

Degradacija farmaceutika pod djelovanjem gama zračenja

Blažek, Karlo

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:911789>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-25**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Karlo Blažek

Degradacija farmaceutika pod djelovanjem gama-zračenja

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Brunislav Matasović

Komentor: dr.sc. Ivana Tartaro Bujak

Osijek, 2021.

Sveučilište J.J.Strossmayera u Osijeku
Odjel za kemiju
Diplomski studij kemije

Karlo Blažek

Degradacija farmaceutika pod djelovanjem gama-zračenja

Diplomski rad

Mentor: doc.dr.sc. Brunislav Matasović

Komentor: dr.sc. Ivana Tartaro Bujak

Osijek, 2021.

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Diplomski studij kemije

Znanstveno područje: Prirodne znanosti

Znanstveno polje: Kemija

DEGRADACIJA FARMACEUTIKA POD DJELOVANJEM GAMA-ZRAČENJA

Karlo Blažek

Rad je izrađen na: Institut Ruđer Bošković, Zagreb, Hrvatska

Mentor: doc.dr.sc. Brunislav Matasović

Komentor: dr.sc. Ivana Tartaro Bujak

Sažetak

Cilj ovog rada bio je ispitati utjecaj gama-zračenja na degradaciju vodene otopine doksazosina, lijeka koji je poznati antihipertenziv i jedan od često korištenih farmaceutika. Istraživanje se provodilo u Laboratoriju za radijacijsku kemiju i dozimetriju, Zavoda za kemiju materija, Instituta Ruđer Bošković. Učinkovitost degradacije proučavana je pri različitim dozama zračenja, brzinama doza, pH vrijednostima otopine, u prisustvu hvatača radikala i u prisustvu anorganskih soli. Ozračeni uzorci analizirani su spektrofotometrijski i tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti s DAD detektorom. Pokazano je da su $\cdot\text{OH}$ glavne reaktivne vrste odgovorne za razgradnju doksazosina, a efikasnost razgradnje polaznog spoja raste s porastom doze gama-zračenja. Prisutnost nitrata je imala značajniji utjecaj na razgradnju doksazosina u usporedbi s karbonatima i fosfatima. Optimalna pH vrijednost za razgradnju vodene otopine doksazosina je u neutralnom, blago kiselom području ($\text{pH} = 6,5$), dok je pri izrazito kiselim i baznim uvjetima razgradnja bila slabija. Utvrđeno je da je razgradnja doksazosina u bunarskoj vodi sporija u usporedbi s ultračistom vodom što ukazuje da organske i anorganske komponente otopljene u vodama utječu na efikasnost radiolitičke degradacije doksazosina.

Diplomski rad obuhvaća: 39 stranica, 34 slike, 2 tablice i 28 literaturnih navoda

Jezik izvornika: Hrvatski

Ključne riječi: doksazosin / farmaceutici / gama-zračenje / otpadne vode / radikali / radioliza vode / razgradnja

Rad prihvaćen: 28. listopada 2021.

Stručno povjerenstvo za ocjenu:

1. doc. dr. sc. Marija Jozanović, predsjednica povjerenstva
2. doc. dr. sc. Brunislav Matasović, mentor i član
3. doc. dr. sc. Ana Amić, članica
4. izv. prof. Mirela Samardžić, zamjenska članica povjerenstva

Rad je pohranjen u: Knjižnici Odjela za Kemiju, Franje Kuhača 20, 31000 Osijek

Josip Juraj Strossmayer University of Osijek
Department of Chemistry
Graduate Study of Chemistry
Scientific Area: Natural Sciences
Scientific Field: Chemistry

**DEGRADATION OF PHARMACEUTICAL RESIDUES BY GAMMA-
RADIATION**
Karlo Blažek

Thesis completed at: The Ruđer Bošković Institute, Zagreb, Croatia

Supervisor: doc.dr.sc. Brunislav Matasović

Cosupervisor: dr.sc. Ivana Tartaro Bujak

Abstract

The aim of this study was to investigate the effect of gamma-radiation on the degradation of doxazosin (a widely used antihypertensive drug) in aqueous solution. The research was conducted at the Radiation Chemistry and Dosimetry Laboratory, Division of Materials Chemistry, Ruđer Bošković Institute. The efficiency of degradation was studied under different absorbed doses, dose rates, pH values and in the presence of radical scavengers and inorganic ions. The irradiated samples were analyzed by UV/VIS spectrophotometry and high performance liquid chromatography with diode array detector. It was found that $\cdot\text{OH}$ are the main reactive species responsible for the degradation of doxazosin, the efficiency of degradation being higher with increasing dose of gamma radiation. The presence of nitrates had a stronger effect on doxazosin degradation compared to carbonates and phosphates. An optimal pH for doxazosin degradation was in the neutral, slightly acidic range (pH = 6.5), while degradation was slower under extremely acidic or alkaline conditions. It was found that the degradation of doxazosin in well water was much slower compared to ultrapure water, suggesting that organic and inorganic components dissolved in natural waters influence the efficiency of radiolytic degradation of doxazosin.

Thesis includes: 39 pages, 34 figures, 2 tables and 28 references

Original in: Croatian

Keywords: degradation / doxazosin / gamma-radiation / pharmaceuticals / radicals / wastewater / water radiolysis

Thesis accepted: October 28th, 2021.

Reviewers:

1. Marija Jozanović, PhD, assistant prof.
2. Brunislav Matasović, PhD, assistant prof.
3. Ana Amiđ, PhD, assistant prof.
4. Mirela Samardžić, PhD, associate prof., alternate member of the committee

Thesis deposited in: Library of Department of Chemistry, Franje Kuhaća 20, 31000 Osijek

SADRŽAJ

1. Uvod	1
2. Literaturni pregled	2
2.1. Farmaceutici u okolišu	2
2.2. Doksazosin, primjena, struktura i fizikalno-kemijska svojstva	3
2.3. Metode određivanja farmaceutika u vodi	6
2.4. Postupci razgradnje i uklanjanja farmaceutika	6
3. Eksperimentalni dio	9
3.1. Materijali	9
3.2. Oprema i instrumenti	9
3.3. Priprema pokretne faze	10
3.4. Priprema otopina 2-propanola i tiouree za ispitivanje utjecaja radikala na razgradnju doksazosina	11
3.5. Priprema otopina različitih soli za ispitivanje utjecaja pojedinih iona na razgradnju doksazosina	11
3.6. Priprema standardne otopine doksazosina	11
3.7. Priprema uzoraka za postupak ozračivanja	12
3.8. Analiza uzoraka UV/VIS spektrofotometrijom i tekućinskom kromatografijom	12
4. Rezultati i rasprava	14
4.1. Utjecaj brzine doze zračenja na razgradnju doksazosina	15
4.2. Utjecaj hvatača radikala na degradaciju doksazosina	20
4.2.1. <i>Degradacija doksazosina u N₂O uvjetima</i>	20
4.2.2. <i>Degradacija doksazosina u N₂ uvjetima</i>	22
4.3. Radiolitička razgradnja doksazosina u prisutnosti anorganskih iona	26
4.4. Utjecaj vodenog matriksa na degradaciju doksazosina	29
4.5. Utjecaj pH vrijednosti na degradaciju doksazosina	32
5. Zaključak	35
6. Literaturna vrela	36
7. Prilozi	38
8. Životopis autora	39

1. Uvod

Voda je veoma važan faktor za život na Zemlji, ali s velikim povećanjem svjetske populacije te aktualnim klimatskim promjenama, dostupnost pitke vode osjetno pada i postaje jedno od najvećih izazova diljem svijeta. S druge strane, zbog sve veće potražnje za farmaceuticima, njihova zastupljenost u okolišu je sve veća. Premda je njihova lakodostupnost danas uvelike olakšala način života i produžila životni vijek, povećana proizvodnja lijekova je isto tako rezultirala većom akumulacijom potencijalno štetnih tvari u okolišu. Iako su koncentracije farmaceutika u okolišu zasad u tragovima, u skoroj budućnosti će predstavljati ozbiljan problem za okoliš. Većina farmaceutika je otporno na biodegradaciju i ima sposobnost bioakumulacije, a s obzirom da neki od njih mogu biti toksični, povećane koncentracije farmaceutika u vodama mogu imati poprilično štetne učinke na živi svijet. Za tretiranje otpadnih voda primjenjuju se razni fizički, biološki i kemijski procesi. Nažalost tradicionalne metode za tretiranje otpadnih voda kao što su adsorpcija, koagulacija i membranska separacija ne garantiraju potpuno uklanjanje tih spojeva. Razgradnjom farmaceutika u okolišu može doći do nastanka produkata toksičnijih od polaznog spoja te često takve vrste razgradnih produkata, s različitim fizikalnim i kemijskim svojstvima dospijevaju u okoliš. Takozvani napredni oksidacijski procesi (engl. *Advanced oxidation processes*, AOP) pokazali su se veoma učinkovitim za razgradnju lijekova i proizvoda za osobnu njegu (engl. *Pharmaceutical and personal care products*, PPCP), a jedan od tih procesa jest primjena ionizirajućeg zračenja [1,2]. Osim što je učinkovito kod uklanjanja zagađivala iz voda, primjena ionizirajućeg zračenja je i ekološki prihvatljiva metoda jer ne zahtjeva korištenje dodatnih kemikalija. Cilj rada bio je istražiti djelotvornost ionizirajućeg zračenja na razgradnju doksazosina u vodenim otopinama te određivanje utjecaja doze, brzine doze i prisutnost pojedinih iona na kinetiku razgradnje doksazosina.

2. Literaturni pregled

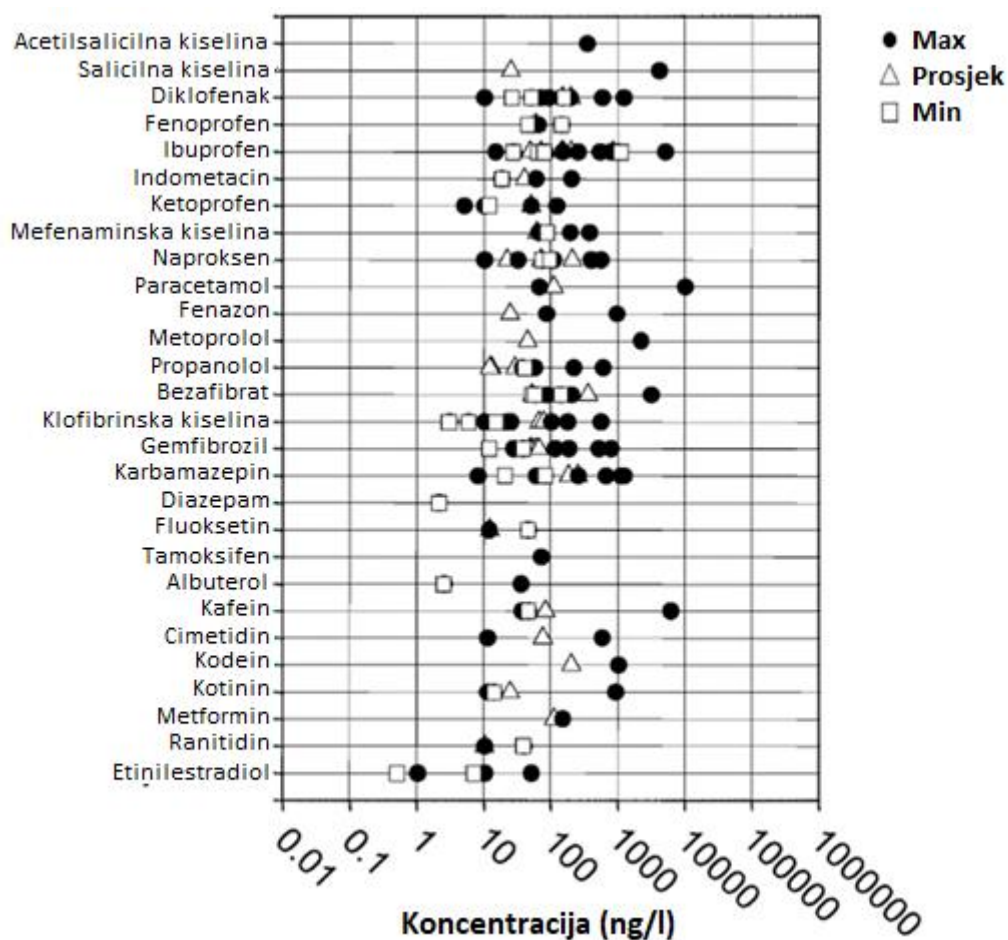
2.1. Farmaceutici u okolišu

U zadnjih dvadeset godina sve više se pažnja preusmjerava na takozvana „nova zagađivala“, spojeve za koje se dosada nije smatralo da su potencijalno štetni za okoliš. Najvažnija skupina novih zagađivala upravo su farmaceutici i sredstva za osobnu njegu. Farmaceutici su sintetički ili prirodni spojevi specifične biološke aktivnosti korišteni za liječenje i sprječavanje bolesti ljudi i životinja [3].

Podjela farmaceutika može biti na temelju njihove kemijske strukture, načina djelovanja, vrste ciljane molekule ili biološke aktivnosti. Primjerice, kod podjele po biološkoj aktivnosti, spoj može biti antibiotik, analgetik, antiepileptik, antidepresiv, itd. Iako je primjena farmaceutika uvelike povećala standarde današnjeg života i produljila životni vijek, kako je potražnja za njima s godinama sve veća, njihovo prekomjerno odlaganje u okoliš potencijalno može rezultirati dugoročnim, negativnim utjecajima na okoliš i živi svijet. Farmaceutici u okoliš dospijevaju na razne načine. Osim izlučivanjem, ljudi ih često nakon uporabe nepravilno odbacuju u odvođe i otpad. Isto tako ih zbog primjene u veterinarskoj medicini izlučuju životinje te se farmaceutici akumuliraju u tlu. Ispiranje odlagališta, ali u najvećoj mjeri ispuštanje komunalnih otpadnih voda i otpadnih voda farmaceutskih industrija znatno doprinosi povećanju njihovih koncentracija u okolišu. Nakon što dospiju u kanalizaciju ili tlo, ukoliko se zajedno sa svojim metabolitima ne uspiju eliminirati, zbog svoje visoke stabilnosti se mogu pojaviti u prirodnim vodama koje se koriste kao izvor za proizvodnju pitke vode [4,5].

Slika 1. prikazuje detektirane koncentracije različitih farmaceutika prisutnih u površinskim vodama. Koncentracije farmaceutika u otpadnim vodama variraju od ng/L do µg/L, a u površinskim vodama do ng/L [6]. Međutim čak i te iznimno niske koncentracije pokazale su da mogu imati štetni učinak na živi organizam. Primjerice neki hormonski aktivni agensi mogu naštetiti spolnom razvoju ljudi jer dovode do hormonalne neravnoteže u ljudskom organizmu. Antitumorski lijekovi u manjim koncentracijama mogu čak i sami izazvati rak, a prisutnost antibiotika u otpadnim i pitkim vodama može određenim bakterijama pojačati toleranciju na njih. Kontinuirani unos farmaceutika u okoliš i nedovoljna istraženost učinaka kako smjese tako i pojedinačnih spojeva, unatoč niskim

koncentracijama uvelike utječu na život riba, algi i bakterija te predstavljaju rizik za zdravlje ljudi [4].



Slika 1. Koncentracije farmaceutika u površinskim vodama [6].

2.2. Doksazosin, primjena, struktura i fizikalno-kemijska svojstva

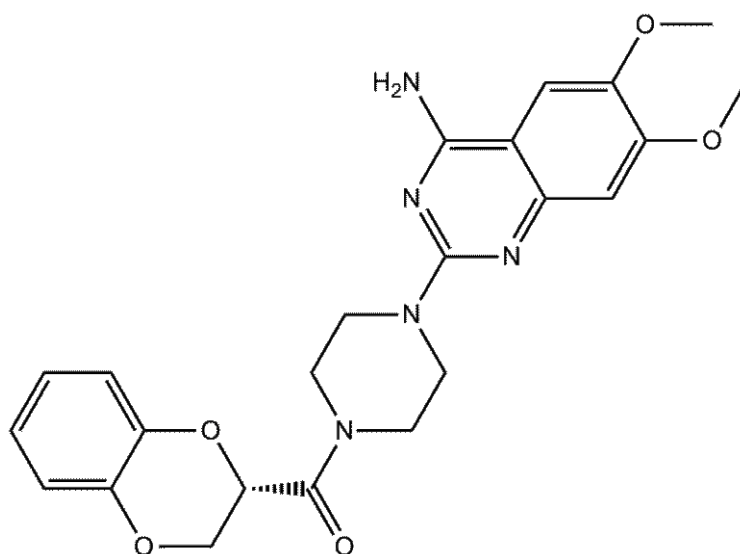
Doksazosin je alfa-adrenergični antagonist koji ima široku primjenu u medicinskoj terapiji kao učinkoviti antihipertenziv (Slika 2.) [5]. On selektivno inhibira utjecaj alfa-1 adrenergičkih receptora koji su uključeni u neurotransmisiji i regulaciji simpatičkog živčanog sustava. Inhibiranjem alfa-1a adrenergičkog receptora ne dolazi do sužavanja krvnih žila, one se šire i time snižavaju krvni tlak. Osim što je zadužen za tretiranje hipertenzije, doksazosin također ima afinitet prema alfa-1c adrenoceptoru smještenom u prostati. Inhibiranje tog tipa receptora pomaže kod tretiranja benigne hiperplazije prostate, nemalignog prekomjernog rasta stanica prostate. Isto tako, doksazosin sprečava rast i izaziva apoptozu stanica raka prostate inhibicijom protein kinaze B (akt) [8].



Slika 2. Lijek doksazosin pod trgovačkim nazivom Cardura [7].

Benigna hiperplazija prostate (engl. *Benign prostatic hyperplasia*, BPH) je sve češći slučaj kod muškaraca i procjenjuje se da je prisutna kod 80 % muškaraca starijih od 40 godina i kod 95 % muškaraca starijih od 80 godina. Neki od simptoma su otežano i bolno mokrenje, hematurija (prisutnost krvi u mokraći) te učestaliye i urgentno mokrenje. Doksazosin djeluje na način da opušta mišiće vrata mjehura te time olakšava mokrenje [9]. Zbog svojeg dugotrajnog učinka, on se primjenjuje jednom dnevno, preciznije preporučuje se unos od 1 do 10 mg dnevno. Neke od nuspojava prilikom primjene doksazosina su glavobolja, umor, otekline udova, kašalj, začepljen nos, otežano disanje, nepravilni otkucaji srca, bol u prsnoj koži, smanjen broj bijelih krvnih stanica, itd. Ono na što pacijent mora paziti je prisutnost drugih lijekova i njihova interakcija s doksazosinom. Primjerice, ne preporučuje se konzumacija doksazosina u slučaju da je pacijent pod antibioticima, antidepresivima, sildenafilu ili drugom tipu lijeka za erektilnu disfunkciju te ukoliko koristi lijekove za tretiranje HIV-a i AIDS-a [10].

Strukturno gledano doksazosin je kinazolin što znači da je organski spoj građen od bicikličkog prstena koji se sastoji od jednog 1,3-diazinskog i jednog aromatskog prstena (Slika 3.). Na taj biciklički kostur vezane su dvije metoksi grupe, jedna amino grupa i jedna piperazin-1-il grupa koja je substituirana s 2,3-dihidro-1,4-benzodioksin-2-ilkarbonilnom grupom. Zbog većeg broja dvostrukih veza u svojoj strukturi, doksazosin ima više elektrona u nezasićenim vezama koji se lako pobuđuju pa su mu upotrebljivi apsorpcijski maksimumi u dostupnom UV području.



Slika 3. Struktura molekule doksazosina [11].

S obzirom da je organski spoj, doksazosin je slabo topljiv u vodi (0,8 %). Temperatura vrelišta mu iznosi 275-277 °C, a temperatura tališta 718 °C. Ostali članovi ove klase lijekova su prazosin, terazosin i tamsulozin [12].

Huerta-Fontela i sur. (2011) su proveli istraživanje u kojem se ispitala prisutnost i uspješnost uklanjanja 55 različitih farmaceutika u prirodnim vodama. Prisutnost β -blokatora (Tablica 1.) kao što su propranolol, metoprolol i sotalol bila je u rasponu koncentracija od 7 do 400 ng/L. Doksazosin je u vodama prisutan u tragovima, koncentracijama manjim od 10 ng/L [5,13].

Tablica 1. Koncentracije β -blokatora (ng/L) tijekom procesa pročišćavanja pitke vode (listopad 2008. - siječanj 2009.) [13].

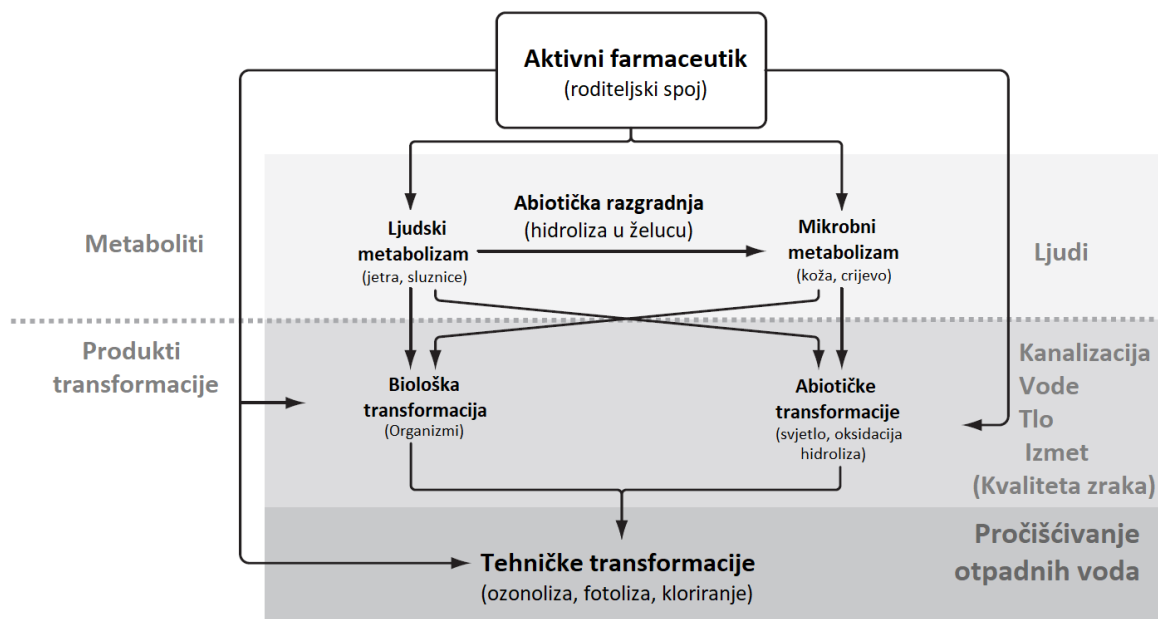
		LOQ			Otpadna voda			Prekloriranje			Pročišćavanje + filtriranje pijeska			Podzemna voda			Ozonacija			GAC filtracija			Obrađena voda (postkloriranje)		
		n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean	n_o	Max	Mean
β -Blokator	Acebutolol	0.01	10	170	44	10	160	37	10	160	36	5	8	2	5	13	3	—	—	—	—	—	—	—	—
	Atenolol	5	12	900	470	12	895	470	12	715	380	7	10	4	12	84	47	10	69	18	10	23	12	—	—
	Betaxolol	0.02	5	13	5	5	2	1	5	1	0.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bisoprolol	0.01	5	250	57	5	250	56	5	230	53	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Doxazosin	0.01	5	10	4	5	1	0.4	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Labetalol	0.01	5	16	6	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Metoprolol	0.01	7	380	90	7	21	10	7	81	23	7	12	6	7	10	5	5	9	3	—	—	—	—	—
	Propranolol	1.1	2	270	54	2	180	37	2	130	26	2	62	12	2	49	10	2	45	9	—	—	—	—	—
	Sotalol	0.1	12	160	100	12	150	99	12	66	53	5	16	6	5	10	4	2	6	4	4	3	2	—	—

2.3. Metode određivanja farmaceutika u vodi

S obzirom na veoma niske koncentracije farmaceutika prisutnih u okolišu i veliki broj prisutnih interferencija, njihovo detekiranje, identificiranje i kvantificiranje može biti poprilično komplicirano. Metode koje se najčešće koriste za njihovo određivanje su plinska (engl. *Gas chromatography*, GC) i tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (engl. *High performance liquid chromatography*, HPLC). Iako su se dosad koristili detektori s nizom dioda (engl. *Diode Array Detector*, DAD) i fluorescentni detektori, primjena masene spektrometrije za kvantitativno određivanje i identificiranje farmaceutika je sve veća zbog svoje niske granice detekcije i mogućnosti određivanja molekulske mase i strukture nepoznatih spojeva. HPLC-MS se pokazala pouzdanijom tehnikom jer plinska kromatografija nije idealna metoda za analizu polarnih i termički nestabilnih spojeva kao što je većina farmaceutika. Za uklanjanje prisutnih interferencija prije analize samog uzorka primjenjuje se ekstrakcija čvrste faze (engl. *Solid phase extraction*, SPE), čime se povećava selektivnost metode i olakšava identifikacija i kvantifikacija ciljanog farmaceutika. Zbog svoje jednostavnosti, visoke selektivnosti i specifičnosti te mogućnosti automatizacije i manje potrošnje organskog otapala, ekstrakcija čvrste faze ima prednost ispred tradicionalnih metoda kao što su ekstrakcija po Soxhletu i ekstrakcija tekuće-tekuće [3].

2.4. Postupci razgradnje i uklanjanja farmaceutika

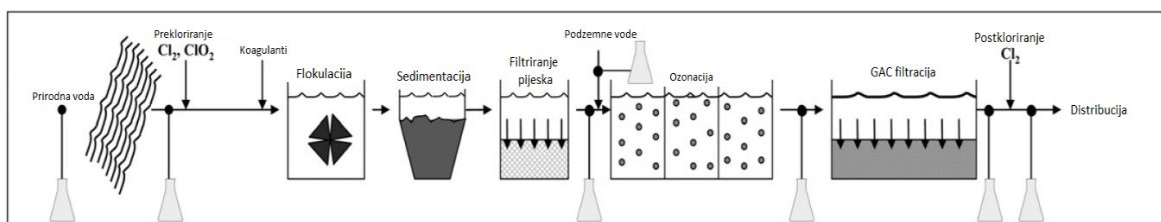
Kada dospiju u okoliš, farmaceutici se sorbiraju na tlo i smanjuje im se aktivnost. Akumuliranjem u tlu, oni podliježu biološkoj razgradnji interakcijom s gljivicama. Međutim, ukoliko farmaceutici nemaju sklonost sorpciji na tlo, oni prodiru u podzemne i površinske vode. Za biološku razgradnju farmaceutika u vodama zadužene su bakterije. Slika 4. prikazuje shemu procesa razgradnje farmaceutika u okolišu. Biološkom razgradnjom može doći do djelomične razgradnje farmaceutika ili do potpune mineralizacije, odnosno nastanka ugljikova dioksida i anorganskih soli. Djelomičnom razgradnjom nerijetko nastaju stabilniji i toksičniji produkti od početne molekule farmaceutika. Neki farmaceutici su otporni na razgradnju mikroorganizmima pa podliježu abiotičkim procesima razgradnje.



Slika 4. Proces razgradnje farmaceutika u okolišu [4].

Organizmi otporni na biološku razgradnju podliježu procesima hidrolize. S obzirom da većina farmaceutika ima aromatske prstene, π -konjugirane sustave, heteroatome, nitro i fenolne skupine, u površinskim vodama može doći do fotolitičke razgradnje. Efikasnost fotolitičke razgradnje ovisi o području elektromagnetskog zračenja u kojem farmaceutik apsorbira, o strukturi i koncentraciji farmaceutika te o prisutnosti otopljenih organskih tvari, nitratah i huminske kiseline. Fotolitičkom razgradnjom mogu potencijalno nastati stabilniji i toksičniji produkti koji mogu imati negativan učinak na okoliš [3].

Farmaceutici koji su prisutni u prirodnim i otpadnim vodama i otporni su na biotičke i abiotičke procese razgradnje, uklanjaju se tehničkim procesima pročišćavanja voda. Slika 5. prikazuje shemu postupka uklanjanja farmaceutika u pitkoj vodi u postrojenju za pročišćavanje pitke vode (engl. *Drinking-Water Treatment Plant, DWTP*).



Slika 5. Shema pročišćavanja pitke vode [13].

Tradicionalni procesi za tretiranje otpadnih voda kao što su koagulacija, flokulacija, sedimentacija, filtriranje i primjena aktivnog mulja su pokazali da nisu sposobni uspješno ukloniti farmaceutike, pesticide i herbicide. Za učinkovito uklanjanje farmaceutika danas se sve više koriste napredni oksidacijski procesi [13,14]. To su robusnije, efikasnije i ekološki prihvatljive metode koje se temelje na stvaranju hidroksilnih radikala. $\cdot\text{OH}$ služe za degradaciju ciljanih molekula ili njihovo prevođenje u jednostavnije spojeve koji se pritom mogu ukloniti tradicionalnim procesima. Proces koji spada u AOP su gama-zračenje, fotoliza, fotokataliza, sonoliza, elektrokemijske oksidacijske tehnologije, Fenton-procesi i ozonacija. Efikasnost AOP-a ovisi o generiranju reaktivnih čestica, od kojih su najefikasniji $\cdot\text{OH}$ zbog svoje visoke reaktivnosti i neselektivnosti. Radijacijska tehnologija se danas djelotvorno koristi u rješavanju problema zagađenja okoliša pri čemu se energijom ionizirajućeg zračenja induciraju fizikalne i kemijske promjene u tvarima. Od obezbojenja i degradacije bojila, obrade mulja u kanalizacijama, uklanjanja pesticida, oksidacije organskih zagađivala do naravno degradacije farmaceutskih spojeva [15].

Primjena gama-zračenja za uklanjanje toksičnih organskih zagađivala prisutnih u vodama ima više prednosti. Primjena gama-zračenja ima visoku učinkovitost, ne zahtjeva uporabu kemikalija pa nema dodatnog zagađenja, nema inducirane radioaktivnosti, nije osjetljivo na boju i suspendirane čestice i ima veliki doseg penetracije u vodenom matriksu. Osim što se gama-zračenjem stvaraju jaki oksidansi $\cdot\text{OH}$, generira se i jednaka količina redukcijskih agenasa procesom radiolize vode [1,16,17]. Količina energije zračenja koja se apsorbira u tvari ovisi o svojstvima tvari te o vrsti zračenja, a količina stvorenih reaktivnih čestica ovisi o pH vrijednosti, prisutnosti hvatača radikala i anorganskih soli te o vrsti plina kojem je otopina zasićena [15].

Izvori zračenja koji se koriste u radijacijskoj tehnologiji za pročišćavanje otpadnih voda su izvori gama-zraka, elektroni velikih energija, x-zrake i UV-svjetlo. Glavna mjera učinka zračenja na određenu tvar/materijal je apsorbirana doza (D). Apsorbirana doza je količina energije koju tvar apsorbira po jedinici svoje mase. Jedinica koja se koristi je grej (Gy), a definirana je omjerom J/kg. U industrijskoj primjeni su najčešće korišteni radioizotopi ^{60}Co i ^{137}Cs . ^{60}Co emitira dvije gama-zrake čije su energije 1,17 i 1,33 MeV, a vrijeme poluživota iznosi 5,26 godina [18]. Jedinu nedostatak primjene gama-zračenja je relativna ekonomska neisplativost i povećane sigurnosne mjere zbog uporabe radioizotopa. Usprkos tome, primjena gama-zračenja se pokazala kao veoma pouzdana metoda za potpuno uklanjanje i mineralizaciju farmaceutika u prirodnim, otpadnim i pitkim vodama [2,16].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Materijali

Soli i otapala su bili analitičke čistoće.

- **Kemikalije**

- Acetonitril, CH_3CN , LC čistoće (Honeywell, Njemačka)
- Amonijev acetat ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$, Gram-mol, Hrvatska)
- Doksazosin (Sigma, $\geq 97\%$, Kina)
- Klorovodična kiselina (Kemika, Hrvatska)
- Kalijev hidrogenfosfat, K_2HPO_4 (Kemika, Hrvatska)
- Metanol, CH_3OH (Honeywell, HPLC čistoće, Njemačka)
- Natrijev hidroksid, NaOH (Kemika, Hrvatska)
- Natrijev hidrogen karbonat, NaHCO_3 , Gram-mol, Hrvatska)
- Natrijev nitrat, NaNO_3 (Lach-ner, Češka)
- 2-propanol (Honeywell, Njemačka)
- Tiourea (Sigma, Francuska)

Za pripremu vodene otopine doksazosina, za ispiranje injektora na HPLC-u, ispiranje kiveta i kao slijepu probu na UV/VIS-u korištena je visoko pročišćena voda (Milli-Q voda).

3.2. Oprema i instrumenti

- Spektrofotometar (Varian Cary 4000, Nizozemska)
 - Računalni program: Cary WinUV – Scan
- Kromatograf: KNAUER K-501 (Njemačka)
 - Binarna pumpa
 - Detektor: DAD
 - Manualno injektiranje
- Kromatografska kolona: reverzna faza C_{18} ET 250/4, 4 mm $\times$ 250 mm ,5 μm , NUCLEOSIL (Macherey-Nagel, Düren, Njemačka)

- Računalni program: ChromGate software (Version 3.1)



Slika 6. HPLC + DAD instrument korišten za analizu ozračenih uzoraka.

Ostala oprema

- Membranski filteri
- Analitička vaga, model AX205 DeltaRange (Mettler-Toledo, Švicarska)
- pH-metar (Mettler-Toledo GmbH, Schwerzenbach)
- Utrazvučna kupelj, model D-78224 Singen/Htw, Elma, Njemačka)
- Bočice za uzorke od 15,0 ml, PTFE čepovi sa silikonskom septom

3.3. Priprema pokretne faze

Pripremljen je pufer volumena 2 L, koncentracije $c = 2,5 \text{ mM}$, pH vrijednosti 4. Odvagano je 3,84 g amonijeva acetata ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) te otopljeno u dvije litre ultračiste vode. pH vrijednost podešena je dodatkom nekoliko kapi koncentrirane klorovodične kiseline, HCl jer je pH vrijednost bila viša od željene. Pufer je korišten kao pokretna faza A, dok je za pokretnu fazu B korišten acetonitril (ACN), CH_3CN .

3.4. Priprema otopina 2-propanola i tiouree za ispitivanje utjecaja radikala na razgradnju doksazosina

Za uklanjanje $\cdot\text{OH}$ i ispitivanje utjecaja e_{aq}^- radikala na razgradnju doksazosina, standardnoj otopini je dodana vodena otopina 2-propanola. 38 μL vodene otopine 2-propanola koncentracije 13,08 M dodano je uzorku od 5 mL i postignuta je koncentracija od 0,1 M. Za ispitivanje utjecaja tiouree na razgradnju doksazosina, odvagano je 0,875 g tiouree molarne mase 76,12 g/mol u 25 mL ultračiste vode. Izdvajanjem 10,8 μL te otopine u 5 mL uzorka dobivena je koncentracija od 3 mM. Pripremljeni uzorci propuhivali su se s N_2 protokom od 3 mL/min u vremenu od 15 minuta i zračili gama-zračenjem brzinom od 0,54 Gy/s.

3.5. Priprema otopina različitih soli za ispitivanje utjecaja pojedinih iona na razgradnju doksazosina

Za ispitivanje utjecaja pojedinih iona na razgradnju doksazosina korištene su prethodno pripremljene otopine NaHCO_3 , NaNO_3 i K_2HPO_4 . U odmjernu tikvicu od 25 mL odvagano je 4,12 mg NaHCO_3 i dodana je ultračista voda do oznake. 50 μL pripremljene otopine izdvojeno je u 5 mL standardne otopine doksazosina, kako bi se postignula koncentracija od 1,9 mM. Isto tako je u odmjernoj tikvici od 25 mL otopljeno 1,41 g NaNO_3 . Koncentracija od 1 mM u 5 mL uzorka postignuta je dodavanjem 7,5 μL pripremljene vodene otopine. Otapanjem 17,5 mg K_2HPO_4 u 25 mL i izdvajanjem 50 μL te otopine u 5 mL uzorka, postignuta je željena koncentracija od 7 mg/L. Pripremljeni uzorci su se propuhivali s N_2 protokom od 3 mL/min u vremenu od 15 minuta te zračili gama-zračenjem brzinom od 0,54 Gy/s.

3.6. Priprema vodene otopine doksazosina

Uzorak doksazosina je prah čiste bijele boje, teško topljiv u vodi. Pripremljena je vodena otopina doksazosina koncentracije $1,9 \times 10^{-5}$ M. U tikvicu od 250 mL odvagano je 2,7 mg doksazosina i dodana je ultračista voda za otapanje uzorka. Tikvica je stavljena na ultrazvučnu kupelj 30 minuta. Nakon toga nadopunjena je otapalom do oznake. Priređena otopina doksazosina čuvana je na $+4$ °C, zaštićena od svjetla aluminijskom folijom te je neposredno prije korištenja sonicirana 30 minuta. Izmjerena pH vrijednost vodene otopine

doksazosina bila je 6,6. Za ispitivanje utjecaja pH vodene otopine uzorka, pH vrijednost se podešavala dodavanjem vodenih otopina HCl i NaOH. Za pripremu doksazosina u modelnom sustavu kao otapalo korištena je bunarska voda. U tikvicu od 250 mL odvagano je 2,7 mg doksazosina i dodana je bunarska voda iz sela Peteranec, iz okolice Koprivnice. Otopina se također sonicirala na ultrazvučnoj kupelji 30 minuta i čuvala na +4 °C te je od svjetla zaštićena aluminijskom folijom.

3.7. Priprema uzoraka za postupak ozračivanja

Iz vodene otopine doksazosina koncentracije $1,9 \times 10^{-5}$ M priređeni su uzorci za ozračivanje. 5,0 ml uzorka je otpipetirano u staklene bočice. Sva mjerenja su provedena ili u ravnoteži sa zrakom ili bez prisustva kisika iz zraka što se postiglo 15-minutnim propuhivanjem s N₂O ili N₂ ovisno o tome jesu li se ispitivali oksidacijski ili reduksijski uvjeti. Gama-radioliza vodenih otopina provedena je pri sobnoj temperaturi, kod različitih doza i brzina doze. Gama-zračenje se provodilo na panoramskom izvoru ⁶⁰Co. Izvor zračenja se sastoji od vertikalnog cilindričnog sklopa sastavljenog od 24 nosača sa šipkama unutar kojih su smještene kapsule ⁶⁰Co. Zračenje uzoraka započinje kada su izvori zračenja elektromotornim pogonom podignuti u radni položaj. Podizanje u radni položaj ili spuštanje u sigurni položaj provodi se iz komandne sobe koja je od komore za ozračivanje odijeljena betonskim zidom debljine četiri metra. Uzorci su zračeni u centru gdje je postignuta najveća brzina doze od 5,75 Gy/s, te na različitim udaljenostima od centra određenim prema eksperimentalno potvrđenom pravilu prema kojem brzina doze pada s kvadratom udaljenosti. Manje brzine doze bile su 0,54 Gy/s i 0,108 Gy/s te su uzorci ozračeni dozama od 10 do 2000 Gy. Brzina doze na panoramskom izvoru određena je ionizacijskom komorom i Monte Carlo simulacijama [19].

3.8. Analiza uzoraka UV/VIS spektrofotometrijom i tekućinskom kromatografijom

Spektrofotometrijska i kromatografska mjerenja su provedena iz istih polaznih uzoraka nakon postupka ozračivanja. Spektrofotometrijska mjerenja provedena su na Varian Carry 4000. Uzorci su analizirani u području valnih duljina od 200 do 450 nm prema vodi jer sam doksazosin apsorbira pri 247 i 330 nm. Razgradnja doksazosina mjerena je

tekućinskom kromatografijom visoke djelotvornosti. Nakon stabilizacije tlaka u koloni analizirani su uzorci injektiranjem uzorka uz gradijentno eluiranje, Tablica 2.

Tablica 2. Kromatografski parametri HPLC metode za analizu doksazosina.

Kromatografska kolona	C ₁₈ ET 250/4, 4 mm × 250 mm, 5 μm, NUCLEOSIL		
Pokrena faza „A“	Amonijev acetat (CH ₃ COONH ₄)		
Organska faza „B“	Acetonitril (CH ₃ CN)		
Gradijent	Vrijeme / min	A%	B%
	0	60	40
	3	60	40
	15	30	70
Volumen injektiranja / μL	100		
Brzina protoka / mL min⁻¹	1,5		
Valna duljina detekcije / nm	247, 330		
Temperatura kolone / °C	25 °C		

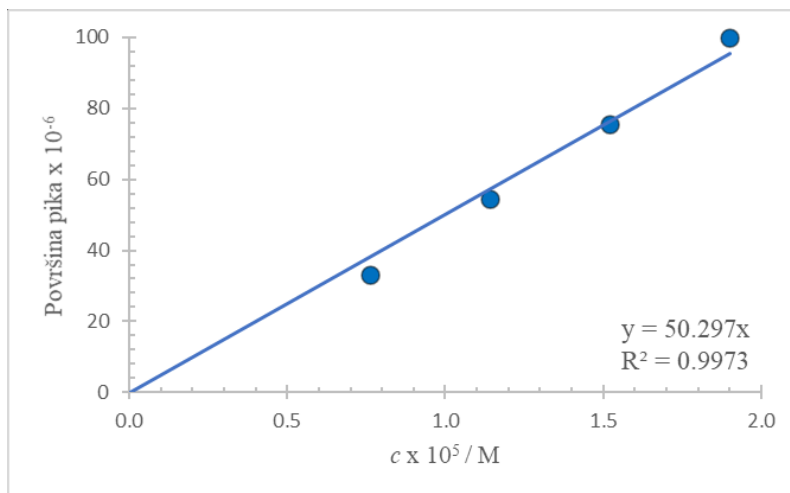
Dobiveni rezultati su prikazani kao postotak degradacije, što je prikazano u jednadžbi (1):

$$\% \text{ DEGRADACIJE} = \frac{c}{c_0} \times 100, \quad (1)$$

gdje je c koncentracija ozračenog uzorka, a c_0 koncentracija neozračenog uzorka.

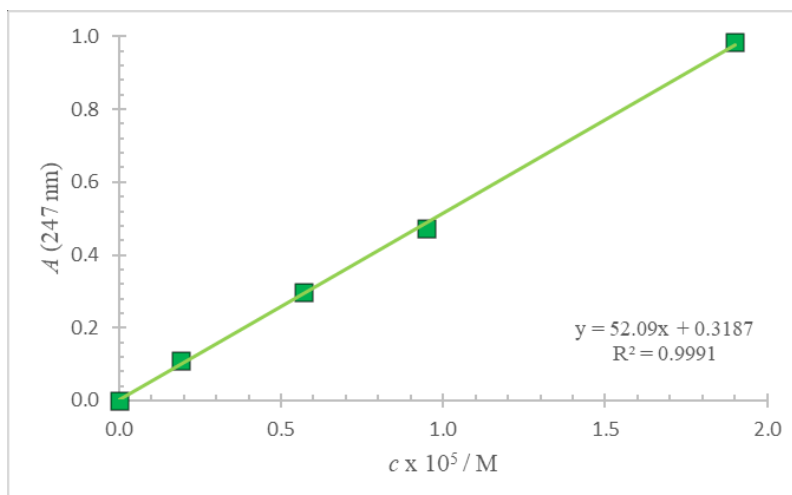
4. Rezultati i rasprava

Probna analiza za HPLC napravljena je s uzorcima vodene otopine doksazosina pri različitim koncentracijama. Standardna otopina doksazosina ($1,9 \times 10^{-5}$ M) razrijeđena je 20 %, 40 % i 60 %. Dobivene su koncentracije od $1,52 \times 10^{-5}$ M, $1,14 \times 10^{-5}$ M i $7,6 \times 10^{-6}$ M (Slika 7.).



Slika 7. (HPLC) Prikaz ovisnosti površine kromatografskog pika o koncentraciji doksazosina.

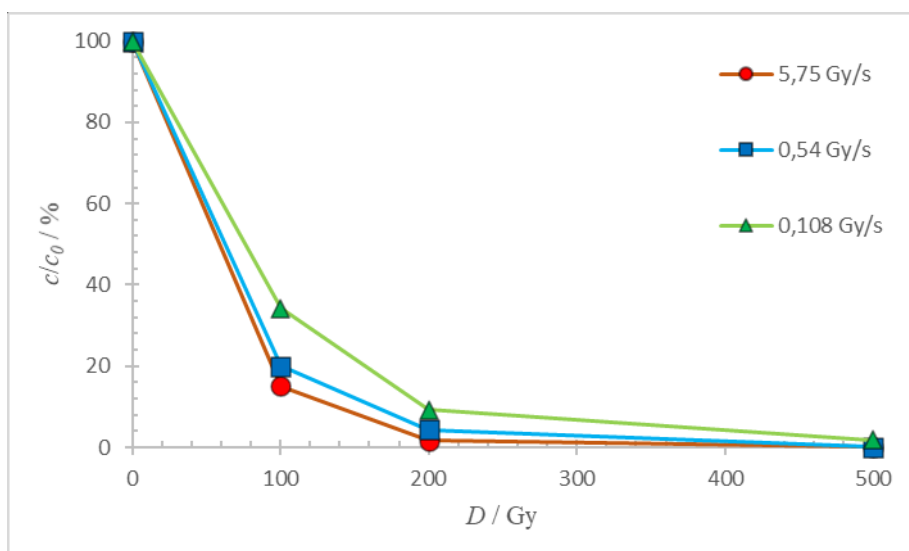
Pripremljene vodene otopine analizirane su i UV/VIS spektrofotometrom. Standardna otopina doksazosina ($1,9 \times 10^{-5}$ M) razrijeđena je 50 %, 70 % i 90 %. Dobivene su koncentracije od $9,5 \times 10^{-6}$ M, $5,7 \times 10^{-6}$ M i $1,9 \times 10^{-6}$ M. Spektrofotometrijska mjerenja vodenih otopina različitih koncentracija doksazosina (prikazani na Slici 8.) pokazuju linearnost u skladu s Lambert-Beerovim zakonom. Za daljnja istraživanja korištena je koncentracija doksazosina $1,9 \times 10^{-5}$ M.



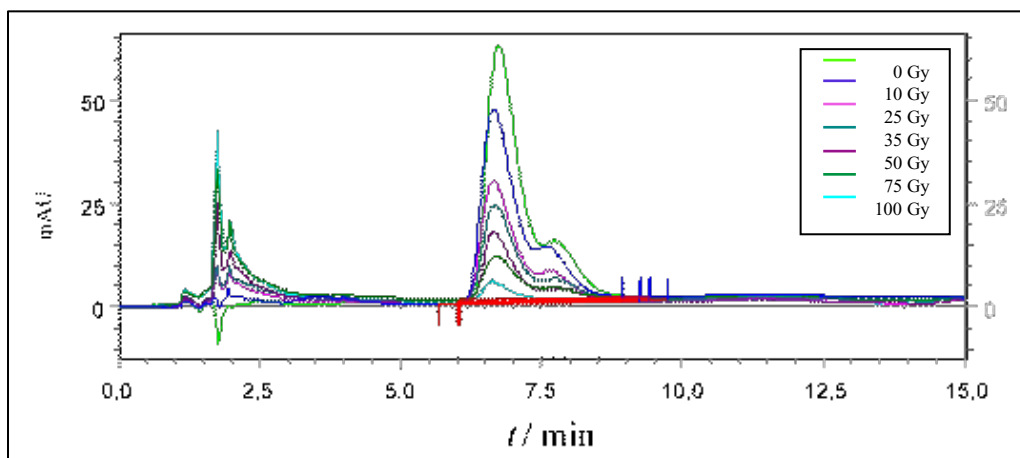
Slika 8. (UV/VIS) Prikaz ovisnosti apsorbancije pri 247 nm o koncentraciji doksazosina.

4.1. Utjecaj brzine doze zračenja na razgradnju doksazosina

Brzina doze zračenja jedan je od parametara koji može utjecati na efikasnost razgradnje zagađivala. Vodena otopina doksazosina ozračena je s tri različite brzine doze, 5,75 Gy/s, 0,537 Gy/s i 0,108 Gy/s u prisutnosti zraka (Slika 9.). Kod brzine doze od 5,75 Gy/s 85 % doksazosina se degradiralo već pri najmanjoj dozi od 100 Gy. Na brzini doze od 0,54 Gy/s primjećena je neznatno sporija razgradnja doksazosina te je pri dozi od 200 Gy 96 % doksazosina bilo razgrađeno. Najniža brzina doze zračenja (0,108 Gy/s) očekivano je rezultirala najsporijom razgradnjom. Ozračivanjem dozom od 200 Gy koncentracija doksazosina pala je na 9 % od početne koncentracije. Slika 10. prikazuje kromatograme razgradnje doksazosina pri brzini doze zračenja od 0,54 Gy/s dobivene u programu CHROMGATE.



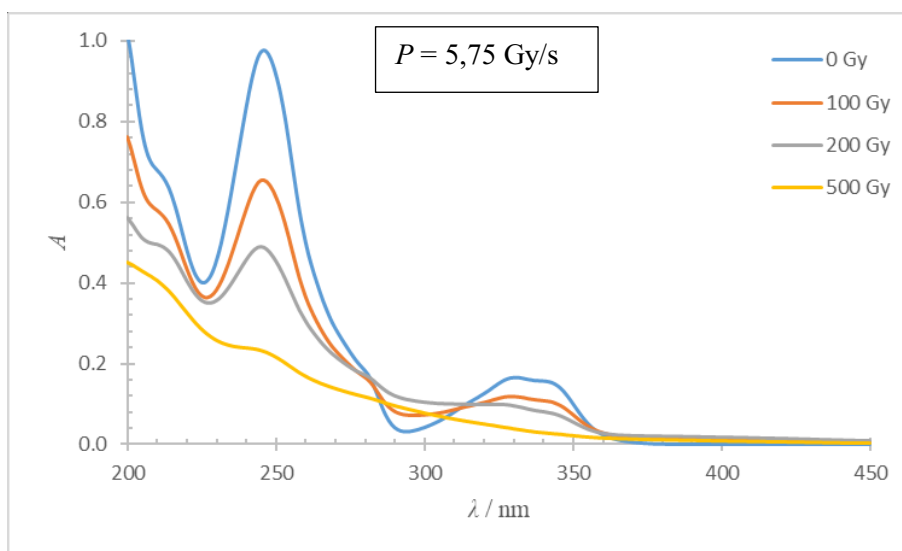
Slika 9. (HPLC) Razgradnja doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u ovisnosti o različitim brzinama zračenja.



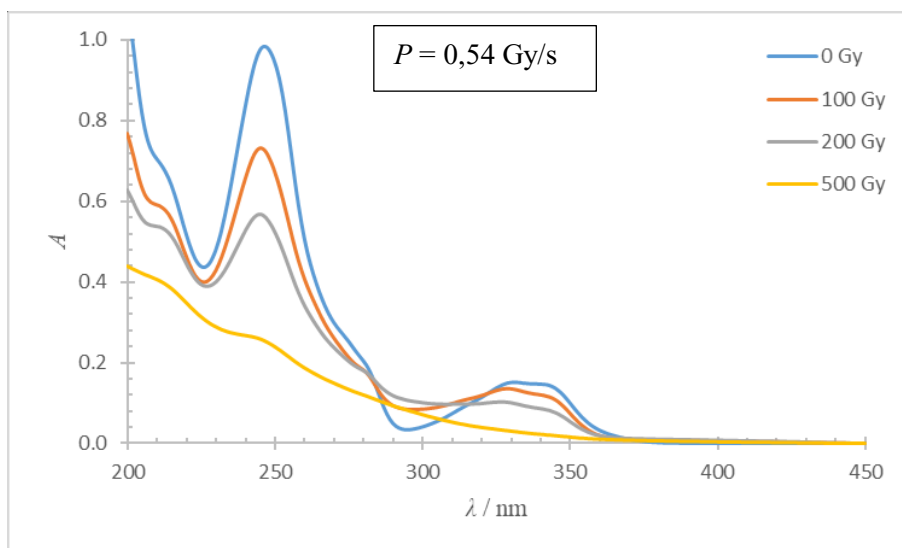
Slika 10. (CHROMGATE, HPLC) Kromatogrami razgradnje doksazosina u ravnoteži sa zrakom ($P = 0,54$ Gy/s).

Usporedbom uporabljenih brzina doza zračenja vidljivo je da je razgradnja doksazosina najbrža kod najveće primijenjene brzine doze gama-zračenja. Pri većim brzinama doza zračenja voda apsorbira veliku količinu energije. Količina energije koju apsorbiraju molekule vode u jedinici vremena raste s porastom brzine doze te su koncentracije slobodnih radikala veće što u konačnici može dovesti do veće brzine razgradnje doksazosina, uspoređujući najmanju i najveću primijenjenu brzinu doze zračenja.

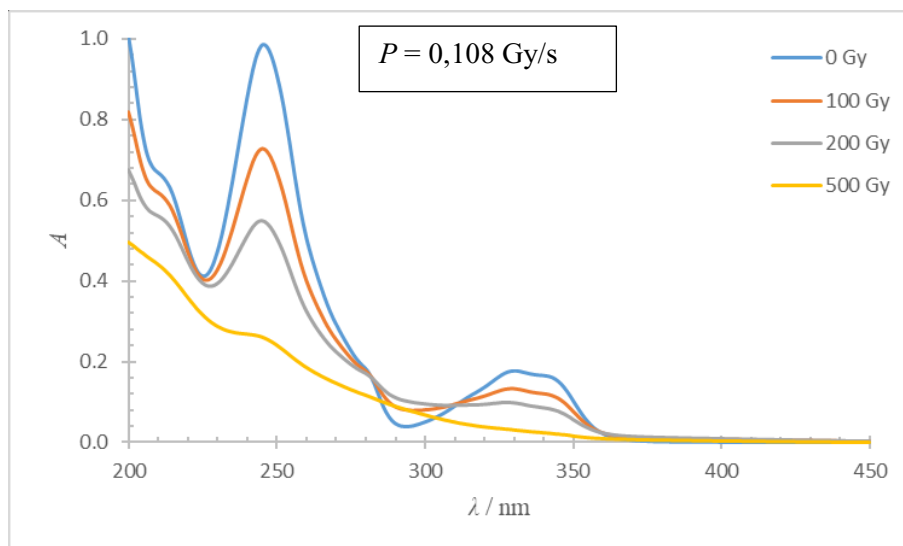
UV/VIS analiza je pokazala slične rezultate (Slika 11., Slika 12. i Slika 13.).



Slika 11. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja ($P = 5,75 \text{ Gy/s}$).

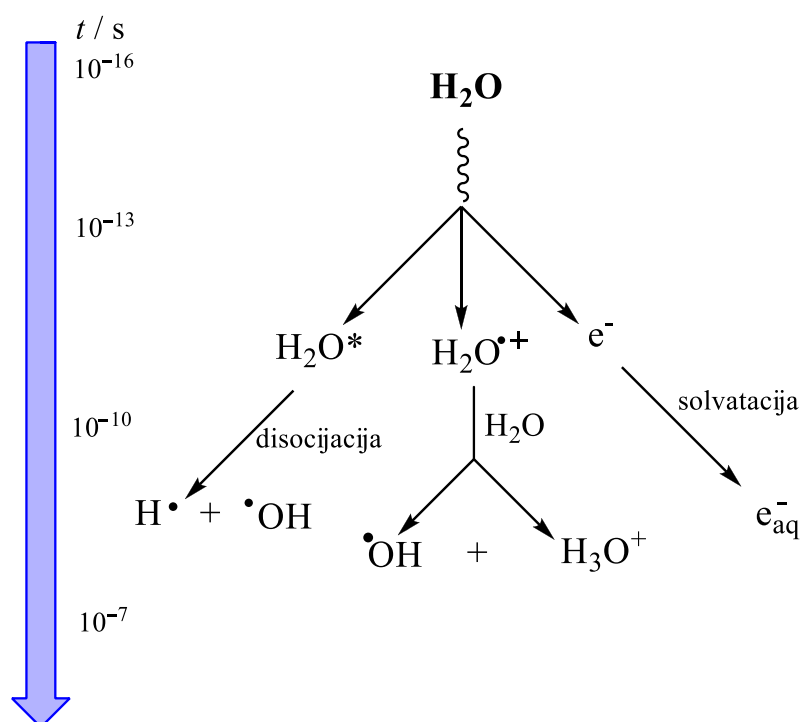


Slika 12. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).



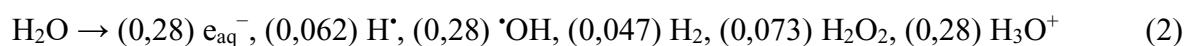
Slika 13. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja ($P = 0,108 \text{ Gy/s}$).

Izlaganje vodene otopine gama-zračenjem rezultira procesom radiolitičke disocijacije molekula vode (Slika 14.).



Slika 14. Radioliza vode [20].

Djelovanje ionizirajućeg zračenja nije specifično. Energija zračenja koja se primjenjuje u radijacijskoj kemiji veća je od energije ionizacije energije molekula sredine te je ionizacija sredine rezultat svake interakcije zračenja i određene tvari. Prilikom interakcije ionizirajućeg zračenja s razrijeđenim vodenim otopinama dolazi do ekscitacije i ionizacije molekula vode pri čemu dolazi do ion-molekulskih reakcija, reakcija disocijacije i solvatacije stvarajući različite radikale i molekulske vrste. Preciznije, u vremenu od 10^{-16} dolazi do ionizacije i elektronske ekscitacije molekule vode. Nastaje pozitivni radikal $\text{H}_2\text{O}^{+\bullet}$ koji u drugom koraku stupa u ion-molekula reakciju s drugom molekulom vode (10^{-14} s). Molekule vode u elektronski pobuđenom stanju podliježu disocijaciji, dok elektroni oslobođeni u prvoj reakciji solvatiraju u vremenu od 10^{-12} s. Radiolizom dolazi do izbijanja i odvajanja elektrona od iona te nastaju $\text{H}^\bullet$ (reducirajuća čestica), $^\bullet\text{OH}$ (oksidirajuća čestica) i odvojeni elektron koji udaljavanjem od svoga pripadnog iona difundira u otopini i postaje takozvani solvatizirani elektron (e_s^-). Ti procesi se odvijaju u vremenu od 10^{-7} s, a radioliza vode se može prikazati reakcijom napisanom u jednadžbi (2).



Prikazane brojne vrijednosti su radijacijsko kemijski prinosi (G) mjerne jedinice $\mu\text{mol/J}$ [2,20]. To je množina tvari koja nastaje, nestaje ili se kemijski mijenja apsorpcijom 1 džula energije u ozračenju tvari. Interakcijom s tim česticama, prikazanoj u jednadžbi (3) stabilne se molekule prevode u solvatizirane elektrone i veoma reaktivne radikale.

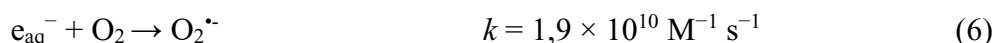
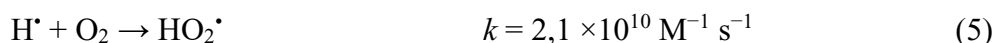


Ionizacijom i ekscitacijom okolnih molekula nastaju primarne čestice: pozitivni ioni, elektroni i pobuđene molekule, zajedničkim nazivom reaktivne (intermedijerne) čestice. Proces nakon prve ionizacije ne staje jer je novi izbačeni elektron sposoban dalje ionizirati i ekscitirati druge molekule stvarajući nove generacije sekundarnih elektrona. Kod radiolize vode, $^\bullet\text{OH}$ i e_{aq}^- su najučinkovitije reaktivne čestice za degradaciju zagađivala. Hidroksilni radikali ($^\bullet\text{OH}$) su jaki oksidansi standardnog elektrodnog potencijala od $E^\circ(^\bullet\text{OH}/\text{OH}^-) = 1,90$ V u neutralnoj otopini i $E^\circ(\text{H}^+/\text{H}_2) = 2,73$ V u kiselom mediju. Oni su sposobni reagirati sa spojevima izvlačenjem vodika iz C–H veze, adicijom na dvostruku vezu ili prijenosom elektrona [20,21]. Hidratizirani elektron (e_{aq}^-) je jaki reducens standardnog elektrodnog potencijala koji iznosi $E^\circ = -2,87$ V. Njegova reaktivnost raste s brojem elektron-odlazećih grupa vezanih na dvostruke veze ili aromatski prsten akceptora. Vodik

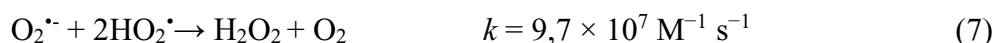
(H[•]) je bitan reducens samo u kiselom mediju ($E^\circ(\text{H}^+/\text{H}^\bullet) = -2,31 \text{ V}$). Jednadžba (4) prikazuje reakciju stvaranja [•]H [20].



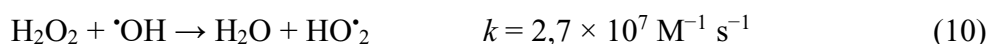
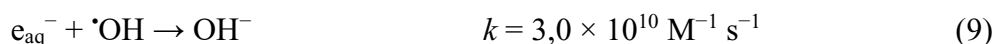
U uvjetima u ravnoteži sa zrakom, vodikovi atomi i hidratizirani elektroni reagiraju s kisikom, uklanjaju se iz sustava i nastaju perhidroksilni radikal (HO₂[•]) i superoksid radikal anion (O₂^{•-}) koji imaju nižu reaktivnost s organskim molekulama. Te reakcije prikazane su u jednadžbama (5) i (6) [22,23].



Upravo iz tog razloga su [•]OH generalno većinski dio reaktivnih čestica koje sudjeluju u degradaciji zagađivala u uvjetima zraka. Superoksid radikal anion reagira s perhidroksilnim radikalom ili s vodom i stvara vodikov peroksid. Reakcije stvaranja vodikovog peroksida prikazane u jednadžbama (7) i (8).



Pri višim dozama zračenja u reakcijama prikazanim u jednadžbama (9) i (10) [•]OH reagira s e_{aq}⁻ i s novonastalim H₂O₂ [23].



Radikali organskih spojeva se u prisutnosti kisika prevode u peroksilne radikale (ROO[•]), a reakcijom s superoksid radikalima (O₂^{•-}) i vodikovim peroksidom (H₂O₂) dolazi do kemijskog razaranja i u nekim slučajevima do mineralizacije zagađivala [24].

U vodenim otopinama u ravnoteži sa zrakom degradacija doksazosina se odvija poprilično brzo što dokazuje da uz [•]OH na razgradnju doksazosina nešto manji utjecaj imaju i O₂^{•-}/HO₂[•].

4.2. Utjecaj hvatača radikala na degradaciju doksazosina

Za razliku od drugih često upotrijebljenih AOP procesa (ozonacija i Fentonova oksidacija) radiolizom vode, i reducirajuće ($H^\bullet$, e_{aq}^-) i oksidirajuće ($^{\bullet}OH$) reaktivne vrste simultano nastaju u gotovo jednakim koncentracijama. Za potrebe proučavanja utjecaja pojedinih reaktivnih čestica, pojedini radikali se mogu ukloniti iz sustava. Takvi uvjeti se mogu ostvariti na nekoliko različitih načina:

- a) interkonverzijom primarnih radikala u jednu vrstu,
- b) pretvaranjem svih primarnih radikala u jednu vrstu sekundarnih radikala,
- c) uklanjanjem neželjenih primarnih radikala da se formira relativno inertni sekundarni radikal.

Na taj način tijekom radiolize vode moguće je kontrolirano generirati radikale točno poznatih koncentracija za proučavanje kinetike slobodnih radikala u vodenoj otopini primjenom principa i načela radijacijske kemije [20]. Za proučavanje utjecaja određenih reaktivnih čestica na degradaciju doksazosina, prije zračenja otopina je propuhana s N_2O ili N_2 , a dobiveni rezultati su uspoređeni s uvjetima u ravnoteži sa zrakom.

4.2.1. Degradacija doksazosina u N_2O uvjetima

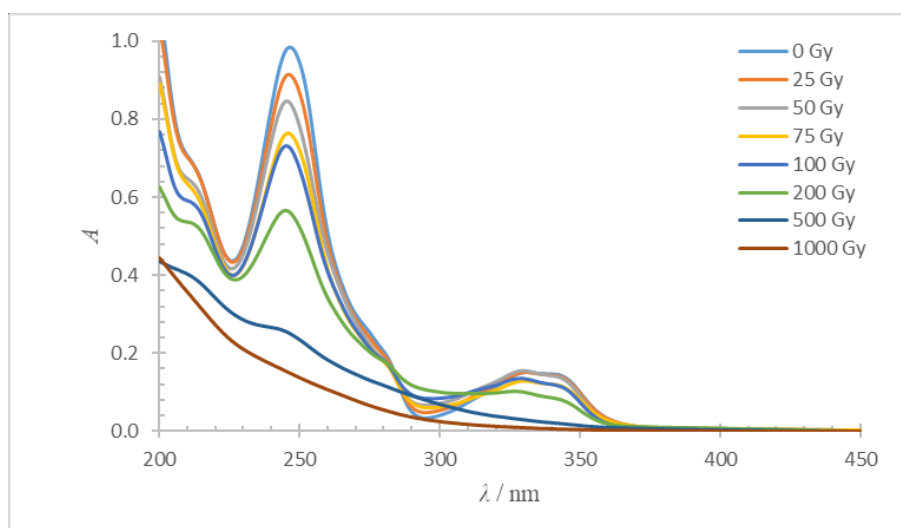
S obzirom da je $^{\bullet}OH$ oksidans, za dobivanje oksidacijskih uvjeta potrebno je prevesti svu količinu e_{aq}^- u $^{\bullet}OH$. Hvatači elektrona (engl. *Scavengers*) su primarno spojevi koji sudjeluju u reakcijama adicije elektrona. Najčešće korištena i veoma pouzdana metoda za tu pretvorbu je propuhivanje vodene otopine s N_2O . Reakcija je prikazana jednadžbom (11) [20,23,25].



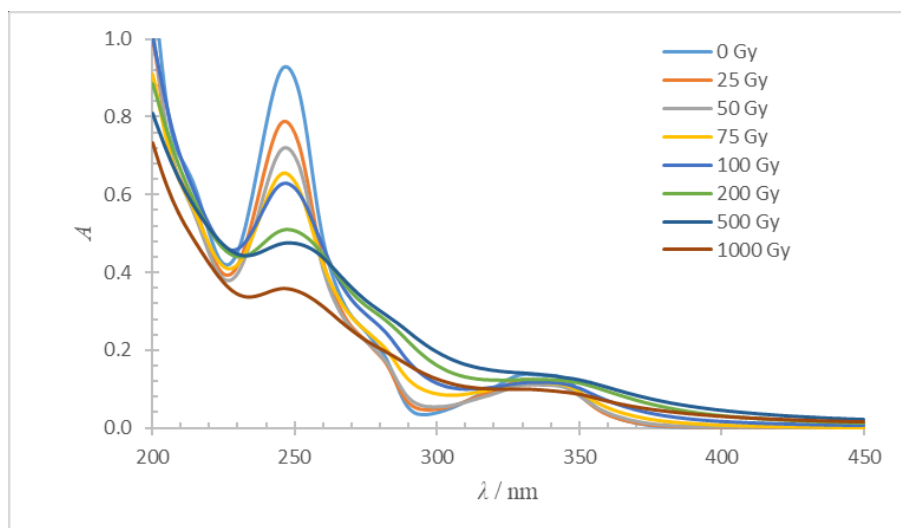
Pod tim uvjetima pretvorba e_{aq}^- u $O^{\bullet -}$ se odvija u vremenu od približno 15 ns, ali poluživot njihovog protoniranja je oko 8 ns. Da bi se završila cijela pretvorba e_{aq}^- u $^{\bullet}OH$ potrebno je otprilike 40 ns. Tu činjenicu uzimamo u obzir kada bismo u kojim uvjetima ćemo raditi jer pretvorba u $^{\bullet}OH$ mora biti završena prije nego što krene ciljana reakcija. $H^\bullet$ jako sporo reagira s N_2O ($k = 2.1 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) tako da je većina radikala prisutna u N_2O -zasićenoj otopini zapravo $^{\bullet}OH$ [20]. $^{\bullet}OH$ se ponašaju kao elektrofilu u reakcijama s organskim spojevima i imaju tendenciju adicije na nezasićene dvostruke veze benzenskih prstena. Time razbijaju strukturu aromatskog prstena i stvaraju se karboksilne kiseline, aldehidi i ostali

intermedijeri u otopini [16]. S obzirom da doksazosin u svojoj strukturi sadrži dva benzenska prstena, pretpostavka je da će $\cdot\text{OH}$ imati značajan utjecaj kod njegove degradacije.

Pri nižim dozama razgradnja doksazosina u N_2O uvjetima je primjetno brža. U usporedbi s uvjetima zraka (Slika 15.) pri kojoj je postotak degradacije doksazosina na 200 Gy bio 43 %, u prisutnosti N_2O doksazosin se degradirao 48 % (slika 16.).



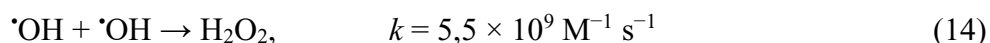
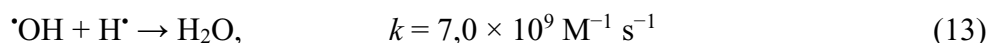
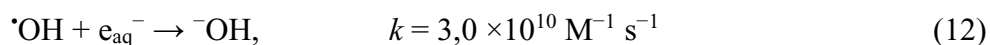
Slika 15. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u ravnoteži sa zrakom ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).



Slika 16. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u N_2O uvjetima ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

Kada se vodena otopina propuhuje s N₂O, radijacijsko-kemijski prinos $\cdot\text{OH}$ je 0,55 $\mu\text{mol/J}$ (u uvjetima zraka je 0,28) i hidroksilni radikali su glavne reaktivne čestice, s obzirom da se sav e_{aq}^- preveo u $\cdot\text{OH}$ [25].

Međutim, pri dozama od 500 i 1000 Gy primjećena je brža razgradnja u uvjetima u ravnoteži sa zrakom. Razlog tome su reakcije rekombinacije gdje $\cdot\text{OH}$ reagiraju s e_{aq}^- , $\text{H}^\cdot$ i $\cdot\text{OH}$ što rezultira smanjenju koncentracije efektivnih radikala. Te reakcije prikazane su jednadžbama (12), (13) i (14) [15,13].

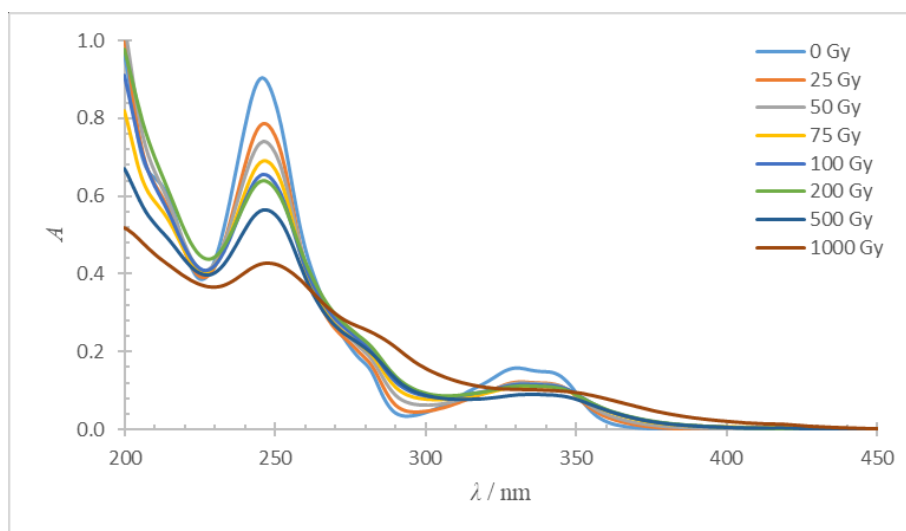


Do 500 Gy zračenja u području od 280 do 320 nm primjećeno je povećanje apsorbancije što ukazuje na prisutnost nekih produkata nastalih dekompozicijom doksazosina. Novonastali produkti mogu biti spojevi cikloheksadienilnog tipa nastalih kao rezultat adicije hidroksilnih radikala na aromatsku jezgru [21,26].

Pri višim dozama apsorbancija se u tom području znatno smanjila što ukazuje na njihovu degradaciju. U N₂O uvjetima razgradnja doksazosina je brža u usporedbi s uvjetima zraka jer su za razgradnju zagađivala $\cdot\text{OH}$ efikasniji od $\text{O}_2^{\cdot-}/\text{HO}_2^\cdot$ [23].

4.2.2. Degradacija doksazosina u N₂ uvjetima

Uvjeti bez prisutnosti zraka postižu se propuhivanjem vodene otopine s N₂ i pod tim uvjetima glavne reaktivne vrste su e_{aq}^- i $\cdot\text{OH}$. Radijacijsko kemijski prinos u anaerobnim uvjetima je 0,28 $\mu\text{mol/J}$ za e_{aq}^- i 0,27 $\mu\text{mol/J}$ za $\cdot\text{OH}$ i doksazosin se sporije razgrađuje u usporedbi s uvjetima u ravnoteži sa zrakom. Dobiveni rezultati se mogu pripisati međusobnim reakcijama između primarnih čestica nastalih radiolizom vode, e_{aq}^- i $\cdot\text{OH}$ (jednadžba 12) čime je onemogućena reakcija s doksazosinom. Također, razgradnja je sporija jer e_{aq}^- radikali imaju slabiji utjecaj na razgradnju doksazosina od $\cdot\text{OH}$ [15,23]. Slika 17. prikazuje UV/VIS spektre degradacije doksazosina u N₂-zasićenoj otopini.



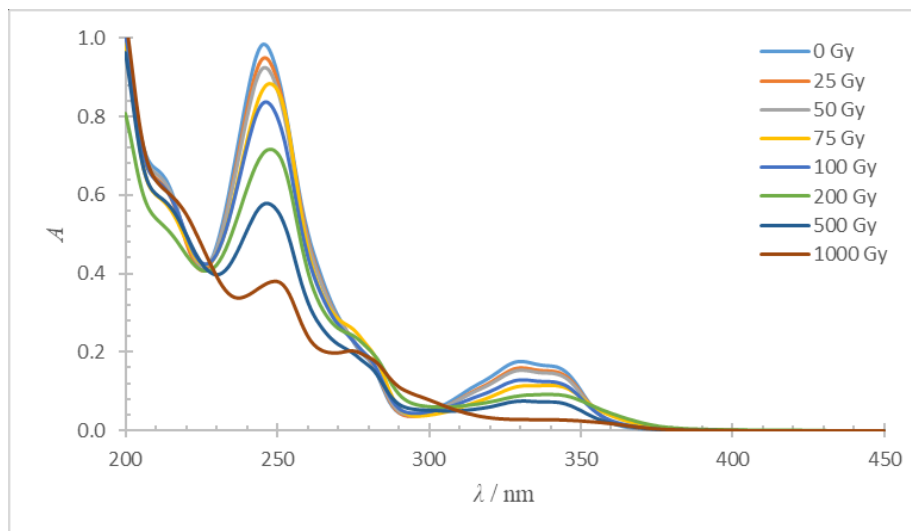
Slika 17. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u N₂ uvjetima ($P = 0,54$ Gy/s).

Osim razlike u kinetici razgradnje, vidljiva je i razlika u porastu apsorbancije u području od 280 do 320 nm. U N₂O uvjetima se nakon doze od 500 Gy vidi značajan pad apsorbancije (Slika 16.), što u N₂ uvjetima nije primijećeno, odnosno nema degradacije novonastalih produkata. S obzirom da su u N₂ uvjetima e_{aq}^- i $\cdot OH$ glavni reaktanti, za proučavanje reakcija s e_{aq}^- potrebno je iz sustava ukloniti $\cdot OH$. To se može postići dodavanjem metanola, 2-propanola, *tert*-butanola ili tiouree koji efikasno uklanjaju $\cdot OH$ [2]. 2-propanol je jaki hvatač H[•] i $\cdot OH$, stoga vodena otopina koja u sebi sadrži 2-propanol kao hvatače radikala omogućuje prisutnost samo jedne reaktivne čestice, e_{aq}^- za proučavanje moguće reakcije s doksazosinom [23].

Reakcijama 2-propanola s $\cdot OH$ i H[•] prikazanim u jednadžbama (15) i (16) stvara se relativno neaktivan radikal $\cdot CH_2CCH_3OH$ [2,23].

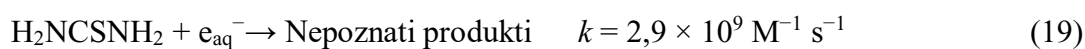
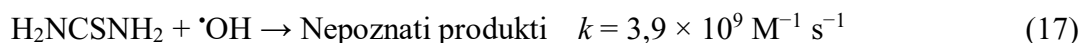


Kao što je i bilo za očekivati, u uvjetima bez kisika i $\cdot\text{OH}$ degradacija doksazosina pod utjecajem gama-zračenja je bila sporija. U ovim uvjetima pri 100 Gy se uzorak razgradio tek 12 % (Slika 18.), u anaerobnim uvjetima 19 % (Slika 17.), u ravnoteži sa zrakom 29 % (Slika 14.), a u N_2O uvjetima (Slika 16.) se razgradio 36 %.

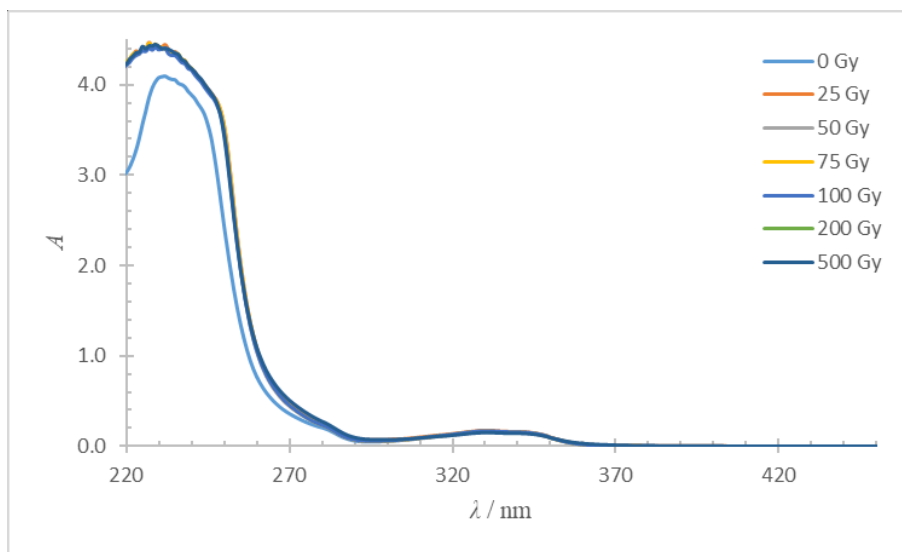


Slika 18. UV/VIS spektar degradacije doksazosina u N_2 + 2-propanol uvjetima ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

Tiourea je poznata kao najjači hvatač $\cdot\text{OH}$, $\text{H}^\bullet$ i e_{aq}^- stoga je za očekivati da će u tim uvjetima degradacija doksazosina pod utjecajem gama-zračenja teći najsporije. Jednadžbe (17), (18) i (19) prikazuju reakcije tiouree s $\cdot\text{OH}$, $\text{H}^\bullet$ i e_{aq}^- [2,16].

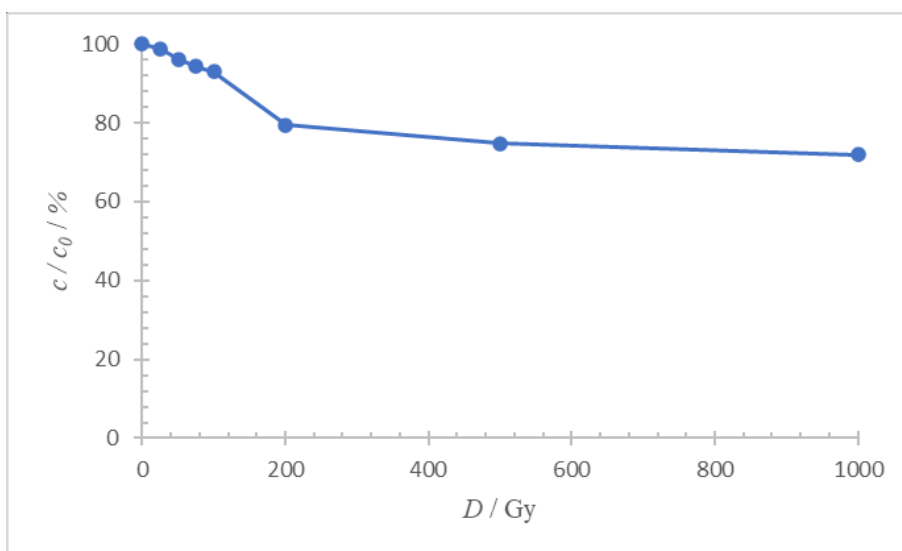


Rezultati su to potvrdili. S obzirom da tiourea apsorbira svjetlost u istom području kao i doksazosin, apsorpcijski spektri im se preklapaju (Slika 19.).



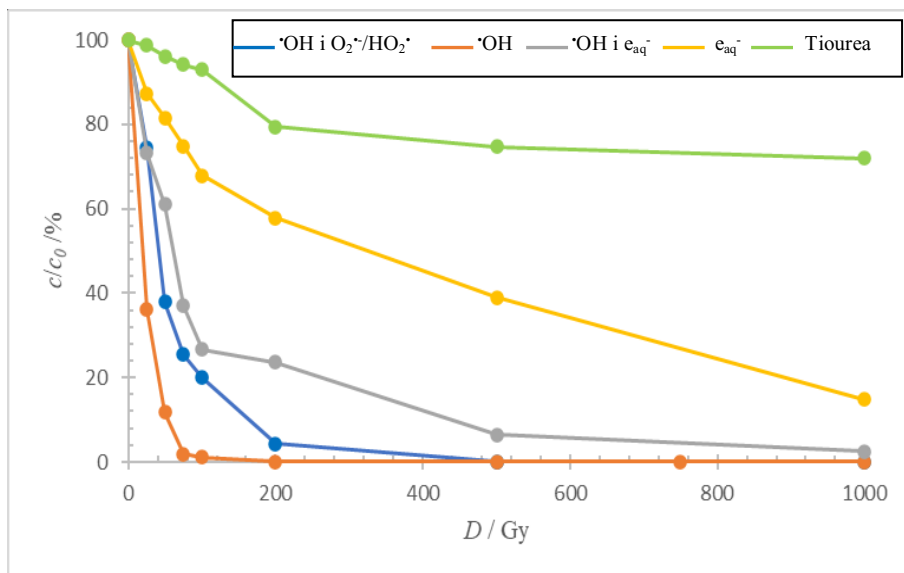
Slika 19. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina u N_2 + tiourea uvjetima dozama do 1000 Gy ($P = 0,54$ Gy/s).

Međutim iz kromatografskih rezultata (Slika 20.) ovisnosti postotka degradacije o dozi zračenja vidljiva je iznimno spora razgradnja doksazosina u prisutnosti tiouree. Nakon 100 Gy doksazosin se tek 7 % razgradio, a kod doze od 1000 Gy nakon koje doksazosin u ostalim uvjetima gotovo posve degradira, ovdje se tek 28 % razgradio.



Slika 20. (HPLC) Degradacija doksazosina u N_2 + tiourea uvjetima ($P = 0,54$ Gy/s). Doze zračenja od 0, 25, 50, 75, 100, 200, 500 i 1000 Gy.

Uspoređujući sve uvjete za analizu utjecaja hvatača radikala (Slika 21.) može se zaključiti da su $\cdot\text{OH}$ glavne reaktivne vrste odgovorne za degradaciju doksazosina. Efikasnost razgradnje doksazosina u ovisnosti o prisutnim radikalima opada u nizu: $\cdot\text{OH} > \cdot\text{OH} \text{ i } e_{\text{aq}}^- > e_{\text{aq}}^-$.

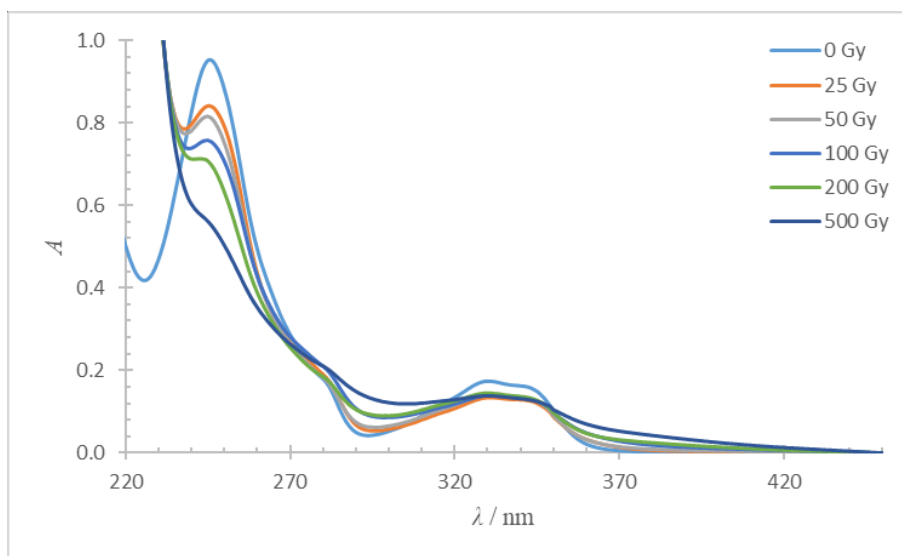


Slika 21. (HPLC) Degradacija doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u prisustvu različitih radikala ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

4.3. Radiolitička razgradnja doksazosina u prisutnosti anorganskih iona

Prirodne i otpadne vode su smjese brojnih anorganskih soli kao što kloridi, nitrati, nitriti, karbonati, hidrogenkarbonati i sulfati. Uz organske spojeve, anorganski anioni također mogu utjecati na radiolitičku degradaciju farmaceutika kompeticijom s nastalim radikalnim česticama. Što je veća koncentracija anorganskih aniona, stopa degradacije je manja. Uspoređujući neke od najčešće prisutnih aniona, nitritni ion (NO_2^-) je najučinkovitiji hvatač $\cdot\text{OH}$, a ostali su redom NO_3^- , CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} i HCO_3^- ioni [2,16,23,27]. Dodavanjem određenih anorganskih soli u vodenu otopinu moguće je identificirati vrstu radikala koja je najviše odgovorna za radiolitičku dekompoziciju određenog organskog zagađivala.

Za ispitivanje utjecaja anorganskih soli, standardnoj otopini su dodani NO_3^- , HCO_3^- i HPO_4^{2-} ioni. Iako NaNO_3 apsorbira svjetlost u sličnom području kao doksazosin, apsorpcijski spektri im se nisu preklapali (Slika 22.).



Slika 22. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina u $\text{N}_2 + \text{NaNO}_3$ uvjetima ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

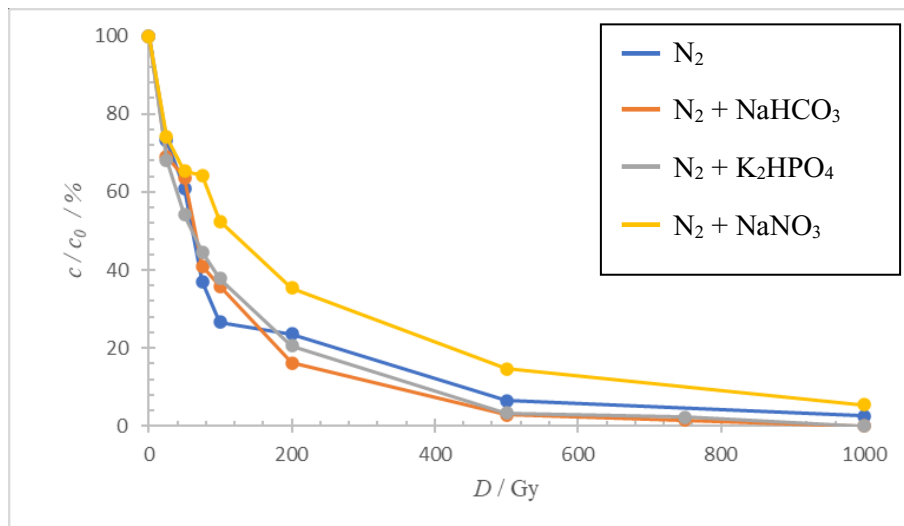
Kromatografska mjerenja su pokazala da je u N_2 -zasićenoj otopini u kombinaciji NO_3^- iona pri dozi zračenja od 200 Gy degradirano 65 % doksazosina, što je puno sporije u usporedbi sa uvjetima zraka (96 %) i anaerobnim uvjetima (76 %). Međutim to je još uvijek puno brža degradacija u usporedbi s N_2 uvjetima u kombinaciji s 2-propanolom (42 %) i tioureom (tek 21 %). NO_3^- ioni su hvatači $\text{H}^\bullet$, $^\bullet\text{OH}$, ali najviše e_{aq}^- , što je prikazano jednadžbom (20). U jednadžbi (21) prikazana je reakcija NO_3^- s H^+ , pri čemu nastaje HNO_3 koja smanjuje koncentraciju $^\bullet\text{OH}$ i $\text{H}^\bullet$ i samim time usporava razgradnju doksazosina [2,23].



HPO_4^{2-} i HCO_3^- su imali nešto slabiji utjecaj na razgradnju doksazosina. Kao jaki hvatači $^\bullet\text{OH}$ u N_2 -zasićenoj otopini njihova prisutnost je rezultirala malo sporijom razgradnjom. Jednadžbe (22) i (23) prikazuju reakcije HCO_3^- i HPO_4^{2-} s $^\bullet\text{OH}$ [2,16,28].

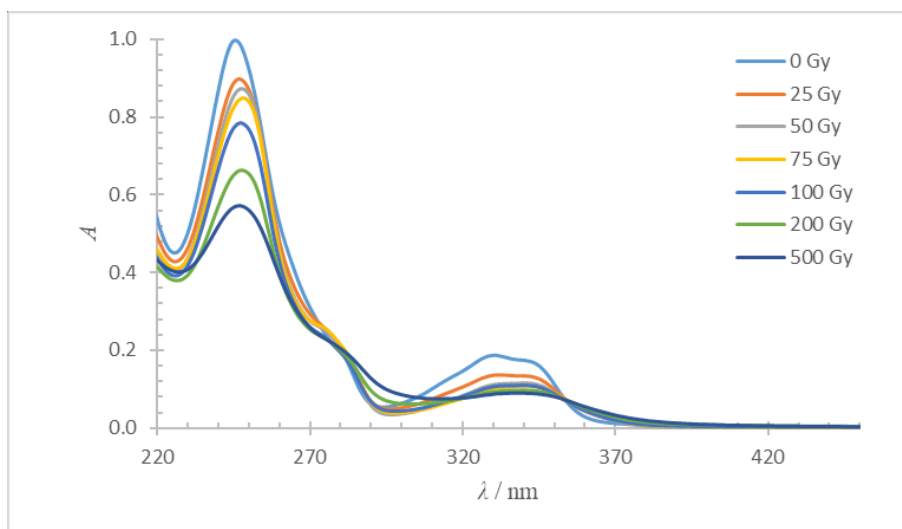


Iako se pri 100 Gy u oba uvjeta degradacija doksazosina odvijala sporije nego u anaerobnim uvjetima (Slika 17.), nakon 200 Gy razgradnja je bila brža (HPO_4^{2-} 79 % i HCO_3^- 84 %). Slika 23. prikazuje usporedbu svih anaerobnih uvjeta.

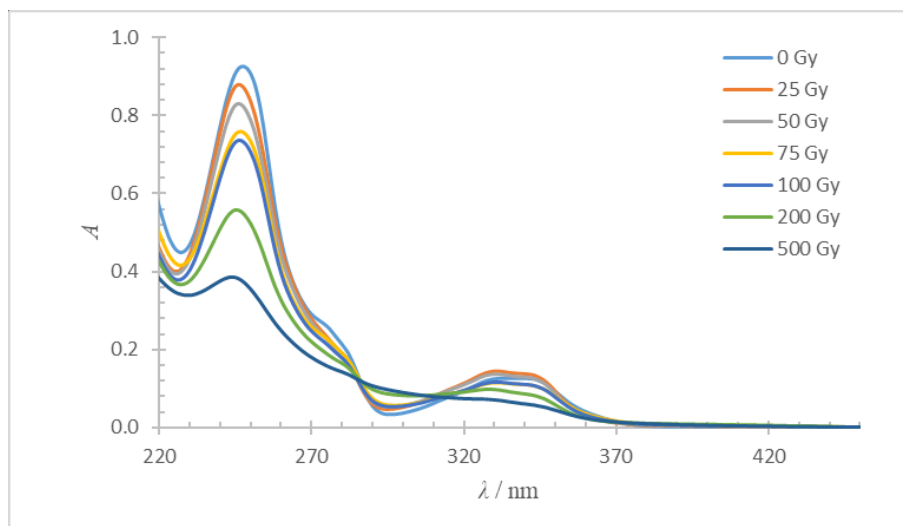


Slika 23. (HPLC) Utjecaj anorganskih aniona na degradaciju doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u anaerobnim uvjetima ($P = 0,54$ Gy/s).

Za HCO_3^- (Slika 24.) UV/VIS analiza je dala podosta slične rezultate. Pri nižim dozama zračenja razgradnja doksazosina je sporija u prisutnosti HCO_3^- iona u usporedbi s anaerobnim uvjetima (Slika 17.), ali se pri višim dozama zračenja doksazosin degradirao brže. Međutim, kod HPO_4^{2-} (Slika 25.) UV/VIS analiza pokazuje da je degradacija sporija i pri višim dozama zračenja.



Slika 24. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina u $\text{N}_2 + \text{NaHCO}_3$ uvjetima ($P = 0,54$ Gy/s).



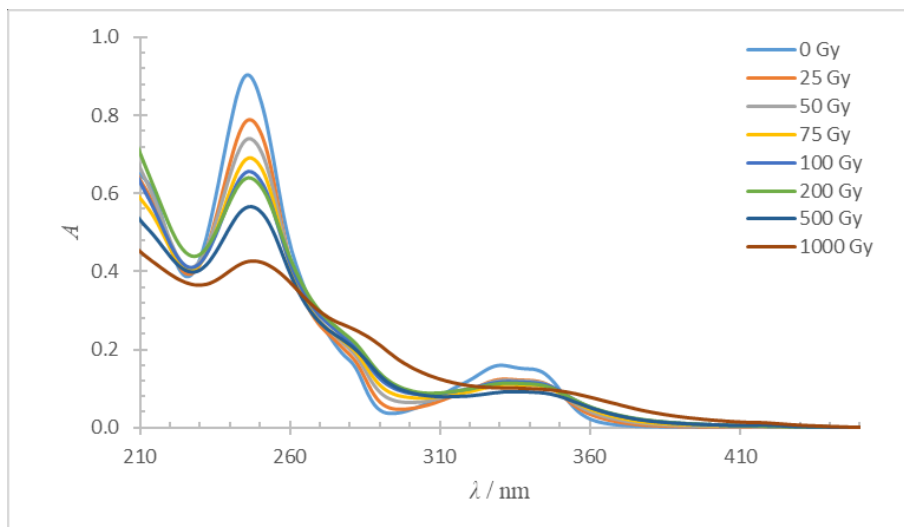
Slika 25. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina u $N_2 + K_2HPO_4$ uvjetima ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

4.4. Utjecaj vodenog matriksa na degradaciju doksazosina

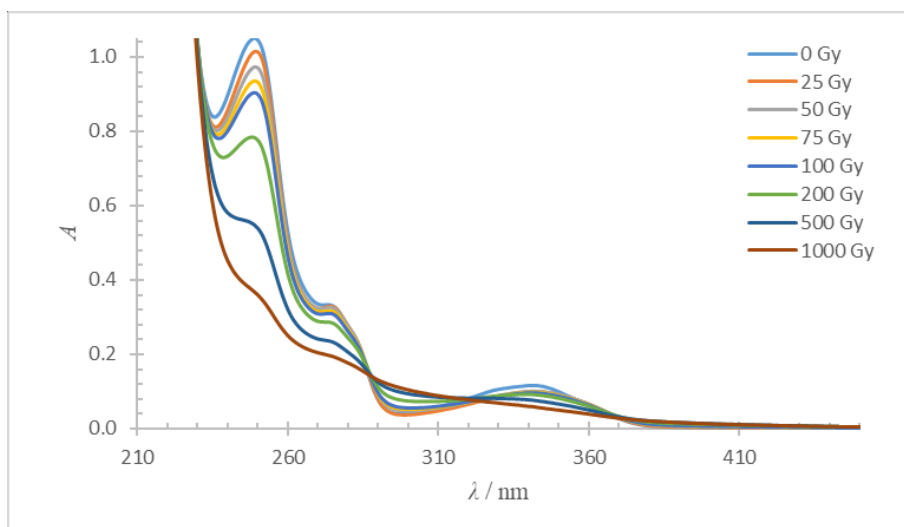
Mnoga istraživanja upućuju da različite organske i anorganske komponente poput soli kao što su NO_3^- , CO_3^{2-} , SO_4^{2-} , huminske kiseline koje se nalaze otopljene u vodama, mogu utjecati na efikasnost radiolitičke degradacije određenog zagađivala [16,27].

Ispitan je utjecaj vodenog matriksa na razgradnju doksazosina. Uzorci u ultračistoj i bunarskoj vodi sadržavali su jednake koncentracije doksazosina, propuhivani su s N_2 i ozračeni rasponom doza od 25 do 1000 Gy. Rezultati su pokazali da je razgradnja doksazosina u bunarskoj vodi bila znatno sporija, što je bilo za očekivati s obzirom da su prethodno ispitani utjecaji potencionalno prisutnih anorganskih soli (HCO_3^- , HPO_4^{2-} , NO_3^-) također imali sličan efekt unatoč pojedinačnom ispitivanju iona, a ne smjese iona. Razlog tome su reakcije između nastalih $\cdot OH$ i organskih i anorganskih spojeva prisutnih u matriksu. Time se smanjuje koncentracija $\cdot OH$ odgovornih za razgradnju doksazosina [27].

Slike 26. i 27. prikazuju UV/VIS spektre razgradnje doksazosina u ultračistoj i bunarskoj vodi.

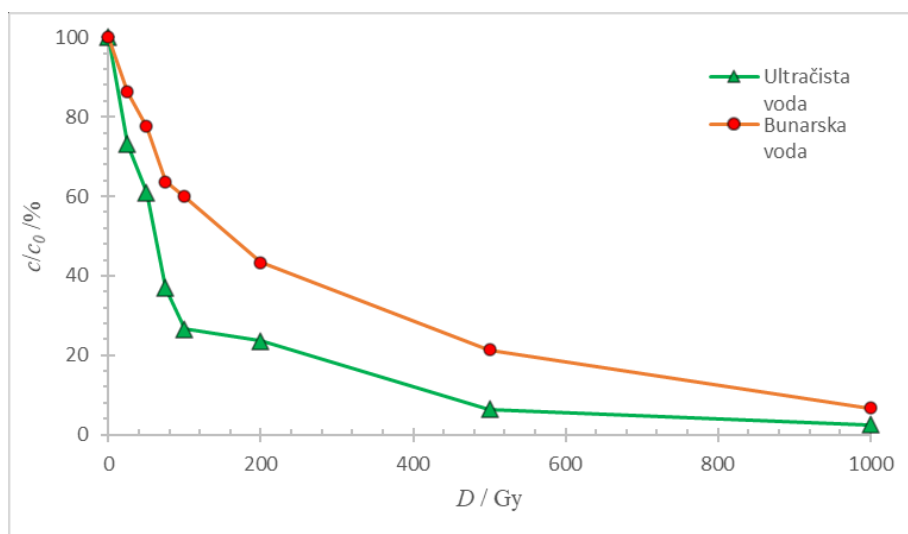


Slika 26. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u ultračistoj vodi ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

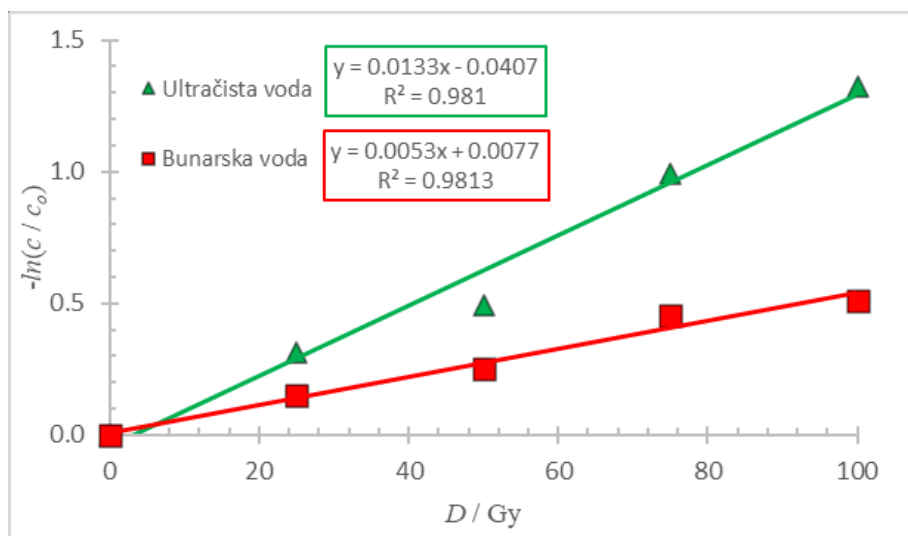


Slika 27. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u bunarskoj vodi ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

Slike 28. i 29. prikazuju kromatografske rezultate razgradnje doksazosina u ultračistoj i bunarskoj vodi.



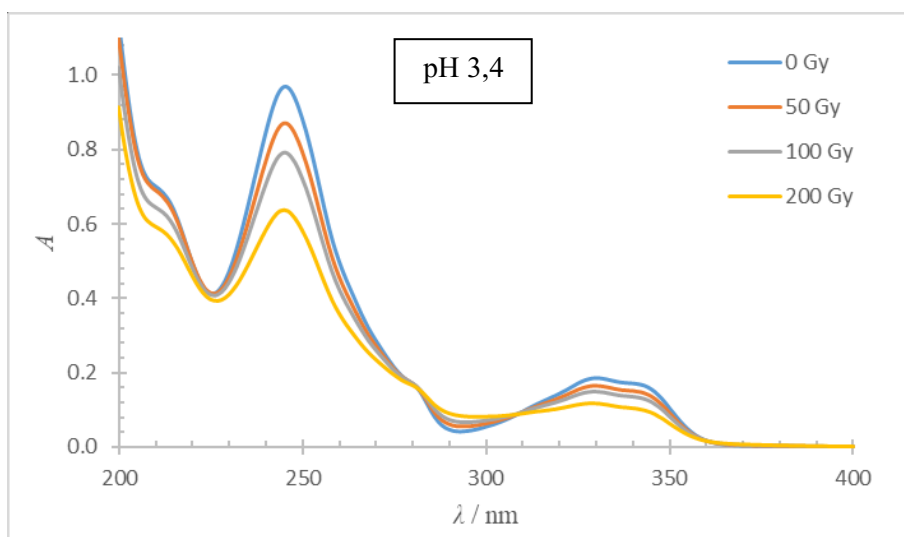
Slika 28. (HPLC) Razgradnja doksazosina u ovisnosti o vrsti vodenog matriksa ($P = 0,54$ Gy/s).



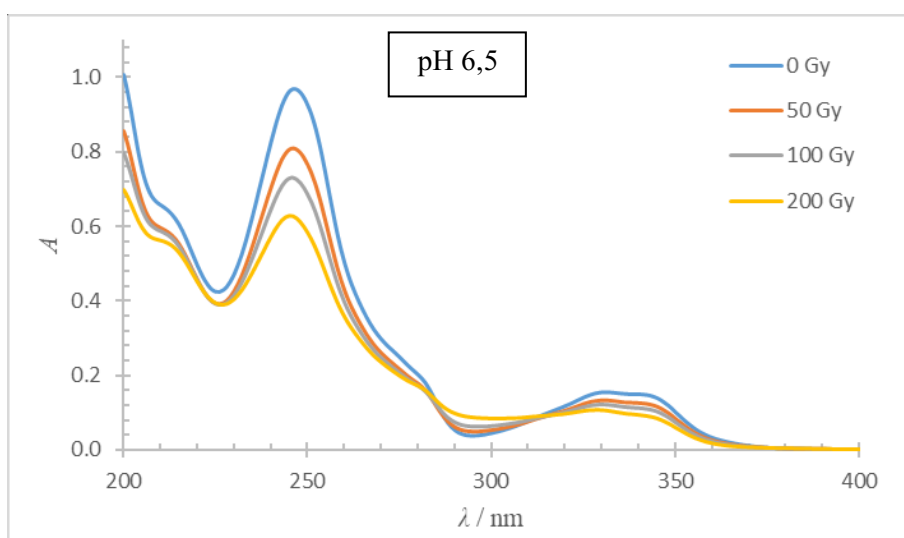
Slika 29. (HPLC) Kinetika razgradnje doksazosina u ovisnosti o vrsti vodenog matriksa ($P = 0,54$ Gy/s).

4.5. Utjecaj pH vrijednosti na degradaciju doksazosina

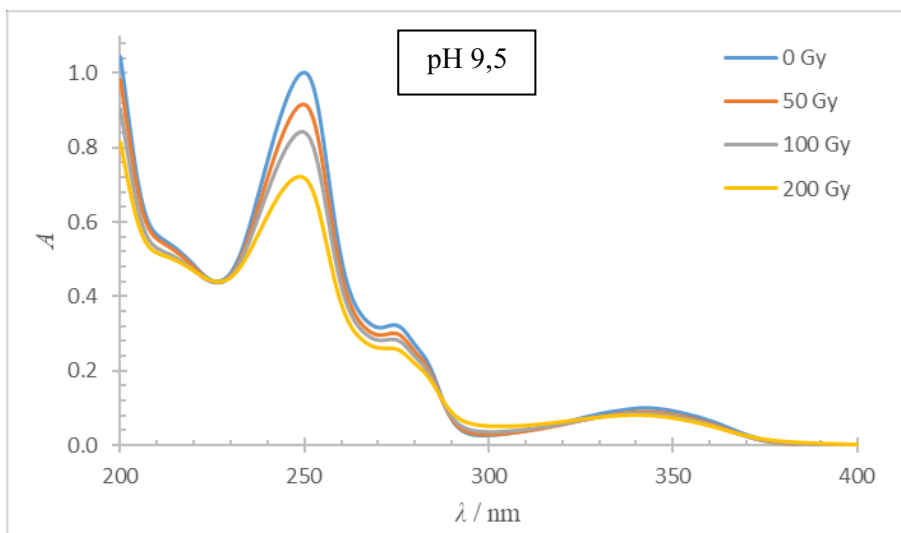
Radijacijsko kemijski prinosi reaktivnih čestica ovise o pH otopine u kojima se odvija proces radiolize. Ozračivanje vodenih otopina doksazosina je provedeno pri pH 3,4, 6,5 i 9,5, dozama zračenja od 50, 100 i 200 Gy. Dobiveni UV/VIS rezultati pokazali su da je razgradnja doksazosina bila najbrža pri pH 6,5, a najsporija pri pH vrijednosti od 9,5 (Slike 30., 31. i 32.).



Slika 30. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja pri pH 3,4 ($P = 0,54$ Gy/s).

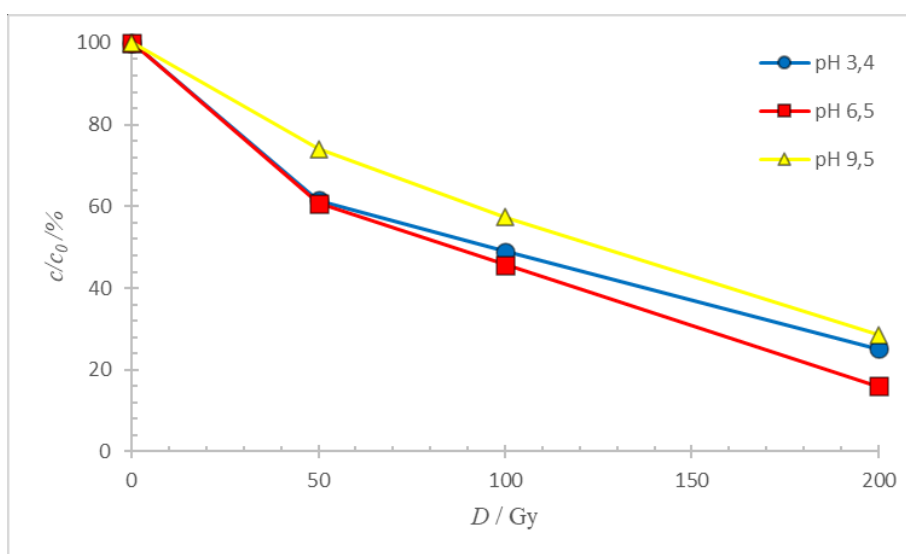


Slika 31. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja pri pH 6,5 ($P = 0,54$ Gy/s).



Slika 32. UV/VIS spektri razgradnje doksazosina pod utjecajem gama-zračenja pri pH 9,5 ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

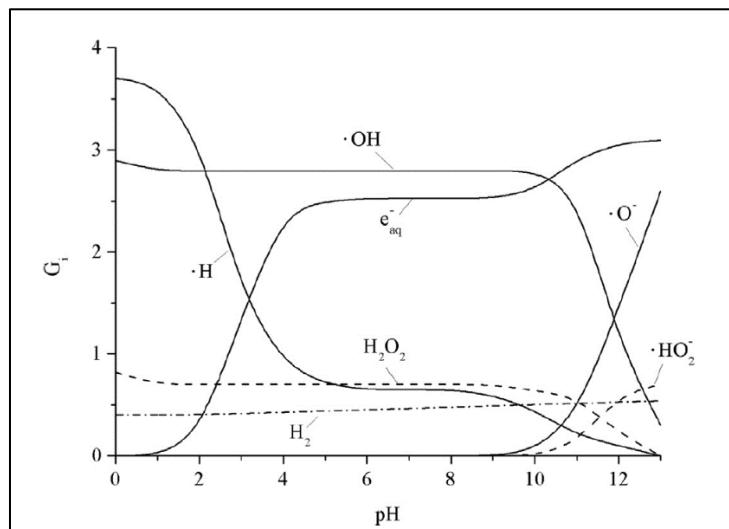
HPLC analizom (Slika 33.) potvrđeni su prethodno dobiveni UV/VIS rezultati. Pri pH 9,5 doksazosin se nakon doze zračenja od 200 Gy razgradio 71 %. Nešto brža razgradnja od 75 % bila je pri pH 3,4, a pri pH vrijednosti od 6,5 doksazosin se razgradio 84 %.



Slika 33. (HPLC) Razgradnja doksazosina pod utjecajem gama-zračenja u ovisnosti o različitim pH vrijednostima ($P = 0,54 \text{ Gy/s}$).

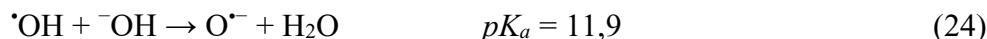
Iz dobivenih rezultata može se uočiti da se doksazosin najefikasnije razgrađuje u približno neutralnim vodenim otopinama. Bitna činjenica je da se s promjenom pH vrijednosti mijenjaju G-vrijednosti pojedinih reaktivnih čestica prisutnih u vodenoj otopini.

Slika 34. prikazuje utjecaj pH na radijacijsko kemijski prinos reaktivnih čestica nastalih radiolizom vode.

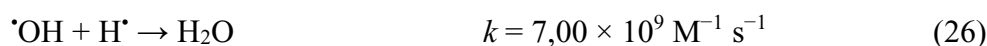
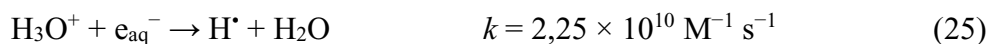


Slika 34. Utjecaj pH vodene otopine na radijacijsko kemijski prinos primarnih produkata radiolize vode [16].

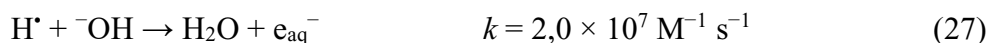
Pri višim pH vrijednostima, posebice iznad pH 10, $\cdot\text{OH}$ se prevode u manje reaktivne vrste $\text{O}^{\cdot-}$ što je prikazano u jednadžbi (24). Rezultat te reakcije jest sporija razgradnja koja se primjećuje već i kod pH 9,5. Ovime je još jednom dokazano da $\cdot\text{OH}$ igraju najveću ulogu kod razgradnje doksazosina.



U iznimno kiselim uvjetima preferirana je reakcija (25) zbog koje se G-vrijednost e_{aq}^- drastično smanjuje i povećava se radijacijsko kemijski prinos $\text{H}^\cdot$. S obzirom da je pri pH 3,4 razgradnja bila sporija, može se zaključiti da $\text{H}^\cdot$ imaju mali utjecaj na razgradnju doksazosina. Povećanjem njihove koncentracije $\text{H}^\cdot$ teže reakciji rekombinacije koja je prikazana u jednadžbi (26). Time smanjuju koncentraciju $\cdot\text{OH}$ u uvjetima zraka, što dodatno usporava razgradnju.



U neutralnijim otopinama u rasponu od pH 6–8 $\text{H}^\cdot$ reagiraju s ${}^-\text{OH}$ povećavajući koncentraciju e_{aq}^- radikala, što objašnjava bržu razgradnju pri pH vrijednosti od 6,5. Ta reakcija prikazana je jednadžbom (27) [2,17,27].



5. Zaključak

Gama-zračenje pokazalo se izrazito učinkovitim za razgradnju doksazosina u vodenoj otopini. Na uspješnost degradacije doksazosina pod utjecajem gama-zračenja utjecali su brojni faktori. Zračenje uzorka većom dozom gama-zračenja rezultiralo je većom razgradnjom, a primjenom većih brzina doza gama-zračenja razgradnja doksazosina se odvijala brže. Propuhivanjem vodene otopine doksazosina s N_2O i N_2 te dodavanjem 2-propanola i tiouree ispitivali su se utjecaji pojedinih reaktivnih čestica. Najučinkovitija razgradnja doksazosina bila je u N_2O uvjetima pa se može zaključiti da su $\cdot OH$ glavne reaktivne vrste odgovorne za degradaciju doksazosina. S druge strane, prisutnost tiouree kao jakog hvatača $\cdot OH$, $H\cdot$ i e_{aq}^- radikala u anaerobnim uvjetima najviše je usporavala degradaciju doksazosina. Utjecaj prisutnosti anorganskih iona dodavanjem $NaNO_3$, K_2HPO_4 i $NaHCO_3$ u vodenu otopinu doksazosina rezultiralo je primjetno sporijom razgradnjom. Za usporedbu utjecaja vodenog matriksa na degradaciju doksazosina uz ultračistu, korištena je i bunarska voda. Razne anorganske i organske komponente, kao što je huminska kiselina u bunarskoj vodi, rezultirale su sporijom razgradnjom doksazosina u usporedbi s ultračistom vodom. Za učinkovitu razgradnju doksazosina optimalna pH vrijednost je u neutralnom, blago kiselom području, dok je pri izrazito kiselim i baznim uvjetima razgradnja bila slabija.

Efikasna razgradnja doksazosina u različitim eksperimentalnim uvjetima već pri primijenjenim nižim dozama gama-zračenja ukazuje na činjenicu da je gama-zračenje obećavajući proces za uklanjanje farmaceutika iz otpadnih voda.

6. Literaturna vrela

1. M. Torun, Ö. Gültekin, D. Şolpan, O Güven, *Environ. Technol.*, 36 (2015), 970-982.
2. J. Wang, R. Zhuan, L. Chu, *Science of the Total Environment* 646 (2019), 1385-1397.
3. M. Periša, S. Babić, *Kem. Ind.*, 65 (2016), 471-482.
4. K. Kümmerer, *Annu. Rev. Environ. Resourc.*, 35 (2010), 57-75.
5. I. Tartaro Bujak, M. Bavcon-Kralj, D. S. Josyakov, N. V. Ul'yanovskii, A. T. Lebedev, P. Trebše, *Science of the Total Environment*, 740 (2020) 1-8.
6. K. Fent, *Pharmaceuticals in the Environment*, (2008), 175-203.
7. <https://medicalstore.com.pk/product/cardura-tablet-4-mg-2x10s/>, 17.7.2021.
8. https://ncit.nci.nih.gov/ncitbrowser/ConceptReport.jsp?dictionary=NCI_Thesaurus&version=21.08e&ns=ncit&code=C61737&key=n122570733&b=1&n=null, 14.7.2021.
9. <https://www.plivazdravlje.hr/bolest-clanak/bolest/30/Benigna-hiperplazija-prostate.html>, 14.7.2021.
10. <https://medlineplus.gov/druginfo/meds/a693045.html>, 26.8.2021.
11. <https://www.apexbt.com/doxazosin.html>, 17.7.2021.
12. <https://go.drugbank.com/drugs/DB00590>, 20.9.2021.
13. M. Huerta-Fontela, M. T. Galceran, F. Ventura, *Water res.*, 45 (2011), 1432-1442.
14. T. Csay, G. Racz, E. Takács, L. Wojnárovits, *Radiat. Phys. Chem.*, 81 (2012), 1489–1494.
15. J. Wang, L. J. Xu, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42 (2012), 251-325.
16. J. Wang, L. Chu, *Radiat. Phys. Chem.*, 125 (2016) 56-64 .
17. X. Chen, J. Wang, *Chem. Eng. J.*, 395 (2020) 125095.
18. A. Rahman, O. Rehab, Y. Hung, *Water*, 12 (2012), 1-16.
19. M. Majer, M. Roguljić, Ž. Knežević, A. Starodumov, D. Ferenček, V. Brigljević, B. Mihaljević, *Appl. Radiat. Isotopes*, 154 (2019), 108824.
20. M. Spothheim-Maurizot, M. Mostafavi, T. Douki, J. Belloni, *L'Actualite Chimique*, 1 (2008), 3–16.
21. L. Wojnárovits, E. Takács, *Radiat. Phys. Chem.*, 96 (2014) 120-134.
22. A. Kimura, M. Osawa, M. Taguchi, *Radiat. Phys. Chem.*, 81 (2012) 1508–1512.

23. J. Nisar, M. Sayed, F. U. Khan, H. M. Khan, M. Iqbal, R. A. Khan, M. Anas, J. Environ. Chem. Eng., 4 (2016), 2573–2584.
24. J. A. Garrido-Cardenas, B. Esteban-Garcia, A. Aguera, J. A. Sanchez-Perez, F. Manzano-Agugliaro, Int. J. Environ. Res. Public Health, 17 (2020), 1-19.
25. A. Tegze, G. Sági, K. Kovács, T. Tóth, E. Takács, L. Wojnárovits, Radiat. Phys. Chem., 158 (2019), 68–75.
26. E. Illes, E. Takács, A. Dombi, K. Gajda-Schranz, K. Gonter, L. Wojnárovits, Radiat. Phys. Chem., 81 (2012), 1479–1483.
27. R. Ocampo-Perez, J. Rivera-Utrilla, M. Sanchez-Polo, J.J. Lopez-Peñalver, R. Leyva-Ramos, Chem. Eng. J., 174 (2011) 1– 8.
28. E. D. Black, E. Hayon, J. Phys. Chem., 74 (1970), 3199-3203.

7. Prilozi

1. ^{60}Co – radioizotop kobalt-60
2. ^{137}Cs – radioizotop cezij-137
3. AOP – napredni oksidacijski procesi (*Advanced Oxidation Processes*)
4. AIDS – sindrom stečene imunodeficijencije (*Acquired Immunodeficiency Syndrome*)
5. BHP – benigna hiperplazija prostate (*Benign Prostatic Hyperplasia*)
6. C – koncentracija ozračenog uzorka
7. c_0 – koncentracija neozračenog uzorka
8. D – apsorbirana doza ionizirajućeg zračenja (*Absorbed dose of ionizing radiation*)
9. DAD – detektor s nizom dioda (*Diode Array Detector*)
10. DWTP – postrojenje za pročišćavanje pitke vode (*Drinking-Water Treatment Plant*)
11. E° – standardni elektrodni potencijal
12. GC – plinska kromatografija (*Gas Chromatography*)
13. Gy – grej (*Gray*), mjerna jedinica za apsorbiranu dozu zračenja
14. Gy/s – mjerna jedinica za brzinu apsorbirane doze ionizirajućeg zračenja
15. HIV – virus humane imunodeficijencije (*Human Immunodeficiency Virus*)
16. HPLC – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti (*High Performance Liquid Chromatography*)
17. HPLC-MS – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti – masena spektrometrija (*High Performance Liquid Chromatography – Mass spectrometry*)
18. HPLC-DAD – tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti s detektorom niza dioda (*High Performance Liquid Chromatography with Diode Array Detector*)
19. k – konstanta brzine radioaktivnog raspada
20. MS – masena spektrometrija (*Mass spectrometry*)
21. P – brzina apsorbirane doze ionizirajućeg zračenja (*Absorbed dose rate*)
22. pKa – negativni logaritam baze-10 konstante disocijacije kiseline
23. PPCP – lijekovi i proizvodi za osobnu njegu (*Pharmaceutical and personal care products*)
24. SPE – ekstrakcija čvrstom fazom (*Solid phase extraction*)
25. UV/VIS – ultraljubičasta-vidljiva spektroskopija (*Ultraviolet-visible spectroscopy*)

8. Životopis autora

Osobni podaci:

Ime i prezime: Karlo Blažek

Datum rođenja: 16. srpnja 1996.

Mjesto rođenja: Koprivnica

Obrazovanje:

2003.-2007. Područna škola „Fran Galović“ Peteranec

2007.-2011. Osnovna škola „Fran Koncelak“ Drnje

2011.-2015. Gimnazija „Fran Galović“ Koprivnica

2015.-2019. Preddiplomski studij Kemije, Odjel za kemiju, Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera, Osijek