

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2018.

Antun Stegić

917/PI

**UKLANJANJE DIURETIKA
FUROSEMIDA IZ MODELNIH
UZORAKA I OTPADNE VODE
OZONIRANJEM**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju vode na Zavodu za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom dr. sc. Marina Matošića, red. prof. Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu te uz pomoć Josipa Ćurka, doc. dr. sc. i Vlade Crneka, mag. ing. Dio istraživanja proveden je u Laboratoriju za analitiku i biogeokemiju organskih spojeva na Zavodu za istraživanje mora i okoliša na Institutu Ruđer Bošković uz pomoć znanstvenog suradnika, dr. sc. Ivana Sente.

Zahvaljujem se svom mentoru, prof. dr. sc. Marinu Matošiću na ukazanom povjerenju, na strpljenju i potpori, kao i na svim stručnim savjetima i razgovorima koji su doprinijeli izradi ovog rada. Također, zahvaljujem se doc. dr. sc. Josipu Ćurku i mag. ing. Vladi Crneku na nesebičnoj pomoći, motivaciji i savjetima.

Najljepše se zahvaljujem i svom mentoru sa Instituta Ruđer Bošković, znanstvenom suradniku, dr. sc. Ivanu Senti na iznimnoj susretljivosti, strpljenju i pomoći, bez čijeg znanja i stručnih savjeta ne bi bila moguća izrada ovog diplomskog rada na Prehrambeno-biotehnološkom fakultetu.

Najveće hvala mojoj obitelji i prijateljima na bezuvjetnoj podršci, razumijevanju i ljubavi tijekom mojeg studiranja.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju vode

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

UKLANJANJE DIURETIKA FUROSEMIDA IZ MODELNIH UZORAKA I OTPADNE VODE OZONIRANJEM

Antun Stegić, 917/PI

Sažetak: Svrha ovog rada je istražiti djelotvornost postupka ozoniranja za razgradnju diuretika furosemida te odrediti kinetiku njegovog uklanjanja iz modelne otopine kod različitih uvjeta, kao što su koncentracija ozona, pH otopine i vrsta matrice. Nadalje, cilj je pokušati identificirati transformacijske produkte nastale razgradnjom matičnog spoja nakon tretmana ozonom. Uzorak furosemida tretiran je u demineraliziranoj vodi pri 4 doze ozona ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, $0,2 \text{ mg L}^{-1}$) te pri 4 različite pH-vrijednosti otopina (5, 7, 8, 9), kao i u otpadnoj vodi, koja je prethodno obrađena biološkom metodom. Modelni uzorci analizirani su vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa (UHPLC-MS). Koncentracija ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ učinkovito uklanja furosemid iz modelne otopine tijekom 10 minuta tretmana. Pri dozi ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ postignuto je najučinkovitije uklanjanje furosemida unutar 2 minute od početka tretmana ozonom. Analizom alikvota modelnih uzoraka nisu uočeni nikakvi transformacijski produkti furosemida.

Ključne riječi: *ozon, furosemid, pH-vrijednost, tekućinska kromatografija – spektrometrija masa*

Rad sadrži: 46 stranica, 7 tablica, 14 slika, 84 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je tiskan u elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *prof. dr.sc. Marin Matošić*

Pomoć pri izradi: *dr. sc. Ivan Senta, znanstveni suradnik, doc. dr. sc. Josip Čurko, mag. ing. Vlado Crnek*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Doc. dr. sc. *Josip Čurko*
2. Prof. dr. sc. *Marin Matošić*
3. Dr. sc. *Ivan Senta*, znanstveni suradnik
4. Izv. prof. dr. sc. *Lidija Barišić* (zamjena)

Datum obrane: 20. rujan 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Food engineering
Laboratory for Water Technology

Scientific area: Biotechnical Sciences

Scientific field: Food Technology

ELIMINATION OF DIURETIC FUROSEMID FROM MODEL SAMPLES AND WASTEWATER BY OZONE

Antun Stegić, 917/PI

Abstract: The purpose of this paper was to investigate the efficiency of the ozone treatment for degradation of diuretic furosemide and to determine the kinetics of its removal from the model solution under various conditions such as ozone concentration, pH of model solution, and matrix types. Furthermore, the aim was to try to identify the transformation products resulting from the degradation of the parent compound after ozone treatment. The furosemide sample was treated in demineralised water at 4 ozone doses (0,02 mg L⁻¹, 0,05 mg L⁻¹, 0,1 mg L⁻¹, 0,2 mg L⁻¹) and at 4 different pH values of the solution (5, 7, 8, 9) as well as in waste water, previously treated by a biological method. Model samples were analyzed by ultrahigh performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (UHPLC-MS). The ozone concentration of 0.05 mg L⁻¹ effectively removes furosemide from the model solution during 10 minutes of treatment. At 0.1 mg L⁻¹ ozone dose, the most effective removal of furosemide was achieved within 2 minutes of ozone treatment. No transformation products of furosemide were observed by model samples aliquot analysis.

Keywords: *ozone, furosemide, pH value, liquid chromatography - mass spectrometry*

Thesis contains: 46 pages, 7 tables, 14 figures, 84 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of food technology and biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Marin Matošić, PhD Full Professor*

Technical support and assistance: *Ivan Senta, PhD Research Associate, Josip Ćurko, PhD Assistant Professor, Vlado Crnek, mag. ing.*

Reviewers:

1. PhD. *Josip Ćurko*, Assistant professor
2. PhD. *Marin Matošić*, Full professor
3. PhD. *Ivan Senta*, Research Associate
4. PhD. *Lidija Barišić*, Associate professor (substitute)

Thesis defended: September 20, 2018.

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO.....	3
2.1. Ozon.....	3
2.1.1. Mehanizmi reakcija ozona.....	5
2.1.1.1. Oksidacijsko-redukcijske reakcije.....	5
2.1.1.2. Reakcije cikličke adicije.....	6
2.1.1.3. Reakcije elektrofilne supstitucije.....	7
2.1.1.4. Reakcije nukleofilne adicije.....	8
2.1.1.5. Reakcije razgradnje ozona.....	8
2.1.2. Kinetika i parametri ozoniranja.....	9
2.2. Furosemid.....	11
2.2.1. Rasprostranjenost furosemida u okolišu.....	12
2.3. Ozoniranje farmaceutskih spojeva.....	14
2.4. Istraživačka pitanja i radne hipoteze.....	17
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Materijali.....	18
3.1.1. Kemikalije.....	18
3.1.2. Instrumenti, laboratorijsko posuđe i pribor.....	18
3.1.3. Priprema izvorne otopine furosemida.....	19
3.1.4. Priprema otopine natrijeva sulfita.....	19
3.1.5. Priprema modelnih uzoraka.....	19
3.1.6. Generator ozona.....	19
3.2. Metode.....	21
3.2.1. Postupak ozoniranja.....	21
3.2.2. Analiza modelnih uzoraka vezanim sustavom UHPLC-a i spektrometrije masa.....	22
3.2.2.1. Ekstrakcija modelnih uzoraka na čvrstoj fazi i obrada ekstrakta.....	23
4. REZULTATI I RASPRAVA.....	24
5. ZAKLJUČAK.....	37
6. LITERATURA.....	38

1. UVOD

Posljednjih godina u javnosti sve više raste zabrinutost zbog povećane pojave lijekova, pesticida, proizvoda za osobnu njegu i drugih bioaktivnih kemikalija u sedimentima i vodenom ekosustavu (Cunningham i sur., 2006). Iako su lijekovi već desetljećima prisutni u vodi, njihove povećane koncentracije tek su nedavno kvantificirane i prepoznate kao potencijalno opasne za ljude i ostale organizme (Kolpin i sur., 2002). Niske koncentracije lijekova u području ng L^{-1} – $\mu\text{g L}^{-1}$ detektirane su u komunalnoj otpadnoj vodi, podzemnoj vodi i vodi za piće (Isidori i sur., 2005). Farmaceutski spojevi korišteni u medicini i veterini, kao i njihovi metaboliti, završavaju u vodenom okolišu nakon upotrebe izlučivanjem putem urina i fecesa ili prilikom nepravilnog odlaganja. Dugotrajna izloženost ovim farmaceutskim proizvodima u vodi za piće može imati brojne zdravstvene učinke na "neciljane" receptore u organizmu i može uzrokovati nuspojave poput endokrinih poremećaja, alergijskih reakcija, pojave otpornosti mikroorganizama na antibiotike, genotoksičnosti, kancerogenosti te imati posljedice na reprodukciju i razvoj fetusa (Daughton i Ternes, 1999; Benotti i sur., 2008).

Istraživanja na otpadnim vodama (Carballa i sur., 2005; Rađenović i sur., 2007) ukazala su na slabu učinkovitost konvencionalnih metoda obrade za razgradnju farmaceutskih spojeva. Stoga je potrebna njihova nadogradnja i primjena novih naprednih tehnologija obrade da bi se dobili kvalitetniji otpadni efluenti. Najbolja učinkovitost uklanjanja postiže se u kombinaciji s novim metodama i reagensima poput vodikovog peroksida, ultraljubičastog zračenja, ozona, upotrebom membranskih tehnologija i bioreaktora ili primjenom naprednih oksidacijskih procesa. Danas se ozon smatra alternativnim sredstvom za dezinfekciju i oksidaciju organskih i anorganskih tvari, s višestrukim mogućnostima primjene u obradi površinskih voda, otpadnih industrijskih i komunalnih voda, zraka te lijekova i pesticida. Postoje brojni radovi na temu upotrebe ozona pri uklanjanju farmaceutskih spojeva iz otpadne vode i vode za piće poput sulfonamidnih antibiotika (Adams i sur., 2002), karbamazepina i diklofenaka (Ternes i sur., 2003), eritromicina i ibuprofena (Snyder i sur., 2006) te ostalih. Međutim, relativno je malo radova na temu uklanjanja diuretika furosemda, čija potrošnja i potražnja na tržištu sve više raste. Premda su za određene skupine zagađivala utvrđeni kriteriji za procjenu okolišnog rizika, još ne postoje zakonske regulative kojima bi se regulirala prisutnost farmaceutika u okolišu. Zbog toga je nužno provesti dodatna istraživanja o posljedicama dugotrajne izloženosti niskim koncentracijama lijekova i njihovim transformacijskim produktima koji se detektiraju u okolišu nakon upotrebe, a mogu biti još toksičniji od osnovnog spoja.

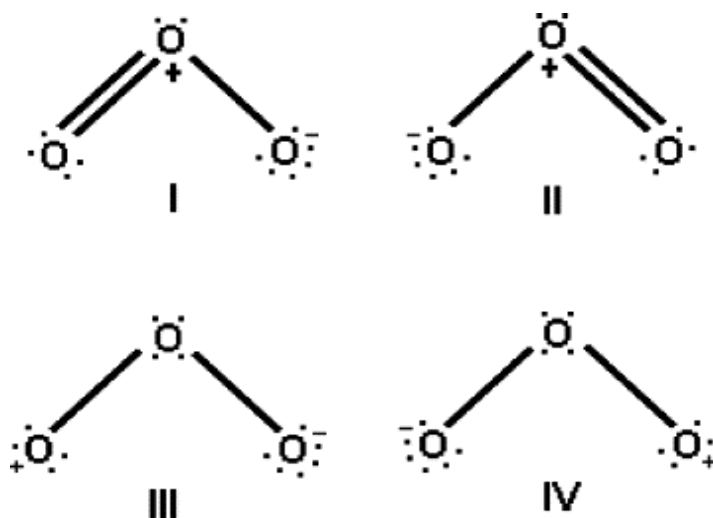
Cilj ovog rada je:

- istražiti djelotvornost postupka ozoniranja za uklanjanje i razgradnju diuretika furosemida u modelnim uzorcima demineralizirane vode različitih pH-vrijednosti i u otpadnoj vodi, koja je prethodno obrađena biološkom metodom
- utvrditi kako različite koncentracije otopljenog ozona utječu na brzinu razgradnje furosemida u modelnim uzorcima
- istražiti kakav je utjecaj pH-vrijednosti modelne otopine na kinetiku razgradnje furosemida pri optimalnoj dozi ozona
- odrediti koji se transformacijski produkti formiraju pri razgradnji furosemida ozoniranjem

2. TEORIJSKI DIO

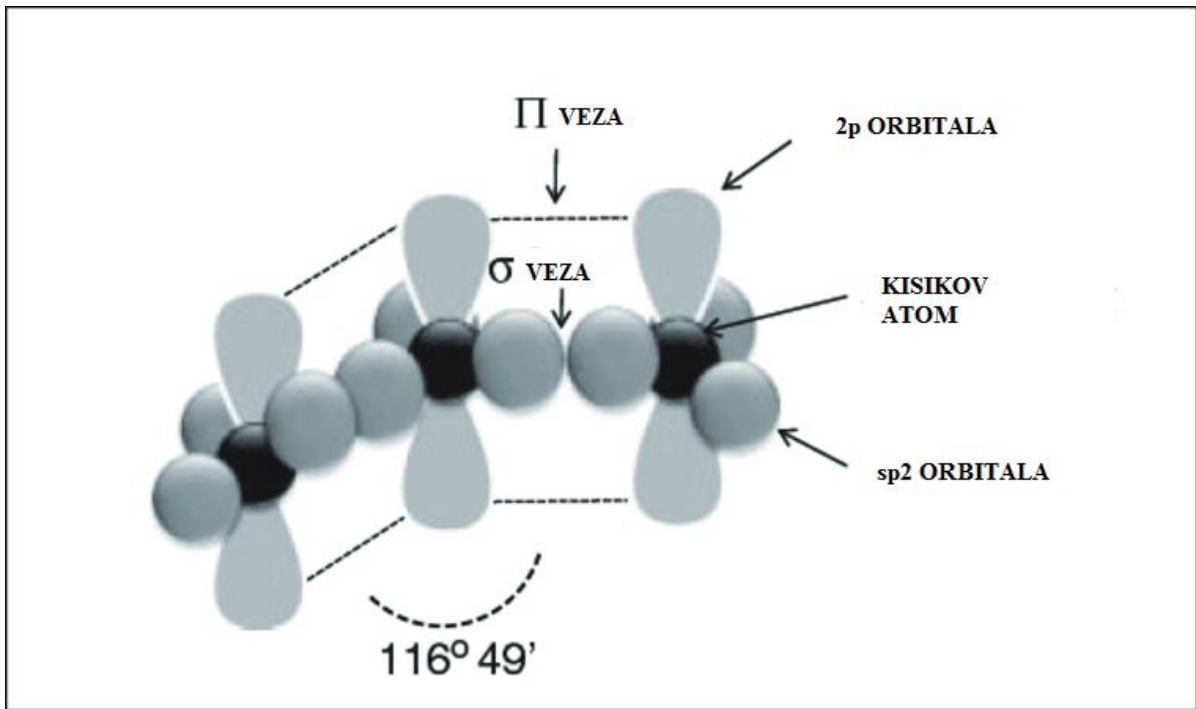
2.1. OZON

Riječ ozon potječe od grčke riječi "ozein" što u prijevodu znači "mirisati". Ozon (O_3) je prvi put primijetio Van Mauren 1785., kao specifičan miris koji se oslobađao nakon električnih pražnjenja tijekom oluja. Kao kemijsku tvar prepoznao ga je njemačko-švicarski kemičar Christian Friedrich Schonbein 1840. i pretpostavio njegovu kemijsku strukturu u obliku troatomne molekule kisika (Langlais, 1991). O_3 ima oštar i opor miris, a njegov intenzitet blijedo-plave boje, ovisi o koncentraciji u kojoj je prisutan. Ozon je alotropska modifikacija kisika koja se sastoji od 3 atoma. Njegove rezonancijske strukture prikazane su na Slici 1, a predstavljaju po jednu vrstu molekule ozona s delokaliziranim elektronima, odnosno dvije glavne, otvorene strukture i dva ciklička oblika. Struktura rezonantnog hibrida potvrđena je metodom mikrovalne spektroskopije tek 1953, te prikazuje smjesu strukturno različitih molekula ozona koje vrlo brzo prelaze jedna u drugu (Trambarulo, 1953).



Slika 1. Rezonancijske strukture ozona (Beltran, 2004)

Atom kisika u svojoj vanjskoj orbitali ima po dva nesparena elektrona, od kojih svaki zauzima po jednu 2p orbitalu (Slika 2). Da bi se kombinirala 3 atoma kisika i formirala molekula ozona, centralni atom kisika se preuređuje u sp^2 hibridnu orbitalu nastalu iz jedne 2s i dvije 2p atomske orbitale valentne ljuske. Naknadno se formiraju i dvije preostale sp^2 hibridne orbitale, koje zatim oblikuju trokut u čijem se središtu nalazi kisikova jezgra, a kut između orbitala iznosi $116,49^\circ$. Udaljenost između dva atoma kisika u molekuli ozona iznosi 1.28 \AA . (Trambarulo, 1953).



Slika 2. Molekularna struktura ozona (Okpala i sur., 2015)

Različita svojstva O_3 , poput njegove topljivosti i reaktivnosti s drugim vrstama, ovise o njegovoj strukturi, a djelomično i o polarosti molekule koji se mjeri dipolarnim momentom. O_3 pokazuje slabu polarnost od 0,5337 D zbog elektronegativnosti kisikovih atoma i nesparenih parova elektrona u nekim orbitalama, ovisno o vrsti rezonantne strukture. O_3 je vrlo reaktivan i posjeduje visok oksidacijski potencijal od 2,07 V, te je jedno od najjačih oksidirajućih sredstava u upotrebi (Tablica 1). Reagira s velikim rasponom organskih i anorganskih spojeva te se učinkovito koristi pri uklanjanju mikroorganizama prilikom obrade otpadnih voda i vode za piće, ali i pri dezinfekciji bolničkih instrumenata i farmaceutskih uređaja, a sve se više koristi i u liječenju. Točka vrenja O_3 iznosi $-111,9^\circ C$, a temperatura taljenja je $-192,5^\circ C$. U prirodi se O_3 spontano generira reakcijom između bimolekularnog (O_2) i atomskog kisika (O) u troposferi i stratosferi gdje ga ima najviše. Pri višim dijelovima atmosfere na visini od 25 do 50 km iznad razine mora, formiran je stratosferski ozonski sloj, širok nekoliko kilometara, koji okružuje i štiti površinu planeta od UV-B i UV-C zračenja. Međutim, na Zemljinoj površini, O_3 postaje toksičan plin s maksimalno dopuštenom dozom kontaminacije od 0,1 ppm pri izlaganju od najmanje 8 sati (Nebel, 1981). Mješavina O_3 i O_2 s više od 20% ozona je eksplozivna, ali, u praktičnoj primjeni, rizik od eksplozije je minimalan, zato što moderni koronarni generatori ozona proizvode jako niske koncentracije za siguran rad.

Tablica 1. Oksidacijski potencijali za standardne oksidanse mjereni vodikovom elektrodom uz standardne uvjete (Beltran, 2004)

Oksidans	Potencijal E^0 (V, 25 °C)
<i>Fluorid</i>	3,06
<i>Hidroksilni radikal</i>	2,80
<i>Atomski kisik</i>	2,42
Ozon	2,07
<i>Vodikov peroksid</i>	1,78
<i>Permanganat</i>	1,68
<i>Klor dioksid</i>	1,57
<i>Hipoklorna kiselina</i>	1,49
<i>Klor</i>	1,36
<i>Kisik</i>	1,23

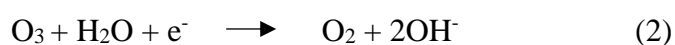
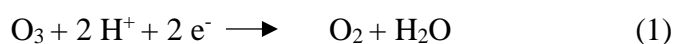
2.1.1. Mehanizmi reakcija ozona

Zbog svojih strukturnih karakteristika, molekula ozona je izrazito nestabilna i ima tendenciju stvaranja brojnih i raznovrsnih radikalskih vrsta. O_3 sudjeluje u različitim vrstama reakcija koje se dijele prema dva osnovna mehanizma u vodenom mediju, a mogu biti: direktne i indirektne reakcije. Direktne reakcije su "prave" ozonske reakcije u kojima glavnu ulogu ima molekula ozona koja reagira s drugim vrstama kemijskih spojeva. Indirektne reakcije, odnosno "reakcije razgradnje ozona", su one između hidroksilnog radikala ($OH\bullet$), koji nastaje raspadom O_3 ili iz drugih direktnih ozonskih reakcija, sa spojevima koji su prisutni u vodenom mediju. Iz toga se može zaključiti da direktne reakcije O_3 prethode indirektnim reakcijama (Beltran, 2004). U direktne reakcije spadaju 4 vrste reakcija: oksidacijsko-redukcijske reakcije, reakcije dipolarne cikličke adicije, elektrofilna supstitucija i reakcije nukleofilnog napada čija je pojava potvrđena jedino u nevodenom mediju. Reakcije razgradnje O_3 karakteriziraju brojni mehanizmi neselektivnih reakcija između $OH\bullet$ te organskih i nekih anorganskih molekula. Specifičnost ovih reakcija je u većoj oksidacijskoj snazi $OH\bullet$ u usporedbi s molekulskim ozonom (Paraskeva i Graham, 2002).

2.1.1.1. Oksidacijsko-redukcijske reakcije

Zahvaljujući svojem visokom redoks potencijalu, reakcije oksidacije i redukcije su najočekivaniji mehanizmi kojima O_3 reagira s drugim spojevima, a karakterizira ih prijenos

elektrona s jedne vrste koja otpušta elektron – reducensa, na drugu vrstu koja prima elektron – oksidans. Sposobnost reagiranja O₃ s različitim vrstama spojeva putem redoks reakcija potvrđena je poznavanjem točnih vrijednosti standardnih redoks potencijala tih spojeva. Međutim, u većini ozonskih reakcija ne dolazi do prijenosa elektrona već do prijenosa atoma kisika s molekule ozona na drugi spoj. Ova reaktivnost je osobito važna u slučaju nekih anorganskih iona poput Fe²⁺, I⁻ ili NO₂⁻ jer dolazi do prijelaza iz nižeg u više valentno stanje, odnosno gubitka elektrona, tako da ove reakcije mogu biti teoretski svrstane u redoks reakcije. Glavne polureakcije O₃ u vodi prikazane su sljedećim izrazima (1 i 2):

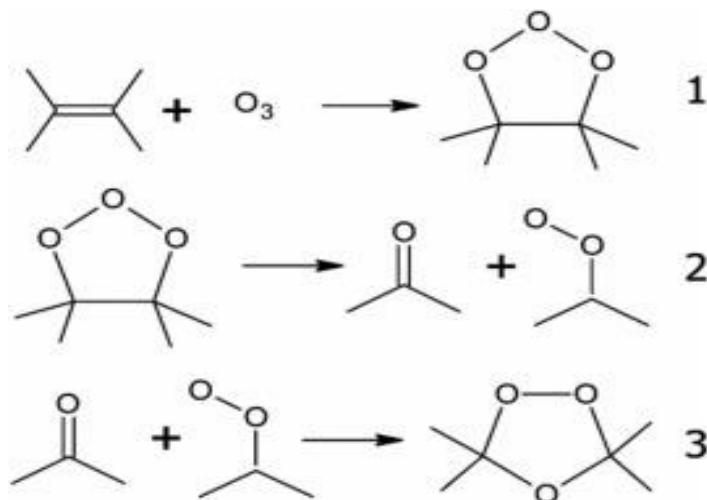


Iz navedenih reakcija može se utvrditi važnost pH-vrijednosti otopina u odvijanju ozonskih reakcija. Primjera definiranih reakcija ozona s prijenosom elektrona je relativno malo, a tu se mogu svrstati reakcije između O₃ i hidroperoksidnih iona te superoksidnih radikala (Hoigné, 1998).

2.1.1.2. Reakcije cikličke adicije

Sljedeća vrsta reakcija u kojima može sudjelovati molekula ozona su reakcije adicije, u kojima dolazi do kombiniranja dviju molekula da bi se dobila treća, potpuno nova molekula. U ovom slučaju jedna molekula se ponaša kao baza i sadrži atome koji dijele više od dva elektrona, kao što su nezasićeni spojevi s π elektronima (olefinski spojevi s dvostrukom vezom između ugljikovih atoma), dok se druga molekula ponaša kao kiselina te ima elektrofilni karakter, a u ovom slučaju predstavlja molekulu ozona. U praksi, postoje različite vrste adicijskih reakcija između O₃ i nezasićenih spojeva, ali posebna vrsta su reakcije cikličke adicije koje slijede Criegee-ov mehanizam u 3 temeljna koraka prikazana na Slici 3. U prvom koraku formira se vrlo nestabilni, peteročlani prsten, tzv. primarni ozonid (Kuczkowski, 1984). On se raspada u drugom koraku i stvara zwitterion, koji u trećem koraku, ovisno o vrsti otapala i prirodi nezasićenog spoja, reagira na različite načine. S obzirom na vrstu otapala u kojem se odvija reakcija, dolazi do nastajanja različitih produkata. U neutralnom mediju razgradnjom zwitteriona mogu nastati drugi oblici ozonida, zatim peroksidi ili ketoni, te različite polimerne tvari. Ako se reakcija odvija u kiselom ili lužnatom mediju koji aktivno sudjeluje u reakcijama, formiraju se neke vrste oksid-hidroperoksida. Također, postoji mogućnost pojave "abnormalne ozonolize" koja se može odviti u svim vrstama medija, pri čemu nastaju određeni ketoni, aldehidi ili karboksilne kiseline (Beltran, 2004).

Dok osnovne reakcije adicije uzrokuju samo kidanje π veze, reakcije cikloadicije uzrokuju raspad σ i π veze. U slučaju reakcije O_3 s aromatskim spojevima, pri čemu dolazi do 1,3-cikloadicije, može doći do gubitka aromatičnosti i posljedično raspada aromatskog prstena. Međutim, zbog velike stabilnosti aromatskih prstenova, vjerojatnost pojave 1,3-cikloadicije je puno manja od reakcije elektrofilnog napada jednog terminalnog kisikovog atoma iz molekule ozona na bilo koji nukleofilni centar aromatskog prstena. Drugi spojevi s dvostrukim vezama ($C=N$, $C=O$) ne reagiraju s O_3 putem ove vrste reakcija (Erikson, 1969).



Slika 3. Criege-ov mehanizam (Beltran, 2004)

2.1.1.3. Reakcije elektrofilne supstitucije

Odsutnost elektrona u jednom od terminalnih atoma kisika u nekim od rezonantnih struktura potvrđuje elektrofilan karakter O_3 . Kao što je već spomenuto, aromatski spojevi, zbog velike stabilnosti prstena, s O_3 uglavnom reagiraju putem reakcija elektrofilne supstitucije. U ovim reakcijama, elektrofilni reaktant (O_3) napada jedan nukleofilni položaj organske molekule (fenol, benzen), što rezultira supstitucijom jednog dijela molekule (atoma, funkcionalne skupine). Najbolji primjer aromatske molekule koja je snažno stabilizirana fenomenom rezonancije je benzen, čiji se hibrid može prikazati različitim elektronskim strukturama. Razlika u stabilnosti između pojedinih struktura i hibrida je energija rezonancije, a što je veća energija rezonancije, to su jača aromatska svojstva molekule. Mehanizmi reaktivnosti aromatskih spojeva s O_3 ovise upravo o tim aromatskim svojstvima. Nakon reakcija elektrofilne supstitucije, aromatska svojstva molekule su izmijenjena, ali zadržana, dok se kod reakcija cikloadicije potpuno gube. Reakcije aromatske supstitucije imaju dva koraka. U prvom nastaje karbokation ($C_6H_5^+HY$), a u drugom bazni spoj preuzima proton s nukleofilnog položaja u

prstenu. U kojem će smjeru ići reakcije supstitucije ovisi i o prisutnosti supstituirajućih skupina vezanih za aromatsku molekulu (fenoli, krezoli, aromatski amini). Ovisno o sposobnosti oslobađanja ili primanja elektrona, supstituirajuća skupina može povećati ili smanjiti stabilnost karbokationa te posljedično aktivirati ili deaktivirati aromatski prsten. Aktivirajuće skupine potiču supstituciju vodikovih atoma iz njihovih *orto*- i *para*- položaja, dok deaktivirajuće skupine olakšavaju supstituciju u *meta*- položaj. Skupine poput OH⁻, -NH₂ ili alkil radikala imaju tendenciju oslobađanja elektrona te aktiviraju aromatski prsten i stabiliziraju karbokation, a skupine kao -NO₂ ili -Cl privlače elektrone na sebe i deaktiviraju prsten. Dakle, ako je poznata priroda supstitucijskih skupina, može se pretpostaviti produkt elektrofilne supstitucije i relativna brzina odvijanja reakcije (Beltran, 2004).

2.1.1.4. Reakcije nukleofilne adicije

Prema rezonancijskom profilu, neke od struktura ozonske molekule imaju negativan naboj na jednom od terminalnih atoma kisika koji molekuli ozona teoretski daje nukleofilan karakter. U tom slučaju ozoniranja putem reakcija nukleofilne adicije, O₃ reagira s molekulama koje sadrže elektrofilne položaje, kao što su razni karbonili i spojevi s dvostrukim ili trostrukim vezama (C=N, C≡N). Bitno je napomenuti da su istraživanja vezana za ovaj mehanizam ozonskih reakcija provedena u organskim otapalima, a ne u vodi (Riebel i sur., 1960).

2.1.1.5. Reakcije razgradnje ozona

Specifičan mehanizam ozoniranja predstavljaju indirektno reakcije koje su posljedica djelovanja različitih vrsta slobodnih radikala nastalih uslijed razgradnje O₃ u vodi. Glavna radikalska vrsta u ovim reakcijama je hidroksilni radikal (OH•), čiji oksidacijski potencijal od 2,80 V omogućuje još veću oksidaciju spojeva od O₃ (Hollender i sur., 2009). Ovakvi mehanizmi koji uključuju nastajanje OH• nazivaju se i napredni oksidacijski procesi (engl. *advanced oxidation processes - AOPs*). Spojevi različite prirode mogu doprinijeti nastajanju ili inhibiciji slobodnih radikala, a dijele se na inicijatore, inhibitore i promotore. Inicijatori su tvari koje izravno reagiraju s O₃ da bi se dobio superoksidni ionski radikal, a glavni primjeri su hidroksilni i hidroperoksidni ion. Također, u prisustvu pomoćnih reakcijskih sredstava, kao što su UV zračenje ili H₂O₂, te korištenjem krutih katalizatora mogu se pojaviti i drugi inicijacijski koraci (Glaze i sur., 1987). Naime, H₂O₂ zauzima posebno značajno mjesto u reakcijama razgradnje O₃ jer se može ponašati kao inicijator i promotor, a kada je njegova koncentracija u reakcijskoj smjesi previsoka, preuzima ulogu inhibitora. Nastajanje superoksidnog radikala je ključan korak za formiranje ostalih radikalskih vrsta zato jer jako brzo reagira s O₃ stvarajući

ozonid radikal, a zatim OH•. Promotori su vrste koje putem reakcije s OH• propagiraju radikalski lanac, a to su metanol, mravlja kiselina i neke humusne tvari. Inhibitori razgradnje ozona ili "scavengeri" su one vrste spojeva koje u reakciji s OH• zaustavljaju produživanje radikalskog lanca tako da ograničavaju ili inhibiraju djelovanje OH• radikala na ciljna zagađivala. U ovu skupinu spadaju *t*-butanol, *p*-klorbenzoatni ion, karbonatni i bikarbonatni ioni i druge humusne tvari (Staelin i Hoigné, 1985). Kod reakcija O₃ u vodi pri oksidaciji stabilnih spojeva posebno je značajna prisutnost karbonata, koji mogu formirati karbonatne ion radikale i tako smanjiti učinkovitost ozoniranja. Naime, neka istraživanja upućuju i na drugi problem, koji predstavlja prisutnost bromidnih iona u ozoniranoj vodi gdje brzom oksidacijom dolazi do formiranja toksičnog bromatnog iona, koji ima potencijalno kancerogena svojstva. Stvaranje bromata ovisi i o prisutnosti H₂O₂ ili amonijaka, koji mogu reagirati s hipobromovom kiselinom, pri čemu nastaju bromamini (von Gunten i Hoigné, 1998; Tanaka i Matsumura, 2002). Treba napomenuti da je kinetika ozoniranja u prirodnoj vodi slična onoj u otpadnim vodama, ali s razlikom prisustva potencijalnih promotora, inicijatora ili inhibitora uslijed kompleksnog organskog i anorganskog sastava matrica otpadnih voda, što može rezultirati pojavom raznovrsnih ozonskih reakcija (Beltran, 2004)

2.1.2. Kinetika i parametri ozoniranja

Da bi se ispravno procijenila učinkovitost postupka ozoniranja u uzorcima prirodnih i otpadnih voda, neophodno je odrediti uvjete provođenja eksperimenta i odgovarajući kinetički režim ozoniranja. Cilj praćenja kinetike ozonskih reakcija je odrediti stopu brzine reakcije između O₃, vode i sastojaka u vodi te koeficijent prijenosa mase O₃ iz plinovite faze u tekuću fazu reakcijske smjese. Prema vrsti eksperimenta, kinetika ozonskih reakcija može biti homogena i heterogena. Homogena kinetika prati reakcije između O₃ i spojeva otopljenih u vodi čije se koncentracije s vremenom mijenjaju, a ovise jedino o vrsti i brzini odvijanja kemijskih reakcija, koje su nerijetko ireverzibilne i pseudo prvog reda. Druga mogućnost je istraživanje kinetike ozoniranja kao heterogenog procesa koji se najčešće odvija u praksi, a temelji se na teoriji apsorpcije plinova u tekućinama popraćenih kemijskim reakcijama. Dakle, ozonske reakcije u vodi i otpadnoj vodi su zapravo heterogene reakcije između tekuće i plinovite faze u kojima se plinska komponenta (O₃) prenosi iz plinske faze (kisika ili zraka) u vodenu fazu, pri čemu istodobno reagira s drugim tvarima (zagađivala) tijekom difundiranja. Heterogeni procesi u reakcijskoj otopini, osim o koncentraciji reaktanata te o, vrsti i brzini kemijskih reakcija, ovise i o parametrima prijelaza O₃ između plinovite i tekuće faze, a to su

difuzivnost, topljivost i koeficijent prijenosa mase ozona. U sustavu plin-tekućina svi navedeni procesi se odvijaju relativno brzo, a najbitniji je fenomen fizikalne apsorpcije plina na granici faza koji se odvija sve dok se ne postigne ravnotežna koncentracija u obje faze, a objašnjava se kombinacijom teorije "filma" (Lewis i Whitman, 1924) i teorije "obnove površine" (Danckwerts, 1951). Naime, stopa apsorpcije O₃ u vodi ovisi o koeficijentu prijenosa mase ozona i specifičnoj površini između faza plin-tekućina. Kada su dvije nemješljive faze u dodiru, glavni otpor prijenosu mase se nalazi u stacionarnom tankom sloju na granici faza nazvanom "film", dok se kod Danckwertsove "teorije obnove", tekućina u graničnom sloju konstantno izmjenjuje s novim tekućim elementima iz otopine. Prijenos mase u oba slučaja se odvija putem difuzije kroz granične slojeve.

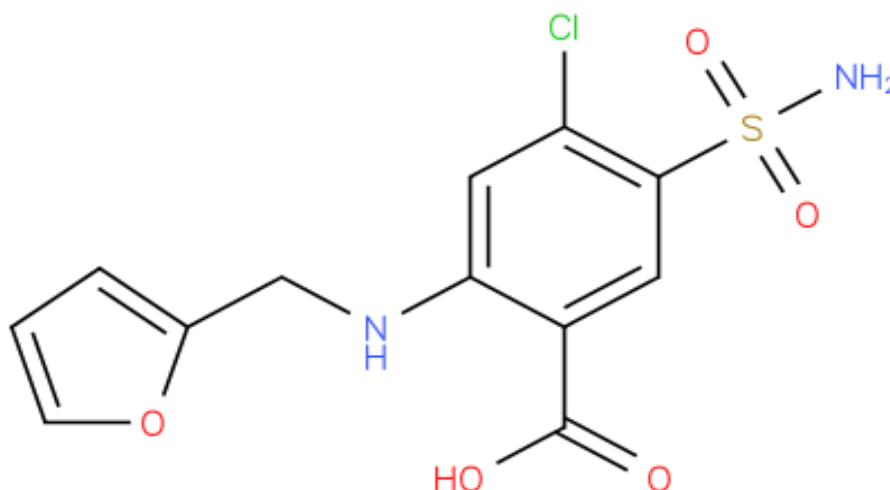
Do koje mjere će se oksidirati sastojci vode pri ozoniranju, ovisi o koncentraciji otopljenog ozona (C_{O₃*}). Pri atmosferskom tlaku i temperaturi (1 atm, 25 °C), O₃ je slabo topljiv u vodi. Topljivost ozona temeljni je parametar u kinetičkim istraživanjima ozoniranja i određuje se Henryjevim zakonom, koji je prikazan sljedećom jednadžbom (3):

$$P_{O_3} = H_e \times C_{O_3}^* \quad (3)$$

Osim parcijalnog tlaka O₃ (P_{O₃}), na C_{O₃*} u vodi utječu i sljedeći operacijski parametri: Henryjeva konstanta (H_e), protok zraka i brzina miješanja otopine. H_e izravno ovisi o ionskoj jakosti otopine, pH, temperaturi, ali i o vrsti otopljene soli (pufera) i izražava se vrijednostima koje su odredili znanstvenici u svojim eksperimentalnim istraživanjima na otpadnim vodama (Sotelo i sur., 1989). Bitan čimbenik koji utječe na razgradnju O₃ u vodi je i pH. Kao opće pravilo, vrijednosti pH < 7 imaju blagi učinak na reakcije razgradnje O₃, ali pri pH > 7, brzina reakcija se značajno povećava. Ako se kinetika ozoniranja kontrolira kemijskim reakcijama koje se odvijaju u otopinama, onda se u obzir mora uzeti parametar Hatta broja, čija vrijednost ovisi o koncentraciji O₃, reakcijskom vremenu (t_r), volumetrijskom koeficijentu prijenosa (k_{L,a}) i kinetičkoj konstanti razgradnje ozona (k_d). Kod vrijednosti H_a > 0,3, brzina apsorpcije je veća od brzine razgradnje O₃ i formiranja OH• pa kemijska kinetika prati reakcije pseudo prvog reda i kontrolira proces ozoniranja. Međutim, ako je H_a > 3, O₃ sa sastojcima u vodi reagira vrlo brzo, a proces ozoniranja kontrolira fenomen apsorpcije i prati ireverzibilne reakcije drugog reda. Također, ako je otpadna voda visokog organskog opterećenja (KPK > 300 mg L⁻¹) za koju vrijedi H_a > 3, kinetika ozonskih reakcija se odvija u brzom kinetičkom režimu, što je slučaj kod većine ozonskih reakcija u vodi. Kod otpadnih voda niskog organskog opterećenja (KPK < 300 mg L⁻¹) s H_a > 0,3 javlja se slučaj sporog kinetičkog režima (Beltran, 2004).

2.2. FUROSEMID

Furosemid (*Lasix*®) je snažni diuretik koji pripada grupi sulfonamida, a danas se sve češće primjenjuje u ljudskoj medicini i veterini pri liječenju otečenih stanja (edema) povezanih sa srčanim, bubrežnim i jetrenim bolestima te za liječenje hipertenzije. Furosemid [4-klor-2-(furan-2-ilmetilamino)-5-sulfamoil-benzojeva kiselina] je ustvari sulfamoil-antranilna kiselina derivirana sulfonamidnom skupinom na čijem se benzenskom prstenu na 4-C atomu veže atom klora, a na 2-C atomu se nalazi amino skupina preko koje je vezana molekula furana (Slika 4). Najvažniji je predstavnik potentne grupe diuretika (saluretika) dobivene derivatizacijom grupe tiazida kojima je strukturno jako sličan, a za povećanu diuretsku aktivnost zaslužan je *meta* položaj između sulfamilne i karboksilne skupine na benzenskom prstenu (Maren, 1976).



Slika 4. Kemijska struktura furosemida (NIH, 2018)

Furosemid je prvi i glavni diuretik Henleove petlje te ima brzo i snažno djelovanje, a mjesto djelovanja je nefronska stanica sisavaca (Odlind, 1979). Mehanizam djelovanja nije u potpunosti razjašnjen, ali je poznato da se veže za ionski $\text{Na}^+/\text{K}^+/2\text{Cl}^-$ superprijenosnik na luminalnoj membrani debelog segmenta uzlaznog kraka Henleove petlje i blokira ga (Feig, 1986). Preciznije, veže se na aktivno mjesto klora na ionskom nosaču i tom blokadom kompetitivno inhibira reapsorpciju navedenih elektrolita i vode, što pospešuje eliminaciju natrijeva klorida, kalija, vodika, kalcija, magnezija, amonijaka, bikarbonata i vjerojatno fosfata (Ponto i Schoenwald, 1990). U Tablici 2, navedena su fizikalno-kemijska svojstva furosemida.

Tablica 2. Fizikalno-kemijska svojstva furosemida (NIH, 2018)

SVOJSTVO	VRIJEDNOST
Molekularna masa	330.739 g mol ⁻¹
Točna masa	330.008 g mol ⁻¹
Agregatno stanje	kristalizirani prah
Boja / Miris	bijela do svijetlo-žuta / bez mirisa
Talište	206 °C
pK vrijednosti	pK _{a1} =3,8 / pK _{a2} =7,5
Topljivost u vodi	slaba – 73,1 mg L ⁻¹ (30 °C)
Topljivost u organskim otapalima	dobra u acetonu, metanolu, vodenim otopinama pri pH > 8

2.2.1. Rasprostranjenost furosemida u okolišu

Premda se lijekovi te ostali farmaceutski proizvodi već dugi niz godina primjenjuju u humanoj medicini i veterini, tek su nedavno u znanstvenoj zajednici prepoznati kao potencijalna zagađivala okoliša. Lijekovi spadaju u grupu farmaceutski aktivnih spojeva (engl. *pharmaceutically active compounds - PhACs*), koji se nakon terapijskog učinka eliminiraju iz ljudskog ili životinjskog organizma, urinom ili fecesom, uglavnom neizmjenjeni ili kao metaboliti, a zbog svojih specifičnih fizikalno-kemijskih svojstava većina ih se ne uklanja u potpunosti u uređajima za obradu vode i dospijeva u površinske vode. Budući da su kemijski često vrlo stabilni, dugo se zadržavaju i akumuliraju u prirodi, dosežući detektabilne, a ponekad i biološki aktivne koncentracije, koje mogu imati nepoželjne zdravstvene posljedice na ekosustav. PhACs-ovi ulaze u okoliš prvenstveno zbog nemogućnosti uklanjanja na postrojenjima za obradu komunalne i industrijske otpadne vode u kojima se tek manji udjeli ovih spojeva uklanjaju putem mikroorganizama i aktivnim muljem. U ovom će se radu pozornost posvetiti diuretikumu furosemidu, koji sadrži specifičnu sulfonamidnu skupinu. Od svih diuretika, upravo je furosemid pronađen u najvećim koncentracijama u većini okolišnih uzoraka, što upućuje na njegovu sve veću proizvodnju i potrošnju u medicini i veterini. U Tablici 3, navedeni su neki od radova u kojima se istraživala rasprostranjenost farmaceutika u okolišu, a među njima i furosemida.

Tablica 3. Koncentracije furoseמידa detektirane u okolišnim vodama

OKOLIŠNI UZORCI	KONCENTRACIJA	LITERATURNI IZVORI
	ng L ⁻¹	
Bolnički efluent	10441	<i>Khan i Ongerth, 2004</i>
	14 000	<i>Verlicchi i sur., 2012</i>
	3 207	<i>Gillard i sur., 2014</i>
Površinske vode (rijeke, jezera)	254,7	<i>Calamari i sur., 2003</i>
	100	<i>Kasprzyk-Hordern i sur., 2008</i>
	239,4	<i>Al-Odaini i sur., 2013</i>
Neobrađena otpadna voda	3450	<i>Lacey i sur., 2011</i>
	4813	<i>Papageorgiu i sur., 2016</i>
Obrađena otpadna voda	750	<i>Castaglioni i sur., 2005</i>
	585	<i>Zuccato i sur., 2005</i>
	180-930	<i>Batt i sur., 2008</i>
	1000	<i>Tracol i Duchemn, 2009</i>
	1015	<i>Valcarcel i sur., 2011</i>
	2280	<i>Lacey i sur., 2011</i>
	1340	<i>Al-Odaini i sur., 2013</i>
1502	<i>Papageorgiu i sur., 2016</i>	

Većina lijekova pronađena u neobrađenoj otpadnoj vodi, obrađenoj vodi, bolničkim efluentima, jezerima, riječnim vodama i sedimentima, ali i u vodi za piće, upućuje na to da su danas farmaceutski proizvodi široko rasprostranjena mikrozagađivala. U otpadnim vodama u Njemačkoj, Francuskoj, Španjolskoj i Engleskoj, pronađene su koncentracije furoseמידa veće od 3 µg L⁻¹, a u efluentima nakon obrade u koncentracijama većima od 1 µg L⁻¹ (Sadezky i sur., 2008). Također, u paralelnom istraživanju, pronađene su veće razine furoseמידa u sedimentima (> 1 µg L⁻¹) nego u površinskim vodama (< 1 µg L⁻¹) (Ferrari i sur., 2011).

Ovisno o farmakokinetici, dio lijeka se izlučuje neizmijenjen, a dio kao metabolit. Kao slabo kiseli lijek sulfonamidne skupine, furoseמיד se kompetitivno veže za proteine plazme i to gotovo isključivo (95%) za albumin. Kako je slabo topljiv u vodi, mali dio neioniziranog spoja favorizira raspodjelu u masno tkivo. Furoseמיד se iz organizma eliminira 90-95% neizmijenjen te, u manjoj mjeri, u obliku dva metabolita. Prvi je furoseמיד-glukuronat, koji se formira

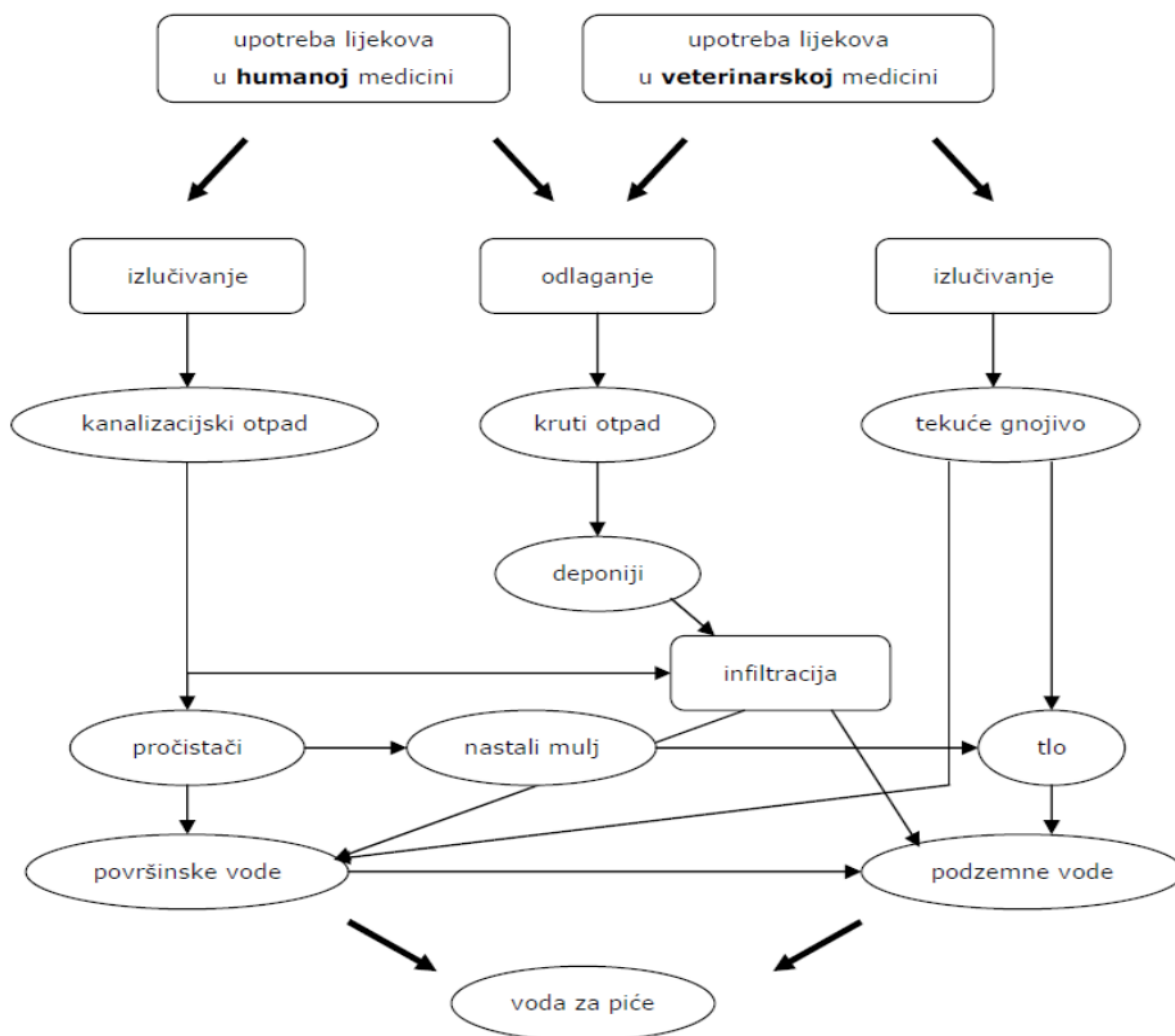
reakcijama konjugacije u jetri, a drugi, rjeđi je 4-klor-5-sulfamoil-antranilna kiselina (CSA). 2/3 lijeka izlučuju se urinom kroz bubrege, a 1/3 se izlučuje putem žuči i fecesa (Diem i Lentner, 1970).

Ponašanje lijeka nakon što dospije u okoliš ovisi o njegovim biogeokemijskim svojstvima, poput topljivosti u vodi, hlapljivosti, sorpcijskom koeficijentu (pH, ionska jakost), otpornosti na kemijsku i mikrobiološku razgradnju, ali i o uvjetima okoliša. Na primjer, zbog visoke fotodegradabilnosti u specifičnim uvjetima okoline, furosemid ima potencijal stvaranja stabilnog i toksičnog fotoproducta, koji djeluje kao endokrini disruptor, a čija aktivnost i utjecaj na organizme još nije sasvim poznata (Isidori i sur., 2009). Pri vrijednostima $\text{pH} < 5$, furosemid je relativno nestabilan, a povećanjem pH od neutralnog prema slabo baznim otopinama povećava se i njegova stabilnost. Lijekovi sulfonamidne skupine posjeduju relativno niske sorpcijske koeficijente, što znači da ovi spojevi imaju slab afinitet vezanja za krute čestice aktivnog mulja te se većinom nalaze u otopljenoj frakciji iz čega se zaključuje da je dominantan mehanizam uklanjanja sulfonamida u uređajima za obradu otpadnih voda mikrobiološka razgradnja (Joss i sur., 2005). Istraživanje na uklanjanju lijekova u Australiji, pokazalo je da se ukupno 5% furosemida uklanja putem aktivnog mulja i 15% putem mikroorganizama (Ongerth i Khan, 2004). Nadalje, rad Ingersleva i Halling-Sorensena iz 2000, koji je proveden na 12 sulfonamida, utvrdio je da ova skupina spojeva nije lako biorazgradiva u aktivnom mulju. Međutim, uočeno je da se koncentracije furosemida u površinskim vodama smanjuju kako se povećava udaljenost od mjesta ispusta iz postrojenja za obradu otpadne vode, što ipak upućuje na slabu, ali prisutnu biorazgradivost furosemida (Kasprzyk-Hordern i sur., 2008).

2.3. OZONIRANJE FARMACEUTSKIH SPOJEVA

Posljednjih godina sve više pažnje se posvećuje brojnim istraživanjima koja potvrđuju sve veću prisutnost novih oblika zagađivala u okolišu (engl. *contaminants of emerging concern – CEC*). Pod CEC-ove spadaju lijekovi i ostali farmaceutski proizvodi, proizvodi za osobnu njegu, pesticidi, endokrini disruptori, umjetni zaslađivači, teško zapaljivi materijali i dr. (Ibanez i sur., 2013). Premda su ovi ksenobiotici pronađeni u tragovima, procesima bioakumulacije i biomagnifikacije dolazi do njihovog nakupljanja u okolišu te se detektiraju u otpadnim i prirodnim vodama, gdje zbog visoke biološke aktivnosti postaju potencijalna prijetnja za ljude i vodene organizme (Bolong i sur., 2009; Petrović i sur., 2009). Dodatni teret predstavlja i nedostatak dovoljno selektivnih i osjetljivih metoda za određivanje tragova pojedinih

mikrozagađivala u uzorcima kompleksnog sastava. Nova zagađivala u vodu za piće dopijevaju kroz uređaje za obradu otpadne vode iz bolničkih ispusta, životinjskih farmi, poljoprivrednih površina, osobnom upotrebom ili nepravilnim odlaganjem (Halling-Sorensen i sur., 1998). Shema kretanja lijekova u okolišu je prikazana na Slici 5.



Slika 5. Putevi farmaceutskih spojeva u okolišu (Senta, 2009)

Brojna istraživanja provedena na postrojenjima za obradu komunalnih i industrijskih otpadnih voda te vode za piće (Ternes, 1998; Ternes i sur., 2002; Gros i sur., 2009; Pojana i sur., 2011; Chen i sur., 2016) ukazuju na nepotpunu eliminaciju CEC-ova korištenjem konvencionalnih metoda. Jedno istraživanje na uklanjanju furosemida na uređaju za obradu otpadne vode govori o ukupnoj učinkovitosti od samo 11% (Schlüsener i sur., 2008). U Italji su provedena istraživanja na uklanjanju farmaceutika iz uređaja za pročišćavanje otpadne vode u zimskom i ljetnom periodu, a učinkovitost uklanjanja furosemida iznosila je 8% i 54%, ovisno o sezoni (Castiglioni i sur., 2006). Konvencionalne metode obrade otpadne vode poput

koagulacije, flokulacije, sedimentacije s Al i Fe solima, živim vapnom, UV zračenja i ionske izmjene, pokazale su se kao relativno neučinkovite metode za uklanjanje farmaceutskih spojeva (Adams i sur., 2002). Koncentracije lijekova pronađene u uzorcima sekundarnih efluenata, bile su gotovo jedan red veličine veće od njihove koncentracije u riječnim uzorcima. Iz toga se zaključuje da ova zagađivala nisu potpuno uklonjena u uređajima za pročišćavanje otpadnih voda i da se kontinuirano otpuštaju u površinske vode. Zato je potrebno koristiti alternativne postupke obrade vode ili njihovu kombinaciju (UV, H₂O₂, membranski procesi, AOP, O₃) da bi se učinkovito uklonili kemijski stabilni spojevi te njihovi metaboliti i razgradni produkti.

Ozoniranje se uspješno koristi kao vrlo učinkovita alternativa kloriranju pri dezinfekciji vode, za redukciju patogena, pri oksidaciji stabilnih i toksičnih spojeva, te kao predkorak pri flokulaciji i filtraciji da bi se poboljšala biorazgradivost otpadnih voda. O₃ je osobito reaktivan prema funkcionalnim skupinama s visokom elektronskom gustoćom (dvostruke veze, aromati, neprotonirani sekundarnih i tercijarni amini, reducirane grupe sa sumporom), koje se uobičajeno nalaze u mnogim CEC-ovima. Stoga se za većinu lijekova, koji se podvrgavaju ozoniranju, očekuje vrlo brza kinetika razgradnje (McDowell i sur., 2005; Hollender i sur., 2009). Rezultati istraživanja u kojem je korišten O₃ za obradu otpadne vode koja sadrži citostatičke lijekove, pokazali su 90%-tnu učinkovitost uklanjanja nakon 45 minuta tretmana (Ray i sur., 1999). U radovima na otpadnim vodama (Huber i sur. 2003; Esplugas i sur., 2007), dokazano je da doze O₃ od 5 mg L⁻¹ mogu dovesti do potpunog nestanka većine lijekova. Također, istraživanje provedeno na sekundarnom efluentu koji sadrži 6.6-7.7 mg L⁻¹ KPK, ukazalo je na 90-99%-tnu razgradnju makrolida i sulfonamidnih antibiotika pri dozi O₃ ≥ 2 mg L⁻¹ (Huber i sur., 2005). Ispitivanje provedeno na grupi sulfonamida pri dozi O₃ od 1 do 3,2 mg L⁻¹ i protoku O₃ od 1,2 L min⁻¹ ukazalo je na učinkovitost razgradnje od 99,9% u pH intervalu 2-10 te pri temperaturi od 22 °C (Garoma i sur., 2010). Ozoniranje karbadoksa, trimetoprima i 5 antibiotika sulfonamidne skupine iz modelne vode pri pH 7,5 i koncentraciji O₃ od 0,3 mg L⁻¹, pokazalo je 95%-tnu učinkovitost unutar 1,3 min od početka tretmana (Adams i sur., 2002). Dakle, čak i pri vrlo niskim koncentracijama ozona, koje su puno niže od onih korištenih u postrojenjima za pročišćavanje vode, O₃ se pokazao kao vrlo učinkovito sredstvo za razgradnju farmaceutskih spojeva i to do razine ispod granica detekcije. Temeljni cilj ovog rada je istražiti djelotvornost ozonskog tretmana za uklanjanje furosemida iz sekundarnog efluenta i modelnih uzoraka različitih pH-vrijednosti. Promatrani parametri tijekom razgradnje furosemida ozonom su koncentracija spoja, primjenjena doza ozona, reakcijsko vrijeme tretmana, volumen uzorka, temperatura, početni i završni pH te električna vodljivost otopine uzorka.

2.4. ISTRAŽIVAČKA PITANJA I RADNE HIPOTEZE

Furosemid je snažni diuretik koji se sve više koristi u humanoj medicini i veterini. Zbog velike kemijske stabilnosti, vrlo ga je teško ukloniti iz vode gdje se nakuplja te predstavlja rizik i opasnost za okoliš i zdravlje ljudi. Konvencionalni postupci pročišćavanja otpadne vode poput flokulacije, sedimentacije, filtracije, biološke obrade te kloriranja ne uspijevaju učinkovito ukloniti lijekove i ostale farmaceutski aktivne supstance, ali u novije vrijeme razvija se sve veći broj novih i naprednih tehnologija za uklanjanje teško razgradivih spojeva iz vode. U alternativne metode, uz membranske procese, UV zračenje, hladnu plazmu, H_2O_2 , AOPs, spada i tretman ozonom. Obzirom da tretman O_3 učinkovito uklanja razne organske i anorganske spojeve, zanimljivim se pokazalo provjeriti djelotvornost razgradnje furosemida u modelnim matricama, jer do sada ne postoji objavljen rad na tu temu. Također, važno je identificirati produkte razgradnje furosemida budući da oni mogu biti više ili manje stabilni ili toksični u odnosu na početnu molekulu, što bi se trebalo utvrditi daljnim istraživanjima. Eksperimenti su provedeni u 5 različitih modelnih uzoraka, odnosno u sekundarnom efluentu, koji je prošao biološku obradu te u demineraliziranoj vodi i puferima pri pH otopina od 5, 7, 8 i 9. Primijenjene su 4 različite doze ozona od $0,02 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ te posljedna doza od $0,2 \text{ mg L}^{-1}$, koja je korištena jedino kod tretmana u sekundarnom efluentu.

Prije provedbe eksperimenta, postavljena su sljedeća istraživačka pitanja:

1. Kakva je djelotvornost uklanjanja furosemida iz modelnih voda ozoniranjem?
2. Koja koncentracija ozona najučinkovitije uklanja furosemid?
3. Kako pH vrijednost otopine utječe na razgradnju furosemida ozonom?
4. Koji razgradni produkti nastaju pri obradi furosemida ozonom?

Na temelju dosadašnjih rezultata znanstvenih istraživanja postavljene su sljedeće radne hipoteze koje će se istraživanjem pokušati provjeriti:

1. Pri koncentraciji otopljenog ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ u demineraliziranoj vodi, očekivana učinkovitost razgradnje sulfonamida je viša od 95% (Adams i sur., 2002).
2. Najveća topljivost i uklanjanje furosemida očekuje se u neutralnim i slabo lužnatim uvjetima otopine uzorka (Devarakonda, 2007).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Kemikalije

- Furosemid, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Amonijev formijat, Sigma Aldrich, Steinheim, Njemačka
- Natrijev sulfit (bezvodni), VWR Chemicals, UK
- Metanol, VWR Chemicals, UK
- Acetonitril, VWR Chemicals, UK
- Kalijev hidrogenfosfat (bezvodni), Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka
- Kalijev dihidrogenfosfat (bezvodni), Merck, KGaA, Darmstadt, Njemačka
- Boca sa sintetskim zrakom, Messer Croatia Plin d.o.o., Hrvatska
- Deionizirana i organski čista voda, Millipore, SAD
- Demineralizirana voda

3.1.2. Instrumenti, laboratorijsko posuđe i pribor

- Uređaj za generiranje ozona, Pacific Ozone Technology, SAD
- Analitička vaga, model ML 104, Mettler Toledo, Švicarska
- pH-metar/konduktometar, model WTW TetraCon 325/Elektrode Blueline 24 pH, inoLab, Njemačka
- Spektrofotometar, model DR900, Hach Lange, Njemačka
- Uređaj za UHPLC, sustav Waters Aquity UPLC, Waters Corp., Milford, SAD
- Hibridni analizator masa, model QToF Premier, Waters Micromass, Manchester, UK
- Vakuumski uređaj za ekstrakciju na čvrstoj fazi s nastavkom za sušenje (Supelco Box), Supelco, Bellefonte, SAD
- Uređaj za uparavanje u struji dušika, Turbovap LV, Zymark Corporation
- Kolonice za ekstrakciju na čvrstoj fazi Oasis HLB (200 mg, 6 mL), Waters Corp., Milford, SAD
- Automatske pipete s nastavcima, Eppendorf, Njemačka
- Kiveta test LCW 510 (0,03 – 1,50 mg L⁻¹ O₃) za mjerenje koncentracije ozona, Hach Lange, Njemačka

- Menzure volumena 250 mL
- Laboratorijske čaše volumena 400 mL
- Odmjerne tikvice volumena 250 mL
- Bočice za uzorke (4 mL i 2 mL) s pripadajućim čepovima
- Stalak za bočice
- Epruvete za uparavanje
- Lađica od papira za vaganje
- Žličica

3.1.3. Priprema izvorne otopine furosemina

U staklenu bočicu odvagano je 40 mg standarda furosemina i otopljeno u 4 mL metanola. Masena koncentracija tako pripravljene izvorne otopine koja se dodaje u modelne uzorke iznosila je 10 mg mL^{-1} .

3.1.4. Priprema otopine natrijeva sulfita

U odmjernu tikvicu od 250 mL odvagano je 0,2625 g Na_2SO_3 i nadopunjeno do oznake s demineraliziranom vodom. Pripremljena otopina Na_2SO_3 koncentracije $8,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ služila je za prekid reakcije ozoniranja.

3.1.5. Priprema modelnih uzoraka

Za ovaj rad korišteno je 5 modelnih matrica: 4 otopine pufera različitih pH-vrijednosti (5, 7, 8, 9) i kompozitni 24-satni sekundarni efluent prethodno obrađen biološkom obradom i skladišten zamrznut ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$), a koji je uzet na Centralnom uređaju za pročišćavanje otpadnih voda u Zagrebu (CUPOV). Puferske otopine pripravljene su u Erlenmeyerovoj tikvici volumena 2 L miješanjem fosfatnih soli kalijevog hidrogenfosfata (K_2HPO_4) i kalijevog dihidrogenfosfata (KH_2PO_4) te nadopunjavanjem do oznake s destiliranom vodom. Modelni uzorci su pripremljeni dodatkom $100 \text{ } \mu\text{L}$ izvorne otopine furosemina u smjesu 220 mL destilirane vode i 30 mL fosfatnog pufera odgovarajuće pH-vrijednosti. Tretman ozonom proveden je u čistoj plastičnoj menzuri od 250 mL.

3.1.6. Generator ozona

Za proizvodnju ozona, koristio se uređaj za generiranje ozona (Slika 6), modela Series G s koronarnim pražnjenjem sastavljen od reaktorske stanice visoke frekvencije, zrakom hlađenog

sustava, mjerača protoka, regulatora snage napajanja, difuzora i popratnih cjevčica. Ovaj model posjeduje modernu tehnologiju "plutajućih" ploča (engl. *floating plate technology*), u čijoj se reaktorskoj ćeliji u jako uskom razmaku između fiksne titanijske ploče i "plutajuće" titanij-keramičke dielektrične ploče, stvara električno polje (korona). Molekulski kisik (O_2) se električnim pražnjenjem razdvaja na pojedinačne nestabilne atome kisika (O), koji se zatim vežu na slobodne molekule kisika (O_2) i formiraju ozon (O_3). Uređaj radi pod naponom od 230 V, a proizvodnja O_3 iznosi $9,4 \text{ g h}^{-1}$. Zbog jako uskog razmaka između ploča, smanjena je potreba za energijom i visokim naponom te ne dolazi do pretjeranog zagrijavanja uređaja koji se učinkovito hladi zrakom. Kao izvor kisika, korištena je boca s komprimiranim zrakom pri 250 bar s redukcijским ventilom. O_3 se cjevčicom uvodi u otopinu gdje oksidira prisutne spojeve točno određenim reakcijama, ovisno o eksperimentalnim parametrima.



Slika 6. Uređaj za generiranje ozona

3.2. METODE

3.2.1. Postupak ozoniranja

Ozon je doziran u menzuru u kojoj će se provoditi eksperiment pomoću difuzora i cijevi spojene na uređaj za generiranje ozona. Protok ozona je namješten na $4,2 \text{ L min}^{-1}$. Snaga generatora je regulirana pomoću potenciometra na prednjoj strani uređaja, a postavljen je na vrijednosti između 40% i 60%, ovisno o željenoj dozi ozona. Pokusi su provedeni u 5 različitim matrica: 4 fosfatna pufera približnih vrijednosti pH od 5, 7, 8 i 9 te sekundarnom efluentu – obrađenoj otpadnoj vodi, koja je prethodno pročišćena biološkom metodom. Ozoniranje u sekundarnom efluentu provedeno je kako bi se odredila razgradnja u prisustvu drugih organskih spojeva u realnom sustavu. Za proces ozoniranja korištene su koncentracije ozona od $0,02 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,2 \text{ mg L}^{-1}$. Za mjerenje koncentracije O_3 korištena je zasebna menzura od 250 mL napunjena demineraliziranom vodom, iste temperature kao i uzorak koji se ozonirao ($23 \text{ }^\circ\text{C}$). Nakon što je u toj menzuri postignuta željena koncentracija ozona, cijev je prebačena u menzuru s odgovarajućom matricom. Koncentracija ozona je provjeravana spektrofotometrom pomoću kiveta testa (LCW 510). U čistu kivetu, prethodno je dodan dietil-*p*-fenilendiamin (DPD) i nekoliko kapi otopine kalijeva jodida, a zatim je iz menzure s demineraliziranom vodom izuzeto 7 mL ozonirane otopine i dodano u kivetu. Sastav kivete je izmiješan i nakon 2 min je očitana koncentracija ozona na spektrofotometru. Prije početka tretmana ozonom, trebalo je odrediti početnu pH-vrijednost i vodljivost modelne matrice, što je mjereno pH-metrom. Injektiranjem $100 \text{ } \mu\text{L}$ izvorne otopine furosemda (10 mg mL^{-1}) u plastičnu menzuru napunjenu s 250 mL modelne matrice, započet je proces razgradnje matičnog spoja, a dinamika izuzimanja uzoraka alikvota bila je 15 s, 30 s, 45 s, 1 min, 1 min i 30 s, 2 min, 3 min, 4 min, 5 min, 7 min i 10 min. Ukupno je izuzeto 11 uzoraka po 2 mL, na način da je pipeta uronjena između stijenke menzure i cijevi za doziranje. U bočicu za prikupljanje uzoraka (4 mL) prethodno je dodano $20 \text{ } \mu\text{L}$ otopine Na_2SO_3 koncentracije $8,3 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, koja je služila za prekid reakcije ozoniranja. Nakon izuzimanja uzorka, bočica je zatvorena, a sadržaj bočice dobro protresen. Uzorak je čuvan u hladnjaku pri $4 \text{ }^\circ\text{C}$ do analize vezanim sustavom UHPLC-MS. Nultni uzorci ($t=0 \text{ min}$) su pripremljeni na način da se u određenu matricu dodala izvorna otopina furosemda u istoj koncentraciji kao u reakcijskoj smjesi, ali se umjesto O_3 kroz difuzor uvodio sintetski zrak (dušik i kisik). Uzorak se izuzimao nakon 30 sekundi kada je postignuta izmiješanost sustava. Nakon svakog tretmana određenom dozom ozona, menzura i cijev su oprani, redom: demineraliziranom vodom, vodovodnom vodom, demineraliziranom vodom, metanolom i demineraliziranom vodom.

3.2.2. Analiza modelnih uzoraka vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa

Modelni uzorci analizirani su vezanim sustavom tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti (engl. *ultrahigh-performance liquid chromatography - UHPLC*) i analizatora masa s mjerenjem vremena preleta (engl. *time-of-flight mass spectrometry - ToFMS*) u pozitivnom i negativnom polaritetu (Slika 7). Prije analize, uzorci su razrijeđeni ultračistom vodom u volumnom omjeru 1:1.

Za kromatografsko razdvajanje upotrijebljena je kolona punjena nepokretnom fazom BEH C18 (50 mm x 2.1 mm; 1,7 μm) uz primjenu sustava Waters Aquity UPLC sastavljenog od binarne visokotlačne crpke i automatskog injektora. Pritom je primijenjena gradijentna elucija uz vodu i acetonitril kao eluense, s tim da je prilikom analiza u pozitivnom polaritetu u oba eluensa dodano po 0,1% mravlje kiseline. Pri početnim uvjetima, pokretna faza sadržavala je 95% vodenog eluensa (eluens A), a zatim je njegov udio, ovisno o primijenjenoj metodi, postupno smanjivan. Za određivanje furosevida primijenjena je kraća metoda u kojoj je u razdoblju od 8 minuta volumni udio acetonitrila (eluens B) povećan na 50%, dok je metoda za pretražne analize razgradnih produkata uključivala duži gradijent u trajanju od 19 minuta u kojem je volumni udio eluensa B povećan na 95%. Za povratak na početne uvjete i kondicioniranje kolone bile su potrebne dodatne dvije minute, što znači da je, ovisno o metodi, ukupno vrijeme analize bilo 10 min, odnosno 21 min po uzorku. Protok pokretne faze iznosio je 0,4 mL min⁻¹.



Slika 7. Vezani sustav UPLC-MS

Maseno-spektrometrijska detekcija provedena je na hibridnom analizatoru masa QToF Premier, uz primjenu elektroraspršenja i pri rasponu m/z vrijednosti od 50 Da do 1000 Da. Kao plin za raspršenje i otparavanje otapala te desolvataciju analita upotrijebljen je dušik. Protok plina za desolvataciju postavljen je na 700 L h^{-1} , a temperatura na $300 \text{ }^\circ\text{C}$. Protok plina na konusu podešen je na 25 L h^{-1} , a temperatura ionskog izvora na $120 \text{ }^\circ\text{C}$. Napon na kapilari za elektroraspršenje bio je postavljen na 3500 V u pozitivnom, odnosno 3000 V u negativnom polaritetu, a napon na konusu na 30 V . Kako bi se osigurala maksimalna točnost i ponovljivost sustava, sva snimanja provedena su pomoću neovisnog referentnog spreja, a kao referentni spoj korišten je leucin enkefalin (m/z 554,2615).

Rezultati su obrađeni pomoću programa MassLynx koji integrira sve osnovne funkcije instrumenta.

3.2.2.1. Ekstrakcija modelnih uzoraka na čvrstoj fazi i obrada ekstrakta

Za identifikaciju razgradnih produkata ozoniranja furosevida, alikvoti modelnih uzoraka furosevida pripremljenih u puferima, preostali nakon ozoniranja, tj. nakon izuzimanja posljednjeg alikvota, dodatno su obrađeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi (engl. *solid-phase extraction* - *SPE*) na kolonicama Oasis HLB (engl. *hydrophilic-lipophilic balance*). Prije nanošenja uzoraka, kolonice su kondicionirane s po 5 mL metanola i 5 mL ultračiste vode. Alikvoti volumena 100 mL propušteni su kroz kolonice brzinom od približno 5 mL min^{-1} upotrebom vakuumskeg sustava za višestruko propuštanje uzoraka. Kolonice su zatim isprane s 5 mL ultračiste vode, sušene 30 minuta u struji dušika te eluirane s 5 mL metanola. Dobiveni eluati upareni su do suha u blagoj struji dušika te otopljeni u 1 mL smjese metanola i vodene otopine amonijevog formijata koncentracije $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ($1:1, v:v$). Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi (*SPE*) korištena za ovaj rad prikazana je na Slici 8.



Slika 8. Aparatura za ekstrakciju na čvrstoj fazi (*SPE*)

4. REZULTATI I RASPRAVA

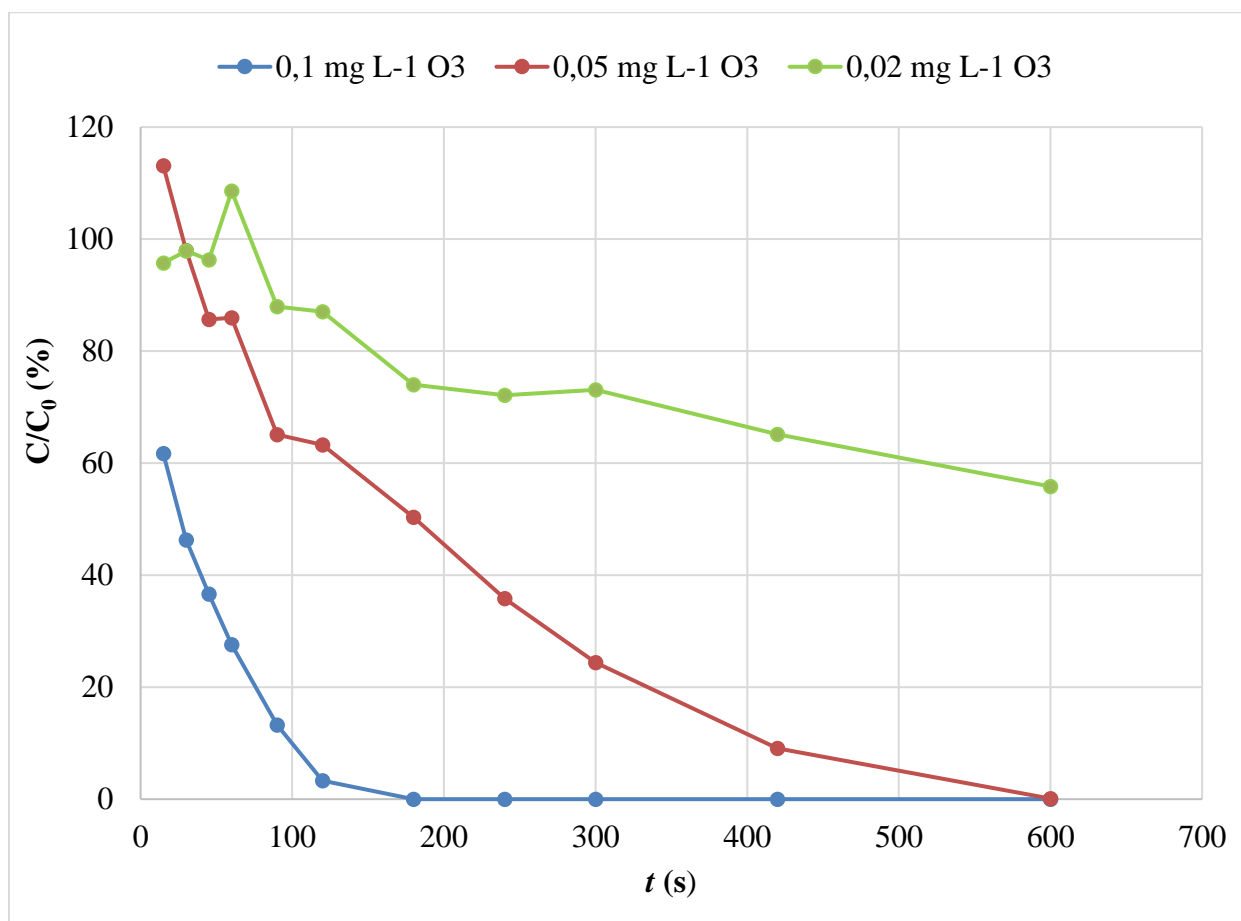
Cilj ovog rada bio je odrediti djelotvornost ozona za uklanjanje diuretika furosemida iz modelnih uzoraka s demineraliziranom vodom i fosfatnim puferima pri različitim pH-vrijednostima otopina (5, 7, 8 i 9) te iz otpadne vode (sekundarni efluent), prethodno obrađene biološkom metodom. Doze ozona pri kojima se istraživala djelotvornost razgradnje furosemida u fosfatnim puferima bile su $0,02 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, a doza od $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ se koristila jedino pri tretmanu otpadne vode. Reakcijsko vrijeme jednog tretmana iznosilo je 10 minuta, a ukupno je u tom periodu izuzeto po 11 alikvota uzoraka. Volumen modelne otopine iznosio je 250 mL. Ukupno je provedeno 10 pokusa ozoniranja. Analiza furosemida provedena je pomoću vezanog sustava tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti i spektrometrije masa (UHPLC-MS). Rezultati djelotvornosti razgradnje i kinetike furosemida pri različitim dozama ozona, u različitim matricama i kod različitim pH-vrijednosti prikazani su grafički na Slikama 9-14.

Rezultati istraživanja prikazuju utjecaj procesnih parametara ozoniranja (doza ozona, pH-vrijednost, reakcijsko vrijeme) na razgradnju diuretika furosemida. Iz dobivenih rezultata jasno je vidljivo da razgradnja furosemida u modelnim uzorcima ovisi o primijenjenoj dozi, odnosno koncentraciji otopljenog ozona, kao i o pH-vrijednosti modelnih otopina.

Laboratorijskim pokusima trebalo je utvrditi optimalnu koncentraciju otopljenog ozona pri kojoj se postiže najučinkovitija razgradnja furosemida. Kako je ozon nestabilna molekula koja se spontano raspada tijekom otapanja u vodi, njegova koncentracija se naglo smanjuje ovisno o uvjetima otopine (temperatura, tlak, onečišćenja). Zbog toga je tijekom postupka ozoniranja, ozon bilo potrebno generirati u uređaju za generiranje ozona na licu mjesta, te ga neprestano uvoditi u reakcijsku smjesu, s ciljem da se njegova koncentracija tijekom odvijanja pokusa znatnije ne mijenja. Nakon završetka tretmana, preostali ozon u otopini se brzo raspada i gubi, što je jedan od glavnih razloga zašto se ozon smatrata ekološki prihvatljivom alternativom za ove vrste aplikacija. Nadalje, ovim načinom rada se izbjegavaju problemi vezani uz skladištenje i transport plinova. Budući da je proizvodnja ozona iz generatora za ozoniranje u praktičnoj primjeni obrade otpadnih voda i zraka energetski jako zahtjevna, poželjno je istražiti koje su to minimalne koncentracije ozona koje bi u što kraćem vremenskom periodu uspješno uklonile određeni farmaceutski spoj - furosemid. Također, svrha ovog rada bila je istražiti kako pH-vrijednost otopine utječe na kinetiku razgradnje furosemida. Zbog lakše usporedbe, istraživanje

utjecaja različitih pH-vrijednosti otopina na učinkovitost uklanjanja furosemda provodilo se pri jednoj dozi ozona, s kojom se postiže idealna krivulja razgradnje u reakcijskom vremenu od 10 minuta tretmana ozonom. Rezultati su prikazani grafički na Slikama 9-11, pri čemu se na x osi nalaze reakcijska vremena u sekundama, a na y osi prikazan je omjer otopljenih koncentracija furosemda u vremenu t (C) i na početku pokusa, tj. u vremenu $t=0$ (C_0).

Istraživanje je započeto u fosfatnom puferu pri neutralnoj pH-vrijednosti otopine (pH 7), s ciljem određivanja koncentracije otopljenog ozona pri kojoj se na grafu može jasno uočiti idealna krivulja razgradnje furosemda tijekom izuzimanja svih alikvota uzoraka iz otopine tijekom 10 minuta tretmana ozonom. Temperatura otopine pri kojoj su se provodili pokusi iznosila je 23 °C. Ovi pokusi provedeni su kod tri različite doze ozona - 0,02 mg L⁻¹, 0,05 mg L⁻¹ i 0,1 mg L⁻¹, a rezultati istraživanja prikazani su na Slici 9.



Slika 9. Razgradnja furosemda ozonom tijekom 10 min tretmana u fosfatnom puferu pri pH 7 i kod 3 različite koncentracije otopljenog ozona (0,02 mg L⁻¹, 0,05 mg L⁻¹ i 0,1 mg L⁻¹)

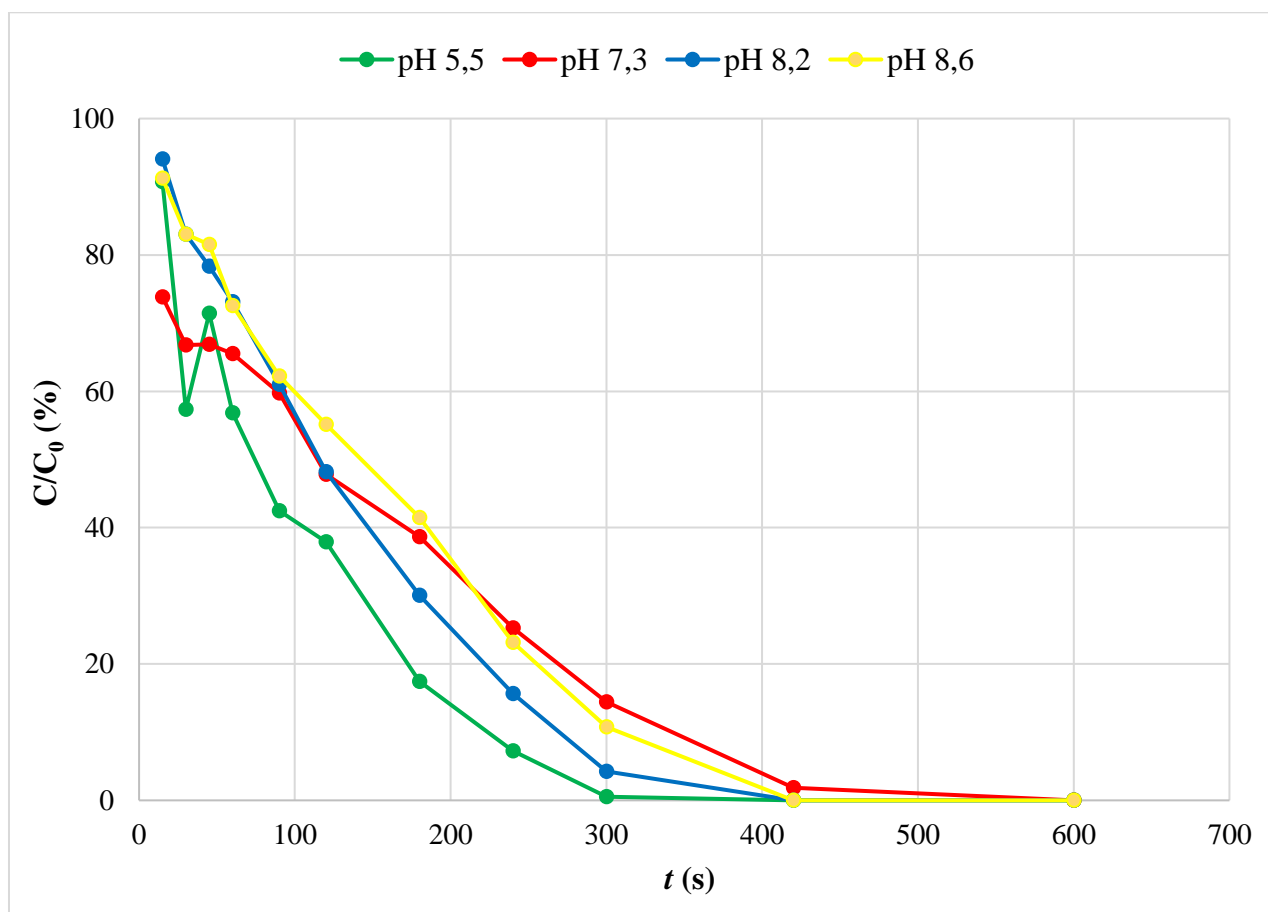
Iz navedenih rezultata zaključuje se da se najučinkovitija razgradnja postiže kod koncentracije otopljenog ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$. Izmjerena doza ozona iznosila je $0,106 \text{ mg L}^{-1}$, za što je bilo potrebno namjestiti snagu generatora ozona na 55%. Već nakon 30 s tretmana ozonom, uklonjeno je 56% furosemida, a nakon 2 min ozoniranja uklonjeno je 97% furosemida iz otopine. Najmanja primijenjena koncentracija otopljenog ozona od $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ nije se pokazala dovoljno uspješnom za razgradnju i uklanjanje furosemida u promatranom reakcijskom vremenu. Sa snagom generatora od 42%, postignuta je doza ozona od $0,019 \text{ mg L}^{-1}$, kod koje se nakon punih 10 min tretmana uklonilo svega 44% furosemida iz modelne otopine. Koncentracija otopljenog ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, pokazala se kao optimalna doza ozona pri kojoj se uočava idealna krivulja razgradnje furosemida tijekom 10 min tretmana. Bitno je napomenuti da je izmjerena koncentracija ozona u otopini iznosila $0,059 \text{ mg L}^{-1}$ pri snazi generatora od 48%, što je nešto više od nominalne vrijednosti. U prvoj minuti tretmana zamijećena je sporija razgradnja spoja s učinkovitosti uklanjanja od 14%. Već nakon 3 min tretmana ozonom uklonjeno je 50% furosemida, a nakon 10 min tretmana postignuta je 100%-tna učinkovitost uklanjanja furosemida iz otopine. U ovom pokusu nije korištena doza ozona od $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ jer se pretpostavilo da će ona prebrzo razgraditi čitav furosemid. U Tablici 4 prikazane su izmjerene vrijednosti pH i ionske jakosti otopina prije početka tretmana i nakon završetka tretmana s 3 doze ozona ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,1 \text{ mg L}^{-1}$).

Tablica 4. Početne (X_0) i završne (X_1) vrijednosti pH te ionske jakosti ($\mu\text{S cm}^{-1}$) otopina pri 3 doze ozona ($0,02 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,1 \text{ mg L}^{-1}$)

Doze O ₃ →		0,02 mg L ⁻¹		0,05 mg L ⁻¹		0,1 mg L ⁻¹	
pH ₀	pH ₁	7,2	7,2	7,2	7,2	7,26	7,2
I ₀	I ₁	1500	1500	1650	1650	1480	1520

Premda je u ranijem radu (Adams i sur., 2002) utvrđeno da koncentracije ozona manje od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ mogu uspješno oksidirati farmaceutike u istraživanom vremenskom intervalu, iz naših rezultata za najnižu primijenjenu dozu ozona od $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ zaključujemo da to ipak nije slučaj, barem za furosemid. Tijekom 10 min tretmana, uspješno je oksidirano svega 44% furosemida. Međutim, već sljedeća viša primijenjena doza ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ pokazala se mnogo učinkovitija. Pri dozi ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, brzina oksidacije furosemida u fosfatnom puferu pri pH 7 je toliko velika da je već nakon 2 min i 20 s tretmana razgrađen čitav furosemid.

Nakon što se u prvim pokusima uspješno odredila najučinkovitija doza ozona za razgradnju furosemida pri istoj pH-vrijednosti otopina, u sljedećim eksperimentima istraženo je kako različite pH-vrijednosti modelne otopine utječu na reaktivnost i razgradnju molekule furosemida pri istoj koncentraciji otopljenog ozona. Za provođenje ovih pokusa odabrana je optimalna doza otopljenog ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$. Promjenom pH-vrijednosti otopine može se utjecati na brzinu ozonizacije discorajućih spojeva s obzirom na njihova svojstva. Za određivanje utjecaja pH-vrijednosti modelne otopine na ionsko stanje molekule furosemida i njegovu razgradnju tijekom ozoniranja, korišteni su fosfatni puferi nazivnih pH-vrijednosti 5, 7, 8 i 9. Na Slici 10, grafički su prikazani i rezultati analize razgradnje furosemida nakon tretmana provedenog pri 4 pH-vrijednosti otopina, uz istu dozu otopljenog ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$.



Slika 10. Razgradnja furosemida ozonom tijekom 10 min pri koncentraciji ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ pri 4 različite pH-vrijednosti modelnih uzoraka (5,5, 7,3, 8,2 i 8,6)

Iz prikazanih rezultata, vidljivo je da razgradnja furosemda ovisi o pH-vrijednosti otopine. Snaga generatora postavljena je na 48% i tijekom provođenja svih pokusa, srednja vrijednost izmjerenih koncentracija otopljenog ozona iznosila je $0,055 \text{ mg L}^{-1}$. Temperatura otopine iznosila je $23 \text{ }^\circ\text{C}$. S obzirom da furosemid ima dvije vrijednosti pK_a : $pK_{a1}=3,8$ (karboksilna skupina) i $pK_{a2}=7,5$ (sulfonamidna skupina), u pH intervalu od 5 do 9 očekivala se različita brzina razgradnje. U našem pokusu, najbrža razgradnja furosemda postignuta je pri nazivnom pH 5, dok je izmjereni pH (pH_i) iznosio 5,5 i nije se previše mijenjao tijekom tretmana. Nakon 1 min i 30 s tretmana razgrađeno je 58% furosemda, a nakon 5 min tretmana postignuta je 99%-tna učinkovitost uklanjanja. Pri nazivnoj neutralnoj pH-vrijednosti otopine, izmjerena je početna vrijednost pH od 7,3. Nakon 2 min tretmana ozonom razgrađeno je 52% furosemda, a nakon 7 min tretmana postignuta je 98%-tna učinkovitost uklanjanja furosemda. Rezultati razgradnje furosemda pri pH 8 i 9 su jako slični (Slika 11). Kod oba pH, nakon 1 min tretmana ozonom, postignuta je 40%-tna učinkovitost razgradnje furosemda, a nakon 7 min tretmana uklonjeno je 100% furosemda iz modelnih otopina. Treba napomenuti da su izmjerene početne vrijednosti kod nazivnih pH-vrijednosti bile $pH_i = 8,2$ za pH 8 i $pH_i = 8,6$ za pH 9. Iz prikazanih krivulja razgradnje na Slici 11, uočavamo da se rezultati uklanjanja furosemda za dozu ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ pri vrijednosti otopina pH 7, 8 i 9 uglavnom poklapaju te pokazuju sličnu djelotvornost uklanjanja. Također, utvrđena je i najbrža razgradnja furosemda u slabo kiselom mediju (pH 5,5). U Tablici 5 prikazane su početne i konačne vrijednosti pH i ionske jakosti otopina izmjerene prije i nakon provođenja pokusa ozoniranja pri istoj dozi ozona ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$).

Tablica 5. Početne i završne vrijednosti pH te ionske jakosti ($\mu\text{S cm}^{-1}$) otopina pri 4 nazivne pH vrijednosti i pri koncentraciji otopljenog ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$

Nazivni pH		5		7		8		9	
Početni pH	Završni pH	5,5	5,35	7,3	7,24	8,26	8,23	8,64	8,56
I_0	I_1	1065	1617	1344	1805	1322	1842	1360	1925

Aktivnost većine lijekova, odnosno njihovo ionizacijsko stanje, ovisi o pH-vrijednosti medija i konstanti disocijacije (pK_a). Budući da je furosemid slaba kiselina s funkcionalnom skupinom karboksilne kiseline ($pK_{a1}=3,8$), njegova topljivost u vodi se povećava prema neutralnoj i slabo lužnatoj pH vrijednosti otopine u vrijednostima od $0,18 \text{ mg mL}^{-1}$ (pH 2,3) do

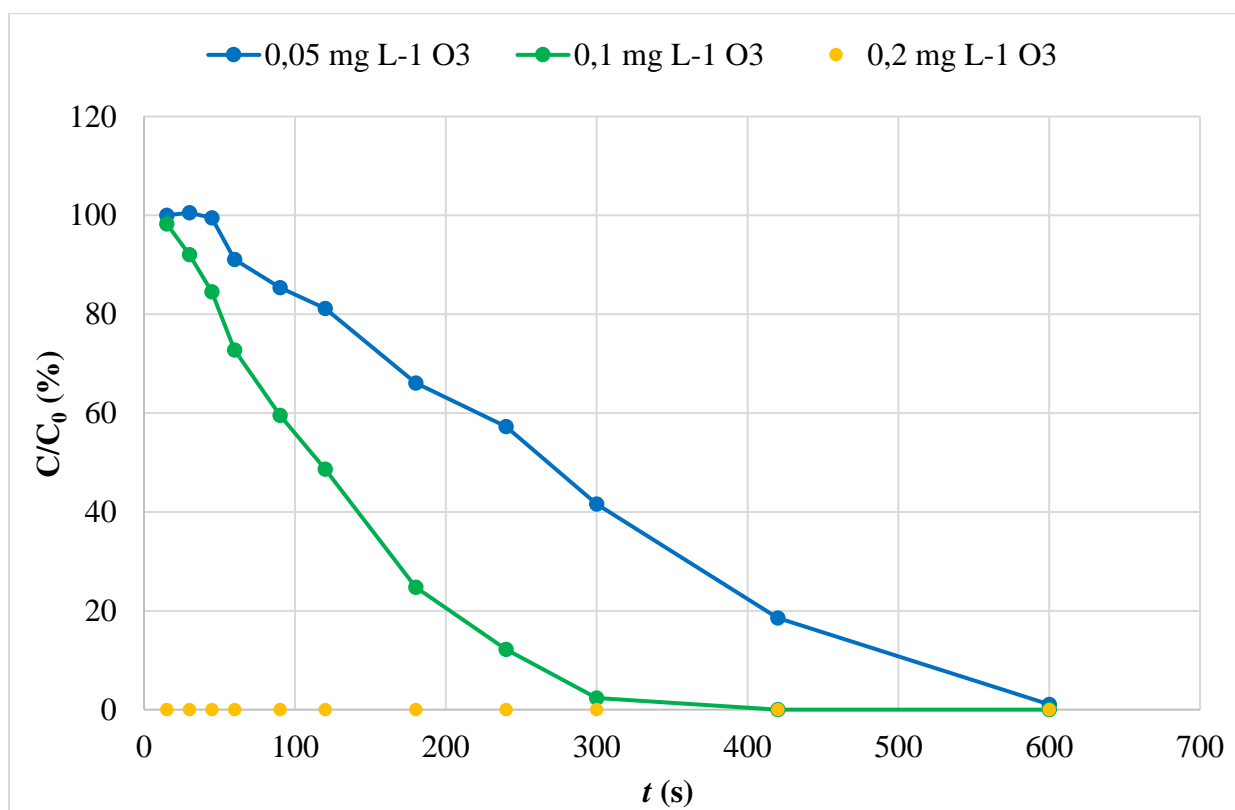
13,36 mg mL⁻¹ (pH 10) (Devarakonda, 2007). Prema tome, iz ovog rada, može se zaključiti da se pri neutralnim i blago lužnatim pH-vrijednostima otopine, furosemid dobro otapa i uklanja. Pri pH-vrijednostima otopina u rasponu od 7 do 9 te pri dozi ozona od 0,05 mg L⁻¹ u vremenu od 7 minuta tretmana ozonom, uočena je jako dobra učinkovitost razgradnje i uklanjanja furosemida ozonom. Nadalje, kako je furosemid slabo topljivi derivat karboksilne kiseline, kada bi se našao u jako kiselom mediju, došlo bi do stvaranja netopljivog taloga, kojeg je puno teže razgraditi (Neil i sur., 1984). Na temelju navedenog može se zaključiti da je razgradnja furosemida najbolja u slabo lužnatom području zbog njegove dvije *pKa* vrijednosti (*pKa*₁=3,8 i *pKa*₂=7,5). Međutim, to se iz rezultata ne može u potpunosti potvrditi, budući da je razgradnja pri blago kiselim uvjetima otopine (pH=5,5) nešto brža nego pri višim pH-vrijednostima, što je pomalo iznenađujuće, s obzirom da anionske vrste mogu biti i za jedan red veličine reaktivnije u odnosu na njihove neutralne forme (Huber i sur., 2005). Razgradnja furosemida pri neutralnom pH pokazuje dobru učinkovitost, ali je u usporedbi s ostalim vrijednostima pH otopina nešto lošija. Međutim, radi se o malim razlikama koje se mogu objasniti nepreciznostima u radu ili mjerenju. Zaključno se može reći da u uobičajenom rasponu pH-vrijednosti otpadne vode, nema većih razlika u učinkovitosti razgradnje furosemida ozonom, dok je kod slabo kiselih pH-vrijednosti razgradnja nešto brža. Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se utvrdio razlog za ovakav rezultat, tj. kako bi se odredio točan mehanizam reakcije furosemida s ozonom.

Za posljednji pokus bilo je potrebno provjeriti djelotvornost tretmana ozonom za razgradnju furosemida u realnoj matrici, odnosno u otpadnoj vodi, koja je prethodno obrađena primarnom (mehaničkom) i sekundarnom (biološkom) metodom. Također, ovim pokusom se željela potvrditi učinkovitost postupka ozoniranja kao tercijarne metode u obradi otpadnih voda za uklanjanje kemijski stabilnih zagađivala (furosemida), koja se inače slabo uklanjaju iz sekundarnog efluenta u uređajima za pročišćavanje vode. Na primjer, u istraživanju (Rosal i sur., 2010) na sekundarnom efluentu koji je sadržavao 84 različita zagađivala (farmaceutici, proizvodi osobne njege, metaboliti), potvrđena je visoka učinkovitost uklanjanja većine ovih spojeva s ozonom. Sekundarni efluent je preuzet iz Centralnog uređaja za pročišćavanje otpadne vode u Zagrebu (CUPOVZ, 2018). U Tablici 6 prikazani su sljedeći parametri otpadne vode: TSS - ukupna suspendirana tvar, KPK - kemijska potrošnja kisika, BPK₅ - biološka potrošnja kisika. Osim podataka za obrađenu otpadnu vodu (sekundarni efluent), prikazani su podaci za neobrađenu otpadnu vodu (influent), i to za nefiltrirani influent te za influent koji je

filtriran kroz filter papir, promjera pora 0,45 μm . Rezultati razgradnje furosemida u uzorku sekundarnog efluenta pri 3 doze ozona prikazani su na Slici 11.

Tablica 6. Karakteristike otpadne vode (CUPOV, 2018)

Parametar	Influent (nefiltriran)	Influent (filtriran)	Sekundarni efluent
TSS (mg L^{-1})	68	0	3,6
KPK (mg O_2^{-1})	171	75,3	20,9
BPK ₅ (mg O_2^{-1})	120	38	2



Slika 11. Razgradnja furosemida ozonom tijekom 10 min u sekundarnom efluentu pri 3 različite koncentracije ozona ($0,05 \text{ mg L}^{-1}$, $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,2 \text{ mg L}^{-1}$)

Za pokus u otpadnoj vodi (sekundarnom efluentu) bilo je potrebno prilagoditi doze ozona jer se zbog kompleksnog karaktera otpadne vode koja je opterećena organskom tvari, očekivala veća interakcija između ozona i zagađivala u vodi. Zato se očekuje duže vrijeme

trajanja samog procesa i povećava potrošnja ozona koji bi inače nesmetano reagirao s željenim spojem (furosemidom). Umjesto najniže doze ozona iz prethodnih pokusa od 0,02 mg L⁻¹, odabrana je nova najveća doza ozona od 0,2 mg L⁻¹, a ostale dvije doze ozona bile su iste (0,05 mg L⁻¹ i 0,1 mg L⁻¹ O₃). Snagom generatora od 48%, postignuta je doza ozona od 0,055 mg L⁻¹, koja je pokazala dobru razgradnju furosemida tijekom 10 minuta tretmana ozonom. Naime, primijećena je nešto sporija razgradnja furosemida tijekom prvih par minuta tretmana ozonom nego u prijašnjim pokusima. Pretpostavka je da u tom razdoblju dolazi do intenzivne reakcije ozona s organskim sastojcima otpadne vode, što usporava razgradnju furosemida. Nakon 5 min tretmana postignuta je 58%-tna razgradnja furosemida, a nakon 10 minuta tretmana uklonjeno je 99% furosemida iz uzorka sekundarnog efluenta. Koncentracija otopljenog ozona od 0,115 mg L⁻¹, postignuta je pri snazi generatora od 52%. Nakon 2 min tretmana ozonom uklonjeno je 50% furosemida iz modelne otopine, a nakon 5 min tretmana uklonjeno je 98% spoja. Najveća primijenjena doza ozona od 0,2 mg L⁻¹ je ipak bila previsoka, jer se čitavi furosemid razgradio već unutar 15 sekundi postupka ozoniranja. U usporedbi s pokusima u demineraliziranoj vodi, očekivala se znatno sporija razgradnja furosemida, ali iz rezultata se uočava tek malo sporija razgradnja spoja pri dozi ozona od 0,05 mg L⁻¹, što se podudara s podacima o malom organskom opterećenju otpadne vode (Tablica 6). Iz navedenih rezultata možemo zaključiti da su koncentracije primijenjenog ozona od 0,05 i 0,1 mg L⁻¹ dovoljno visoke da mogu brzo i učinkovito ukloniti furosemid. U Tablici 7 prikazane su izmjerene vrijednosti početnih i završnih pH i provodljivosti modelnih uzoraka sekundarnog efluenta kod 3 doze ozona.

Tablica 7. Početne i završne vrijednosti ionske jakosti i pH otopina sekundarnog efluenta pri 3 doze ozona od 0,05, 0,1 i 0,2 mg L⁻¹

Doza O ₃ →		0,05 mg L ⁻¹		0,1 mg L ⁻¹		0,2 mg L ⁻¹	
pH ₀	pH ₁	7,23	8,83	8,77	8,8	8,75	8,75
I ₀	I ₁	690	678	800	788	810	798

Za proučavanje odvijanja kemijskih reakcija potrebno je poznavati mehanizam reakcija, ali i kemijska svojstva reaktanata o kojima će ovisiti brzina i ravnoteža kemijske reakcije. Prema zakonu prijenosa mase, brzina kemijske reakcije je mjera promjene koncentracije reaktanta ili produkta u jedinici vremena. Dakle, ako poznajemo reaktante i njihove koncentracije prilikom odvijanja kemijske reakcije, možemo odrediti red reakcije i izračunati koeficijent brzine reakcije. Određivanje ovih kinetičkih parametara omogućava bolje

razumijevanje procesa ozoniranja, što je važno i prilikom primjene ove napredne oksidacijske metode za uklanjanje lijekova iz otpadnih voda. Većina reakcija ozoniranja spada u reakcije drugog reda, što znači da brzina reakcije ovisi o koncentraciji dvaju reaktanata - ozona i spoja koji se ozoniranjem razgrađuje. Na primjer, u radu (Huber i sur., 2003) se određivala kinetika reakcija drugog reda za reakcije između određenih farmaceutika i ozona, da bi se procijenila njihova razgradnja tijekom procesa ozoniranja i AOPs. Za 5 lijekova pri neutralnoj pH-vrijednosti otopine, konstante reakcija s ozonom bile su veće od $5 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, što upućuje na potpunu razgradnju ovih spojeva. Također, određivale su se i konstante brzine reakcija s OH^\bullet , koje su bile skoro dva do tri puta veće ($3,3\text{-}9,8 \times 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$).

Međutim, u ovom radu, ozon se neprestano uvodio u reakcijsku smjesu, što znači da se njegova koncentracija tijekom odvijanja pokusa nije znatnije mijenjala. U takvim slučajevima, kad je koncentracija jednog reaktanta približno konstantna, reakcije drugog reda, pa tako i ozoniranje, mogu se dobro opisati kinetičkim parametrima koji vrijede za reakcije prvog reda, kod kojih brzina odvijanja kemijske reakcije ovisi samo o koncentraciji drugog reaktanta, u ovom slučaju furosevida. Takve se reakcije nazivaju reakcijama pseudo-prvog reda. Za izračunavanje kinetike takvih reakcija korišten je nelinearizirani (4), te linearni (5) oblik jednadžbe koji vrijedi za reakcije prvog reda:

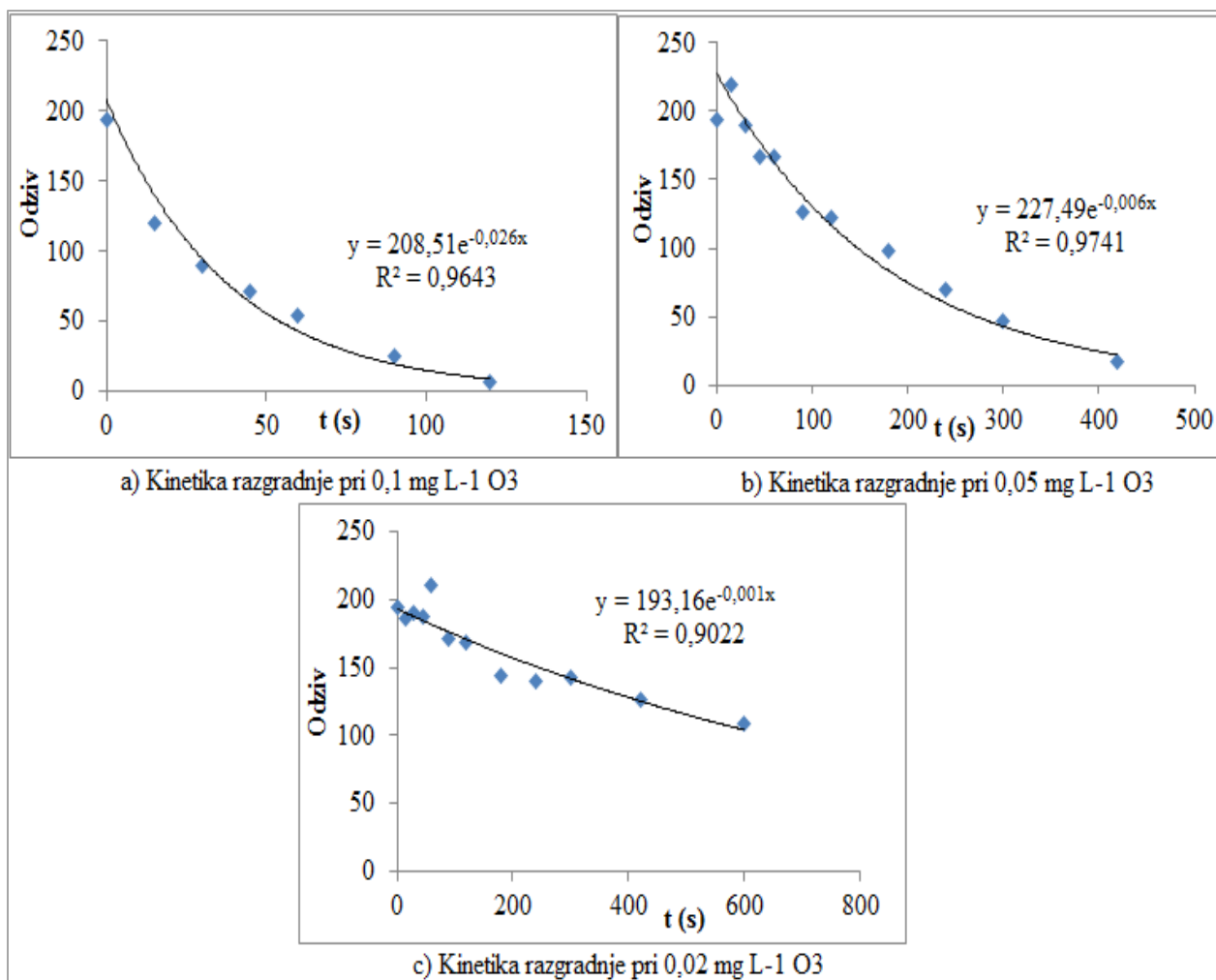
$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \quad (4)$$

$$\ln ([A] / [A]_0) = - kt \quad (5)$$

gdje je $[A]$ koncentracija furosevida u otopini u nekom vremenu tretmana, $[A]_0$ je početna koncentracija furosevida u otopini, t je vrijeme tretmana, a k je konstanta brzine reakcije koju je potrebno izračunati da bismo odredili kinetiku reakcije. Još jedan parametar koji služi za bolje razumijevanje kinetike reakcija je vrijeme potrebno da se koncentracija reaktanta smanji na polovicu svoje početne vrijednosti. Ta vrijednost naziva se "vrijeme polureakcije" ili "vrijeme poluživota" i označava se $t_{1/2}$, a za određivanje ovih vrijednosti za reakcije prvog reda, korištena je sljedeća jednadžba (6):

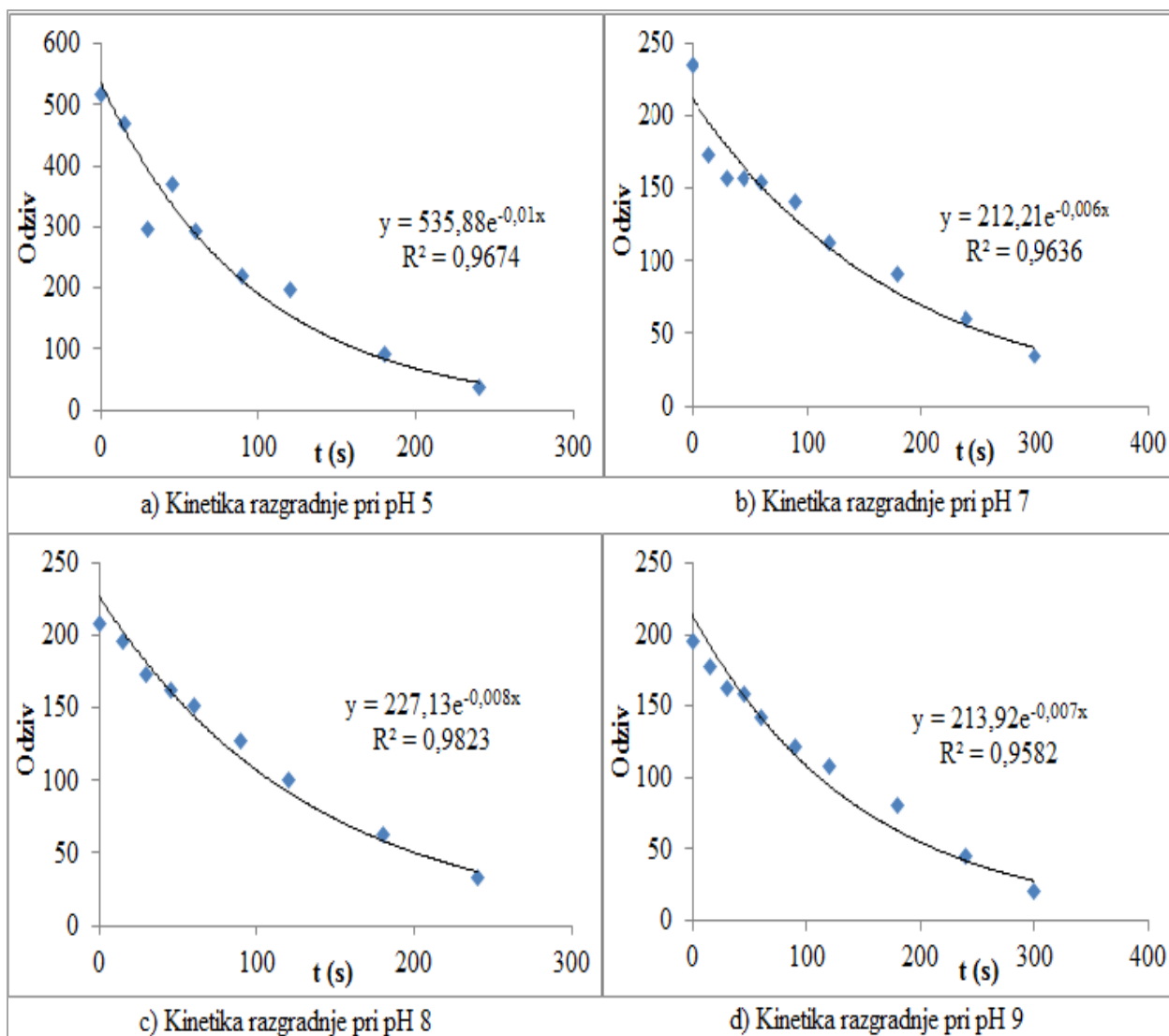
$$t_{1/2} = \frac{0,693}{k} \quad (6)$$

Kinetika razgradnje furosevida u uzorcima fosfatnog pufera pH 7 pri 3 doze ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,02 \text{ mg L}^{-1}$ prikazana je na Slici 12, pri čemu je odziv instrumenta prikazan na y osi izravno proporcionalan koncentraciji furosevida u otopini.



Slika 12. Kinetika razgradnje furosemida tijekom 10 min tretmana pri pH 7 i pri 3 koncentracije ozona (0,1 mg L⁻¹, 0,05 mg L⁻¹ i 0,02 mg L⁻¹)

Konstanta brzine reakcije razgradnje furosemida u fosfatnom puferu pri neutralnoj pH vrijednosti i pri koncentraciji ozona od 0,1 mg L⁻¹, koja najučinkovitije uklanja furosemid, iznosi $k = 2,63 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$. Furosemid je vrlo brzo uklonjen te je vrijeme koje je bilo potrebno da se razgradi polovina početne koncentracije furosemida u otopini iznosilo 26 sekundi. Konstanta brzine reakcije razgradnje furosemida pri optimalnoj koncentraciji otopljenog ozona od 0,05 mg L⁻¹ bila je $k = 5,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, a vrijeme poluživota furosemida u otopini $t_{1/2} = 124 \text{ s}$. Konstanta reakcije za najnižu koncentraciju ozona od 0,02 mg L⁻¹, pri kojoj ni nakon 10 min tretmana nije došlo do uspješne razgradnje furosemida, iznosila je $1 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, s vremenom poluživota $t_{1/2} = 693 \text{ s}$.

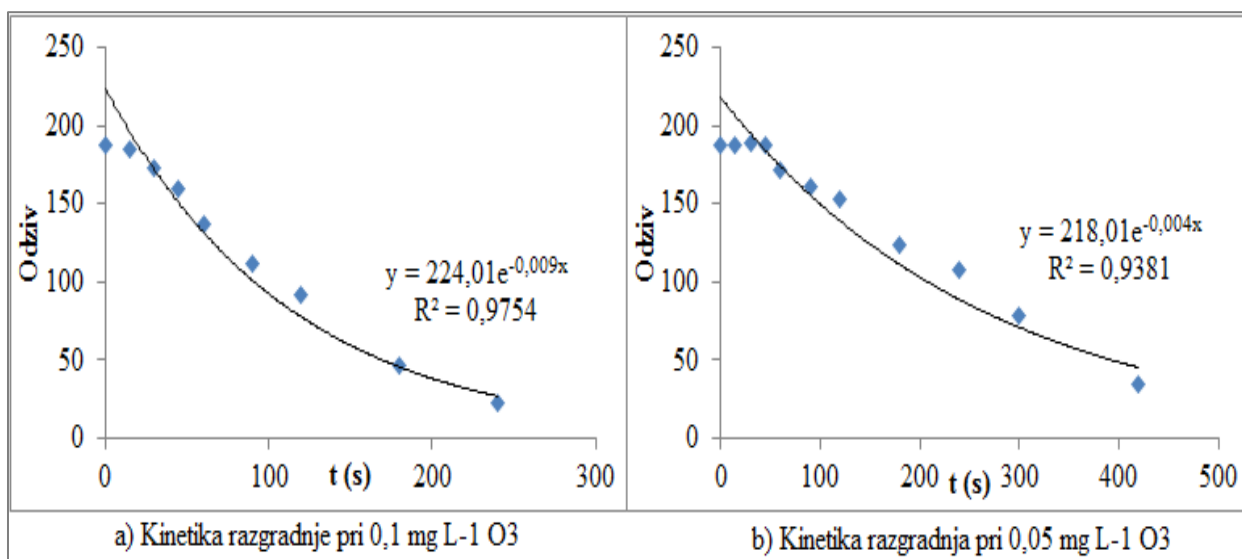


Slika 13. Kinetika razgradnje furosemida ozonom tijekom 10 minuta tretmana u fosfatnim puferima pri 4 pH vrijednosti (5, 7, 8 i 9) i pri koncentraciji ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$

U pokusima koji su provedeni pri različitim pH-vrijednostima modelnih otopina (5, 7, 8 i 9), pri koncentraciji otopljenog ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$, također je proučavana kinetika razgradnje furosemida i utvrđeno je da i ona prati kinetiku reakcija pseudo-prvog reda. Navedene pH-vrijednosti su nazivne, a stvarne izmjerene (pH_i) vrijednosti su u manjoj mjeri odstupale od nazivnih. Pri pH-vrijednosti modelne otopine od 5 ($\text{pH}_i = 5,5$), konstanta brzine reakcije iznosila je $k = 1,03 \times 10^{-2} \text{ s}^{-1}$, a poluživot furosemida $t_{1/2} = 67 \text{ s}$. Konstanta reakcije za otopinu nazivnog pH 7 ($\text{pH}_i = 7,3$) odlično se slaže s vrijednostima dobivenim u prethodnom pokusu u demineraliziranoj vodi, $k = 5,6 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, kao i s vrijednosti poluživota furosemida $t_{1/2} = 124 \text{ s}$. Nadalje, izračunate konstante brzina reakcija za otopine nazivnih pH-vrijednosti 8 (pH_i

= 8,2) i 9 ($\text{pH}_i = 8,6$) su zbog bliskih izmjerenih pH-vrijednosti otopina također vrlo sličnih vrijednosti - k za otopinu nazivne pH-vrijednosti 8 iznosila je $7,5 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, a za otopinu nazivne pH-vrijednosti 9, određena je k od $6,8 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Vrijeme poluživota ($t_{1/2}$) za ove dvije pH-vrijednosti iznosilo je 92 s i 102 s.

Nakon istraživanja utjecaja pH-vrijednosti modelne otopine s demineraliziranom vodom i fosfatnim puferima, preostalo je još istražiti kinetiku razgradnje furosemida u uzorku realne matrice, odnosno u otpadnoj vodi. Kinetika razgradnje furosemida ozonom u sekundarnom efluentu, koji je prethodno obrađen biološkom metodom, pri čemu je uklonjena većina organske tvari, prikazana je grafički na Slici 14, pri 2 doze ozona ($0,1 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,05 \text{ mg L}^{-1}$).



Slika 14. Kinetika razgradnje furosemida ozonom tijekom 10 minuta tretmana u sekundarnom efluentu pri koncentracijama ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,05 \text{ mg L}^{-1}$

Kod pokusa provedenih u realnoj matrici, odnosno u otpadnoj vodi koja je obrađena u uređaju za pročišćavanje otpadnih voda (CUPOVZ), pri koncentracijama ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ i $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, reakcije razgradnje furosemida također prate kinetiku pseudo-prvog reda. Pri koncentraciji otopljenog ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, konstanta brzine reakcije iznosi $k = 8,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$. Poluživot furosemida u otopini iznosio je $t_{1/2} = 78 \text{ s}$. Konstanta brzine reakcije razgradnje furosemida pri dozi ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ iznosila je $k = 3,7 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, a poluživot furosemida u otopini bio je $t_{1/2} = 187 \text{ s}$. Kinetiku razgradnje furosemida pri najvećoj dozi ozona od $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ nije bilo moguće odrediti zbog prebrze razgradnje furosemida koja se odvila već unutar prvih nekoliko sekundi od početka tretmana ozonom.

Osim praćenja razgradnje izvornog spoja (furosemida), analizatori masa visoke rezolucije, poput TOF analizatora, omogućuju i tentativnu identifikaciju transformacijskih (razgradnih) produkata koji nastaju procesom ozoniranja. Kako određeni transformacijski produkti koji se detektiraju u okolišu mogu biti još toksičniji od izvornog spoja (Li i sur., 2008), potrebno je bilo provesti dodatne analize za njihovu identifikaciju. Međutim, u kromatogramima alikvota modelnih uzoraka nisu uočeni nikakvi dodatni pikovi koji bi se mogli povezati s transformacijskim produktima furosemida. Jedno od mogućih objašnjenja izostanka takvih pikova je slabija ionizacija nastalih produkata, što može biti povezano s nedostatkom odgovarajućih funkcionalnih skupina koje se lako ioniziraju, a koje su možda uklonjene (ili transformirane) prilikom procesa ozoniranja. Kako bi se ipak pokušali identificirati barem neki transformacijski proizvodi, alikvoti modelnih uzoraka furosemida pripremljenih u puferima, preostali nakon ozoniranja (tj. nakon izuzimanja posljednjeg alikvota), dodatno su obrađeni ekstrakcijom na čvrstoj fazi. Ovom su metodom iz alikvota volumena 100 mL dobiveni ekstrakti volumena 1 mL, što znači da je faktor koncentriranja iznosio 100. Koncentriranjem uzorka povećava se osjetljivost te, posljedično, mogućnost identifikacije transformacijskih produkata prisutnih u modelnim otopinama nakon ozoniranja, posebno onih koji se ne mogu detektirati u originalnim alikvotima uzoraka zbog niskih koncentracija i/ili slabije učinkovitosti ionizacije. Međutim, čak i u ekstraktima dobivenim prethodno opisanim postupkom koncentriranja, nisu uočeni dodatni pikovi koji bi mogli odgovarati razgradnim produktima furosemida te se može zaključiti da je za njihovu eventualnu identifikaciju potrebno provesti dodatna istraživanja.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju rezultata prikazanih u ovom radu, može se zaključiti:

1. Tretman ozonom učinkovito uklanja furosemid iz modelnih otopina različitih pH-vrijednosti i iz otpadne vode obrađene biološkom metodom (sekundarnog efluenta).
2. Koncentracija primijenjenog ozona značajno utječe na razgradnju furosemida iz modelnih otopina. Pri dozi ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ učinkovito je uklonjen furosemid iz modelne otopine tijekom 10 minuta tretmana ozonom te je ona uzeta kao optimalna. Najučinkovitija doza ozona za uklanjanje furosemida iz modelne otopine (fosfatnog pufera) pri pH 7 bila je $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, pri čemu je već nakon 2 minute tretmana uklonjeno više od 97% furosemida.
3. Razgradnja furosemida ozonom iz modelne otopine ovisna je o pH-vrijednosti otopine. Najpogodnija pH-vrijednost otopine za razgradnju furosemida bio je pH = 5, što se može objasniti većom reaktivnosti furosemida pri nižim pH-vrijednostima otopine. S druge strane, nema većih razlika u brzini razgradnje kod uobičajenih pH-vrijednosti otpadne vode, što je važno prilikom praktične primjene ozoniranja u obradi otpadnih voda.
4. Pri ozoniranju furosemida u realnoj matrici (obrađenoj otpadnoj vodi), pri dozi ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ razgrađeno je 99% furosemida tijekom 10 minuta tretmana, a pri dozi ozona od $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ razgrađeno je 98% spoja tijekom 5 minuta. Zbog kompleksnog sastava otpadne vode i interakcijama između organskih spojeva otpadne vode i ozona, pri dozi ozona od $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ u početnim fazama postupka ozoniranja uočena je usporena razgradnja. Nadalje, ozoniranjem sekundarnog efluenta pri dozi ozona od $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ furosemid je uklonjen unutar nekoliko sekundi.
5. Kinetika razgradnje furosemida odgovarala je reakcijama pseudo-prvog reda te su povećanjem koncentracije ozona rasle i konstante brzine reakcija, kao i razgradnja furosemida iz modelnih otopina.
6. U ovom radu nije bilo moguće identificirati transformacijske (razgradne) produkte ozoniranja furosemida, čak niti nakon postupka koncentriranja modelnog uzorka preostalog nakon završetka procesa ozoniranja.

6. LITERATURA

Adams, C., Wang, Y., Loftin, K. i Meyer, M. (2002) Removal of Antibiotics from Surface and Distilled Water in Conventional Water Treatment Processes. *J. Environ. Eng.* **128**, 3.

Al-Odaini, N. A., Zakaria, M. P., Yaziz, M. I., Surif, S. i Abdulghani, M. (2013) The occurrence of human pharmaceuticals in wastewater effluents and surface water of Langat River and its tributaries, Malaysia. *Int. J. Environ. An. Ch.* **93**, 245-264.

Batt, A. L., Kostich, M. S. i Lazorchak, J. M. (2008) Analysis of ecologically relevant pharmaceuticals in wastewater and surface water using selective solid-phase extraction and UPLC-MS/MS. *Anal. Chem.* **80**, 5021–5030.

Beltran, F. J. (2004) Ozone reaction kinetics for water and wastewater systems. CRC, Boca Raton, Florida.

Benotti, M. J., Stanford, B. D., Wert, E. C., Snyder, S. A. (2009) Evaluation of a photocatalytic reactor membrane pilot system for the removal of pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds from water. *Water Res.* **43**, 1513-1522.

Bolong, N., Ismail, A. F., Salim, M. R., Matsuura, T. (2009) A review of the effects of emerging contaminants in wastewater and options for their removal. *Desalination.* **238**, 229-246.

Calamari, D., Zuccato, E., Castiglioni, S., Bagnati, R. i Fanelli, R. (2003) Strategic Survey of Therapeutic Drugs in the Rivers Po and Lambro in Northern Italy. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 1241–1248.

Camel, V. i Bermond, A. (1998) The use of ozone and associated oxidation processes in drinking water treatment. *Water Res.* **32**, 3280-3222.

Cunningham, V. L., Buzby, M., Hutchinson, T., Mastrocco, F., Parke, N., Roden, N. (2006) Effects of human pharmaceuticals on aquatic life: next steps. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 3456–3462.

Carballa, M., Omil, F., Lema, J. M. (2005) Removal of cosmetic ingredients and pharmaceuticals in sewage primary treatment. *Water Res.* **39**, 4790–4796.

- Castiglioni, S., Bagnati, R., Calamari, D., Fanelli, F i Zuccato, E. (2005) A multiresidue analytical method using solid-phase extraction and high-pressure liquid chromatography tandem mass spectrometry to measure pharmaceuticals of different therapeutic classes in urban wastewaters. *J. Chromatogr. A.* **1092**, 206–215.
- Castaglioni, S., Bagnat, R., Fanelli, R., Pomati, F., Calamari, D. i Zuccato, R. (2006) Removal of Pharmaceuticals in Sewage Treatment Plants in Italy. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 357-363.
- Chen, Y., Vymazal, J., Březinová, T., Koželuh, M., Kule, L., Huang, J., Chen, Z. (2016) Occurrence, removal and environmental risk assessment of pharmaceuticals and personal care products in rural wastewater treatment wetlands. *Sci. Total Environ.* **556**, 1660-1669.
- Danckwerts, P. V. (1951) Significance of liquid film coefficients in gas absorption. *Ind. Eng. Chem.* **43**, 1460–1466.
- Daughton, C. G., Ternes, T. A. (1999) Pharmaceuticals and personal care products in the environment: Agents of subtle change. *Environ. Health Perspect.* **107**, 907–938.
- Devarakonda, B., Otto, D. P., Judefeind, A., Hill, R. A., de Villiers, M. M. (2007) Effect of pH on the solubility and release of furosemide from polyamidoamine (PAMAM) dendrimer complexes. *Int. J. Pharmaco.* **345**, 142-153.
- Diem, K. i Lentner, C. (1970) Documenta Geigy Scientific Tables. JR Geigy, SA Basle, Switzerland.
- Erikson, R. E., Andrulis, P. J., Collins, J. C., Lungle, M. L., Mercer, G. D. (1969) Mechanism of ozonation reactions. IV. Carbon-nitrogen double bonds, *J. Org. Chem.* **34**, 2961–2966.
- Esplugas, S., Bila, D. M., Krause, L. G. T., Dezotti, M. (2007) Ozonation and advanced oxidation technologies to remove endocrine disrupting chemicals (EDCs) and pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in water effluents. *J. Hazard. Mater.* **149**, 631-642.

- Feig, P. U. (1986) Cellular mechanism of action of loop diuretics: Implications for drug effectiveness and adverse effects. *Am. J. Cardiol.* **57**, 14-19.
- Ferrari, F., Gallipoli, A., Balderacchi, M., Ulaszewska, M. M., Capri, E. Trevisan, M. (2011) Exposure of the Main Italian River Basin to Pharmaceuticals. *Int. J. Toxicol.* **2011**, 6.
- Garoma, T., Umamaheshwar, S. K., Mumper, A. (2010) Removal of sulfadiazine, sulfamethizole, sulfamethoxazole, and sulfathiazole from aqueous solution by ozonation. *Chemosphere.* **79**, 814–820.
- Gillard, N., Detry, B., Robert, C., Nonet, S., Samou, Y., Moise, E., Bauwens, F. i Delahaut, P. (2013) Detection of pharmaceutical products in untreated hospital wastewater. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods.* **6**, 459–467.
- Glaze, W. H., Kang, J. W., and Chapin, D. H. (1987) The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation, *Ozone Sci. Eng.* **9**, 335–342.
- Gros, M., Petrović, M., Ginebreda, A., Bacelo, D. (2010) Removal of pharmaceuticals during wastewater treatment and environmental risk assessment using hazard indexes. *Environ. Int.* **36**, 15-26.
- Grahnén, A., Hammarlund, M., Lundqvist, T. (1984) Implications of intraindividual variability in bioavailability studies of furosemide. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* **27**, 595-602.
- HALMED (2018) Furosemid. HALMED-Agencija za lijekove i medicinske proizvode, < <http://www.halmed.hr/Lijekovi/Baza-lijekova/Fursemid-40-mg-tablete/11788/> >. Pristupljeno 10. travnja 2018.
- Halling-Sorensen, B., Nielsen, N. S., Lanzky, P. F., Ingerslev, F., Holten-Lutzhofl, H. C., Jorgensen, S. E. (1998) Occurrence, Fate and Effects of Pharmaceutical Substances in the Environment. *Evniron. Chem.* **36**, 357-393.
- Hernando, M. D., Petrovic, M., Radjenovic, J., Fernández-Alba A. R., Barceló, D. (2007) Removal of pharmaceuticals by advanced treatment technologies. U: Petrovic, M., Barceló, D. Analysis, fate and removal of pharmaceuticals in the water cycle. *Elsevier Science Ltd.*, Oxford, UK.

Hollender, J., Zimmermann, S. G., Koepke, S., Krauss, M., McArdell, C. S., Ort, C. H. (2009) Elimination of organic micropollutants in a municipal wastewater treatment plant upgraded with a full-scale post-ozonation followed by sand filtration. *Environmen. Sci. Techno.* **43**, 7862-7869.

Hoigné, J. (1998) Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes, U: The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 5, Part C, Quality and Treatment of Drinking Water II, in J. Hrubec, Ed., Springer-Verlag, Heidelberg, 83–141.

Huber, M., Canonica, S., Park, G. Y. i von Gunten, U. (2003) Oxidation of pharmaceuticals during ozonation and advanced oxidation processes. *Environ. Sci. Technol.* **37**, 1016-1024.

Huber, M. M., Gobel, A., Joss, A., Hermann, N., Löffler, D., McArdell, C. S. i von Gunten, U. (2005) Oxidation of Pharmaceuticals during Ozonation of Municipal Wastewater Effluents: A Pilot Study. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 4290-4299.

Ibanez, M., Gracia-Lor, E., Bijlsma, L., Morales, E., Pastor, L. i Hernandez, F. (2013) Removal of emerging contaminants in sewage water subjected to advanced oxidation with ozone. *J. Hazard. Mater.* **260**, 389-398.

Isidori, M., Nardelli, A., Parrella, A., Pascarella, L. i Previtera, L. (2005) A multispecies study to assess the toxic and genotoxic effect of pharmaceuticals: Furosemide and its photoproduct. *Chemosphere.* **63**, 785–793.

Isidori, M., Bellotta, M., Cangiano, M. i Parrella, A. (2009) Estrogenic activity of pharmaceuticals in the aquatic environment. *Environ. Int.* **35**, 826-829.

Joss, A., Keller, E., Alder, A. C., Gobel, A., McArdell, C. S., Ternes, T. i Siegrist, H. (2005) Removal of pharmaceuticals and fragrances in biological wastewater treatment. *Wat. Res.* **39**, 3139-3152.

Kasprzyk-Horderna, B., Dinsdale, R. M. i Guwy, A. J. (2008) The occurrence of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs in surface water in South Wales, UK. *Water Res.* **42**, 3498.

Kasprzyk-Hordern, B., Dinsdale, R. M., i Guwy, A. J. (2009). The removal of pharmaceuticals, personal care products, endocrine disruptors and illicit drugs

during wastewater treatment and its impact on the quality of receiving waters. *Water Res.* **43**, 363-380.

Khan, S. i Ongerth, J. E. (2004) Drug Residuals: How Xenobiotics can Affect Water Supply Sources. *J. Am. Water Works Assoc.* **96**, 94-101.

Klavarioti, M., Mantzavinos, D., Kassinos, D. (2009) Removal of residual pharmaceuticals from aqueous systems by advanced oxidation processes. *Environ. Int.* **35**, 402–417.

Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., Buxton, H. T. (2002) Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U.S. Streams, 1999-2000: A National Reconnaissance. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 1202-1211.

Kuczkowski, R. L. (1984) Ozone and carbonyl oxides, in 1,3 Dipolar Cycloaddition Chemistry. John Wiley & Sons, New York, 197–276.

Lacey, C., McMahon, G., Bones, J., Barron, L., Morrissey, A. i Tobin, J. M. (2008) An LC–MS method for the determination of pharmaceutical compounds in wastewater treatment plant influent and effluent samples. *Elsevier, Talanta.* **75**, 1089-1097.

Lacey, C., Basha, S., Morrissey, A. i Tobin, J. M. (2011) Occurrence of pharmaceutical compounds in wastewater process streams in Dublin, Ireland. *Environ. Monit. Assess* **184**, 1049–1062.

Langlais, B., Reckhow, D. A., Brink, D. R. (1991) Ozone in Water Treatment: Application and Engineering. *Lewis Publishers.* Chelsea.

Lewis, W. K., Whitman, W. G. (1924) Principles of gas absorption. *Ind. Eng. Chem.* **16**, 1215–1220.

Li, K., Yediler, A., Yang, M., Schulte-Hostede, S., Wong, M. H. (2008) Ozonation of oxytetracycline and toxicological assessment of its oxidation by-products. *Chemosphere.* **72**, 473–478.

Lindim, C., van Gils, J., Georgieva, D., Mekenyan, O. i Cousins, T. (2016) Evaluation of human pharmaceutical emissions and concentrations in Swedish river basins. *Sci. Total Environ.* **572**, 508–519.

Maren, T. H. (1976) Relations Between Structure and Biological Activity of Sulfonamides. *Annu. Rev. Pharmacol.* **16**, 309-327.

McDowell, D., Huber, M. M., Wagner, M., von Gunten, U., Ternes, T. A. (2005) Ozonation of carbamazepine in drinking water: identification and kinetic study of major oxidation products. *Environ. Sci. Technol.* **39**, 8014-8022.

NIH (2018) Furosemide. NIH-National Institutes of Health: Pubchem-open chemistry data base. <
<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/3440#section=Top>>. Pristupljeno 10. travnja 2018.

Nebel, C. (1981) Ozone. U: Kirk-Othmer: Encyclopedia of Chemical Technology, 3 izdanje. John Wiley & Sons, New York. 683–713.

Neil, J. M., Fell, A. F. i Smith, G. (1984) Evaluation of the stability of frusemide in intravenous infusions by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Int. J. Pharm.* **22**, 105-126.

Odlind, B. (1979) Relationship between tubular secretion of furosemide and its saluretic effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **208**, 515-521.

Okpala, C. O. R., Bonoa, G., Abdulkadirb, A. i Madumelub, C. U. (2015) Ozone (O₃) Process Technology (OPT): An Exploratory Brief of Minimal Ozone Discharge applied to Shrimp Product. *Energy Procedia.* **75**, 2427–2435.

Ongerth, J. E. i Khan, S. (2004) Drug Residuals: How xenobiotics can affect water supply sources. *J. Am. Water Works Assoc.* **96**, 5.

Papageorgiou, M., Kosma, C., Lambropoulou, D. (2016) Seasonal occurrence, removal, mass loading and environmental risk assessment of 55 pharmaceuticals and personal care products in a municipal wastewater treatment plant in Central Greece. *Sci. Total Environ.* **543**, 547–569.

Paskareva, P., Graham, N. J. D. (2002) Ozonation of Municipal Wastewater Effluents. *Water Environ. Res.* **74**, 569-581.

Petrović, M., Sole, M., Lopez de Alda, M., Barcelo D. (2002) Endocrine disruptors in sewage treatment plants, receiving river waters, and sediments: Integration of

chemical analysis and biological effects on feral carp. *Environ. Toxicol. Chem.* **21**, 2146.

Petrović, M., de Alda, M. J. L., Diaz-Cruz, S., Postigo, C., Rađenović, J., Gros, M., Barcelo, D. (2009) Fate and removal of pharmaceuticals and illicit drugs in conventional and membrane bioreactor wastewater treatment plants and by riverbank filtration. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* **367**, 3979-4003.

Pojana, G., Fantinati, A., Marcomini, A. (2011) Occurrence of environmentally relevant pharmaceuticals in Italian drinking water treatment plants. *Int. J. Environ. An. Ch.* **91**, 537-552.

Ponto, L. L. B., Schoenwald, R. D. (1990) Furosemide (Frusemide) *Clin. Pharmacokinet.* **18**, 460-471.

Rađenović, J., Petrović, M., Barcelo, D. (2007) Analysis of pharmaceuticals in wastewater and removal using a membrane bioreactor. *Anal. Bioanal. Chem.* **387**, 1365–77.

Rey, R. P., Padrón, A. S., León, L. G., Pozo, M. M. i Baluja, C. (2008) Ozonation of Cytostatics in Water Medium. Nitrogen Bases. *Ozone-Sci. Eng.* **21**, 69-77.

Riebel, A. H., Erikson, R. E., Abshire, C. J., Bailey, P. S. (1960) Ozonation of carbon-nitrogen bonds. I. Nucleophilic attack of ozone. *J. Am. Chem. Soc.* **82**, 1801–1807.

Rosal, R., Rodriguez, A., Perdigon-Melon, J. A., Petre, A., Garcia-Calvo, E., Gomez, M. J., Aguera, A., Fernandez-Alba, A. R. (2010) Occurrence of emerging pollutants in urban wastewater and their removal through biological treatment followed by ozonation. *Water Res.* **44**, 578–588.

Sadezky, A., Löffler, D. i Ternes, T., (2008) Deliverable 1.2: proposal of an environmental indicator and classification system of pharmaceutical product residues for environmental management. Knowledge and need assessment on pharmaceutical products in environmental waters (KNAPPE), European Commission, Brussels, Belgium, 92 pp.

- Senta, I. (2009) Occurrence and Behaviour of Sulfonamides, Fluoroquinolones, Macrolides and Trimethoprim in Wastewater and Natural Water. PhD thesis, Zagreb, Croatia. 120 pp.
- Schlüsener, M., Löffler, D. i Ternes, T. (2008) Deliverable 1.1: list of the relevant PPs. Knowledge and need assessment on pharmaceutical products in environmental waters (KNAPPE), European Commission, Brussels, Belgium, 63 pp.
- Snyder, S. A., Wert, E. C., Rexing, D. J., Zegers, R. E., Drury, D. D. (2006) Ozone Oxidation of Endocrine Disruptors and Pharmaceuticals in Surface Water and Wastewater. *Ozone-Sci. Eng.* **28**, 445-460.
- Sotelo, J. L., Beltran, F. J., Benitez, F. J., Beltran-Heredia, F. (1989) Henry's law constant for ozone-water system. *Water Res.* **23**, 1239-1246.
- Stahelin, S., Hoigné, J. (1985) Decomposition of ozone in water in the presence of organic solutes acting as promoters and inhibitors of radical chain reactions. *Environ. Sci. Technol.* **19**, 1206–1212.
- Tanaka, J., Matsumura, M. (2002) Kinetic studies of removal of ammonia from seawater by ozonation. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **77**, 649–656.
- Ternes, T. A. (1998) Occurrence of drugs in German sewage treatments plants and rivers. *Water Res.* **32**, 3245–3260.
- Ternes, T. A. (2001) Analytical methods for the determination of pharmaceuticals in aqueous environmental samples. *Anal. Chem.* **20**, 419-434.
- Ternes, T. A., Meisenheimer, M., McDowell, D., Sacher, F., Brauch, H. J., Haist-Gulde, B., Preuss, G., Wilme, U., Zulei-Seibert, N. (2002) Removal of pharmaceuticals during drinking water treatment. *Environ. Sci. Technol.* **36**, 3855-3863.
- Ternes, T. A., Stuber, J., Herrmann, N., McDowell, D., Ried, A., Kampmann, M., Teiser B. (2003) Ozonation: a tool for removal of pharmaceuticals, contrast media and musk fragrances from wastewater. *Water Res.* **37**, 1976–1982.
- Trambarulo, R., Ghosh, S. N., Burrus, C. A., Gordy, W. (1953) The molecular structure, dipole moment, and g factor of ozone from its microwave spectrum. *J. Phys. Chem.* **21**, 851–855.

Tracol, R. i Duchemin, J. (2009) Evaluation de l'occurrence des résidus de médicaments dans un échantillon de nappes souterraines vulnérables du bassin Seine-Normandie utilisées pour la production d'eau destinée a la consommation humaine. Report of the DDASSDRASS de Basse-Normandie – Service Santé-Environnement, Caen, France, 42 pp. Dostupno na: <<http://prse.bn.free.fr/regional/medicaments/Synthmedic2009.pdf>>

Verlicchi, P., Al Aukidy, M., Galletti, A., Petrović, M. i Barceló, D. (2012) Hospital effluent: Investigation of the concentrations and distribution of pharmaceuticals and environmental risk assessment. *Sci. Total Environ.* **430**, 109–118.

von Gunten, U., Hoigné, J. (1998) Advanced oxidation of bromide containing waters: bromate formation mechanisms. *Environ. Sci. Technol.* **32**, 63–70.

Valcárcel, Y., González Alonso, S., Rodríguez-Gil, J. L., Romo Maroto, R., Gil, A. i Catalá, M. (2011) Analysis of the presence of cardiovascular and analgesic/anti-inflammatory/antipyretic pharmaceuticals in river- and drinking-water of the Madrid Region in Spain. *Chemosphere* **82**, 1062–1071.

Zuccatto, E., Castiglioni, S. i Fanelli, R. (2005) Identification of the pharmaceuticals for human use contaminating the Italian aquatic environment. *J. Hazard. Mater.* **122**, 205–209.

IZJAVA O IZVORNOSTI

Izjavljujem da je ovaj diplomski rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Ime i prezime studenta