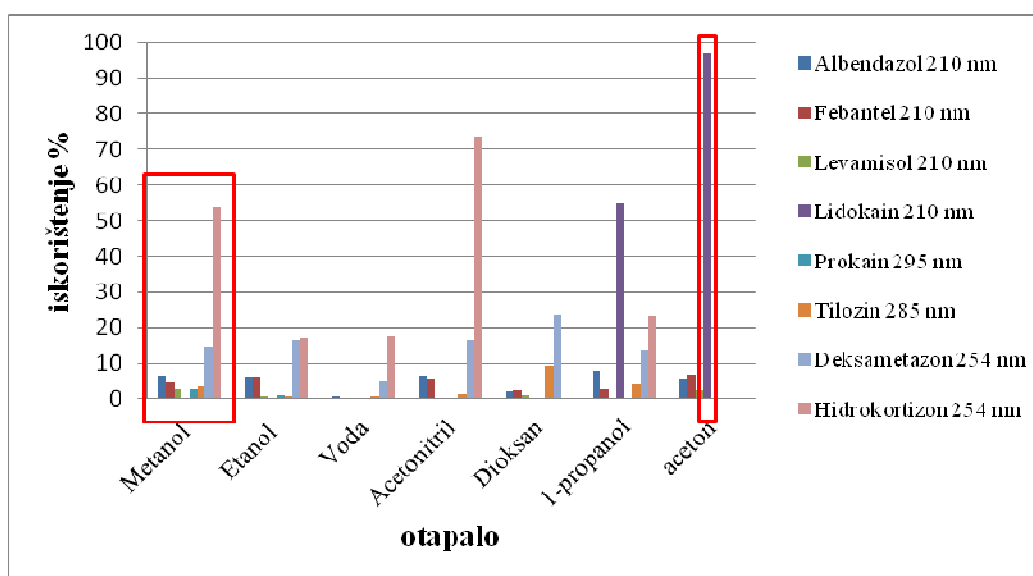
Eksperiment 1. 30 minuta/30 °C/600 W/1g

Eksperiment 2. 30 minuta/30 °C/600 W/5g

Eksperiment 3. 30 minuta/30 °C/600 W/1g/24 sata

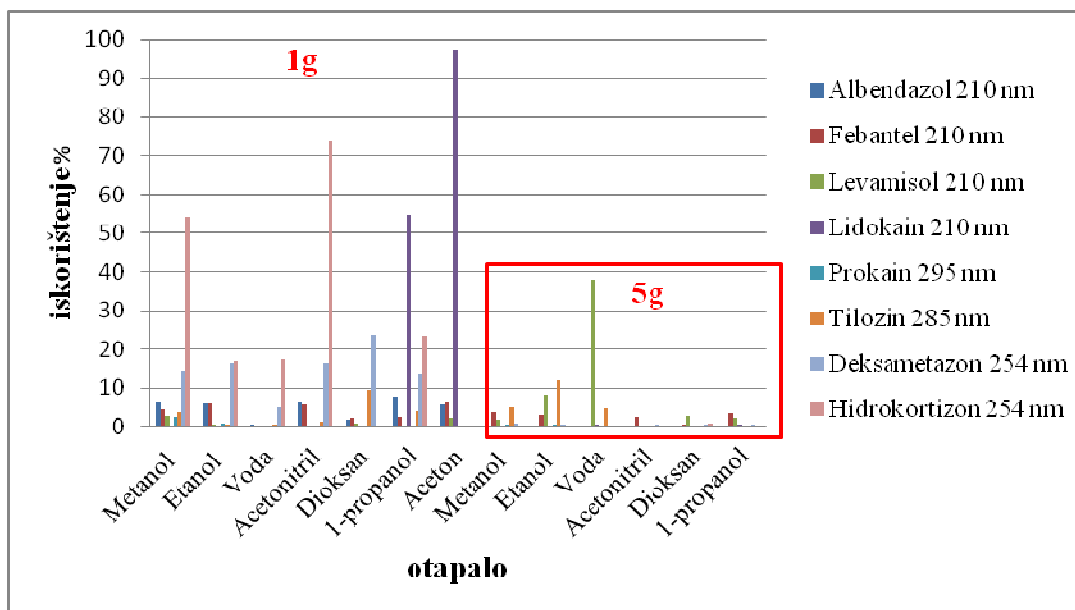
Prvim eksperimentom željelo se odrediti najbolje otapalo za ekstrakciju ultrazvukom. Stoga su korištena čista otapala: metanol (MeOH), etanol (EtOH), voda (H₂O), 1-propanol (1-PrOH), aceton (ACO), diklormetan (DKM), dioksan (DIO) i acetonitril (ACN), ta otapala

izabrana su jer su najčešće korištena otapala za ekstrakciju prema proučenoj literaturi. Prema prethodnim eksperimentalnim saznanjima iz literature [27] izabrani su prvi eksperimentalni uvjeti provođenja ultrazvučne ekstrakcije otapalima. U plastične bočice s 1 g uzorka sedimenta dodana su čista otapala (15 mL) te stavljena na ultrazvučnu kupelj pri 30 °C, 30 minuta i snagom 600 W. Dobiveni ekstrakti nakon filtriranja injektirani su (30 µL) u kromatografski sustav i to uvijek nakon injektiranja standardne otopine ispitivanih farmaceutika. Uvijek su rađene 3 probe i slijepa proba.



Slika 16. Grafički prikaz iskorištenja za različita otapala korištena u 1. eksperimentu (30 minuta/30 °C/600 W/1g)

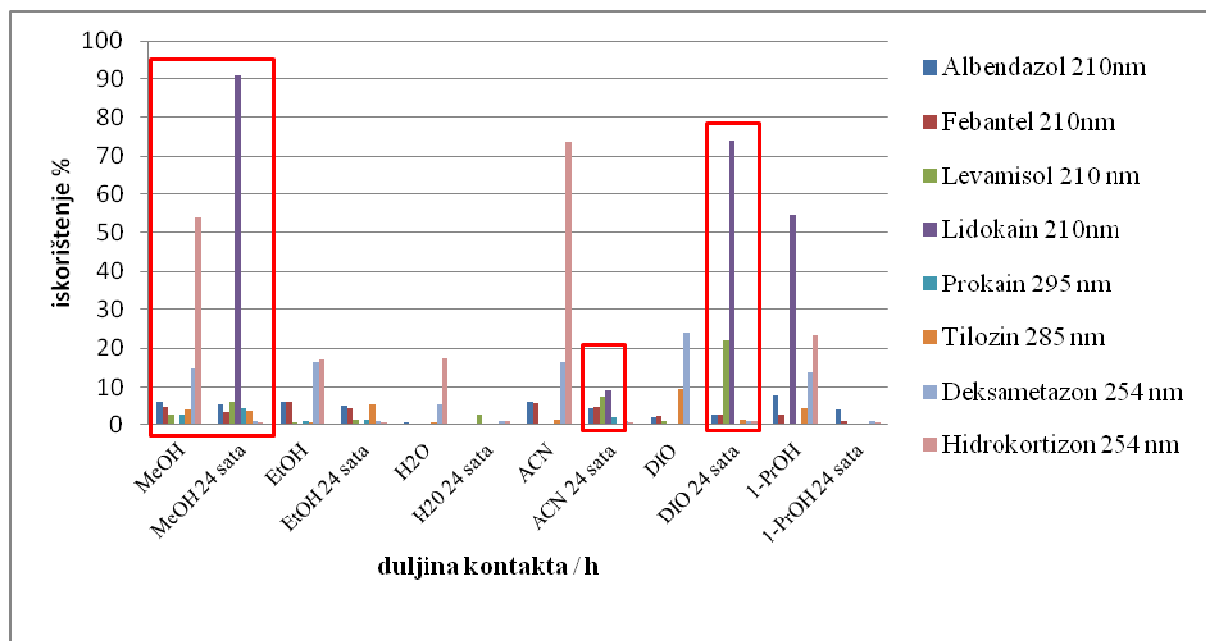
Na temelju dobivenih rezultata u prvom eksperimentu (slika 16) zaključeno je da je najbolje iskorištenje dobiveno u slučaju metanola za svih osam ispitivanih farmaceutika, dok je korištenjem diklormetana iskorištenje neznatno (<1%) pa na slici 16 nije niti prikazan. Najveće iskorištenje u prvom eksperimentu dobiveno je za lidokain u acetonu (97%). Pošto je cilj eksperimenta pronaći optimalne uvjete ekstrakcije za svih 8 ispitivanih farmaceutika u ovom eksperimentu metanol se pokazao kao najbolje otapalo. Za drugi eksperiment odlučeno je da se ultrazvučna ekstrakcija provodi pod istim eksperimentalnim uvjetima sa svim otapalima ali da se radi s 5 g uzorka kako bi se vidio utjecaj mase uzorka na ekstrakciju. Međutim drugi eksperiment (slika 17) dao je znatno lošije rezultate od prvog eksperimenta - albendazol nije identificiran niti u jednom otapalu, a prokain i tilozin identificirani su u vodi, etanolu i metanolu, odlučeno je da se daljnje eksperimente provodi s jednim gramom uzorka. Ujedno zbog loših iskorištenja i u prvom i u drugom eksperimentu iz daljnjih eksperimenata odbačeni su aceton i diklormetan.



Slika 17. Grafički prikaz iskorištenja u 1 i 2 eksperimentu
 [Eksperiment 1. 30 minuta/30 °C/600 W/1g
 Eksperiment 2. 30 minuta/30 °C/600 W/5g]

Trećim eksperimentom htjelo se provjeriti da li duljina kontakta pojedinog otapala sa sedimentom prije ultrazvučne ekstrakcije utječe na ekstrakciju ispitivanih farmaceutika iz sedimenta. Stoga su u trećem eksperimentu čista otapala ostavljena u kontaktu s 1 g uzorka sedimenta 24 sata, a potom je provedena ultrazvučna ekstrakcija otapalima pod istim uvjetima rada kao i u prvom i u drugom eksperimentu. Na slici 18 prikazana su iskorištenja dobivena nakon što je uzorak direktno stavljen na ultrazvučnu ekstrakciju i nakon što je uzorak sedimenta bio 24 sata u kontaktu s otapalom. Metanol se opet pokazao kao najbolje otapalo za svih osam ispitivanih farmaceutika i nakon duljeg kontakta otapala sa sedimentom (24 sata), pri čemu je bolja iskorištenja u odnosu na prethodne eksperimente dao dioksan i to za levamisol (74%) i lidokain (90%), te acetonitril koji je dao bolja iskorištenja za svih osam farmaceutika. Međutim gledajući svih osam farmaceutika generalno može se zaključiti da se nakon 24 satnog kontakta otapala sa sedimentom ne povećavaju značajno iskorištenja, pa su daljnji eksperimenti provedeni bez duljeg kontakta otapala sa sedimentom.

Obzirom da niti jedno otapalo nije dalo generalno rješenje za svih osam farmaceutika, za daljnje eksperimente uzeta su otapala koja su dala najbolje rezultate za pojedine farmaceutike, odnosno grupe farmaceutika, a to su metanol, voda i dioksan.



Slika 18. Grafički prikaz iskorištenja za različita otapala
 Eksperiment 1. 30 minuta/30 °C/600 W/1g
 Eksperiment 3. 30 minuta/30 °C/600 W/1g/24 sata

4.2. Izbor vremena trajanja ekstrakcije

U sljedećim eksperimentima ultrazvučna ekstrakcija otapalima provodila se korištenjem čistih otapala: metanol (MeOH), voda (H₂O) i dioksan (DIO) koji su u prethodnim eksperimentima dali najbolje rezultate, te se pratio utjecaj trajanja ekstrakcije na iskorištenje.

Pregled napravljenih eksperimenata s navedenim otapalima su:

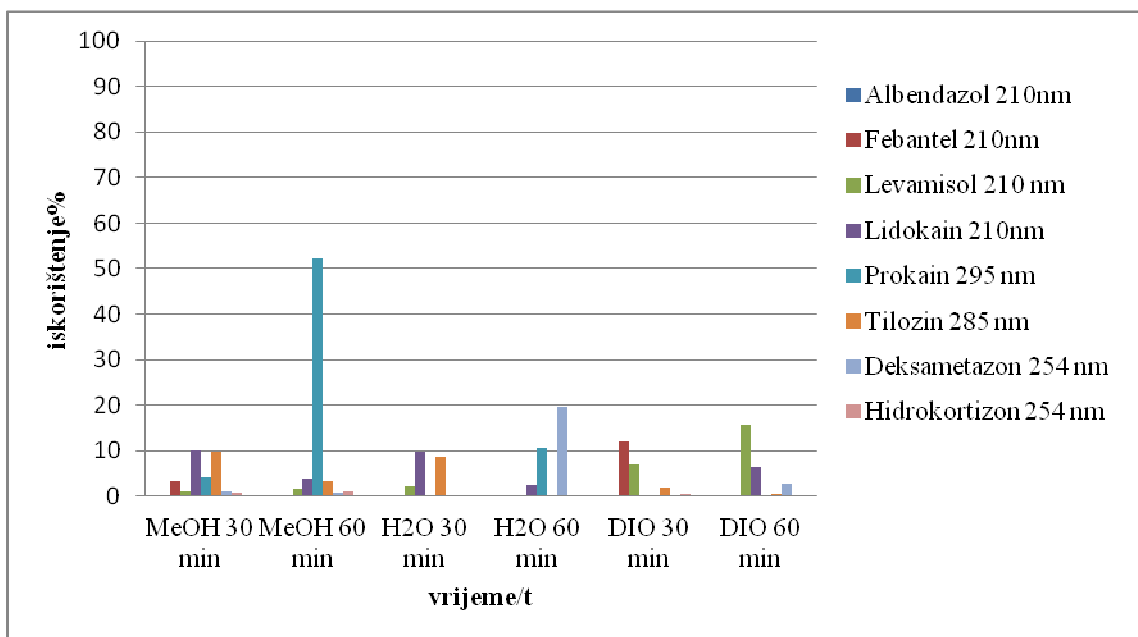
Eksperiment 4a. 30 minuta/30 °C/600 W/24 sata

Eksperiment 4b. 60 minuta/30 °C/600 W/24 sata

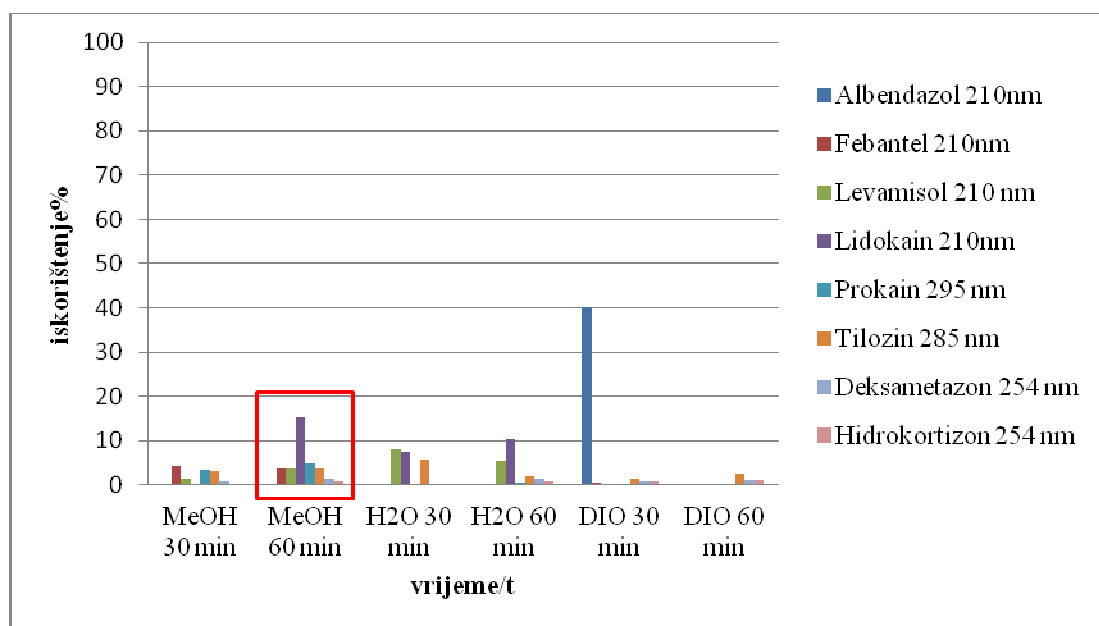
Eksperiment 4c. 30 minuta/30 °C/600W

Eksperiment 4d. 60 minuta/30 °C/600W

Slika 19 prikazuje iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije ispitivanih farmaceutika dobivenih nakon što se ekstrakcija provodila u trajanju od 30 i 60 minuta, a duljina kontakta čistih otapala sa sedimentom bila je 24 sata. Na slici 19 jasno se vidi da vrijeme kontakta između otapala i sedimenta bitno ne utječe na povećanje iskorištenja ekstrakcije provedenima s čistim otapalima kao što je i ranije već zaključeno, a najbolje dobiveni su metanolom za vrijeme trajanja ekstrakcije 30 minuta, no niti to nije bilo zadovoljavajuće obzirom na dobivena vrlo loša iskorištenja.



Slika 19. Grafički prikaz iskorištenja
 [Eksperiment 4a. 30 minuta/30 °C/600 W/24 sata
 Eksperiment 4b. 60 minuta/30 °C/600 W/24 sata]



Slika 20. Grafički prikaz iskorištenja
 [Eksperiment 4c. 30 minuta/30 °C/600W
 Eksperiment 4d. 60 minuta/30 °C/600W]

Iz grafičkog prikaza na slici 20 može se zaključiti da je najbolje iskorištenje ekstrakcije za sve ispitivane farmaceutike postignuto čistim otapalom metanolom pri vremenu trajanja ekstrakcije 60 minuta, pri čemu je otapalo direktno stavljeno na ultrazvučnu ekstrakciju bez

24 satnog kontakta. Na temelju dobivenih loših iskorištenja za gotovo sve farmaceutike s čistim otapalima (>50%), bez obzira na duljinu kontakta sa sedimentom i vremena trajanja ekstrakcije odlučeno je prema literaturnim izvorima raditi sa smjesama otapala.

Izabrani sustavi smjese otapala prema literaturi su sljedeći: MeOH:ACN, MeOH:H₂O, MeOH:DIO, i to u udjelima 50:50 i čisto otapalo Komplekson III. Time se željelo vidjeti da li će se povećati iskorištenje ekstrakcije ako se iskoriste dobra svojstva pojedinih otapala u kombinaciji.

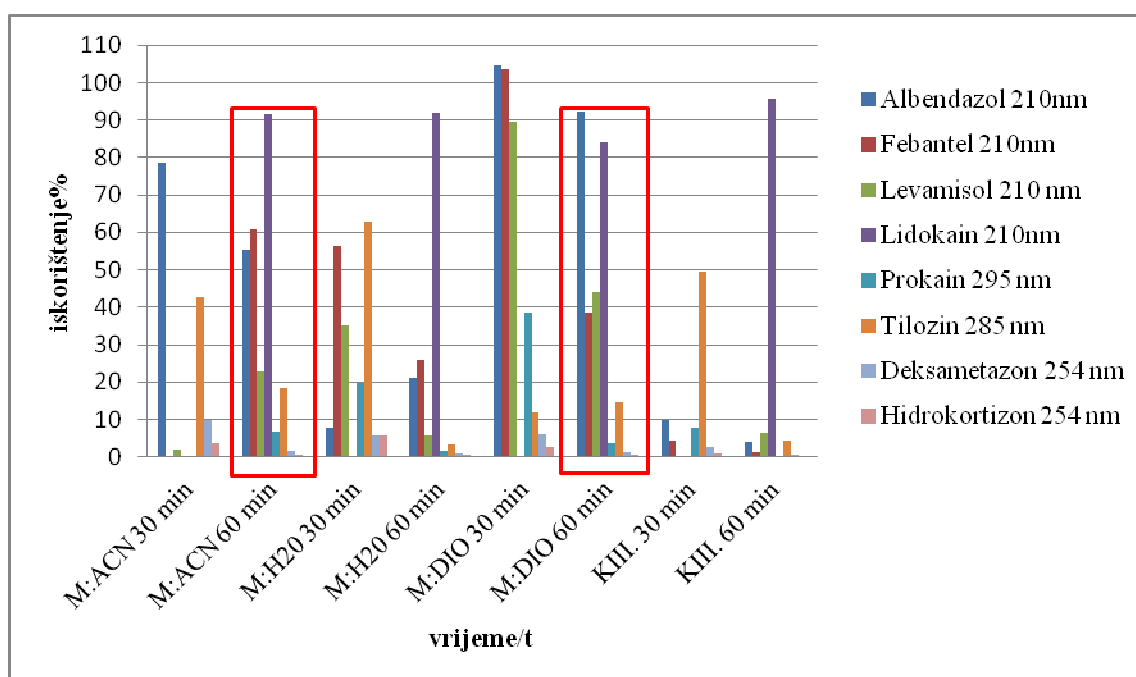
Pregled napravljenih eksperimenata sa navedenim smjesama otapala su:

Eksperiment 5. 30 minuta/30 °C/600 W

Eksperiment 6. 60 minuta/30 °C/600 W

Eksperiment 7. 30 minuta/30° C/ 1200 W

Eksperiment 8. 60 minuta/30° C/ 1200 W

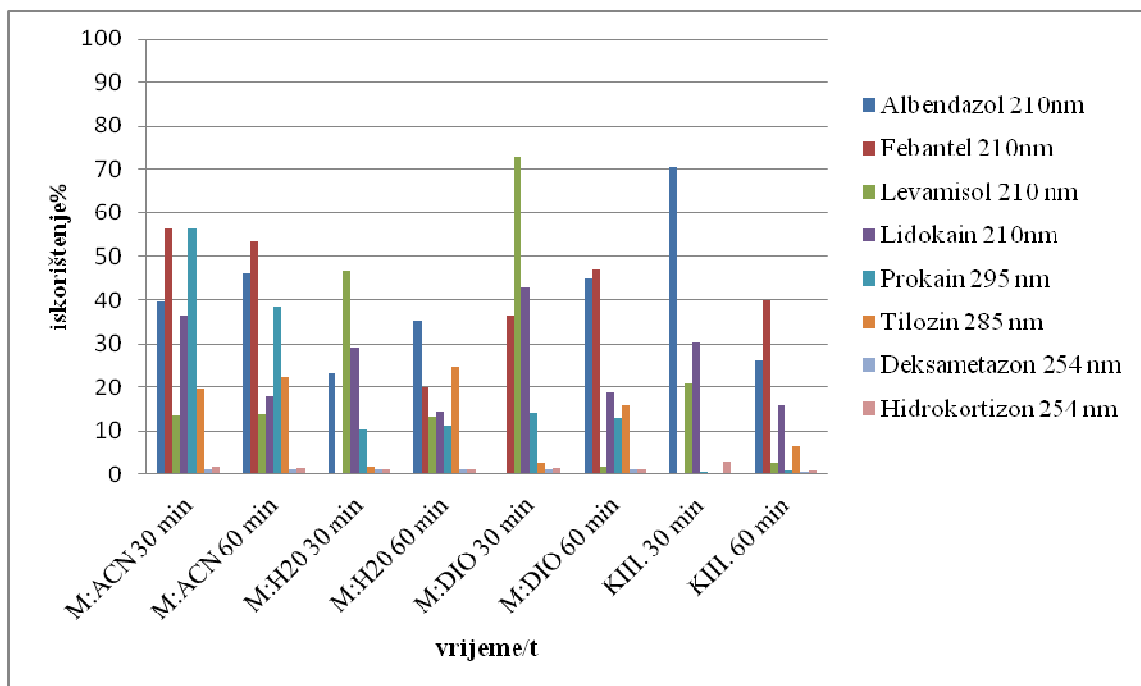


Slika 21. Grafički prikaz iskorištenja za različite smjese otapala

[Eksperiment 5. 30 minuta/30 °C/600 W
Eksperiment 6. 60 minuta/30 °C/600 W]

Iz grafičkog prikaza na slici 21 vide se znatna povećanja iskorištenja ekstrakcije korištenjem smjesa otapala kod snage ultrazvučne kupelji od 600 W i kao optimalna smjesa pokazala se MeOH:ACN, ali podjednako dobre rezultate dala je i smjesa MeOH:DIO. Albendazol (104%), febantel (103%) i levamisol (89%) u smjesi MeOH:ACN imaju najveća iskorištenja.

Lidokain u svim smjesama otapala dao je iskorištenja preko 150% s vrijednostima relativnog standardnog odstupanja $RSD=\pm 15\%$ što može biti rezultat vezanja nekog spoja iz matice uzorka. Potrebno je napomenuti da je zadana temperatura ultrazvuka bila $30\text{ }^{\circ}\text{C}$, ali je ultrazvuk radio na temperaturi od $36\text{ }^{\circ}\text{C}$ zbog visoke temperature u laboratoriju i nemogućnosti hlađenja ultrazvučne kupelji.

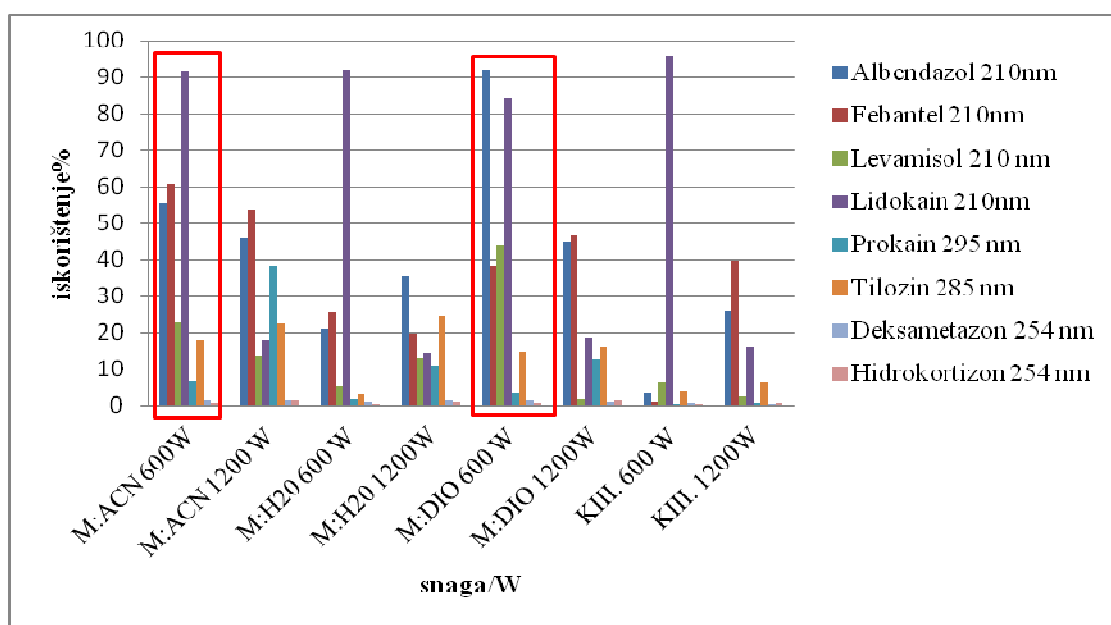


Slika 22. Grafički prikaz iskorištenja
 [Eksperiment 7. 30 minuta/ 30°C / 1200 W
 Eksperiment 8. 60 minuta/ 30°C / 1200 W]

Slika 22 prikazuje iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije ispitivanih farmaceutika pri snazi ultrazvučne kupelji od 1200 W kod različitih vremena trajanja ekstrakcije. Povećanjem vremena trajanja ekstrakcije na 60 minuta postignuti su bolji rezultati bez obzira na snagu ultrazvučne kupelji. Iskorištenja farmaceutika su se povećala u svim smjesama, što znači da povećanje vremena trajanja ekstrakcije pri većoj snazi ultrazvučne kupelji bitno utječe na poboljšanje rezultata provedenih eksperimenata. Najveća iskorištenja postignuta su u smjesi MeOH:ACN (albendazol 47%, febantel 53%) sa zadovoljavajućim relativnim standardnim odstupanjima (albendazol $RSD=\pm 5\%$, febantel $RSD=\pm 4\%$).

4.3. Izbor snage i temperature ultrazvučne kupelji

Sljedećim eksperimentima nastojalo se utvrditi da li će promjena snage ultrazvučne kupelji utjecati na dobivanje boljih rezultata kada se koriste smjese otapala (slika 23). Smjese MeOH:ACN i MeOH:DIO dale su najbolje rezultate pri radu ultrazvučne kupelji snagom 600 W za svih osam ispitivanih farmaceutika.



Slika 23. Grafički prikaz iskorištenja
Eksperiment 6. 60 minuta/30 °C/600 W
Eksperiment 8. 60 minuta/30 °C/1200 W

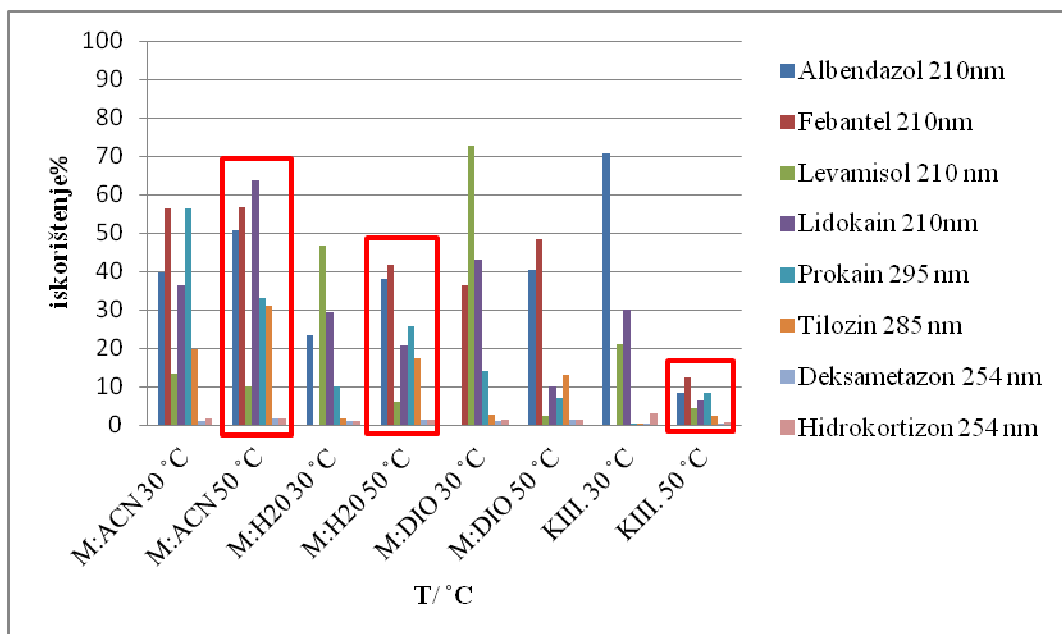
U posljednjem nizu eksperimenata ispitivan je utjecaj temperature na djelotvornost ultrazvučne ekstrakcije za smjesu otapala. Ekstrakcija je provedena na dvije različite temperature: 30 °C i 50 °C.

Pregled provedenih eksperimenata za smjese otapala su:

Eksperiment 7. 30 minuta/30 °C/1200 W

Eksperiment 9. 30 minuta/50 °C/1200 W

Iz grafičkog prikaza dobivenih rezultata na slici 24 možemo zaključiti da povećanjem temperature dolazi do povećanja iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije ispitivanih farmaceutika, a bitno bolja iskorištenja u odnosu na prethodne eksperimente dao je i Komplekson III.



Slika 24. Grafički prikaz iskorištenja
 [Eksperiment 7. 30 minuta/30 °C/1200 W
 Eksperiment 9. 30 minuta/50 °C/1200 W]

Na osnovu provedenih eksperimenata, optimalni uvjeti ultrazvučne ekstrakcije otapalom ispitivanih farmaceutika (albendazol, febantel, levamisol, lidokain, prokain, tilozin, deksametazon i hidrokortizon) iz sedimenta postignuti su šestim eksperimentom (slika 23). Najlošija iskorištenja u svim eksperimentima dali su hidrokortizon (1-5%) i deksametazon (0-5%). U tablici 16 navedene su vrijednosti iskorištenja ispitivanih farmaceutika u navedenom (šestom) eksperimentu.

Tablica 16. Vrijednosti iskorištenja ispitivanih farmaceutika u 6. eksperimentu (60 minuta/30 °C/600 W)

Otapalo/mL	Iskorištenje, %							
	ALBE	FEBA	LEVA	LIDO	PRO	TILO	DEKSA	HIDRO
M:ACN	55,45	60,62	22,89	91,54	6,73	18,21	1,55	0,69
M:H2O	21,12	25,75	5,58	92,04	1,72	3,35	0,98	0,55
M:DIO	92,1	38,53	44,1	84,11	3,68	14,66	1,31	0,63
KIII.	3,85	1,22	6,57	95,65	0,38	4,24	0,62	0,28

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu pokušao se optimirati postupak ultrazvučne ekstrakcije otapalima osam farmaceutika iz sedimenta "Kupirovo". Ispitan je utjecaj mase sedimenta, vremena trajanja ekstrakcije, temperature i snage ultrazvučne kupelji. Prije svega određeni su kromatografski uvjeti radi određivanja ispitivanih farmaceutika. Na temelju provedenih eksperimenata zaključeno je:

1. Kromatografskim ispitivanjima utvrđeno je da se najbolja separacija ispitivanih farmaceutika postigla kolonom: InterSustain TM C18 (250mm x 4,6mm, 5mikrom) GL Sciences Inc. Japan, te su optimalni uvjeti kromatografskih ispitivanja postignuti korištenjem pokretne faze s gradijentom navedenom u tablici 15 uz protok od 0,7 mL/min.

2. Obzirom na provedene eksperimente s nizom čistih organskih otapala utvrđeno je da se najbolji rezultati dobivaju uporabom čistog metanola, još bolja iskorištenja ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika dobivaju se kombiniranjem metanola s acetonitrilom i dioksanom.

3. Utvrđeno je da se povećanjem mase sedimenta ne povećava iskorištenje ultrazvučne ekstrakcije farmaceutika, stoga su sva ispitivanja provedena s 1 g uzorka sedimenta.

4. Eksperimenti su pokazali da 24 satni kontakt otapala sa sedimentom ne povećava iskorištenje ultrazvučne ekstrakcije bez obzira da li se radi sa čistim otapalima ili njihovom smjesom. Međutim, bolja iskorištenja se dobivaju duljim trajanjem same ultrazvučne ekstrakcije (60 min) bez obzira na snagu rada ultrazvučne kupelji. Čak štoviše za neke ispitivane farmaceutike bolja iskorištenja su dobivena kod manje snage ultrazvučne ekstrakcije.

5. Najbolji uvjeti rada ultrazvučne ekstrakcije ispitivanih farmaceutika iz sedimenta na temelju svih provedenih eksperimenata postignuti su u šestom eksperimentu smjesom otapala metanol:acetonitril=50:50, v/v pri uvjetima rada ultrazvučne kupelji: 60 minuta/30 °C/600 W bez prethodnog duljeg kontakta smjese otapala sa sedimentom.

Obzirom na relativno loša iskorištenja trebalo bi ispitati utjecaj pH otapala i primijeniti puferske otopine kao otapala za ekstrakciju u kombinaciji s organskim otapalima, osobito za hidrokortizon i deksametazon koji su uvijek imali iskorištenja manja od 10% što se može objasniti i značajno različitim njihovim molekulskim strukturama spram ostalih farmaceutika.

6. LITERATURA

- [1] B. Roig, *Pharmaceuticals in the Environment*, IWA Publishing, 2010, str. 1-9
- [2] M. Silvia Diaz-Cruz, M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo, Environmental behavior and analysis of veterinary and human drugs in soils, sediments and sludge, *TrAC-Trends in Analytical Chemistry*, 22 (2003), str. 340
- [3] K. Kummerer, *Pharmaceuticals in the Environment*, Springer, 2004, str. 1-10
- [4] N. T. Crosby, *Determination of veterinary residues in food*, Woodhead Publishing Limited, 2007, str. 240-245
- [5] R. A. Harvey, P. C. Champe, *Pharmacology*, The Point, 2009, str. 560-571
- [6] J. Keegan, M. Whelan, M. Danaher, S. Crooks, R. Sayers, A. Anastasio, C. Elliott, D. Brandon, A. Furey, R. O'Kennedy, Benzimidazole carbamate residues in milk, Detection by Surface Plasmon Resonance biosensor, using a modified QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe) method for extraction, *Analytica Chimica Acta*, 654 (2009), str. 111
- [7] R. K. Oldham, R. O. Dillman, *Principles of Cancer Biotherapy*, Springer, 2009, str. 645-659
- [8] H. S. Dolliver, *Fate and Transport of Veterinary Antibiotics in the Environment*, UMI, 2007, str. 8-11
- [9] K. L. D. Henderson, *Impact of Veterinary Antibiotics in Environment*, UMI, Iowa State University, 2008, str. 142
- [10] G. A. Contreras, The use of Tylosin to treat intramammary infections during the non-lactating period of heifers and dairy cows, UMI, 2008, str. 15
- [11] J. Schuttler, H. Schwilden, *Modern Anesthetics*, Springer, 2008, str. 4-8
- [12] J. E. Riviere, M. G. Papich, *Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, WILEY-BLACKWELL, 2009, str. 586
- [13] D. Shi, *Nanoscience in Biomedicine*, Springer, 2009, str. 231
- [14] F. T. Cannizzo, P. Capra, S. Divari, V. Ciccotelli, B. Biolatti, M. Vincentic: Effects of low -dose dexamethasone and prednisolone long term administration in beef calf: Chemical and morphological investigation, *Analytica Chimica Acta* 700 (2010), str. 95
- [15] WHO, *Evaluation of certain veterinary drug residues in food*, WHO, 2009, str. 29
- [16] S. N. Koch, S. M. F. Torres, D. C. Plumb, *Canine and Feline Dermatology Drug Handbook*, Wiley Blackwell, 2012, str. 236-240
- [17] D. E. Raynie: *Extraction*, The Procter & Gamble Company, Cincinnati, OH, USA, *Academic Press* (2000), str. 118
- [18] H. Drmić, A. Režek Jambrak: *Ultrazvučna ekstrakcija bioaktivnih spojeva*, Prehrambeno-biotehnološki fakultet, Zagreb, 2010, str 45
- [19] J. R. Dean, *Extraction Techniques in Analytical Sciences*, WILEY, 2009, str. 49-53
- [20] R. K. Jyothi, Jin-Young Lee, *Liquid-Liquid Extraction*, VDM Verlag , 2010, str. 56

- [21] P. A. Rock, Chemical Thermodynamics, University Science Bodes, 2003, str. 253
- [22] D. Samaržija, N. Antunac: Važnost dokazivanja prisutnosti antibiotičkih ostataka u mlijeku, *Mljekarstvo*, 52 (2002), str. 61
- [23] V. Lopez-Avila: Microwave-Assisted Extraction, Midwest Research Institute, Cupertino, CA, USA, *Academic Press* (2000), str. 1389
- [24] S. Mitra, Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry, WILEY Interscience, 2003, str. 148–154
- [25] D. L. Luthria, Oil Extraction and Analysis, AOCS Books and Special Publication Committee, 2004, str.23
- [26] M. Brnčić, B. Tripalo, A. Penava, D. Karlović, D. Ježek, D. Vikić Topić, S. Karlović, T. Bosiljkov: Primjena ultrazvuka visokog intenziteta pri obradi hrane, *Hrvatski časopis za prehrambenu tehnologiju, biotehnologiju i nutricionizam*, str. 32-37
- [27] D. Drljača: Ultrazvučna ekstrakcija farmaceutski aktivnih tvari iz sedimenta, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009, str 30-42
- [28] M. Kaštelan-Macan, Kemijska analiza u sustavu kvalitete, Školska knjiga, Zagreb, 2003, str. 217-237
- [29] S. Ahuja, M. W. Dong, Handbook of Pharmaceuticals Analysis by HPLC, Elsevier Inc, USA, 2005, str. 145
- [30] A. Braithwaite, F. J. Smith, Chromatographic Methods, Kluwer Academic Publishers, Norwell, 2002, str. 258-261
- [31] H. J. Kim, Advantages of Photo Diode Array for UV-Vis spectrophotometer, *Lab Asia* 11, 2004, str. 27-28
- [32] L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. W. Dolan, Introduction to Modern Liquid Chromatography, Wiley, New Jersey, 2011, str. 256-278
- [33] M. W. Dong, Modern HPLC for practicing Scientist, Wiley Interscience , 2006, str. 91
- [34] 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 & Bioanalytical Chemistry* 398 (2010), 1188

7. POPIS KRATICA

$A_{i,E}$ – površina kromatografske krivulje analita iz ekstrakta

$A_{i,STD}$ - površina kromatografske krivulje analita u standardnoj otopini

ATP – adenzin-trifosfat

DAD – detektor s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*)

DNK – deoksiribonukleinska kiselina

HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

I – iskorištenje ekstrakcije

K_{oa} – koeficijent raspodjele n-oktanol/zrak

K_{oc} – koeficijent adsorpcije

K_{ow} – koeficijent raspodjele n -oktanol/voda

S_w – topljivost u vodi (mg/L) kod 25 °C

8. ŽIVOTOPIS

IVONA KASELJ

Rođena sam 9. rujna 1990. godine u Livnu, Bosna i Hercegovina. Osnovnu školu Ivan Goran Kovačić i Opću Gimnaziju (2005.-2009.) pohađala sam u Livnu. 2008. godine sudjelovala sam u programu međunarodne razmjene učenika u Washingtonu, USA. Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu, studij Ekoinženjerstvo upisala sam 2009. godine. Stručnu praksu odradila sam u farmaceutskoj industriji Pliva Hrvatska d.o.o. u laboratoriju Kontrola kvalitete. Na " Festivalu znanosti " 2012. godine sudjelovala sam u radionici " Organske molekule" prof. Raosa. Pod mentorstvom dr. sc. Danijele Ašperger, doc. radila sam znanstveni rad pod nazivom " Karakterizacija žica folklornih instrumenata tankoslojnom kromatografijom ", koji je prijavljen za dodjelu Rektorove nagrade u 2012. godini, s kojim sam također sudjelovala u znanstvenom dijelu " Tehnologijade ", održane u Umagu 2012. godine. U sklopu Erasmus programa 2012./2013. sudjelovati ću u razmjeni studenata na University Pierre and Marie Curie (UPMC) Sorbonne, Pariz, Francuska.

Od stranih jezika koristim se engleskim i njemačkim u govoru i pismu. U radu na računalu koristim Microsoft Word, Excel, PowerPoint, te programske pakete Mathematica, Matlab i Scientist.