

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Mia Gotovuša

**FOTOKATALITIČKA RAZGRADNJA DIAZEPAMA S
IMOBILIZIRANIM TiO₂**

Zagreb, 2019.

Ovaj rad izrađen je na Zavodu za analitičku kemiju Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu pod vodstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2018./2019.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	2
2.1. Farmaceutici.....	2
2.1.1. Pojava farmaceutika u vodenom okolišu	2
2.1.2. Sudbina farmaceutika u vodenom okolišu.....	3
2.1.3. Benzodiazepini	4
2.1.3.1. Podjela Benzodiazepina	4
2.1.4. Diazepam	5
2.1.4.1. Djelovanje diazepama	6
2.2. Postupci uklanjanja farmaceutika iz okoliša.....	7
2.2.1. Primjena Sunčevog zračenja u pročišćavanju i dezinfekciji vode.....	7
2.2.1.1. Utjecaj ultraljubičastog zračenja na pročišćavanje vode.....	8
2.2.1.2. Utjecaj infracrvenog zračenja na pročišćavanje vode	8
2.2.2. Napredni oksidacijski procesi	9
2.2.2.1. UV-zračenje	10
2.2.2.2. Fotoliza.....	11
2.2.2.2.1. Fotoliza H ₂ O ₂ uz UV-zračenje	11
2.2.2.3. Kinetika razgradnje farmaceutika u vodenom okolišu.....	13
2.3. Heterogena kataliza.....	14
2.3.1. Fotokataliza.....	14
2.3.2. Fotokatalizatori	17
2.3.2.1. Titanijev dioksid (TiO ₂)	18
2.4. Toksičnost farmaceutika	20
3. EKSPERIMENTALNI DIO	22
3.1. Materijali.....	22
3.1.1. Kemikalije.....	22
3.1.2. Farmaceutski aktivna tvar – diazepam	22
3.2. Instrumenti	23
3.2.1. Analitička vaga	23
3.2.2. Fotokatalitički reaktor.....	24
3.2.3. Pumpa	25
3.2.4. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti	26
3.3. Opis rada	26
3.3.1. Priprema standardnih otopina diazepama	26
3.3.2. Fotoliza diazepama	27
3.3.3. Fotokatalitička razgradnja diazepama	27
3.3.3.1. Priprema mrežica s imobiliziranim TiO ₂	27
3.3.3.2. Fotokatalitička razgradnja diazepama u prisutnosti imobiliziranog TiO ₂	28

3.3.3.3. Fotokatalitička razgradnja diazepama u prisutnosti imobiliziranog TiO ₂ i otopine H ₂ O ₂	28
3.3.4. Analiza uzoraka pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC)	28
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	30
4.1. Fotolitička razgradnja diazepama	33
4.2. Fotokatalitička razgradnja diazepama.....	34
4.3. Identifikacija produkata fotolitičke i fotokatalitičke razgradnje diazepama.....	41
4.4. Određivanje toksičnosti farmaceutika diazepama	55
5. ZAKLJUČAK.....	57
6. ZAHVALA	58
7. LITERATURA	59
8. SAŽETAK	63
9. ABSTRACT.....	64
10. ŽIVOTOPIS.....	65

1. UVOD

Povećanjem broja stanovnika, razvojem industrije te sveopćim napretkom civilizacije, ljudski pritisak na okoliš, iz dana u dan, sve je veći. Istražuju se ili otkrivaju nove aktivne kemijske tvari koje služe liječenju živog – ljudskog, životinjskog ili biljnog svijeta pa je upotreba farmaceutika, od analgetika, preko antibiotika, anestetika, do antidepresiva i drugih lijekova u stalnom porastu, kao i primjena medikamenata u veterinarskoj medicini. Nadalje, razvojem agrikulture, raste upotreba agrokemikalija – pesticida, insekticida, fungicida i ostalih – koje služe tretiranju, odnosno liječenju ili prevenciji bolesti uzrokovanih biljnim nametnicima. Ovime, direktnim ili indirektnim putem, različiti kemijski spojevi dospijevaju u okoliš te se u njemu zadržavaju.

Osobnom konzumacijom lijekova, ljudi putem komunalnog otpada ispuštaju brojne farmaceutike u okoliš, koji time mogu dospjeti u tlo ili vodu, utječući na ekosustave na nepredvidiv i potencijalno opasan način. Pod utjecajem uvjeta kojima je izložen, farmaceutik u okolišu podliježe različitim procesima razgradnje, a novonastali razgradni produkti, ovisno o svojoj toksičnosti, mogu imati štetne učinke na prirodne prijamnike.

Izuzev individualne primjene i ispuštanja putem komunalnih otpadnih voda, farmaceutici u okoliš najčešće dospijevaju kroz otpadne industrijske tokove. Glavni problem koji se uz to veže pojava je toksičnih spojeva u vodenom okolišu i zagađenje izvora pitke vode. S obzirom da su zalihe pitke vode s vremenom sve manje i manje, od egzistencijalne je važnosti pronaći adekvatne postupke obrade otpadnih voda, koji će vodu dezinficirati i obnoviti, pritom ne stvarajući nove štetne razgradne nusprodukte.

S tim je ciljem pristupljeno izradi ovog rada, kojim se istražuje fotokatalitička razgradnja farmaceutika diazepama u prisutnosti titanijeva dioksida kao katalizatora. Naime, heterogena fotokataliza te napredni oksidacijski procesi pokazali su se boljom alternativom u odnosu na klasične procese razgradnje, gdje je dokazano da uslijed remedijacije otpadnog toka dolazi do nastanka novih opasnih zagađivala. Također, kako bi se utvrdila sudbina ovog farmaceutika kada je izložen UV-zračenju, analizirana je njegova toksičnost te produkti njegove razgradnje.

2. OPĆI DIO

2.1. Farmaceutici

2.1.1. Pojava farmaceutika u vodenom okolišu [1]

Vodeni mediji, poput površinskih voda, otpadnih voda, podzemnih voda te vode za piće, mjesta su kojima se u posljednje vrijeme pridaje veća pažnja, uslijed detekcije farmaceutski aktivnih supstanci. Iako su uočene koncentracije reda nanograma ili mikrograma po litri, one predstavljaju ozbiljnu prijetnju okolišu te ljudima, ukoliko se nađu u pitkoj vodi. Iz toga se razloga provode brojna istraživanja na polju analitičke kemije koja daju uvid u ponašanje farmaceutika izloženih okolišnim uvjetima, a spomenuta istraživanja poticana su i od strane Svjetske zdravstvene organizacije (*engl.* WHO¹). Njihov cilj je utvrditi sudbinu i pojavu farmaceutika u vodi, mjeru u kojoj su ljudi izloženi mogućnosti pojave farmaceutika u pitkoj vodi te potencijalni rizik za zdravlje, kao i načine uklanjanja farmaceutika tijekom obrade otpadnih industrijskih voda te pripreme vode za piće.

Slikom 1. shematski su predloženi raznoliki putevi kojima farmaceutici dospijevaju u okoliš, odnosno prijete zagađenju pitke vode.



Slika 1. Putevi dospijevanja farmaceutika u prirodne vode (prilagođeno prema referenci [1])

Predložene rute kojima farmaceutici dospijevaju u okoliš uključuju ljudske ili životinjske izlučevine, otpadne vode, tretirani kanalizacijski mulj, industrijski otpad, medicinski otpad iz zdravstvenih i veterinarskih ustanova, odlagališne procjedne vode i drugo.

Istraživanja su pokazala da koncentracija farmaceutika pronađenih u površinskim vodama, podzemnim vodama te djelomično obrađenim vodama uglavnom iznosi manje od 0,1 µg/L, odnosno 100 ng/L, dok su koncentracije farmaceutika u potpuno obrađenim vodama obično ispod 0,05 µg/L (50 ng/L).

¹ World Health Organization

Farmaceutici se u okolišu, tako, često pojavljuju u tragovima te prolaze prirodne procese adsorpcije, razrjeđivanja i razgradnje, ovisno o vlastitoj hidrofobnosti i biorazgradljivosti na određenoj temperaturi.

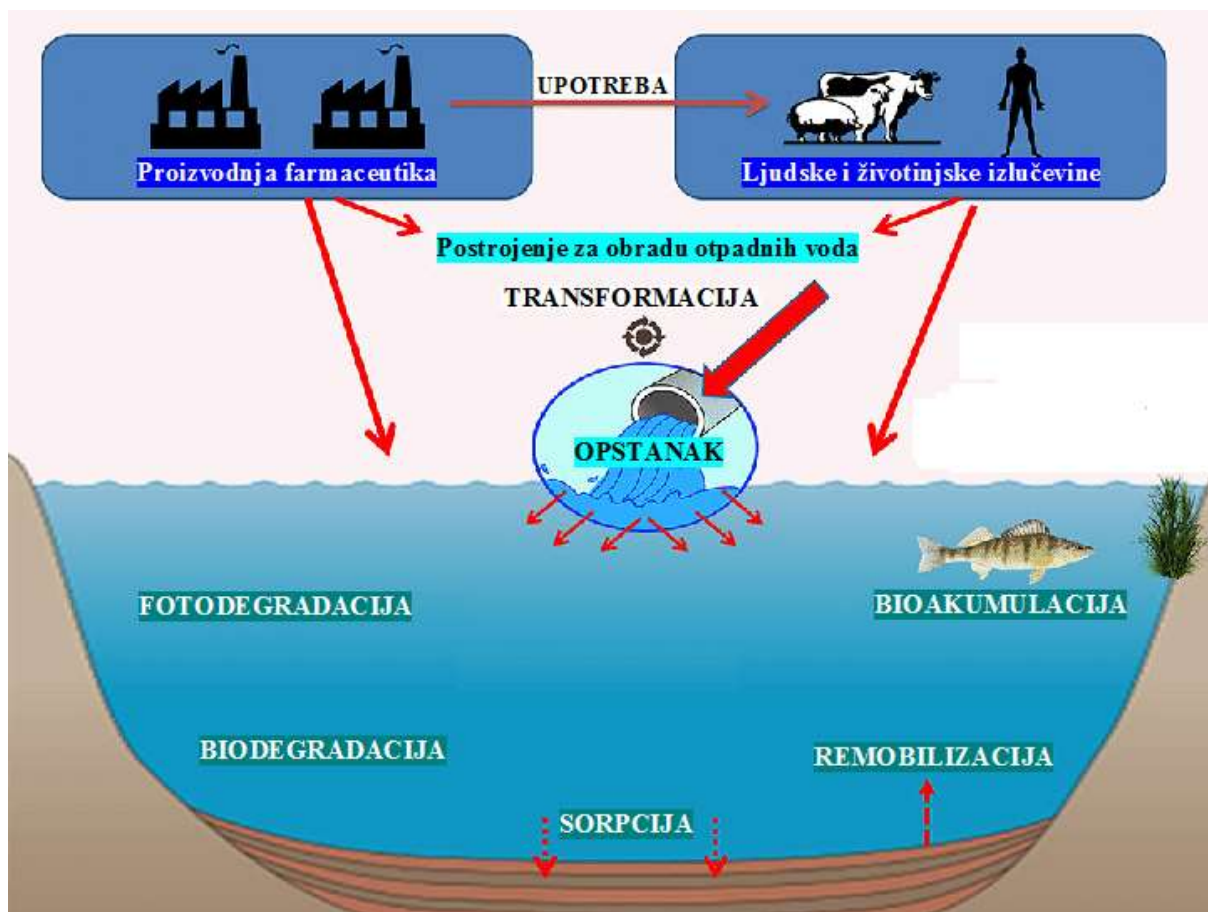
2.1.2. Sudbina farmaceutika u vodenom okolišu

Jednom ispušteni u okoliš, farmaceutici podliježu različitim procesima razgradnje. Disipacija farmaceutika u vodenom okolišu kontrolirana je različitim razgradnim mehanizmima. Glavnim procesima su se pokazali oni koji uključuju aerobnu i anaerobnu biorazgradnju i abiotičku transformaciju, odnosno razgradnju pod utjecajem UV-zračenja, hidrolizom ili, pak, sorpcijom na sediment. Intenzitet pojedinog od prethodno navedenih procesa ovisit će o fizikalno-kemijskim svojstvima određenog farmaceutika, kao i o karakteristikama okoliša u kojem se taj farmaceutik našao. [2]

Hidroliza, fotoliza te sedimentacija primjeri su abiotičkih transformacija lijekova u površinskoj ili otpadnoj vodi. Većina je farmaceutskih tvari, međutim, otporna na hidrolizu što čini ovu razgradnu reakciju zanemarivom kad je u pitanju većina lijekova u humanoj medicini. S druge strane, izravna i neizravna fotoliza primarni su putevi abiotičke transformacije farmaceutika u površinskim vodama. Izravna je fotoliza rezultat direktne apsorpcije Sunčeva zračenja, dok neizravna fotoliza uključuje primjenu prirodnih fotosenzibilizatora. [2]

Istraživanja na temu sudbine farmaceutika u okolišu pokazala su kako se ponašanje pojedinih farmaceutika može svrstati u tri glavne skupine. Aspirin je, primjerice, farmaceutik koji pripada skupini koja, ispuštena u okoliš, podliježe mineralizaciji do ugljikova dioksida i vode. Drugu skupinu čine one farmaceutski aktivne tvari koje su lipofilne i nisu lakorazgradive u vodi, čime zaostaju u mulju. Naposljetku, postoje i oni spojevi koji se metabolitičkim procesima razgrade do oblika koji je hidrofilniji od lipofilnog matičnog spoja, međutim još uvijek dovoljno postojan da prođe procese obrade otpadnih voda te dospije u prirodne prijamnike. S obzirom da se otpadne vode uglavnom ispuštaju u rijeke, neuklonjeni spojevi mogu utjecati na vodene organizme ukoliko su zaostali metaboliti biološki aktivni. Pojava ovih spojeva u mulju, time, dovodi do negativnog učinka na korisne mikroorganizme te sav živi svijet u prirodnom staništu. [2]

Shematski prikaz procesa razgradnje kojima podliježu farmaceutici ispušteni u vodeni okoliš dan je u nastavku Slikom 2.



Slika 2. Shematski prikaz izvora i sudbine farmaceutika u okolišu (prilagođeno prema referenci [3])

2.1.3. Benzodiazepini

Benzodiazepini su psihoaktivni lijekovi koji pomažu opuštanju mišića i ublažavanju tjeskobe, nesаницe, napadaja i simptoma odvikavanja od alkohola. Temelj njihova djelovanja promjena je učinka kemijskog glasnika ili neurotransmitera pod imenom gama-aminobutirna kiselina (GABA). [4]

2.1.3.1. Podjela Benzodiazepina [5]

Farmaceutici koji spadaju u ovu skupinu lijekova razlikuju se po brzini početka djelovanja, duljini djelovanja te namjeni za koju se propisuju.

U nastavku su dane tablice s nabrojanim farmaceuticima iz skupine benzodiazepina te njihovim karakterističnim vremenima ili načinom djelovanja.

Tablica 1. Vrijeme početka djelovanja nekih farmaceutika iz skupine benzodiazepina

Farmaceutik	Početak i duljina djelovanja
diazepam (<i>Valium</i>) i klorazepat (<i>Tranxene</i>)	početak unutar 30 do 60 minuta
oxazepam (<i>Serax</i>)	spor početak
lorazepam (<i>Ativan</i>), alprazolam (<i>Xanax</i>) i klonazepam (<i>Klonopin</i>)	srednji početak
klorazepat (<i>Tranxene</i>), midazolam (<i>Versed</i>) i triazolam (<i>Halcion</i>)	kratkotrajno djelovanje od 3 do 8 sati
alprazolam (<i>Xanax</i>), lorazepam (<i>Ativan</i>), estazolam (<i>Prosom</i>) i temazepam (<i>Restoril</i>)	srednjedjelujući agensi s trajanjem djelovanja od 11 do 20 sati
klordiazepoksid (<i>Librium</i>), klonazepam (<i>Klonopin</i>), diazepam (<i>Valium</i>), flurazepam (<i>Dalmane</i>) i quazepam	dugodjelujući agensi s trajanjem djelovanja od 1 do 3 dana

Tablica 2. Namjena nekih od farmaceutika iz skupine benzodiazepina

Farmaceutik	Namjena
alprazolam (<i>Xanax</i>), klordiazepoksid (<i>Librium</i>), klorazepat (<i>Tranxene</i>), diazepam (<i>Valium</i>), lorazepam (<i>Ativan</i>) i midazolam	liječenje anksioznih poremećaja
klonazepam (<i>Klonopin</i>), klorazepat (<i>Tranxene</i>), lorazepam (<i>Ativan</i>), klobazam (<i>Onfi</i>) i diazepam (<i>Valium</i>)	liječenje napadaja
estazolam (<i>Prosom</i>), flurazepam (<i>Dalmane</i>), quazepam (<i>Doral</i>), temazepam (<i>Restoril</i>) i triazolam (<i>Halcion</i>)	lijekovi protiv nesаницe i problema sa spavanjem
midazolam (<i>Versed</i>), lorazepam (<i>Ativan</i>) i diazepam (<i>Valium</i>)	anestetiци
diazepam (<i>Valium</i>)	opuštanje mišića
klordiazepoksid (<i>Librium</i>)	odvikavanje od alkohola

2.1.4. Diazepam

Diazepam ili derivat benzodiazepina farmaceutik je koji utječe na neuravnotežene kemikalije u mozgu koje se javljaju kod ljudi s tjeskobom. Upravo se stoga i koristi tijekom liječenja simptoma odvikavanja od alkohola, grčenja mišića te općenito anksioznih poremećaja. U kombinaciji s drugim lijekovima, upotrebljava se i kao lijek za liječenje napadaja. Komercijalno ime mu je *Valium*. [6]

U organizmu, diazepam djeluje na način da olakšava aktivnost gama-aminobutirne kiseline (GABA), koja je inhibitorni neurotransmiter u središnjem živčanom sustavu te se na taj način manifestiraju anksiolitički, sedativni, mišićno-relaksirajući, antikonvulzivni i amnestički učinci ovog farmaceutika. [7] Diazepam djeluje na gama-aminobutirnu kiselinu na način da se veže na GABA receptor, smješten u limbičkom sustavu i hipotalamusu. Ovime povećava frekvenciju otvaranja kloridnih kanala i omogućuje protok kloridnih iona u neuron. Rezultat je hiperpolarizacija membrane te smanjenje neuronske ekscitabilnosti, to jest pobuđivanja stanice. [8]

Istraživanja djelovanja diazepamama na životinjama pokazala su da diazepam stvara isti aktivni metabolit kao klordiazepoksid i klorazepat, odnosno smirujuće djeluje na dijelove limbičkog sustava, talamusa i hipotalamusa. Međutim, nasuprot spojevima poput klorpromazina i rezerpina, diazepam ne djeluje na periferno autonomno blokiranje ili proizvodnju ekstrapiramidalnih nuspojava. Nadalje, životinje liječene diazepamom posjedovale su prolaznu ataksiju u višim dozama, točnije kod pasa su uočeni prolazni kardiovaskularni depresorski efekti. [9]

Liječenja životinja pokazala su da diazepam ne uzrokuje poremećaje endokrinih funkcija, no može izazvati lokaliziranu iritaciju tkiva oko mjesta primanja injekcije, odnosno venska zadebljanja nakon intravenske primjene. [9]

Na tržištu je diazepam dostupan u obliku tableta, to jest namjenjen je za oralnu primjenu. Tablete su dostupne s 2, 5 ili 10 mg aktivne tvari, a svaka tableta sadrži i neaktivne komponente poput magnezijeva stearata, mikrokristalne celuloze te bezvodne laktoze. [7]

2.1.4.1. Djelovanje Diazepamama

Jedno od djelovanja koje posjeduje diazepam je anestetičko. Intravenski anestetici upotrebljavaju se za indukciju, pri čemu je gubitak svijesti ultrabrz, a indukcija ugodna. Ovi farmaceutici ne uzrokuju opuštanje mišića, niti odgovarajuće smanjenje refleksa, a analgetsko djelovanje im je malo ili nikakvo pa se rijetko koriste samostalno ili u kraćim zahvatima. [10]

Tijekom anestezije primjenjuju se i pomoćna sredstva, adjuvanti, radi povećanja učinkovitosti anestetika, bolje isporuke te smanjenja potrebne doze. [11]

S ciljem sprječavanja napadaja ili smanjenja njihove intenzivnosti, koriste se antikonvulzivi. [12]

Kao lijek protiv grčenja mišića, diazepam spada i u ovu heterogenu skupinu lijekova koja prihvaća neuromišićne -blokirajuće agense. Njihova uloga primarno je klinička i terapijska, tijekom liječenja mišićne spazme ili nepokretnosti uslijed leđnih istegnuća, uganuća i ozljeda, odnosno, nešto rjeđe, kod ozljeda vrata. Koriste se i kod liječenja mišićnih spazmi kod multiple skleroze, kada dolazi do hiperaktivnosti kosturnih mišića. [13]

Djelovanje diazepama kao farmaceutski aktivne tvari ogleda se i u ublažavanju anksioznosti, napetosti te smirujućem učinku bez utjecaja na jasnoću svijesti ili neurološka stanja. [14] Kao hipnotik i sedativ, potiče pospanost i olakšava spavanje, također smanjujući psihološko uzbuđenje ili tjeskobu. [15]

Diazepam može djelovati i antiemetički, sprječavajući mučninu i povraćanje. [16]

2.2. Postupci uklanjanja farmaceutika iz okoliša

Razvojem znanosti, proučeni su brojni postupci uklanjanja farmaceutika, kao zagađivala, iz otpadnih vodenih tokova. Ti postupci uključuju različite procese filtracije, napredne oksidacijske procese ili procese klorinacije, od kojih su se neki pokazali destruktivnima, dok se za druge smatra da su nedestruktivni. [17]

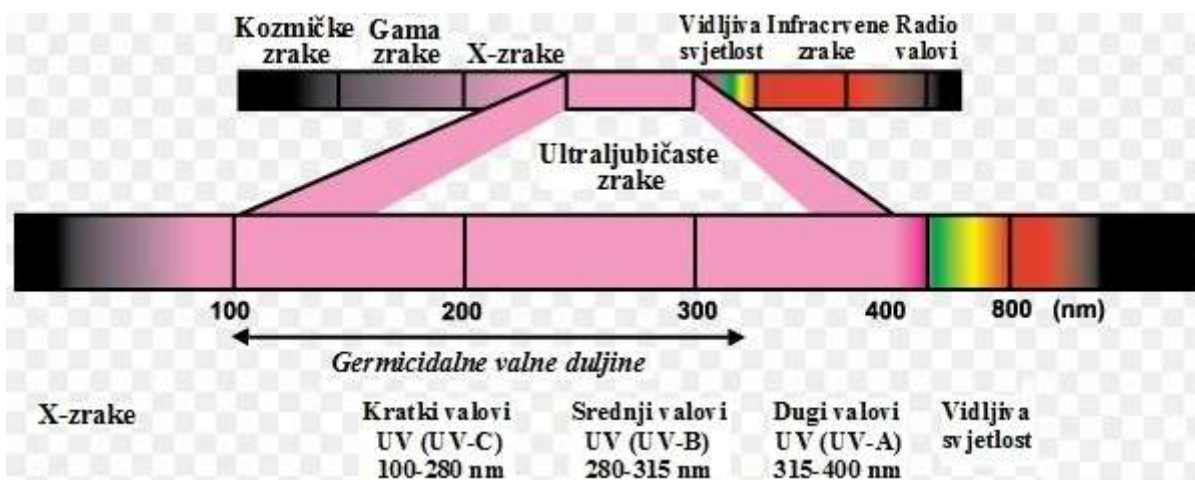
Destruktivni postupci uklanjanja farmaceutika zasnivaju se na potpunoj razgradnji spojeva koji su prisutni u otpadnim vodama, odnosno na dezinfekciji otpadnih voda. S druge strane, postoje postupci koje uključuju, procese, bilo filtracije ili adsorpcije opasnih zagađivala i organskih tvari na adsorbensu, što ih čini nedestruktivnima. [17]

Kako bi se bolje objasnile specifičnosti i prednosti korištenja naprednih oksidacijskih procesa koji primjenjuju UV-zračenje i heterogene fotokatalize, kao procesa koji su predmet interesa ovog rada, prethodno će biti dan uvid u razloge primjene Sunčeva zračenja korištenog s ciljem uklanjanja farmaceutika iz okoliša.

2.2.1. Primjena Sunčevog zračenja u pročišćavanju i dezinfekciji vode

Pročišćavanje i dezinfekcija voda pomoću Sunčeva zračenja moguća je zbog širokog raspona valnih duljina koje ono obuhvaća. Ultraljubičasto područje, područje vidljive svjetlosti i infracrveno područje valnih duljina tri su intervala od kojih se sastoji Sunčevo elektromagnetsko zračenje. Proces pročišćavanja vode putem Sunčeva zračenja baziraju se na primjeni njegova ultraljubičastog i infracrvenog dijela spektra. Ultraljubičasto zračenje, preciznije UV-A zračenje, ima germicidno djelovanje, dok infracrveno zračenje povećava temperaturu vode potičući njezinu pasterizaciju na temperaturi od oko 70 do 75 °C. Kombinirana upotreba UV-A zračenja i topline proizvodi sinergijski učinak koji povećava učinkovitost procesa. [18]

Spektar elektromagnetskog zračenja s istaknutim ultraljubičastim dijelom spektra i pripadajućim valnim duljinama prikazan je Slikom 3.



Slika 3. Ultraljubičasti dio spektra elektromagnetskog zračenja
(prilagođeno prema referenci [19])

2.2.1.1. Utjecaj ultraljubičastog zračenja na pročišćavanje vode

Ultraljubičasto zračenje dio je elektromagnetskog spektra kojeg emitira Sunce, a može se podijeliti na tri intervale valnih duljina: UV-A zračenje s rasponom valnih duljina od 400 do 315nm, UV-B zračenje koje uključuje valne duljine od 315 do 280 nm te UV-C zračenje u kojem se valne duljine kreću od 280 do 100 nm. [20]

Ovaj dio spektra Sunčeva zračenja nije vidljiv ljudskom oku, veoma je agresivan te može uzrokovati ozbiljna oštećenja kože, očiju te, općenito, imati negativan utjecaj na sve žive stanice. Zaštitu od agresivnog djelovanja većeg dijela UV-B i UV-C zračenja, koje na Zemlju dopire iz svemira, predstavlja atmosferski sloj ozona (O_3), apsorbirajući zračenje valnih duljina u rasponu od oko 200 do oko 320 nm. Izuzetak je veći dio UV-A zračenja, čiji raspon valnih duljina seže od oko 320 nm do oko 400 nm. Naime, UV-A zračenje se u spektru valnih duljina nalazi blizu vidljivog ljubičastog svjetla te ipak dopire do površine zemlje. [18]

Dakle, upravo prodor UV-A zračenja ima smrtonosni učinak na ljudske patogene prisutne u vodi. Patogeni koji napadaju ljudski organizam nisu dobro prilagođeni agresivnim okolišnim uvjetima s obzirom da svoje specifične životne uvjete pronalaze u ljudskom probavnom (gastrointestinalnom) sustavu. To ih čini osjetljivijima na Sunčevu svjetlost od organizama koji su uobičajeni u okolišu. UV-A zračenje izravno reagira s DNA, nukleinskim kiselinama i enzimima živih stanica, mijenja molekularnu strukturu i dovodi do stanične smrti. Također, reagira i s kisikom otopljenim u vodi, proizvodeći visoko reaktivne kisikove specije, poput slobodnih radikala kisika ili vodikovog peroksida, koje dodatno ometaju stanične strukture i ubijaju patogene. [18]

2.2.1.2. Utjecaj infracrvenog zračenja na pročišćavanje vode

Infracrveno zračenje ili zračenje dugih valova drugi je aspekt Sunčeve svjetlosti koji doprinosi dezinfekciji vode. Iako je i ovo zračenje nevidljivo ljudskom oku, svjetlost valnih duljina većih od 700 nm proizvodi toplinsku energiju. Dakle, infracrveno zračenje koje apsorbira voda odgovorno je za

njezino zagrijavanje, a u njoj prisutni mikroorganizmi osjetljivi su na pridošlu toplinu. Zanimljivo je spomenuti da je 99,9%-tnu dezinfekciju vode od mikroorganizama moguće ostvariti njezinim zagrijavanjem na temperature od 50 do 60 °C tijekom jednog sata, a ne nužno prokuhavanjem vode. [18]

2.2.2. Napredni oksidacijski procesi [21]

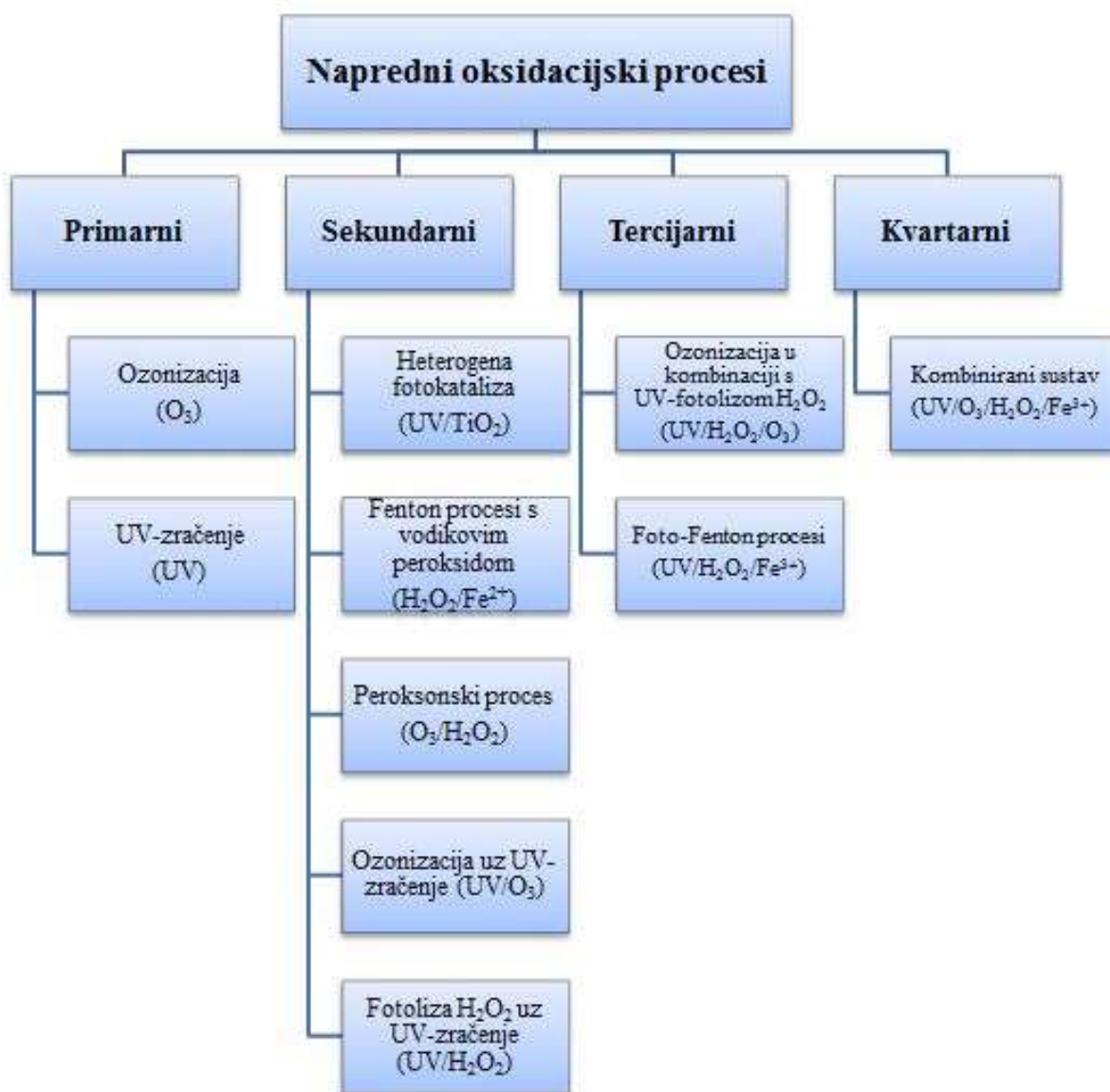
Uobičajeni procesi obrade otpadnih voda, poput klorinacije ili, pak, obrade ozonom, često su korišteni kao klasični postupci obrade komunalnih otpadnih voda. Međutim, pokazalo se da oni posjeduju niz nedostataka koji su prvenstveno vezani uz potencijalan nastanak nusprodukata opasnih za okoliš. Mogućnost nastanka kancerogenih i toksičnih dezinfekcijskih nusprodukata tijekom procesa klorinacije ili formiranje visoko toksičnih bromata skupocjenim postupkom obrade ozonom, dovelo je do potrebe istraživanja i razvoja novih metoda obrade, kako komunalnih, tako i industrijskih otpadnih voda.

Napredni oksidacijski procesi (engl. *AOP*²) pokazali su se veoma obećavajućima u pročišćavanju i obradi vode, eliminirajući prirodne toksine, pesticide i druga štetna zagađivala.

Prema definiciji iz godine 1987., AOP su procesi koji uključuju generiranje hidroksilnih radikala u količini dovoljnoj da utječe na pročišćavanje vode. Od tada je ova definicija naprednih oksidacijskih procesa napredovala pa danas ti procesi uključuju različite metode za generiranje hidroksilnog radikala i drugih reaktivnih vrsta kisika, uključujući vodikov peroksid, singletni kisik i superoksidni anionski radikal. Od prethodno navedenih, ipak, najviše se koristi hidroksilni radikal kojem se pripisuje učinkovitost AOP-a. Većina organskih spojeva reagira s hidroksilnim radikalom reakcijama adicije ili apsorpcije vodika s ciljem formiranja radikala s centralnim ugljikovim atomom. Dobiveni karboncentrirani radikal reagira s molekulskim kisikom pri čemu nastaje peroksil radikal što u konačnici rezultira nastankom molekula sklonih oksidaciji – aldehida, ketona i alkohola. Nadalje, hidroksilni radikal također može primiti elektron iz supstrata bogatog elektronima te time formirati radikalski kation, koji se u vodenom mediju lako hidrolizira što dovodi do nastanka oksidiranog produkta. Nastanak oksidacijskih produkata ovim kemijskim mehanizmima često se pokazao manje toksičnim, a nastale su specije podložnije i bioremedijaciji.

Napredni oksidacijski procesi uključuju, primjerice, postupke UV/O₃, fotokatalize, UV/H₂O₂, radiolize, Fenton procese, sonolize ili superkritične vodene oksidacijske procese. Sistematizirana shema podjele naprednih oksidacijskih procesa dana je Slikom 4.

² *Advanced Oxidation Processes*

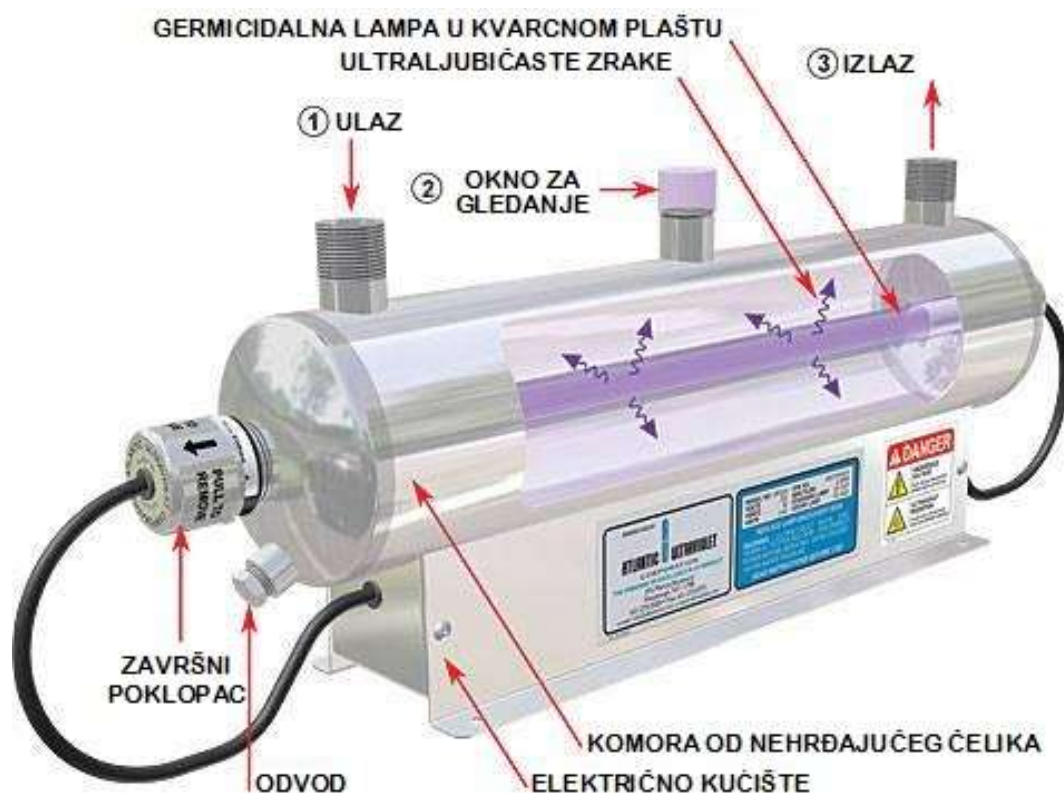


Slika 4. Shematski prikaz podjele naprednih oksidacijskih procesa [17, 22-23]

2.2.2.1. UV-zračenje

Ultraljubičasto (UV) zračenje poželjna je metoda za dezinfekciju uglavnom malih zaliha vode, čija učinkovitost prvenstveno ovisi o njezinoj kvaliteti i protoku. Kako bi se mogla ovim putem dezinficirati, voda mora imati dobru kakvoću te osobito nisku zamućenost. Tako je za uspješnu dezinfekciju poželjno da zamućenje bude manje od 5 NTU. [24]

UV-zračenje se dobiva posebnim lampama, zatvorenima u reakcijskoj komori napravljenoj od nehrđajućeg čelika ili, rjeđe, plastike. Najčešće korištene lampe su niskotlačne živine svjetiljke, koje generiraju 85% svoje energije u području valne duljine od 254 nm. Njihova je valna duljina unutar optimalnog germicidnog raspona od 250 do 265 nm. Sama svjetiljka načinjena je od UV-propusnog kvarca, a optimalna radna temperatura joj iznosi oko 40 °C, zbog čega je izolirana od okolne vode kako je ona ne bi hladila. UV-zračenje vode provodi se ulaskom vode u jedinicu i protokom kroz anularni prostor između kvarcne izolacije i stijenke komore, kao što je predloženo Slikom 5. [24]



Slika 5. Komora za obradu vode UV-zračenjem (prilagođeno prema referenci [25])

2.2.2.2. Fotoliza

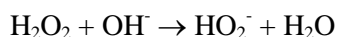
Fotoliza, još zvana fotodisocijacijom ili fotodekompozicijom, kemijska je reakcija u kojoj dolazi do razgradnje anorganske ili organske kemikalije fotonima pridošlima iz svjetlosti. Dakle, prilikom fotolize događa se interakcija jednog ili više fotona s ciljanom molekulom. Nadalje, fotolitička reakcija nije ograničena samo na učinke vidljive svjetlosti, već ju može uzorkovati bilo koji foton s dovoljnom energijom potrebnom za kemijsku transformaciju veza kod određene kemikalije. Iz prethodno navedenoga slijedi da elektromagnetski valovi s energijom vidljive svjetlosti ili višom, poput ultraljubičastog zračenja, rendgenskih zraka ili gama zraka, također mogu inicirati reakcije fotolize. Razlog leži u činjenici da je energija fotona obrnuto proporcionalna valnoj duljini [26], odnosno Planckovu zakonu prema kojem je:

$$E = \frac{hc}{\lambda}$$

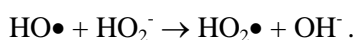
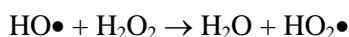
U prethodnoj je formuli h Planckova konstanta, c brzina svjetlosti, a λ valna duljina. [27]

2.2.2.2.1. Fotoliza H₂O₂ uz UV-zračenje [28, 29-30]

Razgradnja nekih spojeva može se značajno ubrzati kada se UV-fotoliza kombinira s vodikovim peroksidom, u kojoj on djeluje kao primarni oksidans. Vodikov se peroksid može pretvoriti u hidroksilne radikale i superoksidne anione u bazičnom mediju, kako slijedi iz reakcija:

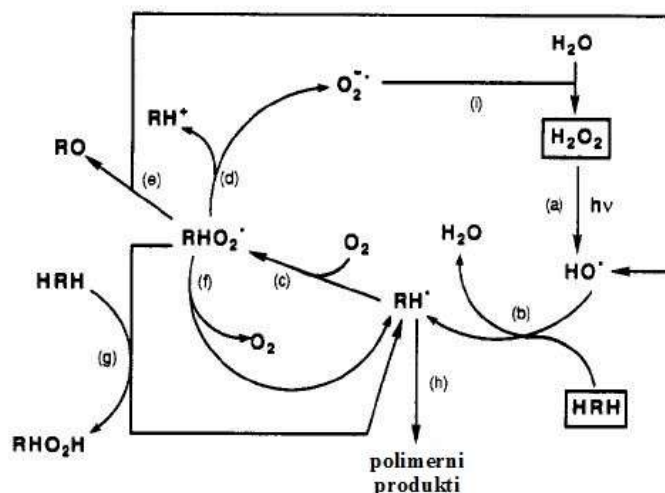


Vrlo visoke koncentracije vodikova peroksida kod ovog sekundarnog naprednog oksidacijskog procesa nužne su za djelotvornu razgradnju zagađivala, uslijed niskog koeficijenta ekstinkcije vodikova peroksida. Porast početne koncentracije H_2O_2 ubrzava oksidaciju do određene točke, na kojoj H_2O_2 počinje ometati razgradnju spojeva. Pri povećanim koncentracijama vodikov peroksid djeluje kao sakupljač slobodnih radikala te dolazi do nastajanja manje reaktivnih hidroperoksilnih radikala, prema sljedećim reakcijama:



Slično drugim naprednim oksidacijskim procesima, učinkovitost sekundarnog procesa UV/ H_2O_2 prilikom uklanjanja organskih spojeva veoma ovisi o eksperimentalnim uvjetima, uključujući, uz pH-vrijednost i koncentraciju vodikovog peroksida, također valnu duljinu te fluks UV zračenja, kao i prisutnost drugih tvari u vodenoj matrici.

Slikom 6. shematski je prikazan tijek reakcija u procesu UV-fotolize u prisutnosti vodikovog peroksida.



Slika 6. Slijed reakcija koje se odvijaju u sustavu UV/ H_2O_2 korištenog za oksidaciju organskih supstrata (prilagođeno prema referenci [31])

Nadalje, sakupljači radikala, primjerice bikarbonati i karbonati, mogu značajno usporiti razgradnju ciljnih spojeva u UV/ H_2O_2 sustavu. Međutim, pokazalo se da je brzina razgradnje nekih spojeva izravnim UV zračenjem ili kombinacijom UV zračenja s H_2O_2 u površinskim ili otpadnim vodama nešto viša nego li je u destiliranoj vodi. Razlog se pronalazi u prisutnosti prirodne organske tvari koja može potaknuti proizvodnju hidroksilnih radikala ($\text{OH}\bullet$).

U sekundarne napredne oksidacijske procese spada i heterogena fotokataliza, koja je predmet ovog istraživačkog rada, a o kojoj će više riječi biti u zasebnom poglavlju.

2.2.2.3. Kinetika razgradnje farmaceutika u vodenom okolišu [32-33]

Kinetička analiza procesa razgradnje kojima podliježu farmaceutici kada dospiju u vodeni okoliš temelji se na određivanju brzine njihove razgradnje. O tome koliko će brzo određeni farmaceutik degradirati u okolišu svjedoče parametri određeni iz kinetičkog modela. S obzirom da se procesi raspada farmaceutika uglavnom odvijaju prema kinetičkom modelu 1. reda, traženi parametri potrebni za opis kinetike takvih sustava su konstanta brzine reakcije, k , te vrijeme poluraspada, $t_{1/2}$. Na temelju vrijednosti ovih dvaju parametara, može se doći do zaključka o brzini hidrolitičke, fotolitičke, fotokatalitičke ili neke druge razgradne reakcije. Što je vrijednost konstante brzine reakcije veća, odnosno što je vrijeme poluraspada farmaceutski aktivne supstance manje, to će se prije smanjiti koncentracija farmaceutika na polovicu početne vrijednosti.

Jednadžbe koje opisuju kinetički model 1. reda dane su u nastavku.

$$\ln\left(\frac{c_0}{c}\right) = k \cdot t$$

gdje je:

c_0 – početna koncentracija farmaceutika u vremenu $t = 0$

c – koncentracija farmaceutika nakon nekog vremena t

k – konstanta brzine reakcije

t – vrijeme razgradne reakcije

Ukoliko se grafički prikaže ovisnost $\ln(c_0/c)$ o vremenu, iz nagiba fitanog pravca moguće je dobiti vrijednost konstante brzine reakcije, k . Na temelju te vrijednosti, moguće je odrediti i vrijeme poluraspada, prema formuli:

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

U nekim slučajevima eksperimentalni podatci koncentracija farmaceutika u određenom vremenu od početka razgradnje pokazuju bolje slaganje s modelom reakcije 0. ili, primjerice, 2. reda. O tome koji će od spomenutih kinetičkih modela najbolje opisivati sustav govori koeficijent korelacije, R^2 . Što je njegova vrijednost bliža jedinici, to je slaganje eksperimentalnih podataka i onih dobivenim na temelju modela bolje.

Kinetički model reakcije 0. reda opisuje se narednim formulama:

$$c = c_0 + k \cdot t$$

$$t_{1/2} = \frac{c_0}{2 \cdot k}$$

dok se za opis kinetičkog modela reakcije 2. reda koriste sljedeće formule:

$$\frac{1}{c} = \frac{1}{c_0} + 2 \cdot k \cdot t$$

$$t_{1/2} = \frac{1}{2 \cdot k \cdot c_0}$$

Značenje konstanti i fizikalnih veličina analogno je onima kod kinetičkog modela reakcije 1. reda, kao što se i njihove vrijednosti mogu iščitati iz odgovarajućih grafičkih prikaza.

2.3. Heterogena kataliza

2.3.1. Fotokataliza

Fotokataliza grana je kemije koja proučava kemijske reakcije u prisutnosti svjetlosti i fotokatalizatora. [34] Temelji se na dvostrukoj sposobnosti fotokatalizatora, uglavnom titanija, tijekom istovremene adsorpcije obaju reaktanata te učinkovitih fotona. [35] Fotokatalizator se, pritom, ponaša kao poluvodič te povećava brzinu kemijske reakcije. [34]

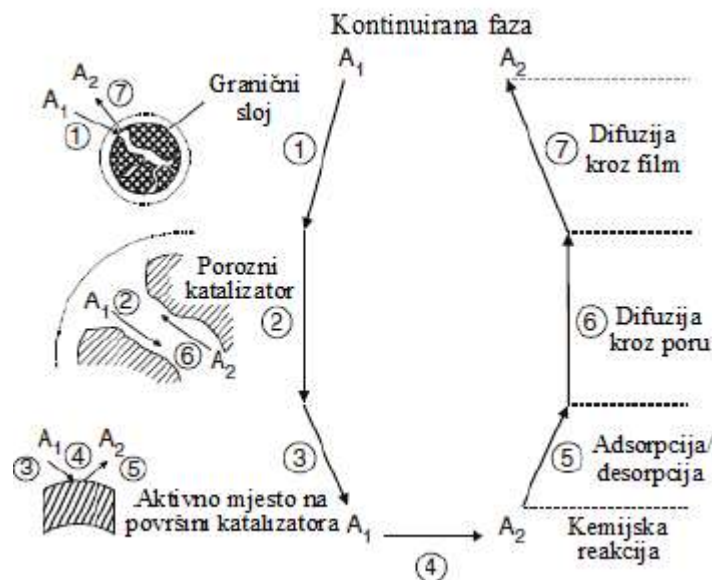
U današnje vrijeme, fotokataliza se pokazala veoma poželjnim procesom razgradnje s obzirom da se ubraja u područje zelene kemije, a njezina je primjena veoma široka te primjerice obuhvaća samopročišćavanje, deodoriranje, antibakterijsko djelovanje, pročišćavanje vode ili zraka, pri čemu bitnu ulogu ima svojstvo superhidrofilnosti. [34]

Zelena kemija i čistija proizvodnja nova su područja kemije koja se zasnivaju na 12 principa, prvenstveno težeći potpunom iskorištenju sirovine te eliminaciji otpada u proizvodnom procesu. Tome pridonosi i mogućnost regeneracije katalizatora, čime se eliminiraju problemi vezani uz zbrinjavanje potencijalno nastalog otpada. [36] Porast broja stanovnika (populacije) iz dana u dan povećava potrebu za pitkom vodom, kao tvari neophodne za opstanak živog svijeta. Iz toga je razloga pročišćavanje vode onečišćene uslijed neoprezne ljudske aktivnosti u domaćinstvima, industiji, agrikulturi i drugdje, neophodno te su pri tom ispitani brojni postupci pročišćavanja. [37] Upravo se fotokataliza pokazala procesom široke primjene u ovom području pročišćavanja otpadnih voda te njihove remedijacije. [34]

Heterogena fotokataliza, kao disciplina koja uključuje širok spektar reakcija poput prijenosa vodika, blagih ili ukupnih oksidacija, izmjene izotopa deuterija i alkana, dehidrogenacije, taloženja metala,

uklanjanja plinovitih onečišćujućih tvari, detoksikacija vode i slično, smatra se jednom od novih naprednih oksidacijskih tehnologija u pročišćavanju vode i zraka. Kao takva, može se provoditi u različitim medijima – čista organska tekuća faza, vodena otopina ili plinska faza. [35]

Koraci koji se događaju tijekom heterogene katalize predloženi su Slikom 16.

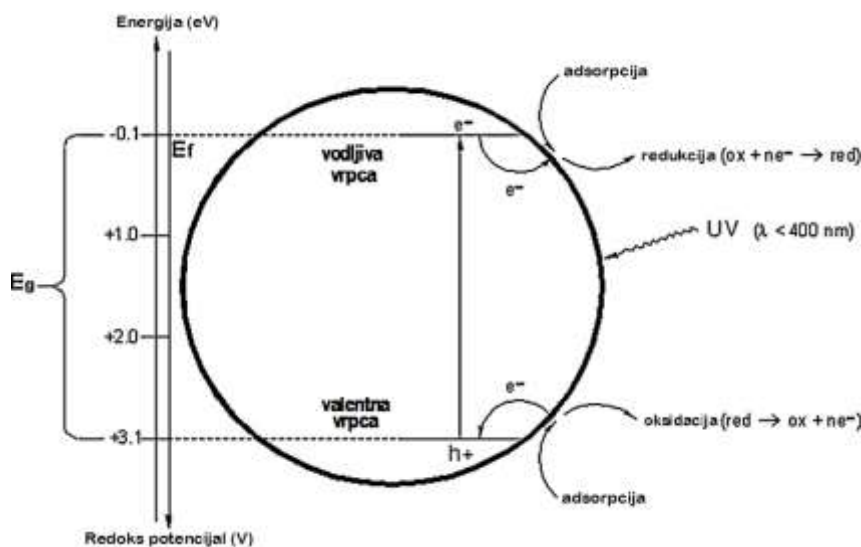


Slika 7. Redoslijed reakcijskih stupnjeva tijekom heterogene katalize
(prilagođeno prema referenci [38])

Heterogena kataliza uključuje sustave s više faza – reaktante, koji su uglavnom u kapljevitom ili plinovitom stanju, te katalizator, koji je često u obliku porozne krutine. Kao što je vidljivo na gornjoj slici, reaktant A_1 prisutan u kontinuiranoj fazi, primjerice u masi otopine, najprije mora difundirati kroz granični sloj ili film na površini čestice katalizatora. Tada se radi o procesu međufazne difuzije. Prošavši kroz granični sloj, molekula reaktanta, potom, prolazi kroz poru poroznog katalizatora fizikalnim procesom unutarfazne difuzije. S obzirom da je prednost primjene poroznih katalizatora u heterogenoj katalizi ta da je njihova aktivna površina puno veća od vanjske (geometrijske) površine, katalitička se reakcija upravo odvija na aktivnom mjestu nakon unutarfazne difuzije. Reaktant A_1 kemisorbira se na površinu katalizatora, a nakon odvijanja kemijske reakcije, s površine se desorbira nastali produkt A_2 . [39]

Kako bi se vratio u masu otopine, i produkt A_2 mora proći fizikalne procese unutarfazne (difuzije kroz poru katalizatora) i međufazne difuzije (difuzije kroz granični sloj ili film). Dakle, iz prethodno navedenog, može se zaključiti kako na ukupnu brzinu heterogeno-katalitičke reakcije utječe, kako sama kemijska reakcija na aktivnoj površini, tako i fizički procesi prijenosa tvari do/od aktivne površine. Upravo se u tome ogleda složenost ovakvih reakcijskih sustava, gdje bilo koji od ovih 7 koraka može biti usko grlo procesa, odnosno limitirajući (najsporiji) korak, određujući ukupnu brzinu reakcije. [39]

Fotokatalitička reakcija je uključena u ovih sedam stupnjeva u četvrtom koraku, tijekom odvijanja kemijske reakcije u adsorbiranoj fazi. Korak koji, međutim, čini razliku između klasične katalize i fotokatalize je način aktivacije samog katalizatora. U prvom slučaju, aktivacija je toplinska, dok je, u drugom slučaju, fotokatalizator aktiviran svjetlošću – fotonima. [35]



Slika 8. Dijagram energetske vrpce sferične čestice titanija (prilagođeno prema referenci [40])

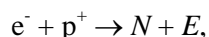
Slika 8. shematski prikazuje energetske promjene tijekom fotokatalitičkog procesa na titanijevu dioksidu. Osvjetljivanjem poluvodičkog katalizatora (SC^3), oksidnog (TiO_2 , CeO_2 , ZrO_2 , ZnO) ili sulfidnog (ZnS , CdS) tipa, fotonima čija je energija jednaka ili veća od energetske barijere između vrpca, dolazi do apsorpcije tih fotona i pojave unutar mnoštva parova elektrona i šupljina, čijom disocijacijom nastaju slobodni fotoelektroni u kondukcijskom pojasu te slobodne fotošupljine u valentnom pojasu. [35]

Istovremeno, u prisutnosti tekuće faze (plina ili kapljevine) dolazi do pojave spontane adsorpcije. Također se javlja i prijenos elektrona, ovisno o redoks potencijalu (ili energetskej razini) pojedinog adsorbata, koji napreduje prema molekulama akceptora, dok su pozitivne fotošupljine prenesene na donorske molekule. Prijenos šupljina, u suštini, odgovara ustupanju donorskih elektrona krutini. Dolazi do odvijanja sljedećih reakcija, tijekom kojih svaki nastali ion sudjeluje u formiranju intermedijera ili gotovih proizvoda reakcije [35]:

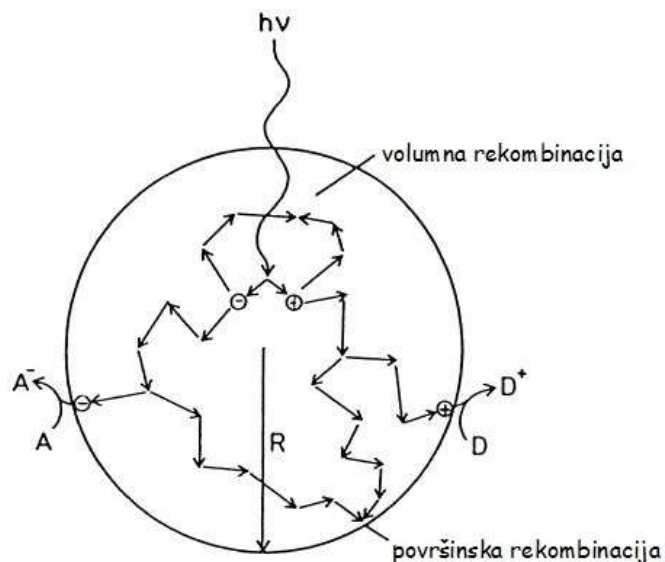
1. $h\nu + (SC) \rightarrow e^- + p^+$
2. $A(ads) + e^- \rightarrow A^-(ads)$
3. $D(ads) + p^+ \rightarrow D^+(ads)$

³ engl. *semiconductor catalyst*

Prethodno dovodi do početka aktivacije cijelog katalitičkog sustava, uslijed fotonske pobude katalizatora. Nadalje, rekombinacijom elektrona i šupljina može doći do smanjenja učinkovitosti fotokatalize, kao posljedice degradacije fotoelektrične energije u toplinu (prikazano Slikom 18.);



gdje je N neutralni centar, a E energija oslobođena u obliku svjetla ili topline. [35]



Slika 9. Volumna i površinska rekombinacija elektrona i šupljina unutar sferične čestice titanija u prisutnosti akceptorskih (A i D) molekula (prilagođeno prema referenci [35])

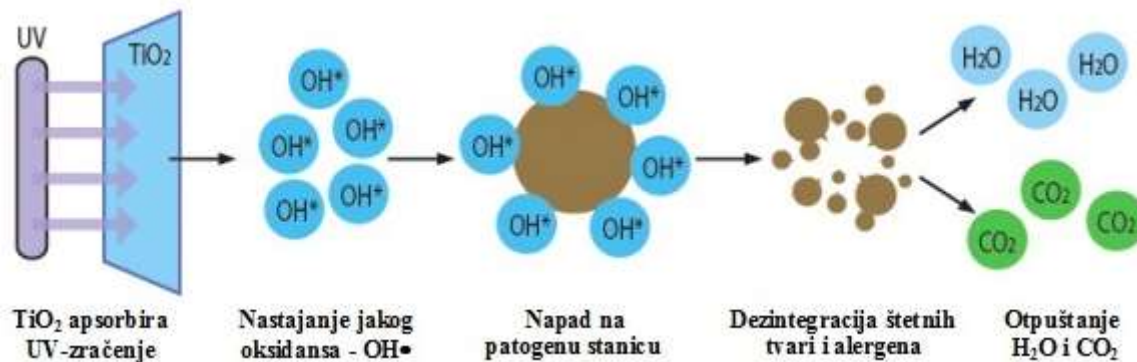
Fotokatalitičke reakcije provode se u različitim tipovima fotoreaktora, poput onih s nepokretnim slojem katalizatora⁴ ili, pak, šaržnih suspenzijskih fotoreaktora, miješanih mehanički ili magnetski. [35]

2.3.2. Fotokatalizatori

Fotokatalizatorima se smatraju materijali koji, apsorbirajući svjetlost dovodeći je na višu energetska razinu, predaju tu apsorbiranu energiju reagirajućoj supstanci te potiču pojavu kemijske reakcije. Različiti spojevi, poput titanijeva dioksida (TiO_2), bakrova (I) oksida (Cu_2O), kadmijeva sulfida (CdS), srebrova fosfata (Ag_3PO_4), bizmut vanadijeva oksida ($BiVO_4$), volframova oksida (WO_3), natrij tantalova oksida ($NaTaO_3$), stroncij titanijeva oksida ($SrTiO_3$) i drugih, koriste se kao fotokatalizatori u procesima oksidacije ili redukcije vode, pretvorbom solarne energije u kemijsku, odnosno u procesima razgradnje farmaceutika pod utjecajem zračenja, s ciljem obrade otpadnih voda. [41]

Slikom 10. dan je pojednostavljen shematski prikaz slijeda koraka koji se događaju uslijed djelovanja fotokatalizatora.

⁴ engl. *fixed bed reactors*



Slika 10. Pojednostavljeni shematski prikaz aktivnosti fotokatalizatora na primjeru TiO₂ (prilagođeno prema referenci [42])

2.3.2.1. Titanijev dioksid (TiO₂)

Titanijev dioksid često je korišten spoj prilikom oksidacijskih procesa poput onih vezanih uz konverziju solarne energije, pročišćavanja zraka ili obrade otpadnih voda. Razlog njegove česte upotrebe leži u činjenici da je netoksičan, jeftin te učinkovit katalizator tijekom fotokatalitičke razgradnje kojom se uklanjaju organske tvari iz medija (uglavnom vode). [43]

Razvoj naprednih oksidacijskih procesa (AOP⁵) omogućio je uklanjanje organskih i anorganskih zagađivala procesom obrade otpadnih voda s ciljem poboljšanja njihove biorazgradljivosti. Jedan od takvih procesa koji se pokazao najučinkovitijim je proces heterogene fotokatalize primjenom TiO₂ kao katalizatora. Generiranje radikala poput OH•, O₂⁻• ili HOO• može neselektivno mineralizirati velik broj teško uklonjivih organskih zagađivala (pesticida, boja, farmaceutskih supstanci, fenola i drugih). Primjena TiO₂, korištenog zbog svoje fotokatalitičke stabilnosti i osjetljivosti, visokog refrakcijskog indeksa, otpornosti prema koroziji, velike energetske barijere između vrpca i relativno niske cijene, međutim, nailazi na poteškoće prilikom naknadne separacije praha titanijeva dioksida iz vode te sprječavanja njegove disperzije u okolišu, kao i potrebe za primjenom kompliciranih i skupih filtracijskih procesa. [37, 44-45]

Rješenje prethodno navedenog problema pronađeno je u imobilizaciji titanijeva dioksida na površini krute faze, primjenom metoda poput metode impregnacije, sol-gel metode, depozicije atomskih slojeva, termalne metode, kemijskog nanošenja organskih premaza iz plinske faze na površinu metala ili hidrolize. Pritom se, kao krute faze, koriste kvarc, silika, čelik, glinica, zeoliti i slično. Izuzev prethodno navedene, krutina koja pronalazi veliku primjenu u naprednim oksidacijskim procesima je i aktivni ugljen. Njegova je uloga značajna jer aktivni ugljen adsorbira zagađivala te ih potom otpušta na površinu TiO₂, koncentrirajući ih u blizini katalizatora te povećavajući brzinu njihove razgradnje. [44]

⁵ engl. *Advanced Oxidation Processes*

Istraživanja u različitim područjima primjene titanijeva dioksida, kao širokopojasnog poluvodičkog materijala, poput onih kod fotokatalizatora, solarnih ćelija osjetljivih na boju, vođenja valova, senzora za plin, dielektrika, antirefleksirajućih premaza i drugih, pokazala su da debljina tankog filma TiO₂ uvelike utječe na njegova optička i električna svojstva. [45]

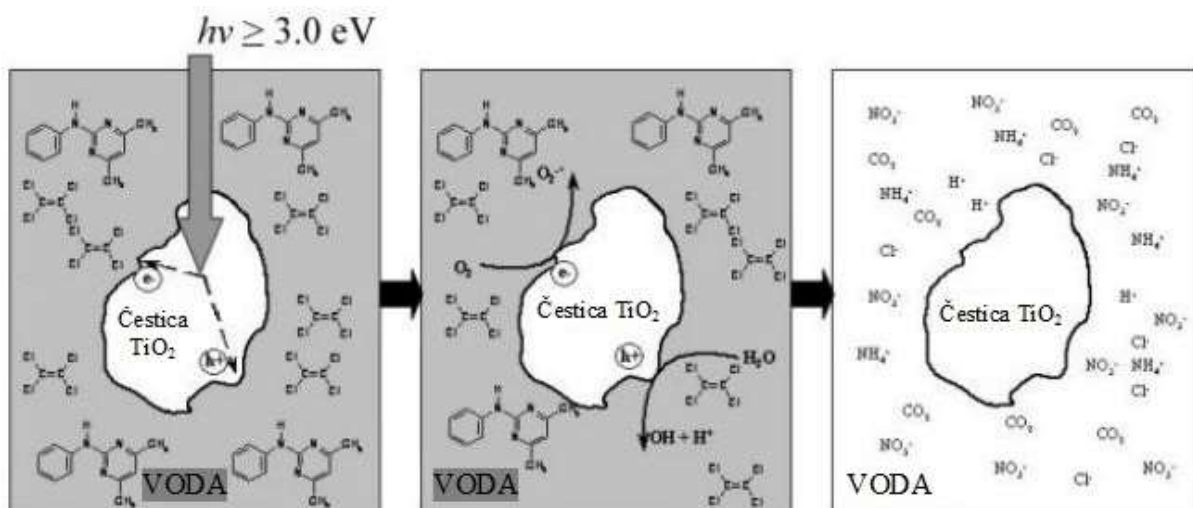
U skladu s prethodno navedenim, primjena ovog poluvodiča od posebnog je interesa, zbog mogućnosti korištenja prirodnog Sunčeva UV-zračenja s obzirom da TiO₂ posjeduje prikladnu energetska barijeru između svoje vodljive i valentne vrpce. Ta se energetska barijera upravo pokazala manjom od energije fotona Sunčeva zračenja valne duljine veće od 300 nm. Iako postoje i druge poluvodičke čestice, poput onih od kadmijeva sulfida (CdS) ili galijeva fosfida (GaP) koje mogu apsorbirati i šire dijelove spektra Sunčeva zračenja te formirati kemijski aktivne međuprodukte, prilikom ponavljanja katalitičkih ciklusa tijekom heterogene fotokatalize ipak dolazi do njihove vlastite razgradnje. Stoga se razgradnja organskih onečišćujućih tvari prisutnih u otpadnim vodama korištenjem ozračenog titanijeva dioksida smatra najperspektivnijim procesom čijem se istraživanju i razvoju pridaje sve veća pozornost posljednjih godina. [46]

Prilikom djelovanja Sunčeva zračenja na čestice TiO₂, dolazi do odvijanja narednih reakcija [44]:

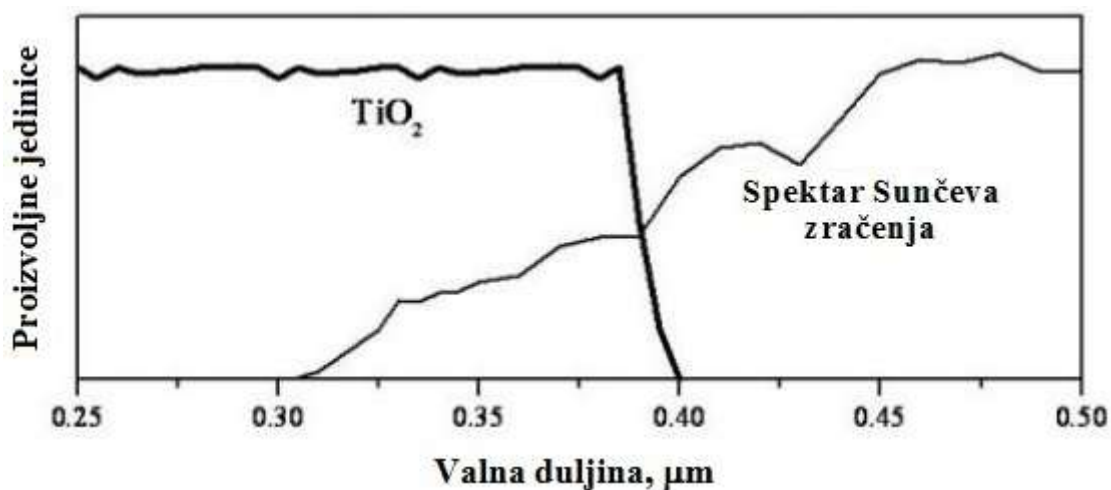
1. $\text{TiO}_2 (h\nu) \rightarrow e_{\text{CB}}^- + h_{\text{BV}}^+ + \text{TiO}_2$
2. $e_{\text{CB}}^- + h_{\text{BV}}^+ + \text{TiO}_2 \rightarrow \text{TiO}_2 + \text{toplina i/ili } h\nu$
3. $(\text{TiO}^{\text{IV}}-\text{O}^{2-}-\text{Ti}^{\text{IV}})-\text{OH}_2 + h_{\text{BV}}^+ \rightarrow (\text{TiO}^{\text{IV}}-\text{O}^{2-}-\text{Ti}^{\text{IV}})-\text{OH}\bullet + \text{H}^+$
4. $\text{O}_{2(\text{ads})} + e_{\text{CB}}^- \rightarrow \text{O}_{2(\text{ads})}\bullet^-$

Hidroksilni radikali (OH•) glavni su oksidans prilikom fotooksidacije mnogih istraženih organskih spojeva. Generiranje parova elektron-šupljina, odvojenih između vodljive i valentne vrpce, nakon apsorpcije ultraljubičastog zračenja ($\lambda < 390$ nm), prvi je korak ovoga mehanizma prikazan reakcijom 1. Kako bi se izbjegla rekombinacija novonastalih parova dana reakcijom 2, otapalo, primjerice voda, ukoliko je oksidoreduktivno aktivno, u mogućnosti je postati elektron-akceptor ili elektron-donor. Time, na hidriranoj i hidroksiliranoj površini titanijeva dioksida, šupljine zadržavaju površinski vezane hidroksilne radikale (reakcija 3). Međutim, bitno je naglasiti da se i ovako zadržani elektroni i šupljine mogu brzo rekombinirati na površini čestice, kao što slijedi reakcijom 2. Rekombinaciju je moguće djelomično izbjeći hvatanjem elektrona od strane prethodno adsorbiranog molekularnog kisika, odnosno formiranjem superoksidnog radikala. [46]

Učinak Sunčeva zračenja na čestice TiO₂ dispergirane u vodi te slijedna razgradnja otopljenih organskih tvari prikazani su Slikom 11. Nadalje, Slikom 12. prikazana je usporedba apsorpcijskog spektra titanijeva dioksida sa spektrom Sunčeva zračenja.



Slika 11. Učinak UV-zračenja na čestice TiO₂ dispergirane u vodenoj otopini organskih tvari (prilagođeno prema referenci [46])



Slika 12. Usporedba apsorpcijskog spektra titanijeva dioksida sa spektrom Sunčeva zračenja (prilagođeno prema referenci [46])

2.4. Toksičnost farmaceutika [47]

Toksičnost farmaceutika u vodenim otopinama može se odrediti nekom od bioanalitičkih metoda, od kojih je jedna ona koja primjenjuje fluorescentnu, gram-negativnu, štapičastu bakteriju *Vibrio fischeri*. Ova bakterija, čije su životno stanište obično morske sredine (Slika 13.), emitira svjetlosti intenziteta koji je tijekom dnevnog i noćnog perioda emisije ujednačen. Međutim, kako je emisija svjetlosti jedan od osnovnih metaboličkih procesa ove bakterije, svako trovanje toksičnim tvarima ili drugo narušavanje metabolizma može se detektirati mjerenjem intenziteta spomenute svjetlosti.



Slika 13. Lignja *Euprymna scolopes* primjer je domaćina za kolonije bakterija *Vibrio fischeri* [48]

Standardom DIN 38 412-L34 propisana je kratka metoda, u trajanju od 30 minuta, pomoću koje se određuje biološka toksičnost, a temeljena je na luminiscenciji spomenute bakterije. Metodom je moguće doći do vrijednosti parametara kao što su primjerice koncentracija koja uzrokuje 20% inhibicije bakterijske kulture (EC_{20}), koncentracija koja uzrokuje 50% inhibicije bakterijske kulture (EC_{50}) ili, pak, najniža koncentracija koja izaziva toksičan učinak ($LOEC$). Dalje se dobivene vrijednosti koriste za usporedbu kod procjene toksičnosti pa se tako iz vrijednosti parametra EC_{50} može izračunati i jedinica toksičnosti, prema formuli:

$$TU = 100 \cdot EC_{50}^{-1}$$

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. Materijali

3.1.1. Kemikalije

Kemikalije korištene tijekom eksperimentalnog dijela ovog rada navedene su u Tablici 3.

Tablica 3. Popis kemikalija korištenih pri provedbi eksperimenata

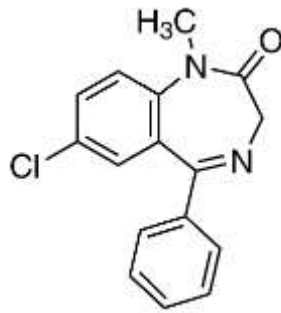
Ime	Formula	Proizvođač	Stupanj čistoće
diazepam	$C_{16}H_{13}ClN_2O$	JGL d. d. Rijeka	99,9 %
metanol	CH_3OH	J. T. Baker	HPLC
acetonitril	CH_3CN	J. T. Baker	HPLC
mravlja kiselina	$HCOOH$	T. T. T. doo Sveta Nedjelja	98-100 % (p. a.)
vodikov peroksid	H_2O_2	Gram-Mol d.o.o.	30 %

3.1.2. Farmaceutski aktivna tvar – diazepam

U ovom je radu ispitivana fotokatalitička razgradnja farmaceutika diazepama. Fizikalno-kemijska svojstva ovog farmaceutika navedena su u Tablici 4, dok je strukturna formula prikazana na Slici 14.

Tablica 4. Fizikalno-kemijska svojstva diazepama [7-9, 49]

Kemijski naziv prema IUPAC-u	7-klor-1-metil-5-fenil-3H-1,4-benzodiazepin-2-on
Boja	bezbojni ili bjelkasti do svijetložuti
Miris	nema mirisa
Okus	bez okusa ili gorkastog okusa
Agregatno stanje	krutina (kristalni praškasti spoj)
Topljivost u vodi	netopljiv
Temperatura tališta	125-126 °C
log K_{ow}	2,82
pK_k	3,4
Vrijeme poluživota	30-56 h; postoje i metaboliti s dugim poluživotom (<i>desmethyldiazepam</i>): 40-100 h
Empirijska formula	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
Molekulska masa	284,743 g/mol



Slika 14. Strukturna formula diazepama [50]

3.2. Instrumenti

3.2.1. Analitička vaga



Slika 15. Analitička vaga Mettler Toledo XA105

S ciljem pripreme standardnih otopina diazepama, ovaj je farmaceutik vagan na analitičkoj vagi Mettler Toledo XA105, predloženoj Slikom 15. Odvage diazepama bile su reda veličine miligrama pa je bilo nužno koristiti veoma preciznu analitičku vagu. [51] Konkretno, specifikacije prikazane vage upućuju na to da vaga posjeduje preciznost od 0,01 miligram, a radno joj područje doseže maksimalne odvage od 120 grama. Primjenjiva je u temperaturnom rasponu od 5 do 40 °C, uz određena ograničenja vezana uz vlažnost zraka. Tako je pri temperaturi od 31 °C dopuštena maksimalna vrijednost relativne vlažnosti zraka od 80%, linearno se smanjujući na vrijednost od 50% pri temperaturi od 40 °C. [52]

3.2.2. Fotokatalitički reaktor



Slika 16. Fotokatalitički reaktor korišten pri provedbi eksperimenata

Slikom 16. prikazan je reaktor u kojem su provedeni svi fotolitički i fotokatalitički eksperimenti tijekom izrade ovoga rada. Riječ je o protočnom ravnom reaktoru pravokutnog oblika, otvorenom prema okolini s gornje strane. Dimenzije reaktora su 17,5 x 4,6 x 3,3 cm, a ukupni radni volumen iznosi 100 cm³. Kontinuirani protok kroz reaktor ostvaren je peristaltičkom pumpom, s brzinom protjecanja od 30 mL/min. U fotokatalitičkim eksperimentima, u kojima su korištene mrežice od titanijeva dioksida, mrežice su stavljene u reaktor tako da prekriju cijelo dno reaktora. Iznad reaktora, na udaljenosti od 7 cm, na pomoćne je stalke pričvršćena UV-lampa snage 8 W, koja radi na potencijalima od 220 do 240 V. Njome je radna otopina bila osvjetljena UV-A zračenjem valne duljine od 365 nm. Lampa je tijekom provođenja eksperimenata bila prekrivena aluminijskom folijom, kao sjenilom/reflektivnom površinom, s ciljem ravnomjernog osvjetljavanja reaktorskog prostora. [53]

3.2.3. Pumpa



Slika 17. Pumpa STEPDOS 03 RC

Kako bi se postigao kontinuirani protok radne otopine kroz fotokatalitički reaktor, korištena je mikroprocesorska membranska pumpa STEPDOS 03 RC s kontinuiranim protokom. Specifikacije ove pumpe upućuju na to da ona može raditi u različitim načinima (modima) rada i doziranja, pod ručnim, analognim ili digitalnim upravljanjem. S preciznošću od $\pm 2\%$ i ponovljivošću od $\pm 1\%$, pumpa je kemijski otporna kako na neutralne, tako i na agresivne kemikalije, čija temperatura mora biti unutar intervala od 5 do 80 °C. Pritom je dopuštena temperatura okoline u kojoj se pumpa nalazi u intervalu od 5 do 40 °C. Broj okretaja u minuti može varirati od 0,180 do 180 rpm, pri čemu je za ovu pumpu specifično to da omogućuje kontinuirani i stacionarni protok i pri nižem broju okretaja. Izlazni protok iz pumpe održava se stacionarnim tijekom cijelog radnog ciklusa primjenom koračnog motora, dok se usis u pumpu odvija pri maksimalnoj brzini. [54]

3.2.4. Tekućinski kromatograf visoke djelotvornosti (HPLC)



Slika 18. HPLC Waters 2795

Analiza uzoraka provedena je na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti, konkretno uređaju HPLC Waters 2795 (Slika 18.) koji se sastoji od vakuumske degazera, automatskog dodavača uzorka, termostata i binarne pumpe. Uređaj je spojen na detektor s nizom dioda (DAD) Waters 2996 Photodiode Array Detector. Korištena je kolona Kinetex punjena sa C18 sorbensom. Dimenzije kolone su 150 x 4,6 mm, a promjer čestica unutar kolone iznosi 5 μ m.

3.3. Opis rada

3.3.1. Priprema standardnih otopina diazepama

Prilikom provođenja eksperimenata u fotokatalitičkom reaktoru, korištena je standardna otopina diazepama koncentracije 10 mg/L. Standardne otopine pripremljene su otapanjem određene odvage diazepama u maksimalno 1 % metanola te nadopunjene redestiliranom vodom do ukupnog volumena. Primjerice, ukoliko je odvagano 2,5 mg diazepama, odvaga je otopljena u 1,5 mL metanola i prenesena u tikvicu od 250 mL. Potom je tikvica nadopunjena redestiliranom vodom do oznake. Za potrebe snimanja, iz standardne otopine početne koncentracije 10 mg/L, pripremljena su i međurazrjeđenja koncentracija 0,5, 1, 2, 5 i 8 mg/L.

3.3.2. Fotoliza diazepama

Fotolitička razgradnja diazepama provedena je zračenjem 100 mL otopine diazepama UV-lampom kroz 48 sati, kako bi se pratila koncentracija razgradnih produkata fotolize diazepama te utvrdilo vrijeme poluživota ovog farmaceutika. Svakih sat vremena (u određenim vremenskim intervalima) iz reaktora je automatskom pipetom uzet alikvot od 500 μ L te stavljen u vijalu za snimanje. Za potrebe praćenja razgradnje otopine diazepama izložene UV-zračenju, tijekom 48 sati, uzeti su uzorci u 1., 2., 4., 18.-26., 42.-48. h, kao i na samom početku spomenutog eksperimenta. Paralelno je proveden identičan eksperiment s istom otopinom diazepama, ali bez utjecaja UV-zračenja (eksperiment u mraku). Uzorci su uzimani u istim vremenskim intervalima. Eksperiment u mraku se proveo s ciljem potvrde razgradnje diazepama pod djelovanjem UV-A zračenja odnosno da se uklone bilo kakve nedoumice vezane uz smanjivanje početne koncentracije diazepama tijekom tog eksperimenta.

Svi uzeti uzorci, slijepa proba (redestilirana voda) te 6 standardnih otopina diazepama (koncentracija 0,5, 1, 2, 5, 8 i 10 mg/L), analizirani su tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti vezanom na detektor s nizom dioda (HPLC-DAD). Pritom su svi uzorci snimani dva puta.

3.3.3. Fotokatalitička razgradnja diazepama

3.3.3.1. Priprema mrežica s imobiliziranim TiO_2 [55]

Eksperimenti fotokatalitičke razgradnje otopina diazepama provedeni su primjenom titanijeva dioksida (TiO_2) imobiliziranog na staklenim mrežicama. Za potrebe ovog istraživanja, korištene su već prethodno pripremljene mrežice, čiji je postupak pripreme opisan u znanstvenom radu [55].

Prema tom znanstvenom radu [55], imobilizacija sloja TiO_2 , provedena je njegovim nanošenjem na staklenu mrežicu sol-gel metodom. Nakon što su staklene mrežice izrezane prema dimenzijama reaktora, one su vagane te se na njih titanijev dioksid nanosio iz prethodno pripravljene suspenzije. Suspenzija je dobivena miješanjem TiO_2 s destiliranom vodom i etanolom, uz omjer vode i etanola 1:1, pomoću magnetske miješalice. S ciljem dobivanja pH-vrijednosti u rasponu 1,5-2, pripremljenoj je suspenziji, uz miješanje, dodavana octena kiselina. Poslije postizanja željene pH-vrijednosti, nastavilo se s miješanjem suspenzije, da bi potom bila provedena homogenizacija ultrazvukom u ultrazvučnoj kupelji. Nakon toga dodan je tetraetoksisilan te se nastavilo miješanje na temperaturi od 50 °C. U konačnici, staklene su mrežice uranjane u tako priređenu suspenziju te stavljene na sušenje pri 70 °C u trajanju od 30 minuta. Prethodno opisan postupak uranjanja i sušenja mrežica ponovljan je 5 puta.

Ovime su priređene mrežice TiO_2 koje su zatim ostavljene na zraku 7 dana, ispirane destiliranom vodom, osušene i izvagane. Vaganjem mrežica utvrđena je masa nanesenog sloja titanijeva dioksida.

Za potrebe eksperimentalnog dijela ovoga rada korištene su dvije mrežice s različitim masama imobiliziranog sloja fotokatalizatora koje su iznosile 0,1938, odnosno 0,2094 grama. Radi pojednostavljenja, u nastavku rada će se za mrežicu manje mase (0,1938 g) koristiti oznaka M1, a za mrežicu veće mase (0,2094 g) oznaka M2.

3.3.3.2. Fotokatalitička razgradnja diazepama u prisutnosti imobiliziranog TiO₂

Praćenje fotokatalitičke razgradnje diazepama provedeno je u prisutnosti UV-zračenja istog intenziteta, no ovog puta uz dodatak katalizatora titanijeva dioksida (TiO₂). Katalizator TiO₂ imobiliziran je na nosaču (mrežici), a pri provođenju eksperimenata korištene su dvije mrežice različitih masa nanesenog sloja TiO₂. Pojedini eksperiment proveden je na način da je na dno reaktora stavljena određena mrežica, nakon čega je u reaktor dodano 100 mL standardne otopine diazepama, koncentracije 10 mg/L. Alikvoti od 500 µL uzorkovani su automatskom pipetom, svakih sat vremena, u periodu od 8 sati, pri čemu je prvi alikvot uzet trideset minuta od trenutka stavljanja otopine diazepama u kontakt s mrežicom TiO₂. Naime, toliko je vremena potrebno da se uspostavi sorpcijska ravnoteža između mrežice s katalizatorom te radne otopine diazepama odnosno da se na staklenu mrežicu sorbira ravnotežna koncentracija diazepama. Nakon uzimanja prvog alikvota upali se UV-lampa te započinje eksperiment fotokatalitičke razgradnje diazepama.

Svi su uzorci, zajedno sa slijepom probom i standardnim otopinama diazepama (koncentracija 0,5, 1, 2, 5, 8 i 10 mg/L) analizirani su pomoću HPLC-DAD.

3.3.3.3. Fotokatalitička razgradnja diazepama u prisutnosti imobiliziranog TiO₂ i otopine H₂O₂

Kako bi se pospješila fotokatalitička razgradnja diazepama u kraćem vremenu, proveden je niz eksperimenata kataliziranih kombinacijom imobiliziranog titanijeva dioksida (TiO₂) na mrežici s 30%-tnom otopinom vodikovog peroksida (H₂O₂) određene koncentracije. Tijek provođenja eksperimenata analogan je onom opisanom u odlomku 3.3.3.1. ovoga rada, uz nadopunu da su koncentracije korištenih otopina vodikovog peroksida iznosile 64, odnosno 320 mg/L.

3.3.4. Analiza uzoraka pomoću tekućinskog kromatografa visoke djelotvornosti (HPLC)

Uzorci standardnih otopina diazepama te uzorci pipetirani iz reaktora, prethodno stavljeni u vijale, analizirani su tekućinskim kromatografom visoke djelotvornosti vezanim na detektor s nizom dioda (HPLC-DAD). Pokretna faza sastojala se od 0,1 % mravlje kiseline u vodi (A) i 0,1 % mravlje kiseline u acetonitrilu (B), uz izokratno eluiranje koje je trajalo 20 minuta. Pritom je udio otapala A u pokretnoj fazi iznosio 55%, a udio otapala B iznosio je 45%.

Prije početka same analiza, kromatografska kolona je kondicionirana. Stabilizacija tlaka u koloni označila je početak analize. Tijekom analize, u kolonu je injektirano po 10 μ L uzorka, pri čemu je protok iznosio 0,5 mL/min. Snimanje i obrada dobivenih rezultata mjerenja napravljena je uz pomoć računalnog programa Mass Lynx. Diazepam je na dobivenim kromatogramima identificiran na temelju vremena zadržavanja koje je iznosilo 10,04 min, pri maksimumu apsorpcije kod valne duljine od 231 nm.

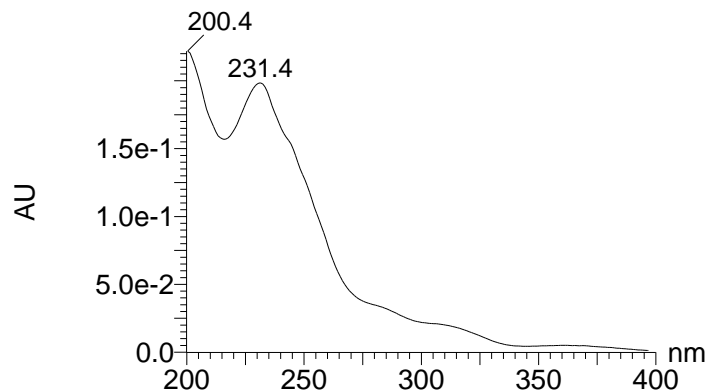
Kromatogrami dobiveni ovom analizom integrirani su, odnosno očitane su površine ispod kromatografskih krivulja pojedinog analita. Nakon provedbe kvantitativne analize diazepama, uspoređivane su vrijednosti površina standardnih otopina diazepama i dobivenih uzoraka te se odredila preostala koncentracija diazepama u uzorcima poslije razgradnje.

Za identificiranje razgradnih produkata te praćenje kinetike razgradnih produkata, korištena je identična metoda, ali na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti vezanom na spektrometar masa (HPLC-MS).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom je radu cilj bio ispitati ponašanje farmaceutika diazepama, odnosno njegovu sudbinu u vodenom okolišu u koji može dospjeti putem industrijskih otpadnih voda. Kada se farmaceutski aktivna tvar nađe u prirodnom prijamniku, ona podliježe različitim procesima razgradnje, uvjetovanim okolišnim čimbenicima. Dotični su procesi, primjerice, hidroliza i fotoliza, koji razgrađuju početnu tvar na nove molekule, odnosno razgradne produkte. Dakle, riječ je o razgradnoj reakciji pod utjecajem otapala – vode, no na koji mogu utjecati i drugi faktori, poput upadnog Sunčeva zračenja. Iz toga se razloga uvidjelo kako se isti procesi mogu simulirati prije ispuštanja otpadnih voda u okoliš i time pridonijeti razgradnji prisutnih farmaceutika i ostalih organskih tvari koje takve vode čine toksičnima. Nadalje, s namjerom ubrzanja raspada farmaceutika, istražuje se i primjena različitih katalizatora koji, bili suspendirani u otopini ili imobilizirani na nosaču, trebaju sniziti energiju aktivacije razgradnih reakcija te time smanjiti vrijeme poluraspada promatranog spoja. Titanijev dioksid primjer je jednog takvog katalizatora koji je, zbog svoje niske cijene i toksičnosti, kemijske i termičke stabilnosti te relativno visoke katalitičke aktivnosti, poželjan dodatak sustavima obrade voda zagađenima farmaceuticima. Iako je česta primjena TiO_2 u suspenziji, poželjnije je čestice titanijeva oksida imobilizirati na nosaču, poput staklene mrežice, te time olakšati njegovo uklanjanje iz sustava, to jest višekratnu primjenu. U kombinaciji s UV-zračenjem, nastaju hidroksil radikali, za koje je poznato da su oksidansi koji djeluju neselektivno, mineralizirajući organsku tvar, uz oslobađanje vode i CO_2 . [55] Nastajanje ovih radikala posebice je pospješeno dodatkom otopine vodikovog peroksida u sustav. Apsorpcijom upadnog zračenja, H_2O_2 se raspada na dva $\text{OH}\bullet$ radikala. Utjecaj svih prethodno iznesenih čimbenika na razgradnju diazepama istražen je tijekom provedbe eksperimentalnog dijela ovog rada, u čijem su nastavku izneseni dobiveni rezultati.

Mjerenjem apsorpcijskog spektra diazepama utvrđeno je da se maksimum apsorpcije postiže pri valnoj duljini od 231 nm. Ovaj je farmaceutik detektiran i kvantificiran uz pomoć HPLC-DAD te je utvrđeno da je vrijeme zadržavanja diazepama jednako 10,04 min (Slika 19.).

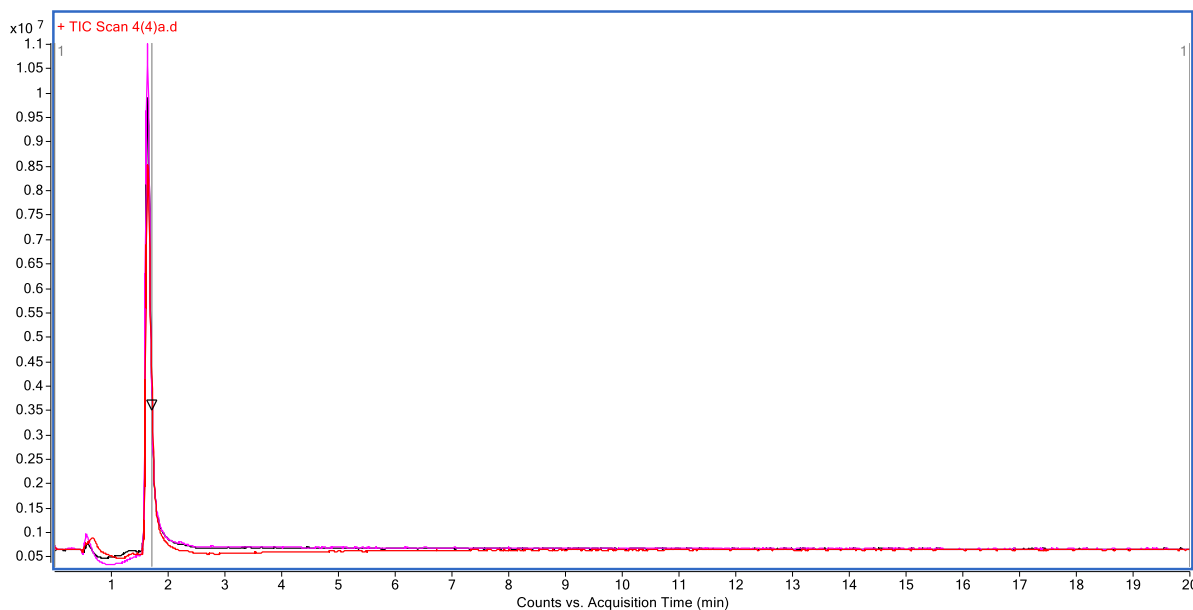


Slika 19. Apsorpcijski spektar diazepama

Nakon provedbe niza eksperimenata, opisanih u eksperimentalnom dijelu ovog rada, pristupilo se obradi dobivenih podataka, s ciljem određivanja kinetike i mehanizma razgradnje diazepama.

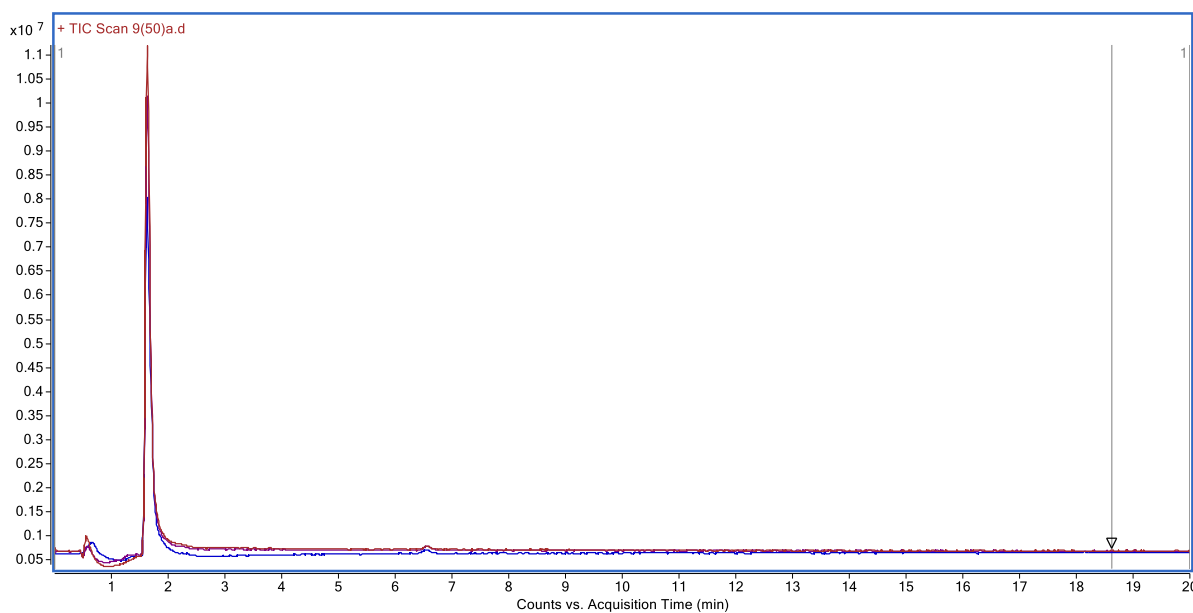
Preliminarno ispitivanje diazepama provedeno je prema smjernicama OECD-a, s ciljem utvrđivanja hidrolizira li ovaj farmaceutik ili ne. Ova smjernica [56] opisuje laboratorijsku metodu ispitivanja za procjenu abiotičkih hidrolitičkih transformacija kemikalija u vodenim sustavima pri pH-vrijednostima koje se normalno nalaze u okolišu (pH 4 - 9). Eksperimenti se izvode s ciljem određivanja brzine hidrolize ispitivane tvari kao funkcije pH-vrijednosti te identiteta ili prirode te brzine nastajanja i nestajanja produkata hidrolize, kojima mogu biti izloženi živi organizmi. Takve se studije pokazuju potrebnima za kemikalije, poput farmaceutika, konkretno diazepama, koji različitim putevima mogu dospjeti u vodeni okoliš.

Na Slikama 20. i 21. prikazani su spektri masa dobiveni spektrometrijom masa s ciljem analize diazepama prema OECD smjernicama.



Slika 20. Spektar masa dobiven analizom diazepama prema OECD-u na temperaturi od 4 °C (crvena linija prikazuje diazepam pri pH = 4, crna linija pri pH = 7, a ružičasta pri pH = 9)

Slikom 20. dan je spektar masa dobiven analizom diazepama prema OECD-u na temperaturi od 4 °C, pri čemu su zajedno prikazani spektri dobiveni za sve ispitivane pH-vrijednosti.



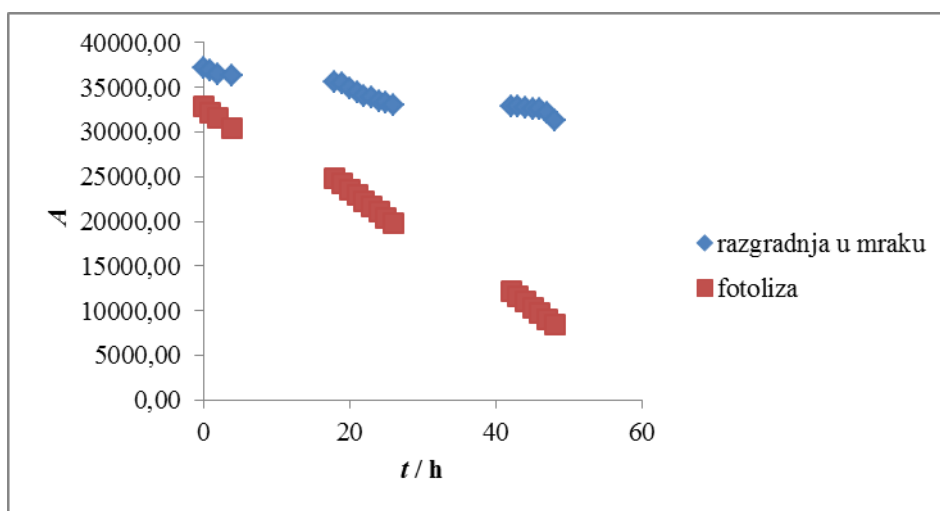
Slika 21. Spektar masa dobiven analizom diazepama prema OECD-u na temperaturi od 50 °C (plava linija prikazuje diazepam pri pH = 4, tamno ljubičasta linija pri pH = 7, a crvenkasto smeđa pri pH = 9)

Slikom 21. dan je spektar masa dobiven analizom diazepama prema OECD-u na temperaturi od 50 °C, te su tu također objedinjeni spektri dobiveni za sve ispitivane pH-vrijednosti.

Dobiveni rezultati pokazali su da se diazepam hidrolitički neće razgraditi. Takvo saznanje je bilo nužno, jer ide u prilog daljnjim eksperimentima. Naime, smanjenje koncentracije diazepama, do kojeg

u daljnjim eksperimentima dolazi, može se povezati isključivo s razgradnjom diazepama pod djelovanjem UV-zračenja, a ne s njegovom eventualnom hidrolizom.

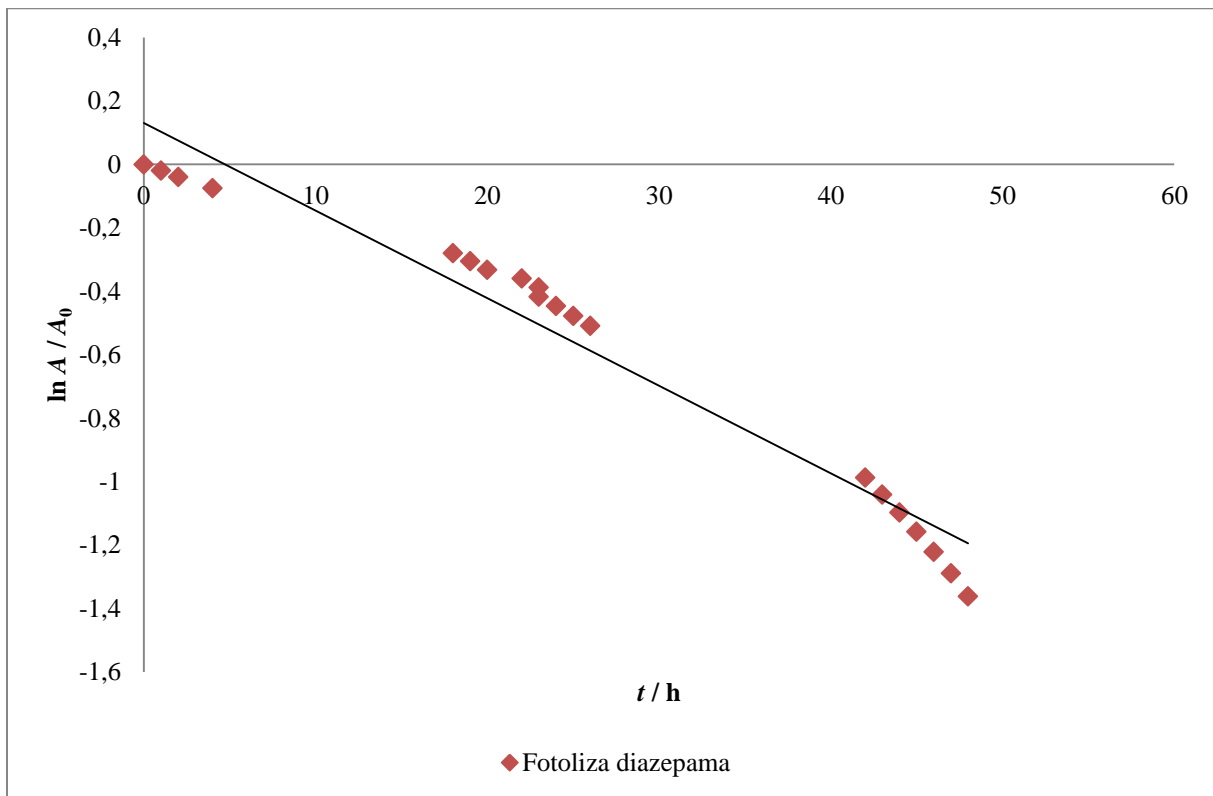
4.1. Fotolitička razgradnja diazepama



Slika 22. Ovisnost koncentracije diazepama u vremenu tijekom fotolitičke razgradnje te razgradnje u mraku

Analizom uzoraka diazepama poslije fotolitičke razgradnje pod utjecajem UV-A zračenja, kao i uzoraka koji nisu bili izloženi UV-zračenju, tijekom 48 sati dobivene su kromatografske krivulje, integracijom čijih površina je utvrđena preostala koncentracija diazepama koji se nije razgradio. Ovisnost integriranih površina kromatografskih krivulja o vremenu dana je Slikom 22. Provedbom ovog eksperimenta u mraku utvrđeno je da nije došlo do značajnijeg pada koncentracije farmaceutika, što je u skladu s brojnim istraživanjima rađenima na tu temu. [37]

Provedbom kinetičke analize (Slika 23.) dobiven je grafički prikaz pomoću kojeg je moguće odrediti vrijeme poluraspada te konstantu brzine reakcije prema kinetičkom modelu reakcije 1. reda.



Slika 23. Primjena kinetičkog modela 1. reda za analizu kinetike fotolitičke razgradnje diazepama

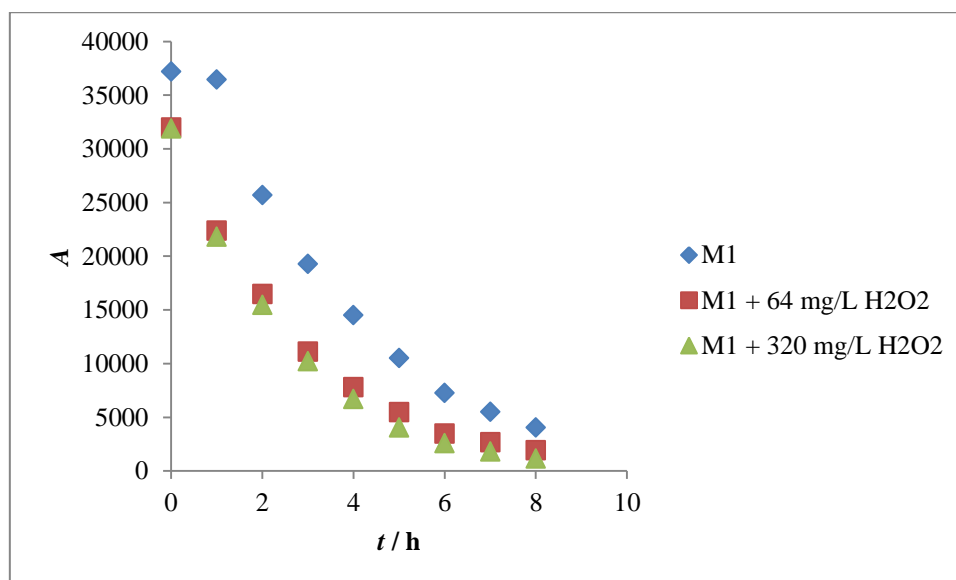
Koeficijent korelacije u slučaju primjene kinetičkog modela 1. reda na proces fotolize diazepama iznosi $R^2 = 0,9542$, što znači da je ovaj model prikladan za opis ovog sustava jer je R^2 -vrijednosti veća od 0,9. Modelom dobivena vrijednost konstante brzine reakcije jednaka je $k = 0,0276 \text{ h}^{-1}$, uz vrijeme poluraspada $t_{1/2} = 25,11 \text{ h}$.

4.2. Fotokatalitička razgradnja diazepama

Poznato je da se razgradnja farmaceutika u vodama može dodatno ubrzati primjenom katalizatora. Koliko prisutnost imobiliziranog titanijeva oksida u kombinaciji s UV-A zračenjem može ubrzati raspad diazepama ispitano je nizom narednih eksperimenata, u kojima su tijekom 8 sati uzimani uzorci iz reaktora te je praćena vremenska promjena koncentracije diazepama, pri čemu su dobiveni sljedeći rezultati.

Tablica 5. Usporedba rezultata kinetičke analize svih promatranih eksperimentalnih sustava

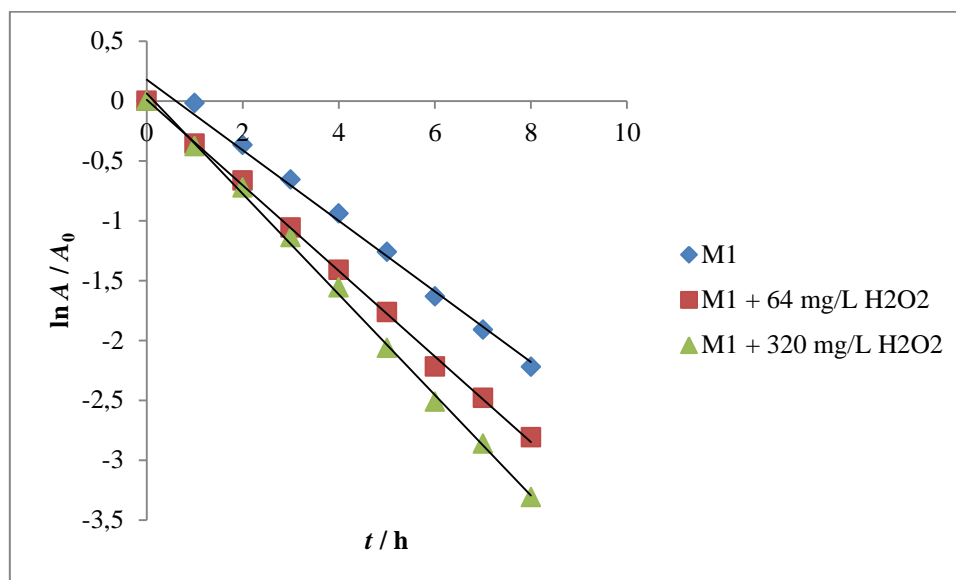
Oksidacijski proces	<i>n</i>	$t_{1/2} / \text{h}$	k / h^{-1}	R^2
Fotoliza	1	25,11	0,0276	0,9570
Fotokataliza (M1)	1	2,35	0,2949	0,9897
Fotokataliza (M1 + 64 ppm H ₂ O ₂)	1	2,19	0,3573	0,9986
Fotokataliza (M1 + 320 ppm H ₂ O ₂)	1	1,78	0,4198	0,9983
Fotokataliza (M2)	1	2,80	0,2473	0,9854
Fotokataliza (M2 + 64 ppm H ₂ O ₂)	1	2,13	0,3252	0,9856
Fotokataliza (M2 + 320 ppm H ₂ O ₂)	1	1,65	0,4200	0,9917



Slika 24. Ovisnost koncentracije diazepama o vremenu tijekom fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti mrežice M1

Iz grafičkog prikaza danog Slikom 24. može se uočiti kako je prisustvo titanijeva dioksida imobiliziranog na mrežici M1, u kombinaciji s UV-A zračenjem, pridonijelo znatno bržoj razgradnji diazepama u odnosu na slučaj kada katalizator nije bio prisutan u sustavu (Slika 22.). Naime, uspoređujući ta dva slučaja, vidljivo je da se unutar 8 sati fotokatalize, koncentracija diazepama uspjela smanjiti na manju vrijednost ($A = 4031$) od one na koju se smanjila tek nakon 48 sati fotolize diazepama ($A = 8415$). Dakle, prisustvo katalizatora uvelike pridonosi ubrzanju razgradnje ovog farmaceutika u vodi.

Ukoliko se razgradnja diazepama provodi u prisutnosti imobiliziranog titanijeva dioksida na mrežici M1 te otopine vodikovog peroksida koncentracije 64, odnosno 320 mg/L, iz grafičkog prikaza na Slici 24. vidljivo je da se najviše diazepama razgradilo ($A = 1165$) kada je koncentracija vodikovog peroksida iznosila 320 mg/L.

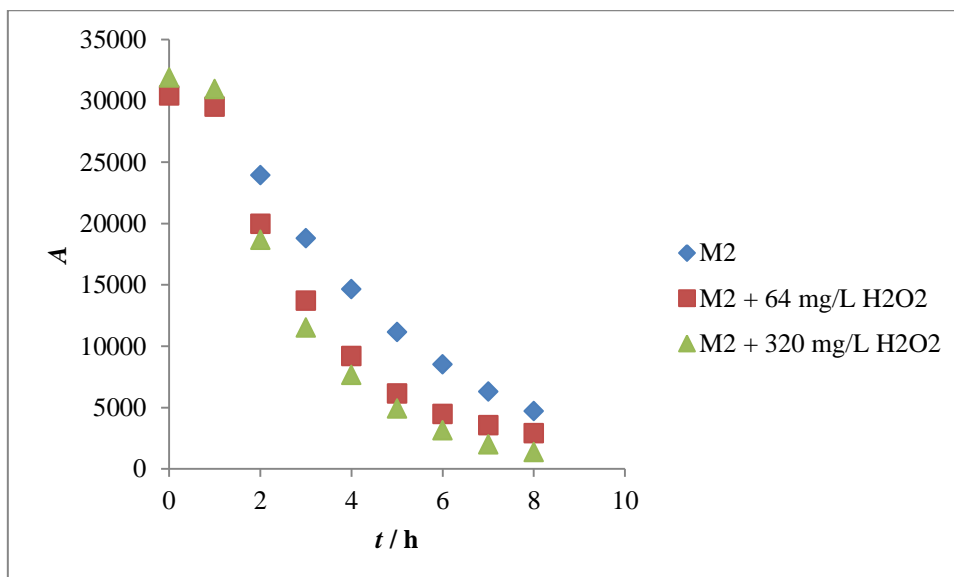


Slika 25. Primjena kinetičkog modela 1. reda za analizu kinetike fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti mrežice M1

Rezultati kinetičke analize (Tablica 5.) pokazali su da u slučaju fotokatalitičke razgradnje u prisutnosti same mrežice M1 konstanta brzine reakcije iznosi $0,2949 \text{ h}^{-1}$. Iz konstanti brzine reakcija izračunato je vrijeme poluraspada koje iznosi 2,35 h.

Nadalje, kombinacija primjene katalizatora TiO_2 imobiliziranog na mrežici M1 i UV-A zračenja uvelike pridonosi skraćenju vremena poluraspada diazepama koje je, u usporedbi s običnom fotolizom u trajanju od 25,11 h, sada skraćeno na samo 2,35 h.

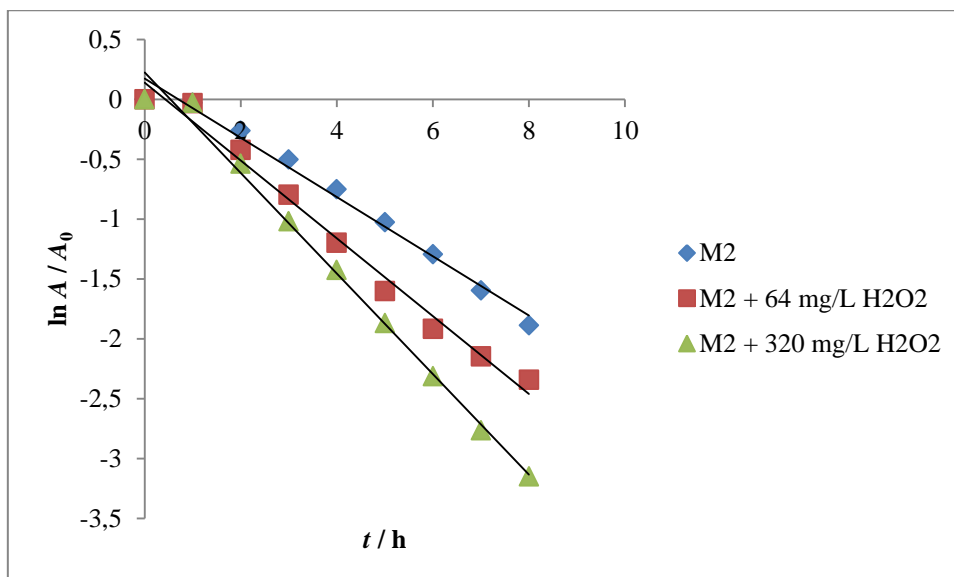
Opisom kinetike fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti H_2O_2 koncentracije 64 mg/L, vidljivo je da se vrijeme poluraspada diazepama smanjuje na 2,19 h, odnosno na 1,78 h povećanjem koncentracije H_2O_2 na 320 mg/L.



Slika 26. Ovisnost koncentracije diazepama o vremenu tijekom fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti mrežice M2

Ovisnost koncentracije preostalog diazepama u otopini tijekom vremena njegove fotokatalitičke razgradnje u prisutnosti mrežice M2 (Slika 26.) ukazuje na slična zapažanja poput onih u slučaju mrežice M1. Dakle, i ovdje je slučaj da prisutnost katalizatora u kombinaciji s UV-A zračenjem uvelike pridonosi razgradnji diazepama te njegova koncentracija pada na vrijednost iskazanu površinom kromatografske krivulje u iznosu od 4704. Ta je vrijednost nešto veća nego što je bila pri korištenju mrežice M1, gdje je $A = 4031$.

Također, predložen je i slučaj gdje se otopina vodikovog peroksida određene koncentracije kombinira s katalizatorom TiO_2 imobiliziranim pomoću mrežice M2. Uočava se da se najviše diazepama razgradilo ($A = 1369$) u slučaju njegove fotokatalize u prisutnosti otopine H_2O_2 koncentracije 320 mg/L. Nešto lošija ($A = 2924$) bila je fotokatalitička razgradnja diazepama u prisutnosti otopine H_2O_2 koncentracije 64 mg/L, međutim trend njezina smanjenja veoma je sličan prethodnom slučaju. Mogući razlog tome je nastanak manjeg broja hidroksilnih radikala kada je otopina vodikovog peroksida manje koncentracije. Svejedno, neovisno o koncentraciji vodikovog peroksida, razgradnja diazepama bit će bolja nego li je bila u eksperimentu bez dodatka peroksida. [57]

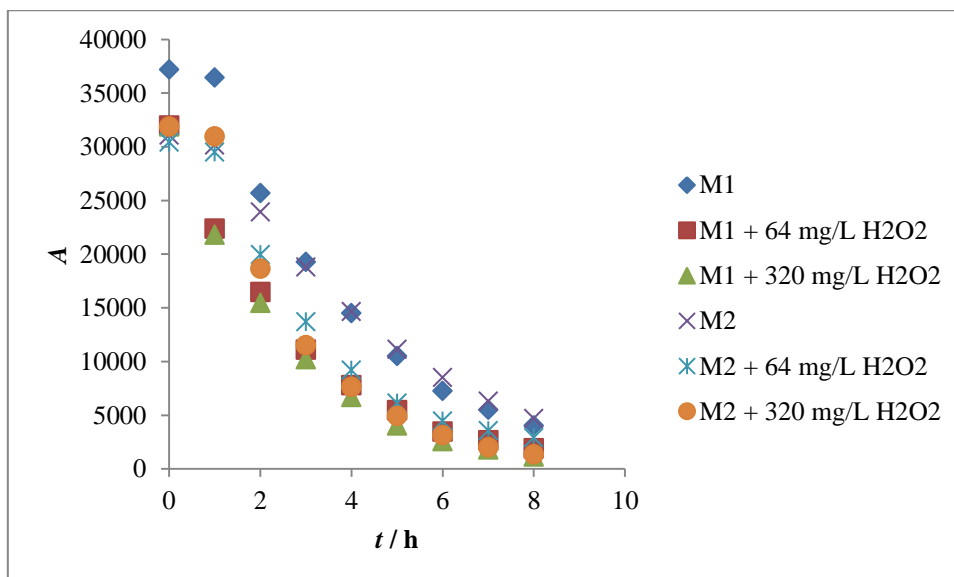


Slika 27. Primjena kinetičkog modela 1. reda za analizu kinetike fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti mrežice M2

Grafičkim prikazom na Slici 27. određene su konstante brzine fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti mrežice M2. Primjenom modela reakcije 1. reda dobivena je konstanta k koja iznosi $0,2473 \text{ h}^{-1}$ ($R^2 = 0,9854$), uz vrijeme poluraspada $2,80 \text{ h}$, za slučaj samostalne primjene mrežice M2.

Fotokatalitička razgradnja diazepama, u slučaju koncentracije vodikovog peroksida od 64 mg/L , odvija se uz veću konstantu brzine reakcije 1. reda u iznosu od $0,3252 \text{ h}^{-1}$, uz $R^2 = 0,9856$. Dakle, vrijeme poluraspada u ovom je slučaju kraće te iznosi $2,13 \text{ h}$. Ako se, međutim, razgradnja diazepama provodi fotokatalitički, također prema kinetičkom modelu reakcije 1. reda, samo uz otopinu vodikovog peroksida koncentracije 320 mg/L , tada će se polovica početne koncentracije diazepama razgraditi u najkraćem vremenu od $1,65 \text{ h}$, uz najveću vrijednost konstante brzine $k = 0,4200 \text{ h}^{-1}$ te $R^2 = 0,9917$.

Kako bi se sumarno razmotrili svi ispitivani sustavi, Slikom 28. dan je uvid u rezultate kinetičkih analiza svih prethodno opisanih slučajeva.



Slika 28. Usporedba ovisnosti koncentracije diazepama o vremenu tijekom fotokatalitičke razgradnje diazepama u prisutnosti mrežice M1, odnosno mrežice M2

Najmanje vrijeme poluraspada diazepama, u iznosu od 1,65 h, pojavljuje se pri fotokatalizi provedenoj na mrežici M2, u kombinaciji s otopinom H_2O_2 , koncentracije 320 mg/L, a slijedi ga vrijeme poluraspada diazepama na mrežici M1 s H_2O_2 koncentracije 320 mg/L ($t_{1/2} = 1,78$ h). Iza navedenih slučajeva slijede fotokatalitičke razgradnje na obje mrežice, samo ovog puta s otopinom H_2O_2 manje koncentracije (64 mg/L), gdje su vremena poluraspada iznosila 2,19 h (M1) te 2,13 h (M2). Konačno, najsporije razgradnje u nizu su same fotokatalize na obje mrežice, s vremenima poluraspada 2,35 h (mrežica M1), odnosno 2,80 h (mrežica M2).

Prisutnost katalizatora titanijeva dioksida imobiliziranog na određenoj mrežici uvelike pridonosi ubrzanju razgradnje reakcije diazepama, a to je ubrzanje još i veće kada se u sustav doda i otopina vodikovog peroksida određene koncentracije.

Ipak, na osnovu dobivenih rezultata može se uočiti kako vremena poluraspada diazepama u potpunosti ne slijede masu TiO_2 na ispitivanim mrežicama (Tablica 5.). Budući da je na svakoj od ispitivanih mrežica proveden po jedan eksperiment, pri čemu nije uočen neki uobičajen trend smanjivanja vremena poluživota diazepama (ne može se masa imobiliziranog sloja TiO_2 u potpunosti povezati s dobivenim vremenima poluživota, bar ne za sve provedene eksperimente), a i razlika mase između dviju ispitivanih mrežica nije značajna (razlika je 0,0156 g) za očekivati je da bi se te razlike smanjile s povećanjem broja eksperimenata na svakoj od ispitivanih mrežica. Naravno, svi eksperimenti provedeni na svakoj od mrežica mogli su se prikazati i kao njihova srednja vrijednost. Ipak, to nije učinjeno iz razloga što se tijekom samog nanošenja sloja TiO_2 na staklene mrežice ne može u potpunosti kontrolirati. Naime, istim postupkom mogu se dobiti mrežice vidljivo identične, ali različitih hrapavosti površina te različitog broja slojeva TiO_2 na svim mjestima mrežice. Iz tog razloga je mrežicama pristupano zasebno, a u cilju povezivanja mase nanijetog sloja TiO_2 s vremenom

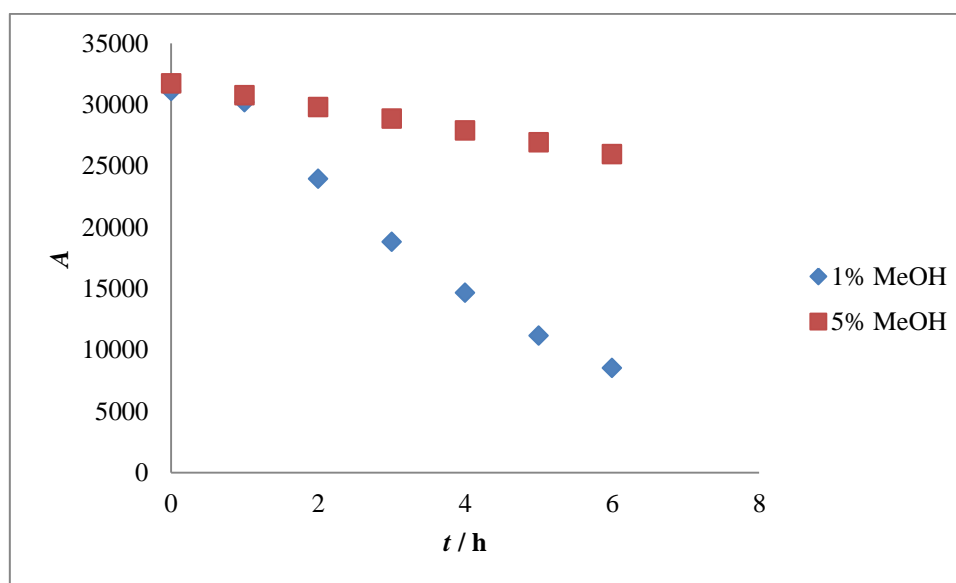
poluraspada diazepama morat će se koristiti mrežice većih razlika masa pri čemu će za svaku od mrežica trebat napraviti veći broj ponovljenih eksperimenata.

Eksperimenti u ovom radu provedeni su samo iz razloga potvrđivanja ubrzavanja razgradnje diazepama primjenom katalizatora TiO_2 imobiliziranog na mrežici u odnosu na običnu fotolizu.

S dodatkom vodikovog peroksida u fotokatalitički sustav uz prisutnost određene mrežice te povećanjem njegove koncentracije sa 64 na 320 mg/L, vidljiv je trend smanjenja vremena poluraspada diazepama.

Paralelno s fotolitičkim i fotokatalitičkim procesima, provedeni su i procesi u mraku, kako bi se mogao isključiti potencijalni gubitak farmaceutika diazepama na, primjerice, stijenkama reaktora ili mrežicama, odnosno pretjerani pad njegove koncentracije uslijed adsorpcije. Rezultati tih ispitivanja nisu pokazali veća odstupanja od istraživanja prethodno obavljenih na tu temu i slična su onim prikazanim na Slici 22. [57]

Također, s ciljem utvrđivanja mehanizma fotokatalitičke razgradnje diazepama, proveden je isti oksidacijski proces, samo uz promjenu udjela dodanog metanola (s 1% na 5%) pri pripremi standardne otopine diazepama. Pritom su dobiveni rezultati prikazani Slikom 29.



Slika 29. Usporedba promjene koncentracije diazepama u ovisnosti o vremenu uz različiti udio metanola u standardnoj otopini diazepama

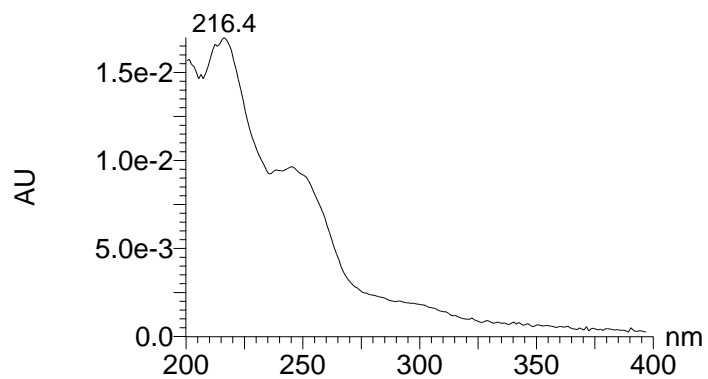
Naime, ovim kontrolnim eksperimentom utvrđeno je da prisutnost većeg udjela metanola, kao „hvatača“ hidroksilnih radikala, značajno inhibira razgradnju diazepama, što je vidljivo na Slici 29. Konačna koncentracija diazepama s 1% dodanog metanola iznosi $A = 8516$, dok ona s 5% dodanog metanola iznosi 25954. Dakle, mehanizam razgradnje diazepama upravo je uvjetovan djelovanjem $\text{OH}\bullet$ radikala, koji nastaju pobudom TiO_2 te prelaskom elektrona iz valetne u vodljivu vrpцу, čime na

hidriranoj i hidroksiliranoj površini titanijeva dioksida, šupljine zadržavaju površinski vezane hidroksilne radikale. [46]

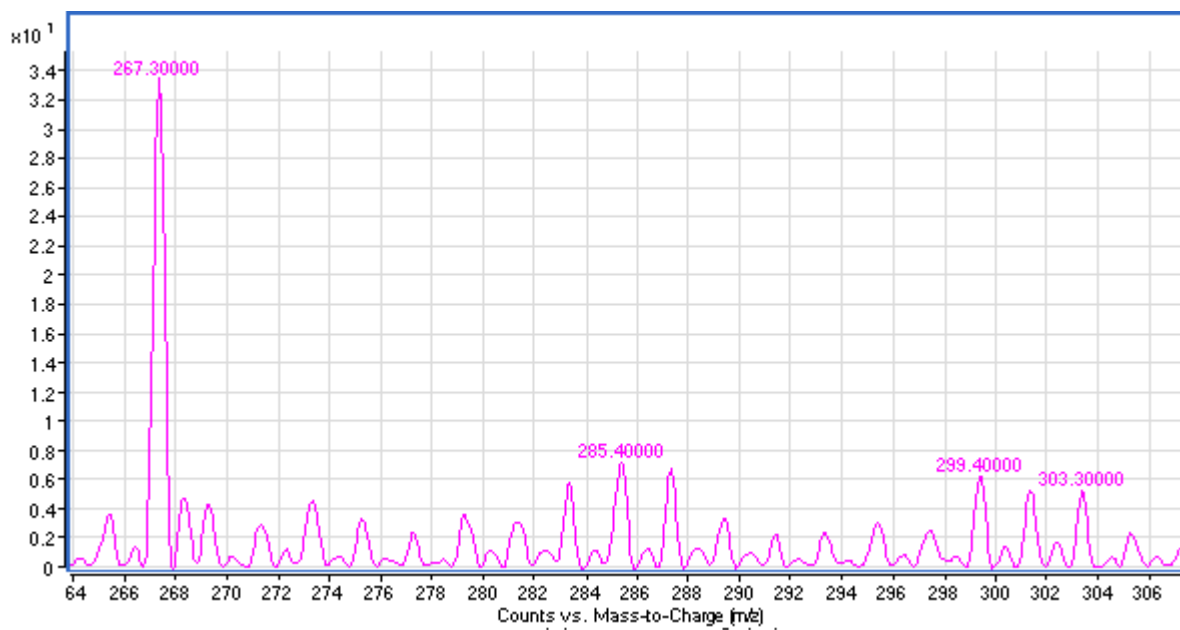
4.3. Identifikacija produkata fotolitičke i fotokatalitičke razgradnje diazepama

Analizom uzoraka otopina diazepama na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti s nizom dioda te potvrdom rezultata s onima dobivenim detekcijom istih uzoraka, samo spektrometrom masa, identificirani su novi spojevi koji nastaju razgradnjom diazepama, odnosno njegovi razgradni produkti. Kvalitativni je parametar, to jest onaj pomoću kojeg je moguće identificirati određeni analit, vrijeme zadržavanja (t_R), a produkti koji su identificirani imali su vremena zadržavanja od 3,64, 3,90, 4,94, 5,31 te 6,46 min. Njihovi apsorpcijski spektri i spektri masa dani su Slikama 30.-39. Tablicom 6. dana su vremena zadržavanja spoja određenog omjera mase i naboja (m/z), dobivena detekcijom pomoću DAD⁶-a te potvrđena spektrometrom masa. Također, istom tablicom su dane i strukturne formule pojedinog identificiranog razgradnog produkta.

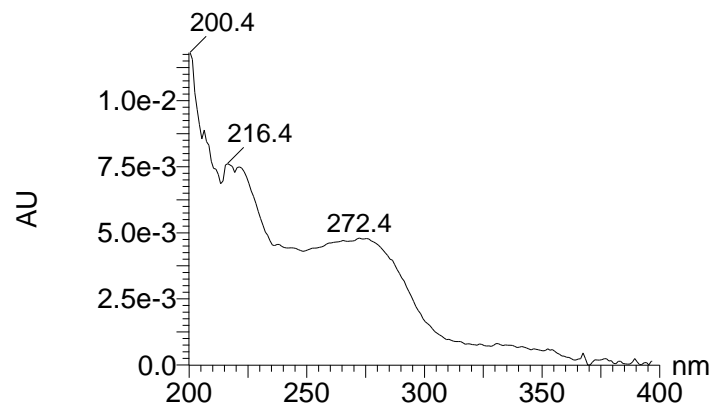
⁶ engl. *Diode Array Detector*



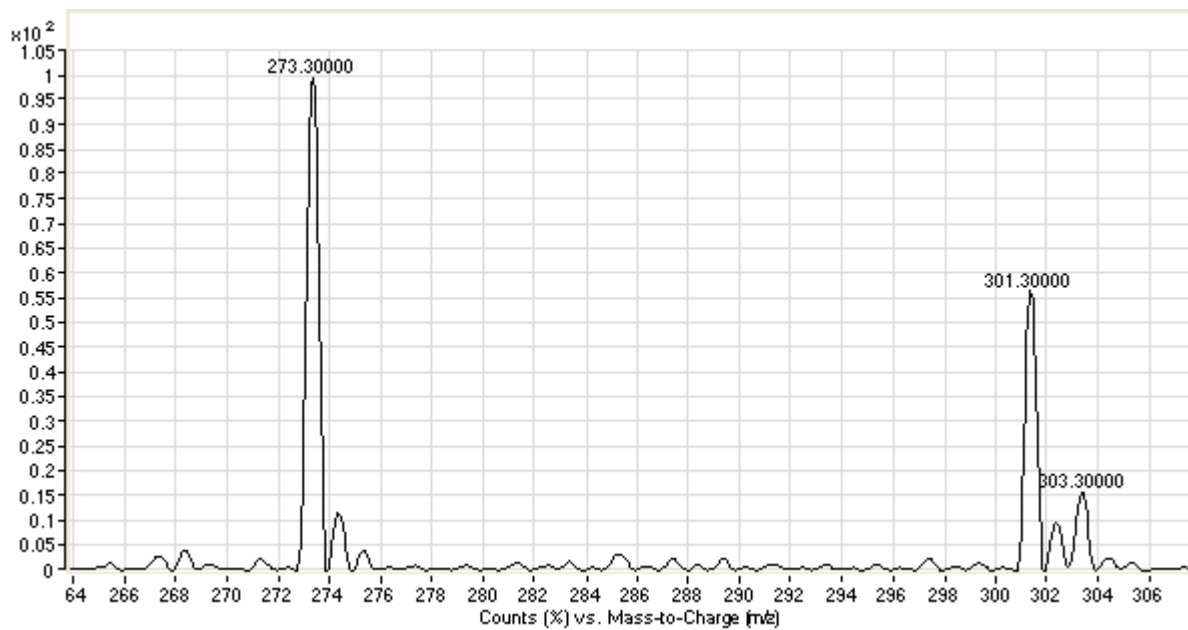
Slika 30. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta diazepama vremena zadržavanja 3,64 min



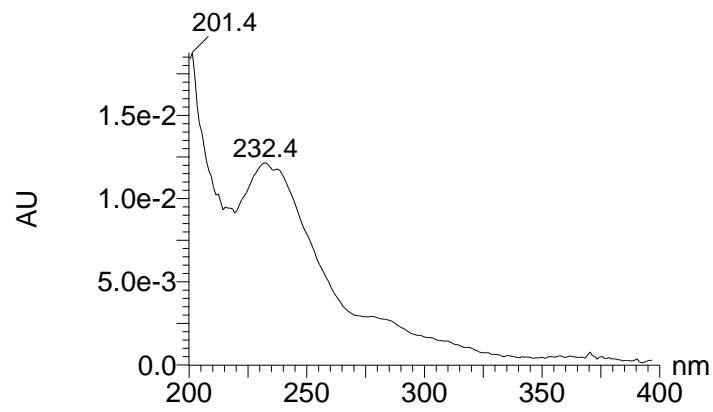
Slika 31. Spektar masa prema kojem je određena formula razgradnog produkta diazepama vremena zadržavanja 3,64 min



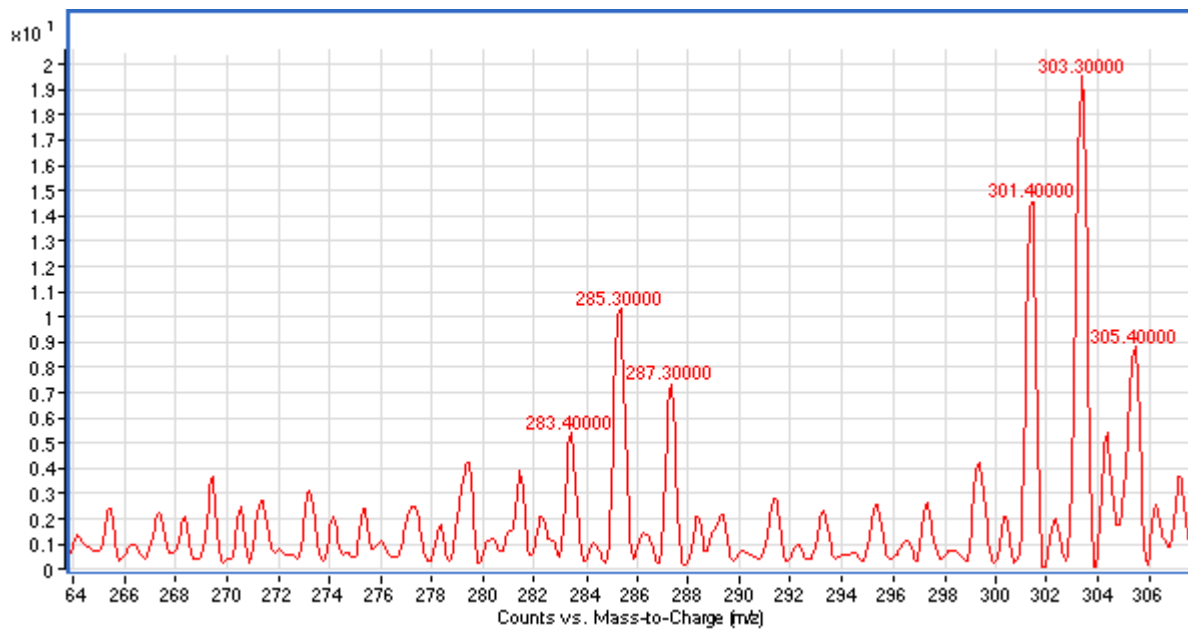
Slika 32. ApSORPCIJSKI SPEKTAR RAZGRADNOG PRODUKTA DIAZEPAMA VREMENA ZADRŽAVANJA 3,90 min



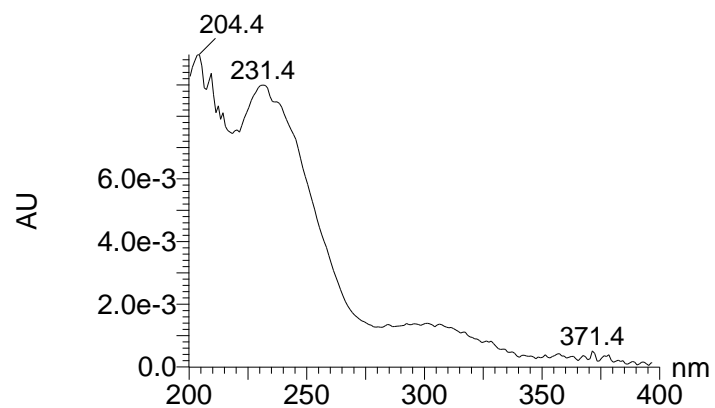
Slika 33. Spektar masa prema kojem je određena formula razgradnog produkta diazepamna vremena zadržavanja 3,90 min



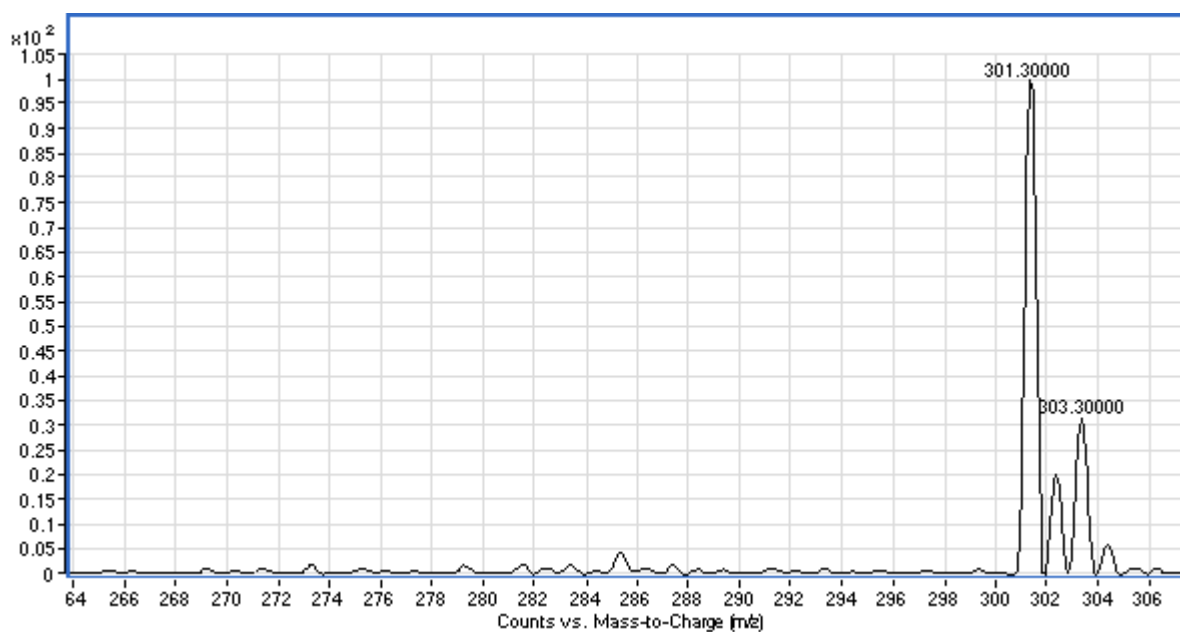
Slika 34. ApSORPCIJSKI SPEKTAR RAZGRADNOG PRODUKTA DIAZEPAMA VREMENA ZADRŽAVANJA 4,94 min



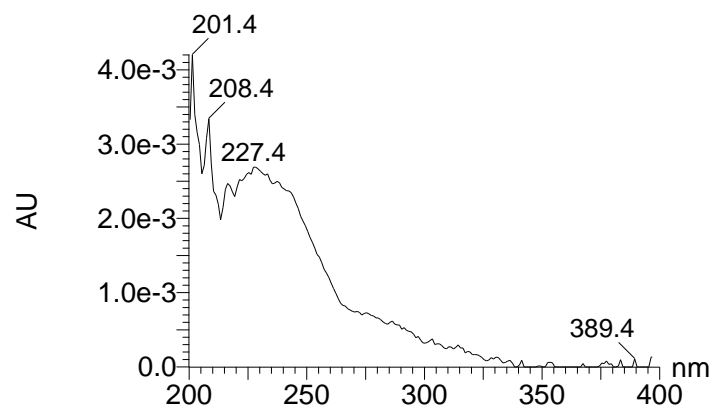
Slika 35. Spektar masa prema kojem je određena formula razgradnog produkta diazepam vremena zadržavanja 4,94 min



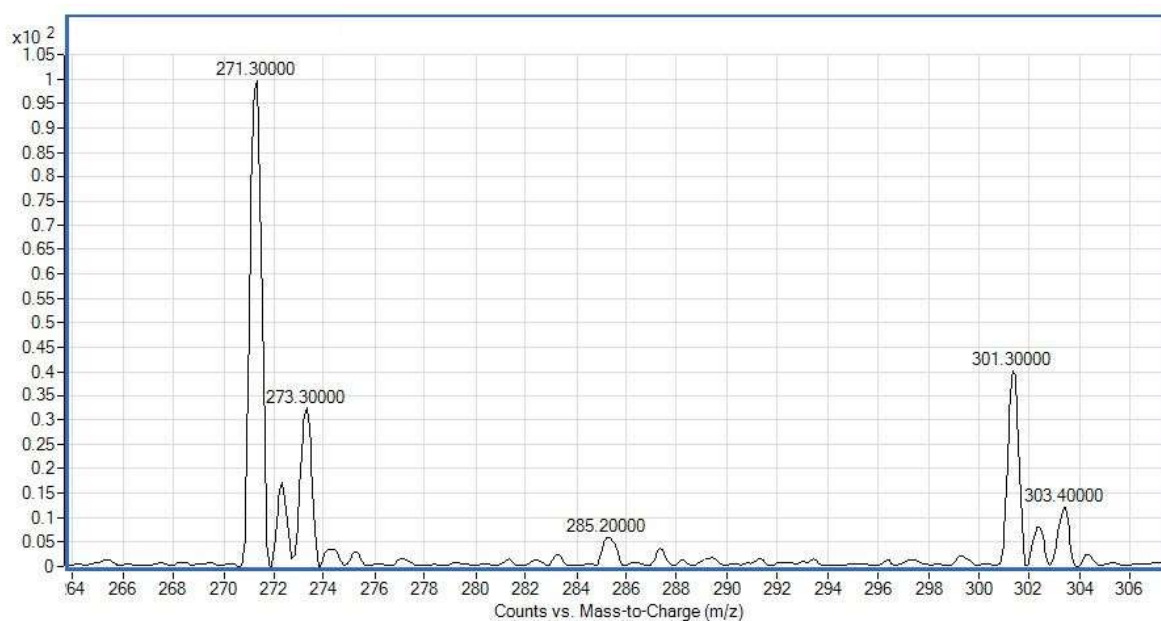
Slika 36. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta diazepama vremena zadržavanja 5,31 min



Slika 37. Spektar masa prema kojem je određena formula razgradnog produkta diazepama vremena zadržavanja 5,31 min

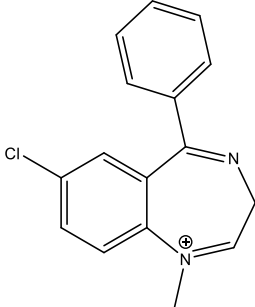
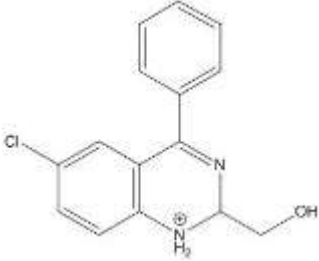
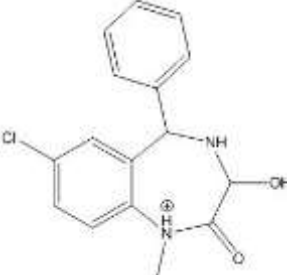
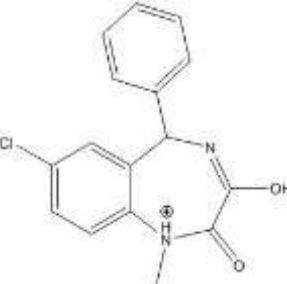
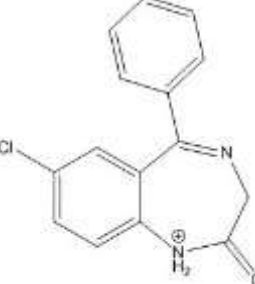


Slika 38. Apsorpcijski spektar razgradnog produkta diazepama vremena zadržavanja 6,46 min

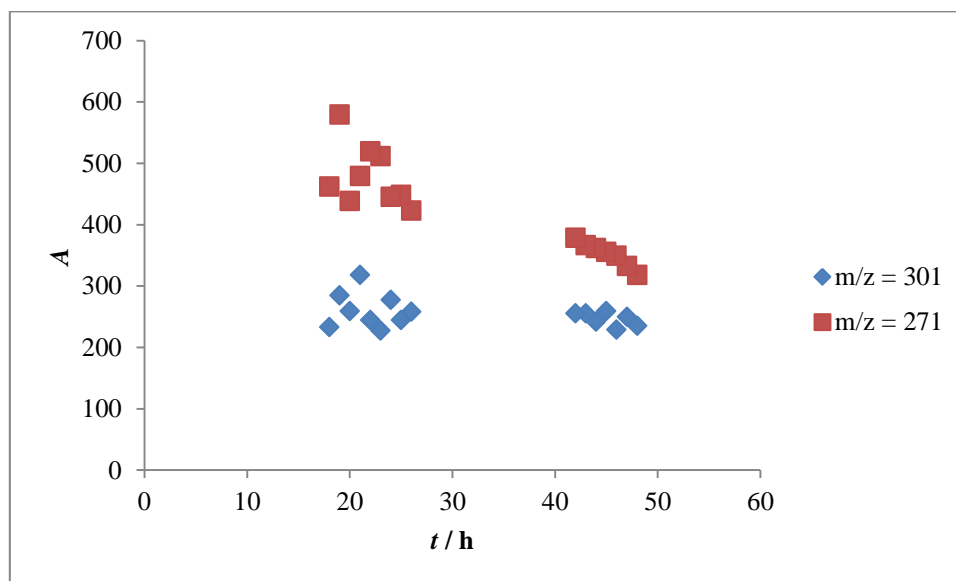


Slika 39. Spektar masa prema kojem je određena formula razgradnog produkta diazepama vremena zadržavanja 6,46 min

Tablica 6. Identificirani razgradni produkti diazepama

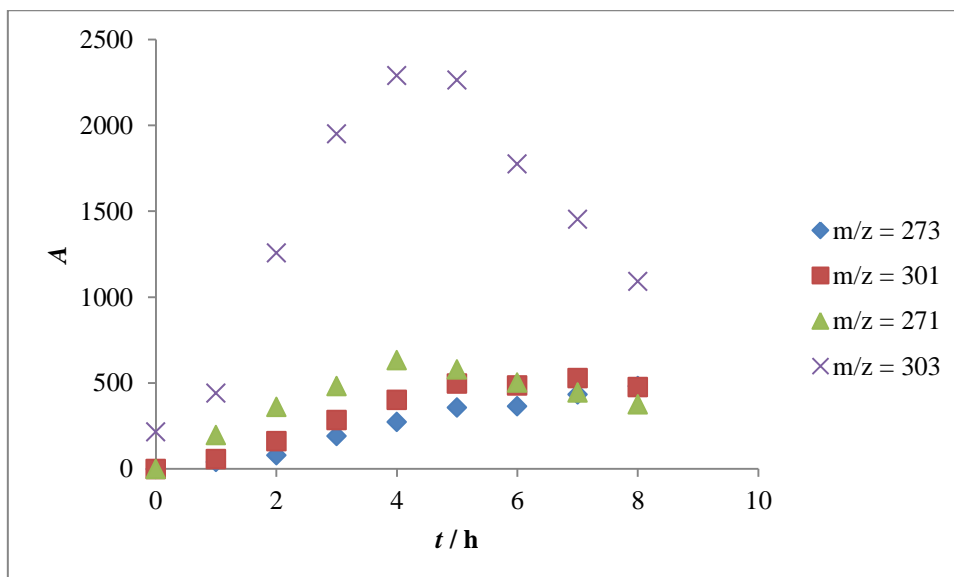
t_R (DAD) / min	m/z	Strukturna formula
3,64	267	
3,90	273	
4,94	303	
5,31	301	
6,46	271	

Provedbom kvantitativne analize, odnosno integracijom površina ispod dobivenih kromatografskih krivulja, određena je koncentracija pojedinog razgradnog produkta u određenom vremenu od početke fotolitičke ili fotokatalitičke razgradnje. Ovime je moguće grafički prikazati njihove kinetičke profile te provesti samu kinetičku analizu.



Slika 40. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih tijekom fotolitičke razgradnje diazepama

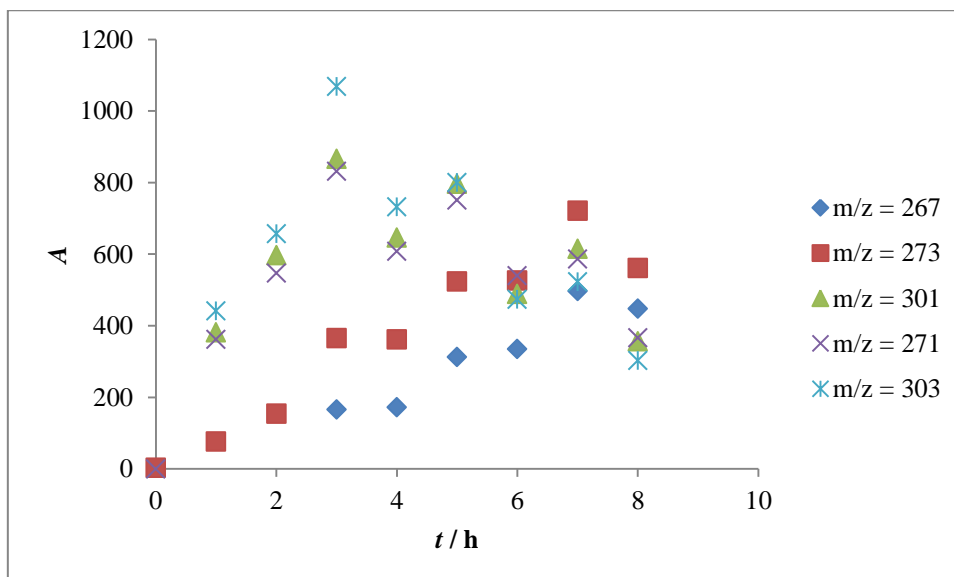
Slikom 40. dan je grafički prikaz koncentracijskih profila dvaju identificiranih razgradnih produkata koji su nastali tijekom 48-satne fotolitičke razgradnje farmaceutika diazepama. Uočava se kako je koncentracija razgradnog produkta vremena $m/z = 271$ kod svih analiziranih uzoraka veća u odnosu na onu produkta $m/z = 301$. Također, vrijedi primijetiti da razgradni produkti $m/z = 267$, $m/z = 273$ te $m/z = 303$ nisu nastali ovom vrstom razgradnje ili su njihove koncentracije bile toliko malene da su se nalazile ispod razine detekcije.



Slika 41. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih primjenom mrežice M1

Slika 41. prikazuje koncentracijske profile prethodno identificiranih razgradnih produkata, a koji nastaju uz provedbu fotokatalize na mrežici M1. Vidljivo je kako, u ovom slučaju, svi razgradni produkti nastaju istovremeno, pri čemu je najdominantniji razgradni produkt $m/z = 303$, čija je brzina nastanka najveća. Nakon razgradnog produkta $m/z = 303$ nastaje $m/z = 271$, potom $m/z = 301$ te naposljetku najsporije nastaje razgradni produkt $m/z = 273$.

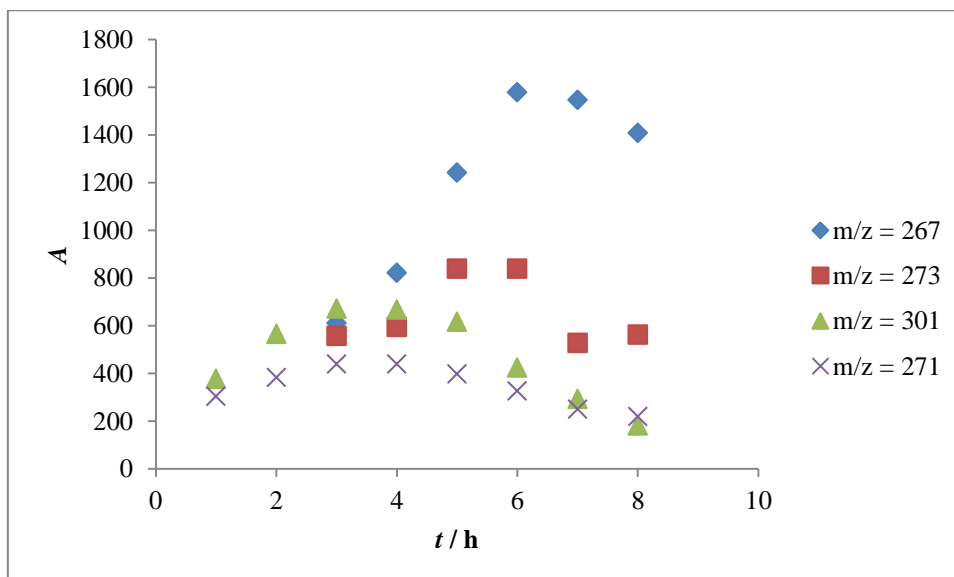
Nadalje, može se uočiti da razgradni produkt $m/z = 303$ najbrže nastaje te je i njegova koncentracija u sustavu najveća ($A = 2290,55$). Razgradni produkt $m/z = 271$ dostiže najveću koncentraciju ($A = 632,52$), no najviše se i razgradi tijekom ovog eksperimenta fotokatalitičke razgradnje (do $A = 375,21$ tijekom 8 h). Razgradni produkt $m/z = 301$ postiže svoj maksimum 3 sata kasnije, u iznosu od $A = 528,81$, a onda se uočava pad njegove koncentracije. Plavim rombovima na grafu označen je koncentracijski profil razgradnog produkta $m/z = 273$, za kojeg je već ustavnovljeno da je brzina njegova nastanka najsporija, međutim koncentracija ovog produkta raste za vrijeme svih 8 sati provođenja ovog eksperimenta, s najvećom vrijednošću u iznosu od $A = 482,84$. Da se eksperiment nastavio pratiti i nakon 8 h, zanimljivo bi bilo vidjeti da li bi se razgradni produkt $m/z = 273$ nastavio i dalje stvarati ili bi već u sljedećem satu došlo do njegove razgradnje odnosno pada koncentracije.



Slika 42. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih primjenom mrežice M1 u kombinaciji s otopinom H_2O_2 koncentracije 64 mg/L

Ukoliko se, pak, eksperimenti provode na istoj mrežici (M1), samo još uz dodatak vodikovog peroksida, uočava se kako se tijekom 8 sati provedbe eksperimenta u sustavu pojavljuje pet razgradnih produkata, $m/z = 267$, $m/z = 271$, $m/z = 273$, $m/z = 301$ i $m/z = 303$. Ovdje, međutim, njihov nastanak nije istovremen, već najprije nastaje razgradni produkt $m/z = 273$, potom se s njime javljaju i $m/z = 271$, $m/z = 301$ te $m/z = 303$, da bi se tek nakon 3 sata provođenja eksperimenta mogao uočiti nastanak $m/z = 267$.

Zanimljivo je uočiti i da je trend, prvo nastajanja, a potom i nestajanja, razgradnih produkata s $m/z = 271$, $m/z = 301$ i $m/z = 303$, veoma sličan onom uočenom za mrežicu M1, dok se profili preostala dva razgradna produkta ($m/z = 267$ i $m/z = 273$), od njih međusobno dosta razlikuju. Nadalje, ovim eksperimentom najviše je nastalo razgradnog produkta $m/z = 303$ ($A = 1069,04$), uz istovremeni nastanak (3 sata od početka mjerenja) nešto manje koncentracije razgradnih produkata $m/z = 301$ ($A = 866,12$) te $m/z = 271$ ($A = 831,37$). U 7. satu preostali razgradni produkti ($m/z = 267$ i $m/z = 273$) postižu svoj maksimum, s time da je koncentracija produkta $m/z = 273$ veća nego kod razgradnog produkta $m/z = 267$.

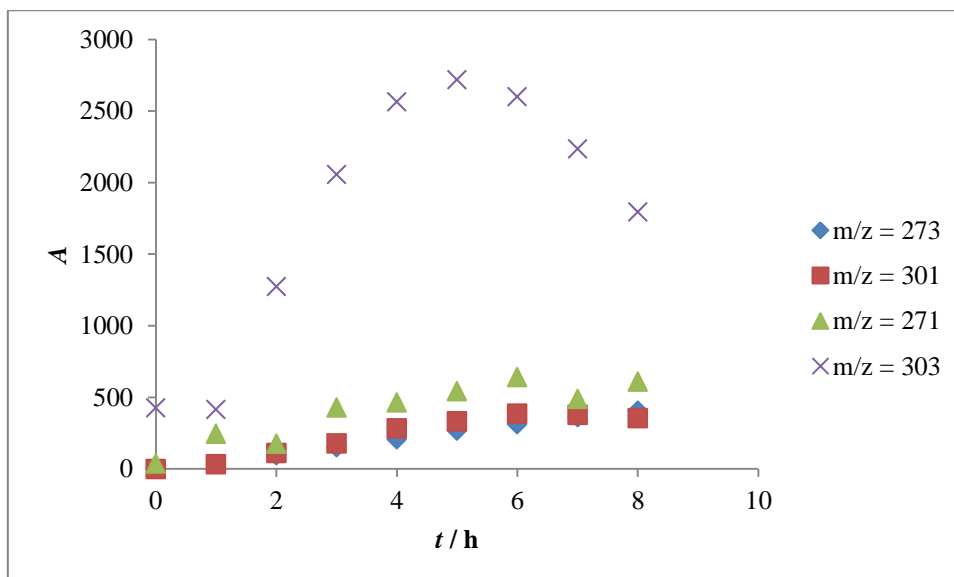


Slika 43. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih primjenom mrežice M1 u kombinaciji s otopinom H_2O_2 koncentracije 320 mg/L

Gornjom je slikom predočena promjena koncentracije svih detektiranih razgradnih produkata tijekom 8 sati provedbe fotokatalize na mrežici M2, uz H_2O_2 koncentracije 320 mg/L. I ovdje se može uočiti da se javljaju isti razgradni produkti kao i kod slučaja s manjom koncentracijom H_2O_2 , samo se njihovi profili uvelike razlikuju. Najprije nakon 1 sata nastaju razgradni produkti $m/z = 271$ i $m/z = 301$, a potom, u 3. satu, detektirani su i produkti $m/z = 267$ i $m/z = 273$.

Također, na temelju grafa može se konstatirati kako je tijekom 7 sati koncentracija razgradnog produkta s najduljim vremenom zadržavanja ($m/z = 271$) bila, u odnosu na ostale produkte, najmanja, da bi tek u 8. satu razgradni produkt $m/z = 301$, imao nešto manju koncentraciju. Jasno se može uočiti da ovim eksperimentom nastaje najviše razgradnog produkta $m/z = 267$, i to u 6. satu od početka provođenja eksperimenta.

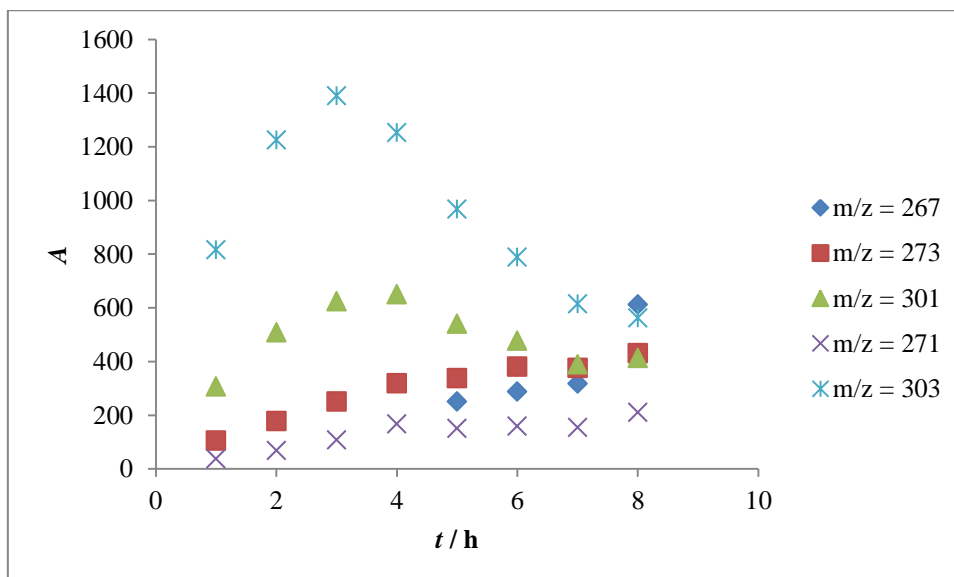
Uspoređujući izgled pojedinih profila, i dalje se nazire sličnost u profilima razgradnih produkata $m/z = 271$ i $m/z = 301$, iako ona nije toliko velika kao u slučaju primjene H_2O_2 niže koncentracije.



Slika 44. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih primjenom mrežice M2

Provedbom fotokatalitičkih eksperimenata, samo uz prisustvo mrežice M2, detektiran je nastanak istih razgradnih produkata $m/z = 271$, $m/z = 273$, $m/z = 301$ i $m/z = 303$ kao i u slučaju mrežice M1. Prvi razgradni produkti koji nastaju su $m/z = 271$ i $m/z = 303$, a koncentracija posljednjeg spomenutog razgradnog produkta je tijekom sljedećih 8 sati i najveća, s maksimumom u 5. satu ($A = 2719,29$).

Razgradni produkt $m/z = 271$ nastaje sljedeći, a njegova koncentracija postiže maksimum u 6. satu te iznosi $A = 640,85$. Sljedeći produkt $m/z = 301$ koji nastaje je onaj čiji je maksimum također u 6. satu ($A = 385,36$), no on se razgradi do najmanje koncentracije (na $A = 355,13$). Naposljetku, kod razgradnog produkta $m/z = 273$ primjećuje se da je promjena njegove koncentracije približno linearna s vremenom, to jest u stalnom porastu pa se najveća vrijednost upravo javlja tek u 8. satu ($A = 406,25$), kada se prekinulo praćenje eksperimenata. Usporedbom koncentracijskih profila mrežice M2 s onim kod mrežice M1 primjećuje se velika sličnost i isti redosljed pojavljivanja razgradnih produkata $m/z = 271$, $m/z = 273$, $m/z = 301$ i $m/z = 303$, s razlikom što se kod mrežice M1 najdominantniji razgradni produkt $m/z = 271$ pojavljuje s maksimumom u 4. satu što je sat vremena ranije nego kod mrežice M2.

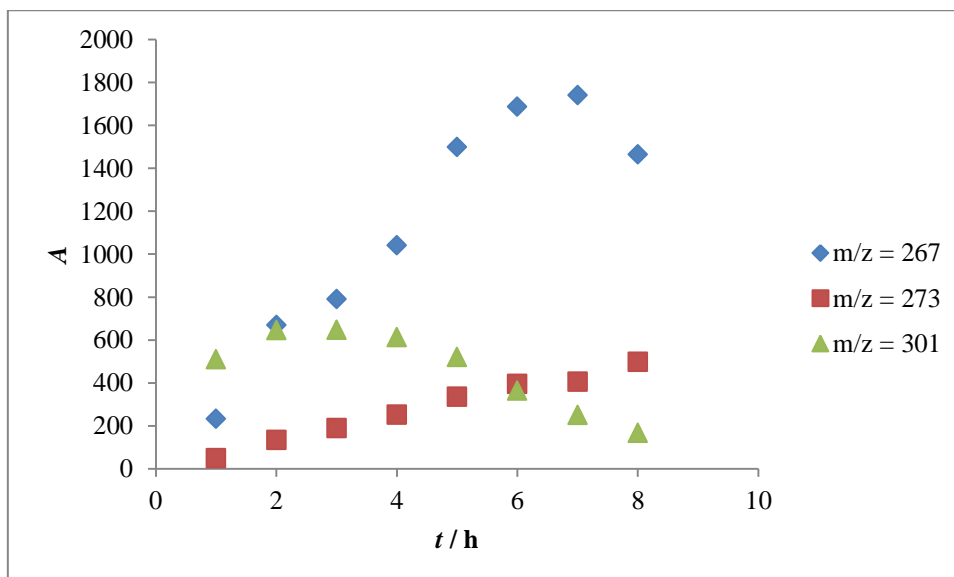


Slika 45. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih primjenom mrežice M2 u kombinaciji s otopinom H_2O_2 koncentracije 64 mg/L

Usporedbom koncentracijskih profila razgradnih produkata nastalih fotokatalitički na mrežici M2, uz prisutnost otopine H_2O_2 koncentracije 64 mg/L, vidljivo je kako od pet detektiranih produkata, $m/z = 267$, $m/z = 273$, $m/z = 301$, $m/z = 271$ i $m/z = 303$, prvi nastaju produkti $m/z = 271$, $m/z = 273$, $m/z = 301$ i $m/z = 303$, a posljednji produkt $m/z = 267$.

Dakako, najveće koncentracije uočljive su u prva 3 sata za razgradni produkt $m/z = 303$, s maksimumom u 3. satu ($A = 1390,33$), da bi zatim došlo do njegove brze razgradnje. Sljedeći produkt s manjim koncentracijama je $m/z = 301$, čije koncentracije rastu u prvih 4 sata, s maksimumom u 4. satu ($A = 650,46$), a potom se naglo smanjuju. Razgradni produkt $m/z = 273$ nastaje nešto sporije od prethodno spomenutog, međutim njegova je koncentracija stalno u porastu, s najvećom vrijednosti u 8. satu razgradnje diazepama u iznosu od $A = 430,99$. Isto vrijedi i za razgradni produkt $m/z = 271$, čija se najveća vrijednost također javlja tek u 8. satu te iznosi $A = 210,37$.

Naposlijetku, kao što je već istaknuto, razgradni produkt $m/z = 267$ nastaje posljednji (u 5. satu od početka razgradnje diazepama) te mu je kroz sljedeća dva sata koncentracija u blagom porastu, da bi naglo porasla u 8. satu te iznosila $A = 612,66$.



Slika 46. Koncentracijski profili svih identificiranih razgradnih produkata nastalih primjenom mrežice M2 u kombinaciji s otopinom H_2O_2 koncentracije 320 mg/L

Posljednji razmatrani fotokatalitički sustav bit će onaj s kombinacijom mrežice M2 te otopine vodikovog peroksida koncentracije 320 mg/L. Na Slici 46. je vidljivo kako u ovom sustavu istovremeno nastaju tri razgradna produkta $m/z = 267$, $m/z = 273$ i $m/z = 301$, pri čemu u tom 1. satu najviše nastaje razgradnog produkta $m/z = 301$, a najmanje produkta $m/z = 273$.

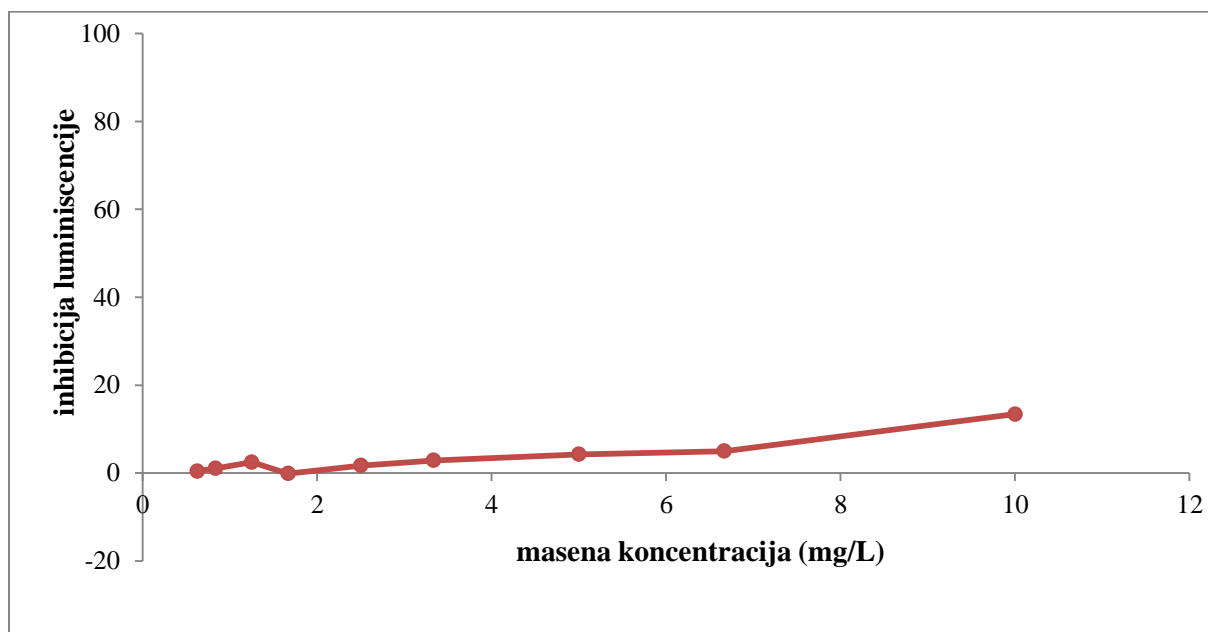
Još se može uočiti kako koncentracije razgradnih produkata $m/z = 267$ i $m/z = 301$ u određenom trenutku dosežu svoj maksimum (za prvi razgradni on iznosi $A = 1740,94$, a za drugi $A = 648,34$), dok je koncentracija razgradnog produkta $m/z = 273$ u stalnom porastu (najveće koncentracije u 8. satu u iznosu od $A = 499,61$).

U konačnici, sumarno gledajuće rezultate svih prethodno iznesenih slučajeva fotokatalize diazepama, može se zaključiti da produkta $m/z = 267$ najviše nastaje fotokatalitičkom razgradnjom na mrežici M2 u kombinaciji s H_2O_2 koncentracije 320 mg/L, a najmanje u periodu od 5. do 7. sata fotokatalize na mrežici M2 u kombinaciji s H_2O_2 koncentracije 64 mg/L. Razgradni produkt $m/z = 273$ postiže najveću koncentraciju u sustavu M1 s 320 mg/L H_2O_2 , a najmanju u sustavu samo s mrežicom M2. U slučaju, pak, razgradnog produkta $m/z = 301$ može se utvrditi da se najveća vrijednost njegove koncentracije pronalazi u sustavu M1 s 64 mg/L H_2O_2 , a najmanja u sustavu M2 s 320 mg/L H_2O_2 . Razgradni produkt $m/z = 271$ najviše nastaje u sustavu M1 s 64 mg/L H_2O_2 , a najmanje u sustavu M2 s 64 mg/L H_2O_2 , dok je razgradni produkt $m/z = 303$ najzastupljeniji u sustavu samo s mrežicom M2, a najmanje ga ima u sustavu u kojem je mrežica M1 kombinirana s 64 mg/L H_2O_2 .

Sve eventualne razlike između tako dobivenih rezultata provedenih na obje ispitivane mrežice posljedica su eksperimentalne pogreške koja je utoliko izraženija što je na svakoj mrežici proveden po jedan eksperiment. Sve još vezano uz to objašnjeno je u poglavlju 4.2.

4.4. Određivanje toksičnosti farmaceutika diazepama

Određivanje toksičnosti farmaceutika diazepama provedeno je primjenom bioanalitičke metode kojom je moguće odrediti akutnu ekotoksičnost određenog farmaceutika. Metoda se zasniva na upotrebi bakterije *Vibrio fischeri* za koju je karakteristično da, kada se nađe u okolišu u kojem su prisutna organska zagađivala, njezin rast biva inhibiran. Prethodno spomenuto se očituje u ovoj metodi kroz smanjenje luminiscencije ove bakterije, koja joj je inače prirodno urođena. Konkretno, metoda primjenjena u ovom radu za određivanje toksičnosti njemačka je standardna metoda s oznakom DIN 38 412-L34, u trajanju od 30 minuta. [47] Eksperimentalno dobiveni rezultati dani su Slikom 47.



Slika 47. Ovisnost inhibicije luminiscencije o koncentraciji farmaceutika diazepama

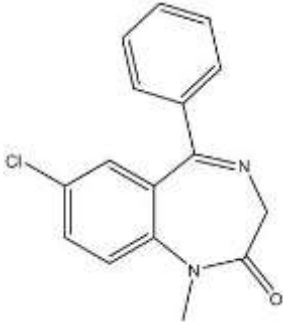
Eksperimentalno dobiveni rezultati vezani uz procjenu toksičnosti farmaceutika diazepama ukazuju na zapažanje da je tijekom 30 minuta inhibirano je 13,4% na temelju čega se može zaključiti da bi za 20% inhibicije bakterijske kulture *Vibrio fischeri* bile potrebne veće koncentracije diazepama od 10 mg/L.

Radi usporedbe s eksperimentalno dobivenim rezultatima, toksičnost diazepama ispitana je i pomoću računalnog programa za procjenu toksičnosti - TEST⁷. Metoda korištena u programu bila je konsenzus metoda⁸, a metodom su se procjenjivali bioakumulacijski faktor te razvojna toksičnost diazepama (Tablica 7.). Pritom, bioakumulacijski faktor predstavlja omjer koncentracije određene kemikalije u ribi, kao rezultata apsorpcije putem površina respiratornog sustava, te koncentracije kemikalije u vodi pri stacionarnom stanju. Parametar razvojna toksičnost, međutim, označava uzrokuje li ili ne određena kemikalije efekte razvojne toksičnosti kod ljudi ili životinja. [58]

⁷ engl. *Toxicity Estimation Software Tool*

⁸ engl. *Consensus method*

Tablica 7. Vrijednosti bioakumulacijskog faktora i razvojne toksičnosti diazepama dobivene programom

Diazepam	Bioakumulacijski faktor	Razvojna toksičnost
 <p>The image shows the chemical structure of Diazepam, which consists of a benzodiazepine ring system with a chlorine atom at the 7-position and a phenyl group at the 5-position.</p>	26,64	+ (0,83)

Na temelju podataka za procjenu toksičnosti diazepama dobivenih primjenom računalnog programa može se zaključiti da diazepam ima niski bioakumulacijski faktor (niži od 30) te da pokazuje razvojnu toksičnost. [58]

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovoga rada bio je istražiti sudbinu farmaceutika diazepama u vodenom okolišu pod utjecajem UV-A, odnosno njegovu fotolitičku razgradnju. Također, nizom eksperimenata praćena je i fotokatalitička razgradnja diazepama, uz primjenu imobiliziranog titanijeva dioksida, u kombinaciji s otopinom vodikovog peroksida određene koncentracije. Analiza uzoraka provedena je na tekućinskom kromatografu visoke djelotvornosti te su utvrđeni mehanizam i kinetika razgradnje ovog farmaceutika, kao i njegova toksičnost te su identificirani glavni razgradni produkti.

Na temelju dobivenih rezultata mogu se izvesti sljedeći zaključci.

- ❖ Preliminarna ispitivanja pokazala su da diazepam ne hidrolizira.
- ❖ Maksimum apsorpcije diazepam postiže pri valnoj duljini od 231 nm te je utvrđeno da je vrijeme njegova zadržavanja jednako 10,04 min.
- ❖ Prisustvo imobiliziranog katalizatora titanijeva dioksida značajno pridonosi razgradnji diazepama pod utjecajem UV-A zračenja.
- ❖ Brzina razgradnje diazepama veća je u sustavima u kojima se, uz imobilizirani TiO_2 , koristila i otopina vodikovog peroksida određene koncentracije.
- ❖ Više se diazepam razgrađuje u sustavima u kojima se primjenjuje vodena otopina vodikovog peroksida veće koncentracije jer je u njima veća količina i nastalih hidroksil radikala.
- ❖ Razgradni produkti identificirani na HPLC-MS/MS ($m/z = 267$, $m/z = 273$, $m/z = 301$, $m/z = 271$ i $m/z = 303$) detektirani su i HPLC-DAD-om na vremenima zadržavanja od 3,64, 3,90, 5,31, 6,46 te 4,94 min.
- ❖ Rezultati vezani uz procjenu toksičnosti farmaceutika diazepama dobiveni primjenom bioluminiscencijske metode na bakteriji *Vibrio fischeri* pokazali su da je tijekom 30 minuta inhibirano je 13,4% na temelju čega se može zaključiti da bi za 20% inhibicije bakterijske kulture *Vibrio fischeri* bile potrebne veće koncentracije diazepama od 10 mg/L.
- ❖ Iz rezultat dobivenih procjenom toksičnosti diazepama pomoću računalnog programa TEST može se zaključiti da diazepam posjeduje razvojnu toksičnost te niski bioakumulacijski faktor (niži od 30).

6. ZAHVALE

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Dragani Mutavdžić Pavlović na svim savjetima, uputama i angažmanu prilikom izrade ovoga rada.

Ujedno veliko hvala asistentici Kristini Tolić, mag. appl. chem. te tehničarkama Slavici Kos i Tanji Ivančić sa Zavoda za analitičku kemiju na velikoj pomoći i asistenciji tijekom izvođenja eksperimentalnog dijela rada.

Veliko hvala izv. prof. Tatjani Gazivodi Kraljević i Ivani Sokol, mag. appl. chem. sa Zavoda za organsku kemiju na pomoći pri identificiranju struktura razgradnih produkata.

Zahvalu upućujem i izv. prof. Ivanu Brnardiću s Metalurškog fakulteta u Sisku na pripremljenim staklenim mrežicama s imobiliziranim TiO_2 .

Hvala i asistentu Dariu Dabiću, mag. chem. na pomoći i svim savjetima udijeljenim pri određivanju toksičnosti diazepama.

Također bih se htjela zahvaliti svojoj mami, prijateljima i kolegama na podršci koju su mi pružili tijekom mojeg dosadašnjeg školovanja.

7. LITERATURA

[1]

https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44630/9789241502085_eng.pdf;jsessionid=8CCDF9C99D5BD2943853D8B89E271D29?sequence=1 (Pristup: 10. 2. 2019.)

[2] <http://umu.diva-portal.org/smash/get/diva2:1085088/FULLTEXT01.pdf> (Pristup: 6. 4. 2019.)

[3]

https://www.researchgate.net/profile/Piotr_Rzymyski/publication/321397572/figure/fig1/AS:566503834439681@1512076447210/Main-sources-and-fate-of-pharmaceuticals-in-the-aquatic-environment.png (Pristup: 6. 4. 2019.)

[4] <https://www.everydayhealth.com/benzodiazepines/guide/> (Pristup: 10. 2. 2019.)

[5] <https://www.rxlist.com/benzodiazepines/drugs-condition.htm> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[6] <https://www.drugs.com/diazepam.html> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[7] <https://www.drugs.com/pro/diazepam.html> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[8] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/diazepam#section=Top> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[9] <https://www.drugbank.ca/drugs/DB00829> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[10] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68018686> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[11] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000759> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[12] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000927> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[13] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68009125> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[14] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68014151> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[15] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68006993> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[16] <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68000932> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[17] S. Murphy, Photocatalytic Degradation of Pharmaceuticals in Aqueous Solutions and Development of New Dye Sensitised Photocatalytic Materials, Dublin City University, 2012.

[18] <https://www.ctc-n.org/technologies/solar-water-purification> (Pristup: 7. 4. 2019.)

[19] https://ultraviolet.com/wp-content/uploads/2014/04/ultraviolet_spectrum.gif (Pristup: 7. 4. 2019.)

- [20] <https://www.who.int/uv/health/solaruvrad.pdf> (Pristup: 7. 4. 2019.)
- [21] K. E. O'Shea, D. D. Dionysiou, Advanced Oxidation Processes for Water Treatment, *J. Phys. Chem. Lett.* **3** (2012) 2112-2113.
- [22] H. Gerly, Application of Chemical Oxidation Processes for the Removal of Pharmaceuticals in Biologically Treated Wastewater, Lund University, 2013.
- [23] Environmental Protection Agency, Guidance Manual Alternative Disinfectants and Oxidants, 1999.
- [24] <http://dwqr.scot/media/21795/pws-technical-manual-section-6-water-treatment-processes-692-ultraviolet-irradiation.pdf> (Pristup: 13. 2. 2019.)
- [25] <http://h2ocare.com/wp-content/uploads/2016/02/UV-Light.jpg> (Pristup: 13. 2. 2019.)
- [26] <https://www.sciencedirect.com/topics/earth-and-planetary-sciences/photolysis> (Pristup: 9. 4. 2019.)
- [27] I. Filipović, S. Lipanović, Opća i anorganska kemija, I. dio, Školska knjiga, Zagreb, 1995., str. 123.-125.
- [28] M. Roma, M. Weller, S. Wentzell, Removal of Ciprofloxacin from Water using Adsorption, UV Photolysis and UV/H₂O₂ Degradation, Worcester Polytechnic Institute, Worcester, 2011.
- [29] I. Epold, Degradation of Pharmaceuticals by Advanced Oxidation Technologies in Aqueous Matrices, Tallinn University of Technology, Estonia, 2015., str. 21.-22.
- [30] J. Beltran-Heredia, J. Torregrosa, J. R. Dominguez, J. A. Peres, Comparison of the degradation of p-hydroxybenzoic acid in aqueous solution by several oxidation processes, *Chemosphere* **42** (2001) 351-359.
- [31] O. Legrini, E. Oliveros, A. M. Braun, Photochemical Processes for Water Treatment, *Chem. Rev.* **93** (1993) 671-698.
- [32] X. Wua, Y. Shao, Study of Kinetics Mechanism of PAHs Photodegradation in Solution, *Procedia Earth and Planetary Science* **17** (2017) 348-351.
- [33] M. Đurković, Brzina kemijskih reakcija, završni rad, Sveučilište J. J. Strossmayera, Osijek, 2017., str. 9.-13.
- [34] <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128104996000061> (Pristup: 2. 1. 2019.)
- [35] J. M. Herrmann, Heterogeneous photocatalysis: fundamentals and applications to the removal of various types of aqueous pollutants, *Catalysis Today* **53** (1999) 115-129.

- [36] D. T. Allen, D. R. Shonnard, Green Engineering, Prentice Hall PTR, New Jersey, 2002.
- [37] L. Scrano, F. Lelario, L. Montinaro, S. Sulaiman, R. Karaman, S. A. Bufo, Diazepam Degradation Using Solar Photocatalysis, Bologna (Italy), 2018.
- [38]
https://www.researchgate.net/profile/Raweewan_Klaewkla/publication/221913296/figure/fig1/AS:305147830915072@1449764320555/Individual-steps-of-a-simple-heterogeneous-catalytic-fluid-solid-reaction-A-1-A-2.png (Pristup: 17. 2. 2019.)
- [39] S. Zrnčević, Kataliza i katalizatori, HINUS, Zagreb, 2005., str. 97.-100.
- [40]
https://www.researchgate.net/profile/D_Goswami2/publication/310607849/figure/fig1/AS:483057787510784@1492181359071/Scheme-of-photocatalytic-process-over-TiO2-surface.png (Pristup: 17. 2. 2019.)
- [41] <https://www.sciencedirect.com/topics/chemistry/photocatalyst> (Pristup: 11. 4. 2019.)
- [42] <https://sciencedatacloud.files.wordpress.com/2013/11/photocatalyst.jpg> (Pristup: 11. 4. 2019.)
- [43] N. Areerachakula, S. Sakulphaemaruethaib, M. A. H. Johirc, J. Kandasamyc, S. Vigneswaranc, Photocatalytic degradation of organic pollutants from wastewater using aluminium doped titanium dioxide, Journal of Water Process Engineering **27** (2019) 177–184.
- [44] C. Andriantsiferana, E. F. Mohamed, H. Delmas, Sequential adsorption - photocatalytic oxidation process for wastewater treatment using a composite material TiO₂/activated carbon, Environ. Eng. Res. **20** (2) (2015) 181-189.
- [45] D. L. Domtau, J. Simiyu¹, E. O. Ayieta, B. Muthoka, J. M. Mwabora, Optical and Electrical Properties Dependence on Thickness of Screen-Printed TiO₂ Thin Films, Journal of Materials Physics and Chemistry **4** (1) (2016) 1-3.
- [46] <http://www.eolss.net/sample-chapters/c08/e6-106-23.pdf> (Pristup: 6. 4. 2019.)
- [47] T. Borojević, D. Ašperger, D. Dolar, Određivanje toksičnosti ksenobiotika u vodi, Kem. Ind. **67** (13) (2018) 135-142.
- [48] <https://microbewiki.kenyon.edu/images/d/d6/Squid.jpg> (Pristup: 30. 4. 2019.)
- [49] <https://www.orlandorecovery.com/blog/how-long-does-valium-remain-in-your-body/#gref> (Pristup: 15. 4. 2019.)
- [50] <https://study.com/cimages/multimages/16/diazepam2.svg.png> (Pristup: 2. 1. 2019.)

[51]

https://www.mt.com/sg/en/home/phased_out_products/Laboratory_Weighing/Analytical_Balances/XA_Analytical_Balance/XA_105_DU.tabs.documents.html (Pristup: 6. 3. 2019.)

[52]

https://www.mt.com/dam/P5/labtec/02_Analytical_Balances/05_XA/03_Documentations/03_Operating_Instructions/OI_XA_Analytical_Part_1_EN.pdf, str. 25-26 (Pristup: 6. 3. 2019.)

[53] J. Macan, M. Ivanko, I. Bukovčan, I. Grčić, A. Gajović, Stable hierarchical ZnO structures for photocatalytic degradation of 2,5-dihydroxybenzoic acid, *Materials Science in Semiconductor Processing* **97** (2019) 48–55.

[54] http://www.pump114.co.kr/USER_DATA/injae/content/editor/img/fmi/E735.pdf (Pristup: 16. 3. 2019.)

[55] I. Jajčinović, M. Borošić, I. Brnardić, I. Grčić, S. Kurajica, Usporedba pripreve fotokatalizatora nanošenjem TiO₂ na nosač različitim metodama, originalni znanstveni rad u sklopu konferencije „17th International Foundrymen Conference“, Opatija, 2018.

[56] OECD Guidelines for Testing of Chemicals Nr. 111, Hydrolysis as a Function of pH, 13. travnja 2004.

[57] M. Čizmić, D. Ljubas, L. Ćurković, I. Škorić, S. Babić, Kinetics and degradation pathways of photolytic and photocatalytic oxidation of the anthelmintic drug praziquantel, *Journal of Hazardous Materials* **323** (2017) 500–512.

[58] <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-estimation-software-tool-test> (Pristup: 28. 4. 2019.)

8. SAŽETAK

FOTOKATALITIČKA RAZGRADNJA DIAZEPAMA S IMOBILIZIRANIM TiO_2

U novije vrijeme puno pozornosti pridaje se zaštiti okoliša. Napredak civilizacije kroz razvoj znanosti, industrije, kao i drugih grana čovjekova djelovanja za sobom je povukao niz pozitivnih i negativnih posljedica. Naime, razvoj znanosti omogućio je otkriće novih kemijskih, primjerice farmaceutskih tvari, od kojih su mnoge postale lijekovi u humanoj i veterinarskoj medicini. Zatim, razvojem poljoprivredne proizvodnje sve više su se počele koristiti agrokemikalije (pesticidi, insektici, herbicidi, fungicidi) kako bi se usporile ili spriječile bolesti biljaka. Industrijski razvoj doveo je do nastanka velikih postrojenja, čije se otpadne vode ispuštaju u prirodne prijamnike. Neovisno o načinu dolaska u okoliš, farmaceutici u njemu podliježu različitim procesima razgradnje. Hidroliza i fotoliza neki su od primjera tih procesa, koji se u vodenom okolišu javljaju pod utjecajem Sunčeva UV-zračenja. Razgradnjom farmaceutika nastaju novi spojevi, koji mogu biti i toksičniji od polaznog spoja. Iz toga se razloga pristupilo pomnom proučavanju metoda obrade otpadnih voda prije njihova ispuštanja u okoliš, od onih klasičnih postupaka (filtracije, ozonizacije i drugih) do novije istraživanih, naprednih oksidacijskih procesa, na kojima se temelji i ovaj rad. Istraživana je primjena UV-A zračenja na razgradnju farmaceutika diazepama, u kombinaciji s katalizatorom titanijevim dioksidom (TiO_2) imobiliziranom na dvije vrste mrežica, uz dodatnu primjenu otopine vodikovog peroksida različitih koncentracija. Analiza ispitivanih uzoraka tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti pokazala je da diazepam ne hidrolizira, a maksimum apsorpcije postiže pri valnoj duljini od 231 nm, uz vrijeme zadržavanja od 10,04 min. Također, prisustvo imobiliziranog katalizatora titanijeva dioksida značajno pridonosi razgradnji diazepama pod utjecajem UV-A zračenja, a brzina razgradnje veća je u sustavima u kojima se koristila i otopina vodikovog peroksida veće koncentracije. Primjenom masene spektrometrije identificirano je pet razgradnih produkata diazepama ($m/z = 267$, $m/z = 273$, $m/z = 301$, $m/z = 271$ i $m/z = 303$), a procjenom njegove toksičnosti utvrđeno je da diazepam posjeduje razvojnu toksičnost te niski bioakumulacijski faktor.

Ključne riječi: diazepam, razgradnja, fotokataliza, titanijev dioksid, vodikov peroksid, toksičnost

9. ABSTRACT

PHOTOCATALYTIC DEGRADATION OF DIAZEPAM WITH IMMOBILIZED TiO₂

Lately, more attention has been paid to environmental protection. The progress of civilization through the development of science, industry, and other branches of human activity has led to a number of positive and negative consequences. Namely, the development of science has enabled the discovery of new chemicals, for example, pharmaceuticals, many of which have become medicines in human and veterinary medicine. Then, since the development of agricultural production, agrochemicals (such as pesticides, insects, herbicides, fungicides) have increasingly been used in order to slow down or prevent plant diseases. Industrial development has led to the emergence of large plants, whose wastewater is discharged into natural receivers. Regardless of the way of coming into the environment, the pharmaceuticals in it are subject to various degradation processes. Hydrolysis and photolysis are some of the examples of these processes that appear in the aquatic environment under the influence of Sun's UV radiation. Disintegration of the pharmaceuticals results in new compounds, which may be more toxic than the starting compound. For this reason, a thorough studies of wastewater treatment methods prior to their release into the environment have taken place, ranging from classical methods (filtration, ozonization and others) to the newly investigated, advanced oxidation processes which are also base of this study. The aim was to investigate the application of UV-A radiation to the diazepam removal in combination with the catalyst titanium dioxide (TiO₂), which was immobilized on two types of meshes, with the addition of hydrogen peroxide solution of different concentrations. Analysis of the tested samples by high performance liquid chromatography showed that diazepam did not hydrolyze, while the peak absorption was achieved at a wavelength of 231 nm with a retention time of 10.04 min. In addition, the presence of immobilized titanium dioxide catalyst significantly contributed to the degradation of diazepam under the influence of UV-A radiation, and the rate of decomposition was higher in systems where a higher concentration of hydrogen peroxide solution was used. Using mass spectrometry, five diazepam degradation products were identified ($m/z = 267$, $m/z = 273$, $m/z = 301$, $m/z = 271$ i $m/z = 303$), whereas the estimation of toxicity found that diazepam possesses developmental toxicity and low bioaccumulation factor.

Key words: diazepam, degradation, photocatalysis, titanium dioxide, hydrogen peroxide, toxicity

10. ŽIVOTOPIS

Mia Gotovuša rođena je 29. kolovoza 1996. godine u Zagrebu, Republika Hrvatska. Osnovno školsko obrazovanje stekla je u Osnovnoj školi Ivan Goran Kovačić u Zagrebu, a srednješkolno u zagrebačkoj prirodoslovno-matematičkoj V. gimnaziji, pohađajući matematičko usmjerenje. Maturirala je 2015. godine i iste upisala preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije.

Korisnica je učeničke Stipendije Grada Zagreba koju počinje primati od rujna 2013. godine te ju nastavlja primati do kraja gimnazijskog te za vrijeme 1. i 2. godine fakultetskog obrazovanja. Na 3. godini preddiplomskog studija dodjeljena joj je studentska Stipendija Grada Zagreba.

Nagrađena je Dekanovim priznanjima po godinama studija, za najbolju studenticu prve (2015./2016.), druge (2016./2017.) i treće (2017./2018.) godine preddiplomskih studija Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije te Dekanovim priznanjem za najbolju studenticu preddiplomskog studija Kemijskog inženjerstvo generacija 2017./2018.

Završila je sveučilišni preddiplomski studij Kemijskog inženjerstva 6. rujna 2018. godine, obranom završnog rada na temu „Sorpcija cefdinira na prirodne uzorke tla i sedimente“, pod mentorstvom prof. dr. sc. Dragane Mutavdžić Pavlović, te stekla akademski naziv sveučilišne prvostupnice inženjerke kemijskog inženjerstva, s najvećom pohvalom (summa cum laude).

U rujnu 2018. godine upisuje diplomski studij Kemijskog inženjerstva, modul Kemijske tehnologije i proizvodi.

Stručnu je praksu odradila u Končaru – Institutu za elektrotehniku, odnosno u njihovom Laboratoriju za fizikalno kemijska ispitivanja.

Od stranih jezika koristi se engleskim u govoru i pismu. U radu na računalu koristi se programskim paketom Microsoft Office (Wordom, Excelom te PowerPointom) i programom Origin. Također ima iskustva i u programiranju koristeći Python, Matlab i Scilab te u projektiranju koristeći ChemCAD.