

Procjena ekološke prikladnosti farmakopejskih metoda za analizu lijekova u terapiji upalnih bolesti crijeva

Rušić, Doris

Professional thesis / Završni specijalistički

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:032212>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-09-18**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FARMACEUTSKO-BIOKEMIJSKI FAKULTET

Doris Rušić

PROCJENA EKOLOŠKE PRIKLADNOSTI FARMAKOPEJSKIH METODA ZA ANALIZU
LIJEKOVA U TERAPIJI UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Zagreb, 2023.

PSS studij: Razvoj lijekova

Mentor rada: prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

Specijalistički rad obranjen je dana _____ u/na
_____, pred povjerenstvom u sastavu:

1. izv. prof. dr. sc. Miranda Sertić

2. prof. dr. sc. Ana Mornar Turk

3. izv. prof. dr. sc. Dajana Kučić Grgić

Rad ima 132 lista.

Predgovor

Rad je financiran sredstvima Hrvatske zaklade za znanost projekt HRZZ-UIP-2017-05-3949 (Razvoj naprednih analitičkih metoda za lijekove i biološki aktivne tvari u liječenju upalnih bolesti crijeva).

Sažetak

Cilj istraživanja: Uporaba zelenih analitičkih metoda još uvijek je ograničena u farmaceutskom području, posebice u aktivnostima kontrole kvalitete. Ozelenjavanje analitičkih metoda postalo je od velikog interesa u području farmaceutske analize kako bi se zaštitilo zdravlje operatera i okoliš. Metode po kojima se ispituju djelatne tvari, dio gotovih lijekova i dr. propisane su farmakopejama, stoga je cilj ovog istraživanja na modelu izabranih djelatnih tvari ispitati koliko su zelene metode za određivanje sadržaja i onečišćenja tih tvari u Europskoj farmakopeji.

Materijal i metode: Vršena je procjena zelenosti metoda opisanih za određivanje sadržaja i onečišćenja za šest lijekova iz skupine imunosupresiva i 5-aminosalicilata, azatioprina, merkaptopurina, mesalazina, sulfasalazina, budesonida i osalazina prema moografijama Europske farmakopeje 10.3. Zelenost opisanih metoda određena je koristeći dva slobodno dostupna alata AGREE i AMGS. Viši AGREE i niži AMGS zbir znače zeleniju metodu. Dobiveni rezultati alata za izračun zelenosti metoda su pojedinačno opisani, a za usporedbu rezultata dvaju alata korišten je test Spearmanove korelacije. Statistička značajnost je postavljena na $p < 0,05$. Statistička analiza je napravljena koristeći softver MedCalc verzija 19.1.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgija).

Rezultati: AGREE zbir za metode određivanja sadržaja bio je u rasponu od 0,38 do 0,54 i postizao viši zbir za titrimetrijske metode. AGREE za metode određivanja onečišćenja se kretao od 0,33 do 0,43. Sukladno izračunima prema AGREE može se zaključiti da su metode za određivanje sadržaja aktivne tvari zelenije od onih za određivanje onečišćenja. AMGS zbir za metode onečišćenja je bio u rasponu od 58,63 do 312,07. Metoda za određivanje sadržaja budesonida je postigla 837,93 AMGS zbir. Prema provedenoj statističkoj obradi AGREE i AMGS rezultata za istraživane metode, nije pronađena značajna korelacija među dvama izračunima ($r = -0,421$; $P = 0,226$).

Zaključak: Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da se postojeće farmakopejske metode za određivanje sadržaja i onečišćenja u djelatnim tvarima ne mogu smatrati zelenima sukladno dostupnim alatima za procjenu ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda.

Summary

Objectives: The use of green analytical methods is still limited in the pharmaceutical field, especially in quality control activities. The greening of analytical methods has become of great interest in the field of pharmaceutical analysis in order to protect operator health and the environment. The methods by which active substances, part of finished medicines, etc. are tested are given in pharmacopoeias, therefore the aim of this research is on the examine greenness of methods for determination of assay and impurities in European Pharmacopoeia on a model of selected active substances.

Material and Methods: An assessment of the greenness of the methods for determining assay and impurities of six drugs from the group of immunosuppressants and 5-aminosalicylates was performed, azathioprine, mercaptopurine, mesalazine, sulfasalazine budesonide and osalazine, according to the European Pharmacopoeia 10.3. monographs. The greenness of the described methods was determined using two freely available tools AGREE and AMGS. A higher AGREE and a lower AMGS score mean a greener method. The obtained results of the method's greenness are described individually, and the Spearman rank correlation test was used to compare the results of the two tools. Statistical significance was set at $p < 0.05$. Statistical analysis was performed using MedCalc software version 19.1.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgium).

Results: The AGREE score for assay methods ranged from 0.38 to 0.54 and achieved a higher score for titrimetric methods. AGREE for impurities methods ranged from 0.33 to 0.43. According to the calculations of AGREE, it can be concluded that the methods for determination of assay active substances are greener than those for detection of impurities. The AMGS total score for impurities methods ranged from 58.63 to 312.07. The budesonide assay determination method achieved 837.93 AMGS total score. According to the performed statistical analysis of AGREE and

AMGS results for the investigated methods, no significant correlation was found between the results of the two calculations ($r = -0.421$; $P = 0.226$).

Conclusion: The results of this research point to the conclusion that the existing pharmacopoeial methods for determining the assay and impurities in active substances cannot be considered green according to the available tools for assessing the ecological acceptability of analytical methods.

Sadržaj

| | |
|---|-------------------------------------|
| 1. Uvod i pregled područja istraživanja..... | 1 |
| 1.1. Ekofarmakovigilancija | 3 |
| 1.2. Zelena kemija | 8 |
| 1.2.1. Načela zelene kemije | 10 |
| 1.2.2. Biokataliza u zelenoj kemiji..... | 12 |
| 1.2.3. Održive sirovine | 13 |
| 1.2.4. Zelena analitička kemija..... | 14 |
| 1.2.5. Zelena kemija u službi farmacije | 20 |
| 1.2.6. Zelena metrika | 32 |
| 2. Cilj istraživanja | 38 |
| 3. Materijal i metode | 39 |
| 3.1. Procjena ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda | 39 |
| 3.2. Statistička obrada podataka | 41 |
| 4. Rezultati | 42 |
| 4.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja azatioprina | 42 |
| 4.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja budesonida | 43 |
| 4.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja merkaptopurina | 45 |
| 4.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja mesalazina | 47 |
| 4.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja osalazina..... | 49 |
| 4.6. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja sulfasalazina | 50 |
| 4.7. Usporedba AGREE i AMGS zbira | 52 |
| 5. Rasprava..... | 55 |
| 6. Zaključak..... | 68 |
| 7. Literatura..... | 69 |
| 8. Životopis..... | Error! Bookmark not defined. |
| 9. Dodatak..... | 86 |

| | |
|--|-----|
| 9.1.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja azatioprina AGREE analiza | 86 |
| 9.1.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja azatioprina AGREE analiza | 87 |
| 9.1.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja azatioprina AMGS analiza | 88 |
| 9.2.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja budesonida AGREE analiza | 90 |
| 9.2.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja budesonida AMGS analiza | 91 |
| 9.2.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja budesonida AGREE analiza..... | 93 |
| 9.2.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja budesonida AMGS analiza | 94 |
| 9.3.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja merkaptopurina AGREE analiza | 96 |
| 9.3.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja merkaptopurina AGREE analiza | 97 |
| 9.3.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja merkaptopurina AMGS analiza | 98 |
| 9.4.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja mesalazina AGREE analiza | 100 |
| 9.4.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AGREE analiza (I) | 101 |
| 9.4.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (I) | 102 |
| 9.4.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AGREE analiza (II) | 104 |
| 9.4.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (II) | 105 |
| 9.4.6. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AGREE analiza (III) | 107 |
| 9.4.7. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (III) | 108 |
| 9.5.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja osalazina AGREE analiza | 110 |
| 9.5.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja osalazina AGREE analiza..... | 111 |

| | |
|---|-----|
| 9.5.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja osalazina AMGS analiza..... | 112 |
| 9.6.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja sulfasalazina AGREE analiza | 114 |
| 9.6.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AGREE analiza (I)..... | 115 |
| 9.6.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AMGS analiza (I)..... | 116 |
| 9.6.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AGREE analiza (II)..... | 118 |
| 9.6.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AMGS analiza (II)..... | 119 |

1. Uvod i pregled područja istraživanja

U proteklim desetljećima, zbog brzog porasta svjetske populacije, povećanog tereta bolesti i zajedno s brzim i kontinuiranim razvojem farmaceutske industrije, suvremeni se svijet suočava s neviđenim stopama rasta farmaceutske proizvodnje kao i potrošnje lijekova (1-3). Posljedično kao onečišćenja od sve većeg interesa farmaceutski proizvodi dospijevaju u okoliš putem komunalnih ili industrijskih otpadnih voda i predstavljaju rizik po okoliš (2). Gotovo 10 000 humanih farmaceutika se trenutno koristi, a proizvode se u količinama koje prelaze stotine tona godišnje (1-3). Štoviše, tisuće farmakološki aktivnih spojeva je u različitim fazama razvoja, a kontinuirano rastući broj dostupnih lijekova će dovesti do sve većeg broja farmaceutskih onečišćenja (2).

Proizvodnja i povećana uporaba humanih i veterinarskih lijekova je ostavila trag u okolišu tijekom vremena. Procesi proizvodnje lijekova imaju značajan utjecaj na okoliš što je u konačnici utjecalo na značaj kemije za društvo. Farmaceutska industrija utječe na okoliš kroz ugljični otisak koji zaostaje tijekom proizvodnje i kontrole kvalitete farmaceutskih proizvoda te kroz lanac opskrbe što u konačnici može voditi do klimatskih promjena (4). Prema jednoj studiji ugljični otisak farmaceutske industrije u smislu emisija je bio 55 % veći u usporedbi s automobilskom industrijom. U 2015. godini procijenjena je globalna emisija farmaceutske industrije na oko 52 milijuna metričkih tona ekvivalenta ugljičnog dioksida, dok je automobilska industrija proizvela 46 milijuna metričkih tona ekvivalenta ugljičnog dioksida (5). Općenito gledajući, klimatski otisak globalnog zdravstvenog sustava iznosi 4,4 % globalnih neto emisija. Prema apsolutnim vrijednostima emisija zdravstvenog sustava, u sam vrh su se smjestile Sjedinjene Američke Države (27 %), a slijede ih Kina (17 %) i Europa (5 %) (4).

Procjenjuje se da će u razdoblju između 2030. i 2050. biti 250 000 dodatnih smrti godišnje uzrokovanih klimatskim promjenama. Klimatske promjene mogu izazvati fenomene poput

ekstremnih vremenskih uvjeta, porasta razine mora i temperatura i porasta razine ugljikovog dioksida. Bolesti i stanja koja će nastati kao posljedica klimatskih promjena će imati utjecaj na potražnju u zdravstvenom sustavu i farmaceutskoj industriji. U farmaceutskoj se industriji može očekivati povećana potražnja za lijekovima. U ovoj promjeni za potražnjom leži i prilika farmaceutske industrije da nove generacije lijekova proizvodi u skladu s načelima zelene kemije (4).

Onečišćenje lijekovima i farmaceutsko onečišćenje je rastući problem i prepoznato je kao jedan od najvećih rizika za ekosustave (6, 7). Rješenja se mogu implementirati na početku, prije nego lijekovi i međuproizvodi dopijaju u okoliš razboritom uporabom lijekova, propisivanjem ekološki prihvatljivijih (zelenijih) lijekova ili dizajniranjem lijekova koji su biorazgradivi. Ključno će biti i rješavati postojeće probleme, primjerice razvojem održivih sustava za pročišćavanje otpadnih voda. U konačnici, edukacija zdravstvenih djelatnika i društva i suradnja svih dionika će biti potrebna (6). Prilikom implementacije različitih rješenja i strategija, osobitu pozornost treba obratiti na to da se ne dovede u pitanje pristup sigurnim i učinkovitim lijekovima za ljude i životinje (7).

Rezultat proizvodnje i potrošnje farmaceutskih proizvoda je prisutnost aktivnih farmaceutskih supstancija (engl. *Active Pharmaceutical Ingredient*, API) u okolišu, odnosno ekosustavu (4). Danas se diljem svijeta često bilježi njihova pojava u prirodnom okruženju. Kao vrsta biološki aktivnih spojeva posebno dizajniranih da budu učinkoviti čak i pri vrlo niskim razinama, farmaceutski proizvodi u okolišu mogu imati negativan utjecaj na zdravlje ljudi ili drugih ne-ciljnih organizama zbog dugotrajne izloženosti (8). Lijekovi mogu dospjeti u okoliš u fazi razvoja kao polazni materijali, tijekom proizvodnje, transporta i skladištenja (9). S obzirom na to da se tek rijetki lijekovi potpuno metaboliziraju u organizmu, u okolišu nerijetko završavaju

API-ji i njihovi metaboliti (10). Aktivne tvari pronalaze svoj put do morskog i kopnenog okoliša zbog njihovog puštanja iz proizvodnih pogona, iz otpadnih voda nakon konzumacije lijekova ili kao rezultat neprikladnog zbrinjavanja lijekova kojima je istekao rok valjanosti ili su ostali neiskorišteni (11-14). Svaki dionik unutar lanca opskrbe lijekovima, od farmaceutske industrije do pacijenta ima važnu ulogu u smanjenju štetnih učinaka farmaceutskih aktivnosti na okoliš. Ključni dionik u utjecaju lijekova i farmaceutskih aktivnosti na okoliš je ipak farmaceutska industrija (5).

Nedavne studije pokazuju da se određeni lijekovi bioakumuliraju u ne-ciljnim organizmima i postižu tkivne koncentracije značajno više od okolišnih (15). Prema jednom istraživanju u divljim europskim ribama za nekoliko su lijekova izmjerene njihove koncentracije koje prelaze humane terapijske plazmatske koncentracije (16). Važno je naglasiti da bioakumulacija nije ograničena samo na vodene organizme, već se ponekad opazi i u kopnenih organizama, kao i u biljaka (6, 7). Nadalje, ljudi mogu ovim lijekovima biti izloženi kroz prehranu (17). Primjeri konkretnih onečišćenja su porast otpornosti bakterija zbog prisutnosti antibiotika u okolišu i utjecaj etinil estradiola na razmnožavanje u riba (18).

1.1. Ekofarmakovigilancija

Diklofenak se 1990-ih i 2000-ih naširoko koristio u veterinarskoj palijativnoj skrbi goveda. Ono što se u to vrijeme nije znalo jest da su lešine ovih goveda bile kobne za lešinare koji su ih konzumirali. Tek 2003. godine su znanstvenici otkrili da je diklofenak nefrotoksičan za lešinare, no tada se već dogodila ekološka katastrofa. Konzumacija lešina zatrovanih diklofenakom dovela je do kolapsa cijele populacije supova u Indiji, Pakistanu i Nepal. Procjene su da se u dvadesetak godina zatrovano i uginulo preko 60 milijuna ptica (6, 19). Ovo je važan primjer koji pokazuje da se štetni učinci izloženosti ne-ciljnih vrsta za određeni API nužno ne može predvidjeti na temelju

iskustva s humanom terapijom, a još manje se zna i o utjecaju lijekova na biljke (7, 17). Štoviše, čini se da **farmaceutska onečišćenja** drugačije štetno djeluju na biološke sustave u sinergiji nego pojedinačno (2). Potaknuto ovom katastrofom, i iz potrebe za razvojem programa koji bi nadzirao sve aspekte nenamjernih i štetnih posljedica lijekova brojni autori uvode novi pojam ekofarmakovigilancije, discipline koja će pratiti utjecaj lijekova na okoliš (6, 20). Cilj je osigurati da se značajni ekološki problemi povezani s farmaceutskim proizvodima u okolišu identificiraju na vrijeme i da se njima upravlja na odgovarajući način (21). Ekofarmakovigilancija se definira kao skup aktivnosti vezanih uz otkrivanje, procjenu, razumijevanje i prevenciju u slučaju štetnih utjecaja lijekova na okoliš (9). Pristupi ekofarmakovigilancije uključuju zeleni dizajn lijekova, zelenu kemiju u razvoju, razvoj biorazgradivih proizvoda, minimizaciju proizvodnih emisija, edukaciju o racionalnoj uporabi lijekova, poboljšanje propisivačkih praksi, upravljanje neiskorištenim lijekovima i dr. (21). S obzirom na to da je u biti kontinuirano antropogeno ispuštanje lijekova u okoliš temeljni uzrok farmaceutskog **onečišćenja** i njegovog rizika za okoliš, ekofarmakovigilancija naglašava upravljanje i regulaciju ljudskog ponašanja povezanog s farmaceutskim proizvodima (2).

Prije nego se pokuša unaprijediti postupak eliminacije lijekova iz otpadnih voda i okoliša, razumno je pokušati djelovati na uzroku (6). Veliki dio potrebe za odlaganjem lijeka na prvom mjestu mogao bi se eliminirati usredotočujući se na korektivne radnje usmjerene prema uzrocima akumulacije lijekova dizajniranjem i implementacijom mjera za smanjenje onečišćenja (20). Racionalna uporaba lijekova je termin postavljen od stručnjaka Svjetske zdravstvene organizacije još 1985. godine. Značenje iza ovog pojma je pacijenti dobivaju prikladne lijekove za svoje kliničke potrebe, u dozama koje odgovaraju njihovim individualnim potrebama, primjereno vremensko razdoblje i pri najmanjoj cijeni za njih i zajednicu. Ovaj je pojam služio kao

konceptualni okvir za poboljšanje propisivačkih praksi u smislu izbjegavanja polifarmacije i sl. Međutim, on se može proširiti kako bi se u obzir uzeo cilj postizanja optimalnog zdravlja za ljude, životinje i stanja našeg okoliša (22). Ovaj se pristup donekle i koristi u smislu smanjenja korištenja antimikrobnih lijekova i njihovog utjecaja na okoliš. Općenito bi smanjenje neprikladne uporabe lijekova smanjilo njihov ulazak u ekosustave i dovelo do poboljšanja za zdravlje ljudi i okoliša (6, 23).

Christian Daughton, bivši ravnatelj Američke agencije za okoliš je predložio termin ekopropisivanje ili zeleno propisivanje. Ovo bi podrazumijevalo da propisivač uzima u obzir i svojstva i okolišno ponašanje lijekova kada se oni propisuju. To može predstavljati svojevrсни izazov jer određeni lijekovi koji su često korišteni se mogu izlučivati nepromijenjeni i akumulirati u okolišu (6, 24). Doza određuje količinu API-ja koje se kontinuirano ispuštaju u okoliš putem izlučivanja, kupanja (kao rezultat lokalne primjene i izlučivanja putem znoja) i odlaganja neiskorištenih viškova. Nerazborito ili neprikladno propisivanje, uključujući pretjerano propisivanje, pogrešno propisivanje, *off-label* primjena, primjena viših doza od potrebnih i liječenje dulje nego je potrebno može doprinijeti nakupljanju neiskorištenih lijekova (25).

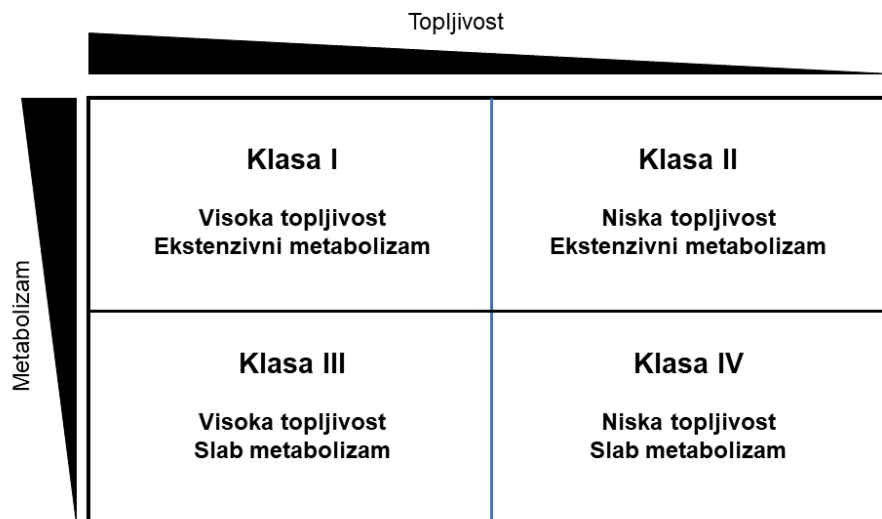
Dvije su strategije davno odbačene kao neizvedive ili nepromišljene, propisivanje nižih doza i odabir API-ja temeljen na dokazima vodeći se njihovim profilima izlučivanja (propisivanje onih API-ja koji pokazuju minimalno izlučivanje matičnog lijeka, bioaktivnog proizvoda ili reverzibilnih metaboličkih konjugata). Propisivanje lijekova s djelatnim tvarima koje se potpuno metaboliziraju bi imalo manji učinak na okoliš, međutim, uzimanje farmakokinetike lijekova i utjecaja na okoliš u obzir prilikom propisivanja je iznad mogućnosti liječnika koji su ograničeni vremenom (25). Istraživanja i potvrđuju da liječnici ne uzimaju ekološke čimbenike u obzir prilikom propisivanja lijekova (7). Sa svakim propisanim lijekom propisivač nehotimice izlaže

druge osobe, koje nisu njegov pacijent, razinama farmakološki aktivnih tvari ekskrecijom. Iako je doza lijeka značajan faktor u onečišćenju lijekovima, on se često odbacuje kao nepromjenjiv cilj za kontrolu onečišćenja. Propisivanje i doziranje lijekova danas je po principu *one-size fits all*. Neki autori iz ovog razloga predlažu i razmatranje propisivanja nižih doza od odobrenih, pronalazeći potvrdu za svoje stavove u činjenici da brojne nuspojave lijekova nastaju zbog pretjerane doze i tumačeći to činjenicom da je propisana doza zapravo prevelika za određene pojedince (25). Prilagodba doze je zapravo korak prema personaliziranoj medicini (17). Važno je naglasiti da se zabrinutost oko API-ja odnosi i na njihove aktivne metabolite, toksične metabolite transformacije u okolišu i toksične degradacijske produkte (25). Nastavak ove priče je izabiranje djelatnih tvari prema farmakogenomskim specifičnostima pacijenta, u smislu izabiranja lijekova koji će se u pojedinog pacijenta potpunije metabolizirati (17). Istaknimo ovdje da čak i ako određeni lijek posjeduje ekološki prihvatljiv profil izlučivanja, njegovo javljanje u okolišu može biti značajno. Primjer za ovo je kofein za kojeg vrijedi da se kod ljudi manje od 2 % izlučuje nepromijenjen. Međutim, temeljem javne potrošnje raznih kofeinskih napitaka, kofein je jedno od najzastupljenijih farmaceutskih onečišćenja (2).

U cilju procjene utjecaja API-ja na okoliš 2005. je u Švedskoj uveden klasifikacijski sustav koji je u obzir uzeo tri faktora, otpornost na mikrobnu degradaciju, potencijal za bioakumulaciju i ekotoksičnost (26, 27). Dva faktora koja ne uzima u obzir su potencijal aktivne supstancije da uđe u okoliš koja ovisi o farmakokinetici i smanjenje ulaska u okoliš jednostavnim snižavanjem doze. Snižavanje doze naravno se ne može razmotriti za sve indikacije i lijekove (25).

Jedan od potencijalnih pristupa za poboljšavanje propisivačke prakse je i uzimanje farmekokinetičkih faktora u obzir, primjerice, izabiranje lijekova s kraćim okolišnim poluvijekom života ili s manjim potencijalom za bioakumulaciju. Predloženi princip održivog ekopropisivanja,

kao dopunu švedskom eko-označavanju u obzir uzima farmakokinetiku lijekova, odnosno njihov potencijal da uopće dospiju u okoliš nepromijenjeni koristeći biofarmaceutsku klasifikaciju raspodjele lijekova (engl. *Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System*, BDDCS, Slika 1) (24). Biofarmaceutski sustav klasifikacije raspodjele lijekova predložen je kao osnova za predviđanje važnosti transportera u određivanju bioraspodjelivosti i raspodjele lijekova. BDDCS može biti koristan u predviđanju putova eliminacije lijeka. Glavni put eliminacije za lijekove klase 1 i klase 2 visoke permeabilnosti u ljudi je metabolizam, dok je glavni put eliminacije za lijekove klase 3 i klase 4 niske permeabilnosti u ljudi izlučivanje nepromijenjenog lijeka putem bubrega i žuči (28). Usprkos brojim ograničenjima ovog istraživanja, rezultati su uputili na to da su lijekovi BDDCS klase IV gotovo dvostruko češće imali povišene razine u okolišu. Više razine lijekova ove klase se i očekuju ne samo zbog zanemarivog metabolizma već i zbog niske potencije, odnosno potrebe za primjenom viših doza. Potrebno je naglasiti da za određene lijekove koji su namijenjeni isključivo za topikalnu primjenu uopće ne mora dolaziti do farmakokinetičke izmjene i oni gotovo nepromijenjeni kupanjem dolaze u okoliš (24).



Slika 1. Biofarmaceutski sustav klasifikacije raspodjele lijekova

1.2. Zelena kemija

Moderna farmaceutska i kemijska industrija razvile su se kao *spin-off* industrije sintetičkih bojila. Prvi sintetički lijekovi su bili relativno jednostavne molekule, ali u sljedećih nekoliko desetljeća su postajale sve složenije, kao primjer možemo navesti polusintetske beta-laktamske antibiotike i steroidne hormone 1940-ih i antitumorski lijek taksol 1990-ih. Doista, moderna farmaceutska industrija uspjeh uvelike duguje izvanrednim dostignućima organske sinteze u prošlom stoljeću. Međutim, mnoge od ovih hvaljenih i široko primjenjivih reakcija su razvijene u vrijeme kada toksična svojstva mnogih reagensa i otapala nisu bila poznata i minimizacija otpada i održivost nisu bili istaknuti kao problemi. Problem otpada u kemijskoj industriji je zapažen 1980-ih, zatvaranjem tvornice Océ' Andeno u Nizozemskoj koja je godišnje proizvodila približno 100 tona farmaceutskog međuproizvoda floroglucinola. Tvornica je zatvorena kada su se troškovi

zbrinjavanja otpada približili prodajnoj cijeni proizvoda (29). Do sredine 1980-ih, kemijski i farmaceutski intermedijer floroglucinol (1,3,5-benzen triol) uglavnom se proizvodio iz 2,4,6-trinitrotoluena (TNT). Prvi korak uključuje oksidaciju s kalijevim dikromatom. On proizvodi floroglucinol u ukupnom prinosu od više od 90 % u tri koraka i, prema klasičnim konceptima učinkovitosti reakcije, općenito bi se smatrao učinkovitim procesom. Međutim, osim željenog proizvoda, proces stvara 40 kg krutog otpada koji sadrži $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3$, NH_4Cl , FeCl_2 i KHSO_4 za svaki dobiveni kilogram floroglucinola. Na kraju je ovaj postupak ukinut zbog previsokih troškova povezanih s odlaganjem otpada koji sadrži krom. Floroglucinol iznosi samo 5 % ukupne mase proizvoda nastalih u stehiometrijskoj jednadžbi, ostatak se sastoji uglavnom od anorganskih soli. Reakcija stehiometrijski predviđa stvaranje oko 20 kg otpada po kilogramu floroglucinola. Međutim, ovo odgovara idealnoj situaciji u kojoj se koriste točni stehiometrijski omjeri reagensa i kemijski prinos je 100 %. U praksi, višak oksidansa i reducensa i veliki višak sumporne kiseline, koji se naknadno mora neutralizirati bazom dovode do izoliranog prinosa floroglucinola od 90 %. Ovo lako objašnjava uočeno stvaranje 40 kg otpada po kilogramu željenog proizvoda, umjesto 20 kg koliko se može očekivati na temelju stehiometrijske jednadžbe. Sama količina otpada koja se generira ovim procesom je dovela do analize i drugih procesa u proizvodnji lijekova i kemikalija i otkrila da ovo nipošto nije izuzetak. To je kasnije predstavilo osnovu za razvoj koncepta E faktora za procjenu utjecaja procesa kemijske proizvodnje na okoliš. Postalo je jasno da je potrebna promjena paradigme industrijske organske sinteze od tradicionalnih konceptata učinkovitosti i selektivnosti reakcije koji se baziraju ponajviše na kemijskom prinosu, do onih koje pripisuju vrijednost korištenju sirovina, uklanjanju otpada i izbjegavanju uporabe otrovnih i/ili opasnih tvari. Kemičari koji su se bavili organskom sintezom su dobro poznavali pojmove kao što je selektivnost reakcije (prinos podijeljen s konverzijom) i kemo-, regio-, stereo- i enantio-selektivnost. Nasuprot

tome, do sredine 1990-ih, nisu bili navikli razmatrati selektivnost atoma ili iskorištenje atoma reakcije, tj. koliki dio mase reaktanata zapravo završi u proizvodu, a ostalo je po definiciji, otpad. Ova je selektivnost od najveće važnosti u kontekstu procjene utjecaja industrijskih organskih sinteza na okoliš (30).

Da kemikalije mogu onečistiti okoliš danas je dobro poznato. Međutim, zabrinutost u vezi s takozvanim **onečišćenjima** od sve većeg interesa raste s lijekovima u fokusu. Farmaceutski proizvodi imaju dvije važne karakteristike koje pokreću ovu preokupaciju. Oni proizvode farmakološke učinke u niskim koncentracijama, poput onih u okolišu i dizajnirani su imajući na umu stabilnost, tako postoji vjerojatnost da će stupiti u interakciju s ciljnom molekulom (6, 31).

Osim API-ja, onečišćenju doprinose i pomoćne tvari kao i druge kemikalije koje se koriste u proizvodnji (17). Znanstvenici su pratili utjecaj farmaceutskih proizvoda na okoliš tijekom posljednjih 30 godina, a tijekom posljednjeg desetljeća je opažen povećan interes na tu temu (4, 32). Povećana svijest o utjecaju farmaceutske proizvodnje na okoliš je dovela do pojave metoda zelene sinteze (4).

1.2.1. Načela zelene kemije

Pojam zelena kemija uveo je Paul Anastasa 1991. godine (33, 34). Zelena se kemija također naziva održivom kemijom, čistom kemijom, kemijom okoliša i benignom kemijom (32, 35). Zelena kemija definirana je kao primjena skupa načela koji smanjuju ili eliminiraju korištenje ili stvaranje opasnih tvari u dizajnu, proizvodnji i primjeni kemijskih proizvoda (4). Nešto kasnije, 1998. godine, Paul Anastas je s Johnom Warnerom razvio dvanaest načela zelene kemije koji služe kao vodič kemičarima u razvoju zelenijih sintetskih puteva. Načela zelene kemije zaokružuju ideju da se treba spriječiti ili smanjiti proizvodnja otpada i njegov učinak na okoliš smanjenjem ili korištenjem ekološki prihvatljivijih i učinkovitijih kemikalija i procesa što se može postići

planiranjem unaprijed prilikom dizajna procesa (4, 33). Ovih 12 načela uključuje prevenciju otpada umjesto uklanjanja, atomsku učinkovitost, manje opasnih/toksičnih kemikalija, dizajn sigurnijih proizvoda, neškodljiva otapala i pomoćna sredstva, energetski učinkovit dizajn, preferiranje obnovljivih sirovih materijala, kraća sinteza (izbjegavanje derivatizacije), katalitičke reakcije dizajn proizvoda za degradaciju, analitičke metode za prevenciju onečišćenja i inherentno sigurnije procese (Tablica 1) (30). Nakon ovoga su Paul Anastas i Julie Zimmerman razvili dvanaest principa zelenog inženjeringa koji se mogu primijeniti tijekom razvoja proizvoda i procesa (36). Poliakoff i suradnici su predložili mnemotehniku koja obuhvaća poruku 12 principa zelene kemije (Slika 2).

PRODUCTIVELY

P – prevent wastes

R – renewable materials

O – omit derivatisation steps

D – degradable chemical products

U – use of safe synthetic methods

C – catalytic reagents

T – temperature, pressure ambient

I – In-Process monitoring

V – very few auxiliary substrates

E – E-factor, maximise feed in product

L – low toxicity of chemical products

Y – yes, it is safe

Slika 2. Mnemotehnika 12 principa zelene kemije

Alternativno, bit zelene kemije može se svesti na definiciju u jednoj rečenici: Zelena kemija učinkovito iskorištava (po mogućnosti obnovljive) sirovine, eliminira otpad i izbjegava upotrebu toksičnih tvari i/ili opasnih reagensa i otapala u proizvodnji i primjeni kemijskih proizvoda. Zelena kemija eliminira otpad na izvoru, tj. ona je primarna prevencija onečišćenja, a ne sanacija otpada (30). Načelo vodilja je benigno po dizajnu ekološki benignih kemijskih

proizvoda i procesa (29). Kada se razvija sintetski put, potrebno je odabrati najučinkovitiji put koji daje proizvod u visokom prinosu iz minimalnu količinu proizvedenih nečistoća, uzimajući u obzir druge čimbenike, kao što su toksičnost, jer se smatra da je učinkovitiji postupak i zeleniji (37, 38). Još jedan cilj zelene kemije je razvoj ekološki prihvatljivih proizvoda. Poželjno je da oni budu netoksični, biorazgradivi i proizvedeni zelenim katalitičkim procesom iz obnovljivih sirovina. Štoviše, takav proizvod ne bi trebao koštati više od proizvoda kojeg zamjenjuje (30).

1.2.2. Biokataliza u zelenoj kemiji

Otpad u kemijskoj industriji nastaje primjenom zastarjelih tehnologija koje uključuju korištenje stehiometrijskih količina uglavnom anorganskih reagensa u obliku oksidansa, reducensa, kiselina i baza. Rješenje je zamjena ovih zastarjelih stehiometrijskih metodologija sa zelenijim katalitičkim alternativama. Katalizator, po definiciji, povećava brzinu kemijske reakcije bez da je konzumiran i posljedično teoretski ne stvara nikakav otpad (29).

Pojam biokataliza se odnosi na uporabu enzima, kao pročišćenih proteina ili kao cijelih stanica da kataliziraju pretvorbu supstrata u željeni proizvod. S povećanim interesom za razvoj zelene kemije, biokatalizatori su postali popularna tema u kemijskoj industriji jer zahvaljujući zelenijim i održivim obilježjima, zadovoljavaju 10 od 12 načela zelene kemije (39). Većina organskih kemičara upoznata je s mnogim prednostima enzimske katalize koje ih čine zelenima i održivima, visoka kemo, regio i enantio-selektivnost u blagim uvjetima (fiziološki pH, temperatura i tlak okoline) dajući proizvode visoke čistoće u procesima koji su učinkovitiji u smislu potrošnje energije i resursa i generiraju manje otpada od konvencionalnih ruta. Enzimi su biokompatibilni (ponekad čak i jestivi), biorazgradivi i u biti bezopasni. Osim toga, oni su izvedeni iz jeftinih obnovljivih izvora koji su lako dostupni i nisu podložni velikim oscilacijama cijena koje

potkopavaju dugoročnu komercijalnu održivost katalizatora dobivenih od rijetkih dragocjenih metala (40). Već je dokazano da se imobilizacijom enzima poboljšava stabilnost i selektivnost enzima, a kontinuirani protočni sustavi mogu pojednostaviti pročišćavanje proizvoda istovremeno zadržavajući enzime. Osim toga, kontinuirano uklanjanje proizvoda i supstrata u protoku smanjuje inhibiciju enzima, poboljšavajući brzinu reakcije. Biokataliza kontinuiranog protoka omogućuje pristup novim zelenijim i učinkovitijim sintezama (39). Biokatalizatori se dobivaju iz obnovljive biomase i biorazgradivi su. Proces se izvode u blagim uvjetima i općenito proizvode manje otpada i energetski su učinkovitiji od konvencionalnih. Zahvaljujući suvremenom napretku u biotehnologiji enzimi „po mjeri“ mogu biti ekonomično proizvedeni u velikoj mjeri (29).

1.2.3. Održive sirovine

Iako je pozornost i dalje usmjerena na minimiziranje otpada i izbjegavanje uporabe otrovnih i/ili opasnih materijala u proizvodnji kemikalija, trenutno postoji sve veći naglasak na još jednom elementu zelene kemije, supstituciji neobnovljivih fosilnih resursa biomasom kao održivom sirovinom za proizvodnju kemikalija i tekućih goriva. Prelazak na obnovljivu biomasu kao sirovinu omogućit će ekološki korisno smanjenje ugljičnog otiska kemikalija i tekućih goriva. Dalje, korist bi mogla biti zamjena postojećih proizvoda sigurnijim alternativama s manjim utjecajem na okoliš poput biokompatibilne i biorazgradive plastike (29).

Vrhunac učinkovite organske sinteze sigurno je iskoristiti energiju sunca za sintetiziranje goriva i kemikalija iz ugljikovog dioksida i vode na zelen i održiv način. To je ono što priroda već radi, naravno, ali je potrebno predugo i fosilni resursi položeni kao velike količine biomase prije mnogo godina troše se mnogo brže nego se mogu obnoviti. Ovi vrijedni resursi su ograničeni i prije ili kasnije će ponestati. Doista, prijelaz iz ekonomije koja se velikim dijelom temelji na

neobnovljivim fosilnim gorivima u održiviju bioekonomiju koja se temelji na obnovljivim izvorima jedan je od velikih izazova s kojima se društvo suočava u 21. stoljeću. Među raznim održivim opcijama energije (solarna, vjetar, geotermalna) samo biomasa, je izvor goriva i kemikalija na bazi ugljika. Cilj je zelene kemije i održivosti zamjena fosilnih resursa, nafte, ugljena i prirodnog plina, biomasom kao primarnom sirovinom. Korištenje biomase za održiva goriva i kemikalije su postale glavni prioritet na međunarodnoj razini (30).

1.2.4. Zelena analitička kemija

Zelena analitička kemija nastaje kao novi trend u konceptu zelene kemije, promičući analitičke tehnike koje zahtijevaju minimalnu potrošnju otapala i reagensa i time smanjujući rizik za okoliš i ljude. Trenutačno se količine otpada mogu smanjiti korištenjem minijaturiziranih i/ili tehnikama potpomognute ekstrakcije ili jednostavno korištenjem alternativnih otapala (41). Ovaj novi zeleni pristup se ponekad opisuje kao tri R, *replace* ili zamijeniti, *reduce* ili smanjiti i *recycle* ili reciklirati, odnosno zamjena toksičnih otapala zelenim otapalima, smanjenje potrošnje otapala i proizvodnje otpada i recikliranje otapala (42, 43).

Tablica 1. Principi zelene kemije i zelene analitičke kemije (44)

| Princip | Zelena kemija | Zelena analitička kemija |
|---------|--|---|
| 1 | Spriječiti stvaranje otpada | Koristiti direktnu analizu |
| 2 | Reakcije su dizajnirane da budu što učinkovitije i atomski učinkovitije | Veličina uzorka i njihov broj trebaju biti minimalni |
| 3 | Metode su modificirane da koriste manje materijala i manje opasne materijale | Kada je moguće, koristiti analizu <i>in situ</i> |
| 4 | Finalni produkti su sigurni i održivi koliko je to god moguće | Operacije i analitički procesi trebaju biti integrirani, kako bi se sačuvali resursi |
| 5 | Metode su modificirane kako bi koristile što je manje supstancija, osobito otapala | Kada je moguće, analize trebaju biti automatizirane |
| 6 | Metode su energetski učinkovite, kada je moguće provedene pri sobnoj temperaturi i tlaku | Izbjegavati derivatizaciju |
| 7 | Materijali trebaju biti održivi ili iz obnovljivih izvora | Proizvodnja otpada treba biti minimizirana, pravilno upravljanje otpadom je nužno |
| 8 | Kada je moguće, derivatizacija je izbjegnuta ili svedena na minimum | Kada je moguće, metoda treba biti optimizirana za korištenje na više analita kako bi se ograničio potreban broj ispitivanja |
| 9 | Selektivne katalitičke reakcije trebaju zamijeniti ekvivalentne stehiometrijske | Utrošak energije treba biti minimalan |
| 10 | Završni produkt treba biti dizajniran da se sigurno razgrađuje | Preferiraju se održivi i obnovljivi reagensi |
| 11 | Proizvodnja otpada treba biti prikladno nadzirana | Preferiraju se sigurniji reagensi – manje opasni i/ili toksični |
| 12 | Procedure minimiziraju opasnost i kemijske nesreće | Sigurnost operatera je najvažnija |

1.2.4.1. Kromatografske tehnike

Kromatografske tehnike imaju potencijal biti zelenije u svim fazama analize, od prikupljanja i pripreme uzorka do odvajanja i konačnog određivanja. Iako bi potpuna eliminacija pripreme uzorka bila idealan pristup, to nije uvijek praktično. Tehnike ekstrakcije bez otapala nude vrlo dobru alternativu, a kada se moraju koristiti otapala, fokus mora biti na smanjenju njihove potrošnje. U tekućinskoj kromatografiji fokus bi trebao biti na redukciji potrošnje otapala i zamjeni ekološki opasnih otapala s benignijim alternativama. Jedan tekućinski kromatograf potencijalno može generirati 1 do 1,5 L tekućeg otpada dnevno. Ne smije se zanemariti utjecaj otapala koja se troše tijekom kromatografskih određivanja na okoliš. Važan zeleni aspekt kromatografskih metoda je prisustvo ili odsustvo koraka pripreme uzorka, koji je nerijetko najveći **onečišćivač** u cijelom postupku kromatografske analize. Iz perspektive zelene analitičke kemije, vrlo je korisno koristiti izravnu kromatografiju koja ne zahtijeva pripremu uzorka kad god je to moguće. Glavno ograničenje takvih metoda je da su primjenjive samo na uzorke s relativno čistim matricama, jer bi se u protivnom kromatografske kolone mogle brzo oštetiti zbog taloženja sastavnica uzorka koje se ne eluiraju iz kolone. Tekućinska se kromatografija općenito smatra manje zelenom od plinske kromatografije, jer zahtijeva otapala za odvajanje. S druge strane, ovo nudi više mogućnosti za ozelenjavanje. U teoriji, jedan konvencionalni analitički tekućinski kromatograf proizvede do 1,5 L otpadna dnevno, što znači oko 500 litara otpada godišnje. Iako je ova količina otpada mala u usporedbi s količinom otpadnih voda i otpada koju proizvede tipična velika industrijska kompanije, neke velike kompanije koriste stotine tekućinskih kromatografa u svojim istraživačkim laboratorijima u procesu kontrole, što rezultira tisućama litara toksičnog otpada proizvedenog svaki dan. Posljedično, smanjenje količine otapala koje se koriste za separacije je vrlo poželjno (45). Na temelju 12 načela zelene kemije, neke se strategije uobičajeno provode za postizanje

ekološki prihvatljivih metoda tekućinske kromatografije. Jedna strategija je smanjiti potrošnju otapala kroz smanjenje duljine, unutarnjeg promjera i/ili veličine čestica kolone (Tablica 1). Smanjenje potrošnje otapala može se postići smanjenjem protoka pokretne faze, što je moguće kada se smanji unutarnji promjer kolone. Smanjenje potrošnje otapala također se može postići povećanjem kromatografske produktivnosti, što se može postići smanjenjem veličine čestica i skraćivanjem duljine kolone. Smanjenje duljine kolone skraćuje vrijeme analize. Međutim, ovaj pristup često podrazumijeva upotrebu skupih instrumenata tekućinske kromatografije ultravisoke učinkovitosti (engl. *ultra-high-performance liquid chromatography*, UHPLC) što ograničava njihov pristup u laboratorijima u zemljama s ograničenim resursima (45).

Tehnološki napredak postignut tijekom posljednjih desetljeća potaknuo je minijaturizaciju u tekućinskoj kromatografiji (kapilarna i nano tekućinska kromatografija) (46). Glavne prednosti smanjenja veličine čestica i promjera kolone su manja potrošnja uzorka, smanjenje potrošnje pokretnih faza te manja disperzija analita na koloni što rezultira većom učinkovitosti (47).

Drugi način da se tekućinska kromatografija učini ekološki prihvatljivom je zamjena klasično korištenih organskih otapala, uglavnom acetonitrila i metanola, ekološki prikladnijim. Etanol je primjerice jedno od najboljih zelenih alternativnih otapala zbog svog izvora i sigurnosti rukovanja od strane operatera (48). Prema vodiču za zelene pokretne faze, voda, aceton, metanol i etanol se mogu smatrati ekološki prihvatljivim fazama za tekućinsku kromatografiju. Etanol je posebno poželjno otapalo za zelenu tekućinsku kromatografiju, jer ima slična svojstva kao acetonitril i metanol, ali je manje hlapljiv, manje toksičan i ima niže troškove zbrinjavanja. Superkritični fluidi se smatraju zelenim pokretnim fazama zbog svojeg ograničenog utjecaja na okoliš, niskih troškova zbrinjavanja, smanjene potrošnje otrovnih otapala i aditiva, nedostatka toksičnosti (u većini slučajeva) i sposobnosti gotovo potpunog obnavljanja otapala. Tekuće smjese

povećane fluidnosti koje se koriste kao pokretne faze za odvajanje umjereno polarnih do polarnih spojeva u tekućinskoj kromatografiji još su jedan od primjera zelenog pristupa (45).

Još jedan parametar koji može biti korišten kao značajna varijabla u tekućinskoj kromatografiji je temperatura. Zato što je lakše promijeniti temperaturu tijekom razvoja metode u usporedbi s drugim parametrima poput sastava pokretne faze ili pH pufera, povišena temperatura je postala popularno korišteni parametar kako bi se HPLC učinio zelenijim (45).

Nekoliko je pristupa ozelenjavanju pripreme uzorka, uklanjanje (ili barem smanjenje) količine otapala i reagensa koji se koriste u analizi, minijaturizacija instrumenata i smanjenje opsega analitičkih operacija, integracija različitih operacija i automatizacija/robotizacija pripreme uzorka, ispravno brtvljenje svih posuda korištenih tijekom pripreme uzorka, povrat i ponovna uporaba otapala, primjena zelenih medija (npr. ionskih tekućina ili superkritičnih fluida) i primjena čimbenika koji povećavaju učinkovitost pripreme uzorka (npr. povišena temperatura i/ili tlak, mikrovalna i ultrazvučna energija) (45). Nadalje, nekoliko je prednosti minijaturizacije i automatizacije kao što su jednostavniji postupak, brža analiza, bolje ekstrakcijske performanse i smanjena količina uzorka. Još jedan relevantan doprinos razvoju i širenju minijaturiziranih tehnika uključuje nedavni napredak u sintezi novih materijala sorbensa i korištenje ekološki prihvatljivih ekstrakcijskih otapala. Oba pristupa predstavljaju dodatne strategije s ciljem postizanja boljeg analitičkog rezultata (49).

Zeleni pristupi pripremi uzoraka zahtijevaju da se potrošnja opasnih otapala i energije minimizira ili čak eliminira u analitičkom procesu. Iako je izbjegavanje pripreme uzorka očito najprihvatljiviji pristup za okoliš, potpuno uklanjanje tog koraka nije uvijek praktično. U takvim slučajevima, tehnike ekstrakcije koje koriste male količine otapala ili ih ne koriste uopće se smatraju idealnim alternativama. Zelena se analitička kemija, kao ogranak zelene kemije oslanja

na njena načela za povećanje sigurnosti analitičara, smanjenje potrošnje energije, pravilno upravljanje otpadom, smanjenje ili čak uklanjanje korištenja opasnih kemikalija i zamjena benignima kad god je to moguće. U praksi, četiri faktora, prikupljanje uzorka, priprema uzorka, reagensi i instrumenti, smatraju se značajnima u ozelenjavanju analitičkih metoda. Priprema uzorka prije analize temeljni je dio mnogih analitičkih protokola. Kao rezultat toga vrlo je važno ovaj korak napraviti zelenijim, osobito ako se uzorci pripremaju iz složenih matrica. Nedavni napredci u tehnikama uzorkovanja usmjereni su na automatizaciju, minijaturizaciju i pojednostavljenje postupke ekstrakcije. Primjeri zelenih pristupa u analizi uzoraka ovisno o vrsti uzorka su direktna analiza bez pripreme uzorka, ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE), mikroekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME), mikroekstrakcija pakiranim sorbentom (engl. *Microextraction by Packed Sorbent*, MEPS), ekstrakcija sorbentom smještenim na magnetski štapić (engl. *Stir-Bar Sorptive Extraction*, SBSE), nanoekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Nanoextraction*, SPNE), mikroekstrakcija u jednoj kapi (engl. *Single Drop Microextraction*, SDME), mikroekstrakcija tekućom fazom u šupljem vlaknu (engl. *Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*, HF-LPME), disperzivna mikroekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME), potpomognuta tekuća membranska ekstrakcija (engl. *Supported Liquid Membrane Extraction*, SLME), mikroporozna membranska ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction*, MMLLE), membranska ekstrakcija s međusklopkom sorbenta (engl. *Membrane Extraction with a Sorbent Interface*, MESI), ekstrakcija otapalom potpomognuta membranom (engl. *Membrane Assisted Solvent Extraction*, MASE), mikrodijalizno uzorkovanje i mikroekstrakcija na tankom filmu (engl. *Thin-Film Microextraction*, TFME). Primjeri zelenih alternativa ekstrakcijskim otapalima su subkritična vodena ekstrakcija (engl. *Subcritical Water*

Extraction, SWE), superkrična fluidna ekstrakcija (engl. *Supercritical Fluid Extraction*, SFE), ionske tekućine (engl. *Ionic Liquids*, ILs) i duboka eutektička otapala (engl. *Deep Eutectic Solvents*, DES) (50, 51). Tehnike zelene mikroekstrakcije imaju prednosti u odnosu na klasične tehnike, uključujući korištenje manje otapala i minimalni broj i veličinu uzorka, smanjenje koraka obrade, potrošnje opasnih reagensa i energije, maksimizirajući u isto vrijeme sigurnost za analitičara i okoliš te proizvodnju manje otpada (52).

1.2.5. Zelena kemija u službi farmacije

Koncept zelene farmacije se može definirati kao skup svih mjera koje bi se trebale poduzeti kako bi se utjecaj farmaceutika na okoliš sveo na minimum. Ove bi mjere trebalo implementirati u sve farmaceutske aktivnosti, od dizajna novih molekula, do proizvodnje, distribucije, izdavanja i odlaganja. Farmaceutska je industrija uključena u dizajniranje i proizvodnju lijekova. Najčešće, dizajn novih bioaktivnih supstancija uključuje kemijsku sintezu, proces koji povećava rizik za onečišćenje okoliša zbog uporabe raznih organskih i anorganskih otapala. Kako bi se umanjio ovaj negativan utjecaj na okoliš, u posljednjih nekoliko godina istraživači su razvili koncept zelene kemije koja se može opisati kao ekološki prihvatljivija kemija. Primjerice, korištenje vodene sinteze, sinteze bez otapala i enzima predstavljaju metode zelene kemije. Biotehnologija je još jedan od načina ekološkog dizajna novih lijekova. Tijekom farmaceutskih istraživanja, veliki se broj molekula razvije prije nego se može ciljani lijek ispitati i staviti na tržište. Metoda koja može smanjiti broj sintetiziranih lijekova je kvantitativna procjena između strukture i biološke aktivnosti novodizajniranih molekula prije nego se sintetiziraju. Još jedan izazov za farmaceutsku industriju je proizvodnja lijekova koji su lako biorazgradivi čim dospiju u okoliš, ponajprije vodu i tlo (53). Stoga su potrebni novi pristupi dizajniranju zelenijih farmaceutika bolje biorazgradivosti u

okolišu. Takav pristup može pomoći u dizajniranju kemijskih proizvoda koji ne opstaju u okolini i raspadaju se na neškodljive spojeve nakon njihove primjene (54). Atraktivna ideja za budućnost je dizajnirati lijekove koji su više biorazgradivi, koncept benigni po dizajnu ili koncept dobroćudnog dizajna što u konačnici i najviše obećava u smislu održivosti i važan je sastavni dio zelene i održive farmacije i kemije (55). Prema ovom konceptu, male promjene u kemijskoj strukturi API-ja mogu imati značajan utjecaj na njezinu aktivnost, topljivost i polarnost s jedne strane i biorazgradivost s druge strane. Ključ za ovo novo shvaćanje je da kemikalije i lijekovi ne moraju biti stabilni u svim uvjetima i okolnostima, već samo gdje je to potrebno (primjerice tijekom skladištenja, ali ne i u okolišu). Različiti fizikalno-kemijski uvjeti (npr. pH, prisutnost i odsutnost različitih vrsta bakterija, svjetla, vlage itd.) mogu se iskoristiti za postizanje ovoga cilja (55). Već i postoje primjeri razvoja ekološki prihvatljivijih API-ja, zelenijih dozirnih oblika, a potrebno je promicati i ekološko i održivo pakiranje lijekova (7, 54, 55).

Primjena zelenih principa tijekom sinteze API-ja i proizvodnje gotovog dozirnog oblika može pomoći u smanjenju utjecaja ovih procesa na okoliš (4). Neki dozirni oblici, primjerice transdermalni flasteri mogu nakon korištenja sadržavati i preko 80 % aktivne tvari (56).

Klasični put sinteze ibuprofena koji je razvila Boots Pure Drug Company uključuje 6 koraka, relativno niskom učinkovitosti atoma i značajnim stvaranjem anorganskih soli. Nasuprot tome, elegantna alternativa koju je razvila tvrtka Boots Hoechst-Celanese uključuje samo tri katalitička koraka. Prvi korak uključuje upotrebu bezvodnog vodikovog fluorida kao katalizatora i otapala u Friedel-Crafts acilaciji. Vodikov fluorid se reciklira s 99,9 % učinkovitosti i otpad je u biti neznan. Nakon toga slijede dva katalitička koraka (hidrogenacija i karbonilacija) koji su 100 % atomski učinkoviti. Ovaj proces je 1996. godine dobio nagradu Green Chemistry Challenge Award i predstavlja mjerilo u ekološkoj izvrsnosti u tehnologije kemijske obrade koja je

revolucionirala proizvodnju farmaceutika i postala izvorom inspiracije za druge proizvođače lijekova (30).

1.2.5.1. Biokataliza u sintezi

Suvremeni napredak u biotehnologiji, tehnike imobilizacije, noviji razvoj proteinskog inženjerstva i izravna evolucija pomogli su poboljšati korištenje biokatalize u sintezi omogućavanjem jeftinije proizvodnje enzima i omogućavanjem pristupa velikoj knjižnici svestranih biokatalizatora (39). Razvoj specifično dizajniranih enzima s dramatično poboljšanim performansama, utrlo je put za široku primjenu biokatalize u industrijskoj organskoj sintezi, posebice u sintezi API-ja (39). Biokataliza nudi mnoge prednosti u kontekstu zelene kemije. Reakcije se izvode u blagim uvjetima (fiziološki pH te tlak i temperatura okoline) s biorazgradivim katalizatorom (enzimom) koji se dobiva iz obnovljivih izvora i u ekološki prihvatljivim otapalima (vodi). Kao izravna posljedica visoke regio i stereoselektivnosti, zajedno s blažim uvjetima reakcije, oni često priušte proizvode više kvalitete od tradicionalnih nastalih kemijskim ili kemokatalitičkim procesima. Na primjer, oni mogu izbjeći problem kontaminacije tragovima (plemenitog) metala što je često ozbiljan problem u proizvodnji farmaceutika (30). Biokataliza je uspješno primijenjena u sintezi hipolipemika atorvastatina i industrijskoj sintezi antidijabetika sitagliptina kao i brojnih drugih API-ja (30, 40, 57). Protočna biokataliza je predložena u sintezi antitrombotika tikagrelola, melatonina, antivirusika vidarabina, anestetika prokaina, antihipertenziva kaptoprila i za razdvajanje racemičnog flurbiprofena i drugih API-ja (39).

1.2.5.2. Zeleno oblikovanje lijekova

Predložena je i zamjena konvencionalnih metoda oblikovanja lijekova, kao što je direktno komprimiranje, zelenijim metodama. Primjer takve metode je zelena granulacija zelena granulacija fluidiziranog sloja (engl. *Green Fluidized Bed Granulation*, GFBG) (58).

1.2.5.3. Biosurfaktanti

Nadalje, s obzirom na saznanja da široko korišteni klasični surfaktanti mogu imati negativne posljedice na okoliš, proteklih nekoliko desetljeća je uložen golem napor kako bi se razvili zeleni biosurfaktanti koje proizvode mikroorganizmi (kvasci, bakterije i određene gljive). Razne obnovljive sirovine, posebice trigliceridi, izvori ugljikohidrata i organske kiseline (proizvedene fermentacijom), služe kao polazni materijali u sintezi zelenih surfaktanata, od kojih trigliceridi/steroli doprinose hidrofobnom dijelu. S druge strane, šećeri/aminokiseline doprinose hidrofilnom dijelu ovih surfaktanata. Ove biološke amfifilne molekule mogu smanjiti površinsku napetost koristeći iste mehanizme kao kemijski surfaktanti. Štoviše, imaju nekoliko prednosti što ih čini superiornijima, uključujući veću biorazgradivost, manju toksičnost, bolju površinsku i međufaznu aktivnost, veću selektivnost i dakle veću sigurnost i biokompatibilnost, uz veću ekološku prihvatljivost i stabilnost. Biosurfaktanti se uglavnom proizvode u mikrobnim kulturama. Bakterije rodova *Pseudomonas* i *Bacillus* su dobri proizvođači biosurfaktanata dok su *Candida bombicola* i *Candida lipolytica* najviše korištene kvasnice za proizvodnju biosurfaktanta (59).

1.2.5.4. Biosintetizirane nanočestice

Određeni autori predlažu i korištenje biološkog otpada (sjemena) za zelenu sintezu zlatnih, srebrnih i drugih nanočestica koje mogu biti terapijski korisne i učinkovite, tj. koncept sintetiziranja nanočestica iz metalnih soli iskorištavanjem redukcijskih svojstava biološki aktivnih spojeva (60-64). Zelene nanočestice se sintetiziraju u postupku u jednom koraku koji je koristan za manipuliranje stabilizacijom, veličinom i oblikom čestica. Nadalje proces u jednom koraku zahtijeva manju količinu energije za sintezu, a plemeniti metali se mogu reciklirati iz otpada koji nastaje, što slijedi načela zelene kemije (60). Zelena sinteza nanočestica srebra korištenjem bioloških resursa je ekonomična, brza i ekološki prihvatljiva metoda koja ublažava nedostatke kemijske i fizikalne metode. Razni biološki resursi kao što su biljke i njihovi različiti dijelovi, bakterije, gljive i alge se mogu koristiti za zelenu sintezu bioaktivnih nanočestica srebra i drugih nanočestica. Biosintetizirane nanočestice srebra su privukle značajnu pozornost istraživača zbog svoje potencijalne primjene u različitim područjima biomedicinskih znanosti, a najveći potencijal nosi njihova baktericidna aktivnost protiv različitih Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija (63, 65-67). Nadalje i nanočestice zlata posjeduju baktericidnu aktivnost, a veliki interes su izazvale i zbog svoje neobične inertnosti prema vanjskom okruženju što se potencijalno može iskoristiti za ciljanu isporuku lijekova. Štoviše ciljana isporuka kemoterapeutika korištenjem nanočestica cinkovog oksida koje sinergistički djeluju na stanice raka pruža nove mogućnosti u onkološkom liječenju koje su sigurnije i učinkovitije. Nanočestice cinkovog oksida su pokazale i fungicidnu aktivnost, a potencijal za primjenu u medicini mogu pronaći i biosintetizirane nanočestice barija i titanija (63, 64, 68-71). Nadalje, kombinirajući prednosti biljnog posredovanja u zelenoj sintezi nanočestica i terapijskih potencijala metala, koji uključuju antikancerogena, antioksidativna, antimikrobna svojstva i svojstva da potiču cijeljenje rana, fito-nanočestice imaju

visoki potencijal za primjenu u dermofarmaciji i sve se više istražuju (72). Recentno su zelenom tehnologijom sintetizirani nanonosači bazirani na trehalozi s modelom nesteroidnog protuupalnog antireumatika, tzv. trehalosomi s konačnim ciljem da ciljaju kolon u liječenju upalnih bolesti crijeva jer trehaloza osim otpornosti na kiselinu dokazano ublažava upalu i odgovor na oksidativni stres (73). Razvijena je i ekološki prihvatljiva sinteza funkcionaliziranog nanoantibiotskog sistema za potencijalnu isporuku linezolida (74). Nadalje, zelenom tehnologijom je formuliran i nanovlaknasti bukalni film kao alata za poboljšanje oralne bioraspoloživosti raloksifena (75). Dodajmo ovdje da se kao potencijalni zeleni izvor u farmaciji se koriste se mikroalge, odnosno proizvodi na bazi mikroalgi (76).

1.2.5.5. Problem otpada

Ironično, otpad koji nastaje u proizvodnji organskih spojeva se prvenstveno sastoji od anorganskih soli. Ovo je izravna posljedica uporabe anorganskih reagensa u stehiometrijskom omjeru u sintezi kemikalija i proizvodnji lijekova. Primjerice stehiometrijske redukcije s metalima, oksidacije s permanganatom i krom (VI) reagensi. Rješenje problema otpada se nameće samo po sebi, zamjena zastarjelih stehiometrijskih metoda sa zelenim katalitičkim alternativama koje imaju manje koraka, učinkovitije i ekonomičnije su pa posljedično i manje utječu na okoliš. Primjerice, katalitička hidrogenacija, oksidacija i karbonilacija su visoko učinkoviti procesi s malo soli. Tradicionalno, katalizatori su podijeljeni u četiri kategorije, heterogene, homogene, organokatalizatore i biokatalizatore (30).

Drugi veliki izvor otpada je gubitak otapala koji završe u atmosferi ili u podzemnim vodama (30). Uobičajeno je masa otapala korištena tijekom procesa između 80 i 90 % ukupne mase (37, 77). Otapala se smatraju glavnim **onečišćivačima** u farmaceutskoj industriji i otpuštanje

otapala u okoliš može dovesti do nakupljanja ovih spojeva u vodenom svijetu (78). Zbog zabrinutosti oko sigurnosnih razloga, regulatorna tijela su razvila smjernice za korištenje otapala u farmaceutskoj industriji (30). Određene farmaceutske kompanije su razvile vodiče za pomoć pri odabiru ekološki prihvatljivijih otapala za farmaceutske procese (79). American Chemical Society Green Chemistry Institute Pharmaceutical Roundtable, osnovan 2005. godine, okuplja skupinu farmaceutskih kompanija koje su prigrlile zelen principe i implementirale zelene prakse u dizajnu i proizvodnji farmaceutskih proizvoda (80). Mnoge farmaceutske kompanije usmjeravaju pozornost na smanjenje uporabe otapala i zamjenu mnogih tradicionalnih organskih otapala, kao što su klorirani i aromatski ugljikovodici, više ekološki prihvatljivim alternativama, kao što su niži alkoholi, ester i neki eteri, primjerice metil terc-butil eter (MTBE). Znanstvenici farmaceutskih kompanija su razvili vodič za odabir otapala za medicinske kemičare, dijeleći otapala u tri kategorije: nepoželjno (crveno), upotrebljivo (žuto) i poželjno (zeleno) (81). Budući da su glavni izvori otpada u proizvodnji kemikalija stehiometrijski reagensi i gubici otapala, rješenje za problem otpada je evidentno korištenje katalitičkih reakcija u alternativnim reakcijskim medijima (82, 83). Što se tiče potonjeg, najbolje otapalo je „bez otapala“, ali ako je otapalo potrebno, trebalo bi biti sigurno za upotrebu i trebale bi postojati odredbe za njegovo učinkovito odvajanje od proizvoda i ponovnu upotrebu. Razni nekonvencionalni reakcijski mediji se intenzivno proučavaju, uključujući vodu, superkritični CO₂, ILs, same ili u tekuće-tekuće bifazičnim kombinacijama (30, 84, 85). Uporaba vode i superkritičnog CO₂ kao reakcijskog medija dobro se uklapa u trend korištenja obnovljivih sirovina temeljenih na biomasi, koji se u konačnici dobivaju iz ugljičnog dioksida i vode (30).

1.2.5.6. Zelene metode u farmaceutskoj analizi

Principi zelene analitičke kemije su uspješno primijenjeni na određivanje širokog spektra farmaceutskih spojeva iz matrica različite prirode. U tom smislu, ne treba zaboraviti da je farmaceutska analiza uključena u sve faze razvoja i kontrole lijekova, kao i studije okoliša i hrane, između ostalog, te da je, stoga, kao rezultat važnog opsega analiza primjena zelenih analitičkih metoda vrlo potrebna. Vrlo se često pozornost skreće na to da se koriste zelena, razgradiva i netoksična otapala i sorbensi, kao i primjena nanomaterijala ili sorbensa visokog kapaciteta ekstrakcije u kojima je količina drugih otapala i reagensa drastično smanjena, s njihovim drugim prednostima u pogledu održivosti. Primjerice Ils su uspješno korištene u ekstrakcijama antidepresiva, psihotropnih lijekova, antibiotika, inhibitora acetilkolinesteraze i nesteroidnih protuupalnih antireumatika iz različitih matrica, DLLME je primijenjena u određivanju triju beta-blokatora iz uzoraka humane krvi, a magnetna DLLME u određivanju diklofenaka iz ljudskog urina. Razvijene su metode mikroekstrakcije koristeći duboka eutektička otapala za određivanje antidepresiva, opijata, salbutamola, paracetamola, antibiotika, sulfonamida, antiaritmika i nesteroidnih protuupalnih antireumatika iz različitih matrica. Supramolekularna otapala (engl. *Supramolecular Solvents*, SUPRASs) su implementirana za određivanje tricikličkih antidepresiva, nesteroidnih protuupalnih antireumatika, metotreksata, metadona, sulfonamida iz složenih matrica. Promjenjiva hidrofilna otapala (engl. *Switchable Hydrophilicity Solvents*, SHSs) korištena su u određivanju nesteroidnih protuupalnih antireumatika, kloramfenikola, metadona, tramadola, antidepresiva, nitrazepam, metamfetamina i antibiotika iz različitih uzoraka. U određivanju farmaceutika temeljem postupaka mikroekstrakcije na bazi otapala uspješno su implementirani i vodeni dvofazni sistemi. Općenito, literatura recentnih datuma pokazuje značajan broj primjena

nanomaterijala, prirodnih sorbena i zelenih otapala u području farmaceutskih analiza, a najbrojnije su one posvećene analizi uzoraka vode (86).

Analitički su postupci temelj u razvoju farmaceutskih lijekova i uključeni su u različite faze farmaceutske proizvodnje, kao što je analiza API-ja, određivanje čistoće, odvajanje enantiomera i određivanje produkata razgradnje (87). Tekućinska kromatografija visoke učinkovitosti obrnute faze (engl. *Reverse Phase High-Performance Liquid Chromatography*, RP-HPLC) najrašireniji je analitički alat za farmaceutske analize. Doista, to je najvažnija tehnika uključena u kontrolu kvalitete lijekova (tj. analiza API-ja, određivanje onečišćenja i produkata razgradnje za ispitivanje stabilnosti proizvoda i određivanje enantiomerne čistoće) i također u određivanju lijekova i metabolita u biološkim uzorcima.

Što se tiče zdravstvenih i ekoloških problema organskih otapala koja se obično koriste u RP-HPLC tehnici, ozelenjavanje RP-HPLC metoda izazvalo je veliko zanimanje analitičke zajednice, čiji je cilj potraga za novim alternativama za zamjenu analitičkih metoda koje zagađuju čišćima. Organska otapala koja su općenito prihvaćena kao zelena, a koja mogu se koristiti u RP-HPLC, su etanol, izopropanol i *n*-propanol. Naveliko su istraživane metode zelene RR-HPLC koje koriste pokretne faze na bazi etanola za analizu lijekova u farmaceutskim proizvodima, kao i u biološkim uzorcima. Ove su metode razvijene za primjerice analizu statina, kombinacije fenilefrina, paracetamola i gvaifenezina, prednizolona, diltiazema, ampicilina, daptomicina, dekstrometorfana, telmisartana, hidroklorotiazida i amlodipina, kapecitabina, kvetiapina i drugih farmaceutskih aktivnih tvari. Nadalje razvijene su metode za analizu paracetamola, kofeina i acetilsalicilatne kiseline koristeći etil laktat kao pokretnu fazu i metoda za analizu indometacina koristeći etil acetat (88). Također, nedavno je razvijena zelena metoda HPLC obrnute faze za kvantitativnu analizu određenih onečišćenja zamjenom uobičajeno korištenih organskih otapala

kao što su acetonitril i metanol, etanolom (48). Opisana je i uporaba tekućinske kromatografije s vodom pri visokoj temperaturi kao pokretnom fazom (engl. *SuperHeated Water Liquid Chromatography*, SHWLC) za uspješnu analizu testosterona i nekoliko srodnih spojeva, lijekova protiv prehlade, kao i nekoliko antitumorskih lijekova. Nadalje, micelarna tekućinska kromatografija je korištena za analizu tricikličkih antidepresiva, šest beta-blokatora, ampicilina, sildenafilila, nikotina, tamoksifena, piroksikama, tenoksikama i lornoksikama, kodeina i niz drugih API-ja. ILs uspješno su korištene za analizu beta-blokatora, antidepresiva, laktamskih antibiotika, efedrina i nekih vitamina (88). Razvijene su metode za određivanje favipiravira koristeći micelarnu tekućinsku kromatografiju bez otapala i spektrofotometrijske metode. Predložene metode su ekološke jer se temelje na biorazgradivim reagensima u vodenim fazama bez otapala što je i potvrđeno korištenjem zelene metrike (89). Nadalje, slijedeći principe zelene kemije, razvijena je zelena UPLC metoda za određivanje izosorbit dinitrata i hidralazin hidroklorida i određivanje farmaceutika u površinskim i otpadnim vodama (90, 91). Etanol je uspješno korišten kao pokretna faza za tankoslojnu kromatografiju obrnute faze (engl. *reverse-phase high-performance thin layer chromatography*, RP-HPTLC) u određivanju sildenafilila i njegovih razgradnih produkata (92). Razvijena je i zelena metoda micelarne elektrokinetičke kromatografije za istodobno određivanje fluorokinolona i glukokortikoida prisutnih u različitim formulacijama za oftalmičku primjenu (93).

Dvije ekološki prihvatljive UV spektrofotometrijske metode su razvijene za detekciju moksifloksacin klorida i flavoksalat klorida iz formulacija koristeći vodu kao otapalo (92). Validirane su tri brze, točne i ekološki prihvatljive spektrofotometrijske metode za istovremeno određivanje remogliflozina i vildagliptina iz formulacija koristeći vodu kao otapalo (94). Nadalje, predložena je zelena spektrofotometrijska metoda za određivanje remdesivira, rupatadina i

montelukasta, kao i za određivanje dantrolen natrija u formulacijama i tramadola s ibuprofenom ili klorzoksazonom (95-98).

1.2.5.7. **Obrada** otpadnih voda

Postoje različiti pristupi kako postići zelenije procese, drugačiji od implementacije zelenih principa i uporabe vodiča za odabir otapala. Inovativne se metode kontinuirano istražuju kako bi se razvili procesi koji su učinkovitiji i koji imaju manji učinak na okoliš (4). Neke metode koje se mogu koristiti kako bi se proces učinio ekološki prihvatljivijim uključuju reakcije „u jednom loncu“ koje smanjuju broj koraka pročišćavanja i korištenje otapala, biokatalizatori i kontinuirana proizvodnja (99-101). Druge mjere koje se mogu provesti za smanjenje utjecaja farmaceutske proizvodnje na okoliš uključuju **obradu industrijskih i komunalnih otpadnih voda** čijim bi se pročišćavanjem **smanjilo onečišćenje** morskog i vodenog okoliša API-jima (4).

Postojeći sustavi za pročišćavanje otpadnih voda nisu dizajnirani specifično da uklanjaju lijekove. Neki se eliminiraju, ali neki zaostaju. Iako se farmaceutici u postrojenjima za pročišćavanje otpadnih voda većinom pronalaze u koncentracijama koje se kreću od nanograma to mikrograma po litri, što su preniske koncentracije da bi uzrokovale toksičnost, oni su ipak biološki aktivne supstancije koje imaju potencijal za kroničnu toksičnost i bioakumulaciju (102). Prema istraživanju u Ujedinjenoj Kraljevini oko 13 % otpadnih voda sadržava potencijalno opasne koncentracije različitih lijekova (6, 103). Neka istraživanja procjenjuju i da se do 70 % otpadnih voda uopće ne pročišćava, a ova problematika je u zemljama u razvoju sigurno i veća (6, 104).

Zbog nepotpune eliminacije tijekom **uobičajene obrade** otpadnih voda i potencijalnog rizika za okoliš, izražen je interes za razvojem alternativnih metoda, osobito biološke

transformacije ovih polutanata kao zelene tehnologije (105, 106). Primjerice, karbamazepin, koji se nepotpuno uklanja i stoga je često detektiran u otpadnim vodama, se može razgraditi gljivom *Trametes versicolor* i do 94 %, a ofloksacin do 99 % (107-109). Nadalje, gljiva *Phanerochaete chrysosporium* u nekoliko dana uklanja i do 99 % paracetamola (110). Pokazalo se da gljivica *Penicillium oxalicum* može potpuno razgraditi određene koncentracije diklofenaka unutar 24 sata (111). *P. oxacilum* postiže potpunu degradaciju kombinacije lijekova paracetamola, diklofenaka, ibuprofena, ketoprofena i naproksena u bioreaktoru uz dodatak glukoze unutar osam dana (112). Jedan od najvećih izazova za implementaciju ovih metoda je održavanje kontroliranih uvjeta, primjerice pH (110). U tu svrhu se istražuju miješane bakterijske kulture i kombinacije različitih mikroorganizama (10). Gljive *Imleria badia* i *Lentinula Edodes* unutar sedam dana potpuno uklanjaju cefalosporinski antibiotik cefuroksim aksetil (113). Gljiva *Leptosphaerulina sp.* unutar šest dana uklanja oxacilin (114). Također, gljiva *Irpex lacteus* uklanja fluorokinolone flumekvin, ciprofloksacin i ofloksacin unutar šest dana (115, 116). U svrhu uklanjanja antibiotika iz otpadnih voda, **gljive bi mole pronaći ulogu** s obzirom na to da bakterije mogu brzo steći otpornost na antibiotike i na taj način pridonijeti širenju te otpornosti (10).

Bioapsorpcija je također **proces** kojom gljive mogu uklanjati aktivne supstancije, tako, primjerice, *L. edodes* and *Agaricus bisporus* uklanjaju 100 % 17 α -etinilestradiola u 20 i 30 minuta apsorpcijom (117). Sorpcija farmaceutika se može poboljšati povećanjem koncentracije biomase, povećavajući vrijeme koje otpadne vode prolaze kroz proces obrade (engl. *Hydraulic Retention Time*, HRT) i produljenjem razdoblja u kojem se aktivni čvrsti mulj ili bakterije zadržavaju u sustavu (engl. *Solids Retention Time*, SRT). Povećanje biomase će stvoriti veću površinu za sorpciju aktivnih tvari, dulji HNL povećat će kontakt između prisutnih mikroorganizama i farmaceutika, povećavajući učinkovitost tretmana, a dulji SRT će pospešiti odvajanje mulja i rast

sporije rastućih mikroorganizama koji su prikladniji za uklanjanje određenih lijekova kao što su ciprofloksacin i gemfibrozil. I pH i temperatura dodatno igraju značajnu ulogu u tretmanu otpadnih voda. Karakteristike aktivnih tvari koje utječu na topljivost, hidrofobnost i hidrofilnost ovise o prisutnim uvjetima. Kemijska modifikacija farmaceutika putem biotransformacije je visoko ovisna o pH i temperaturi tijekom tretmana i mikrobi su izuzetno osjetljivi na promjene okoliša, što utječe na učinkovitost uklanjanja (31).

Korištenje izoliranih gljivičnih enzima moglo bi prevladati neka ograničenja povezana s mikoremedijacijom. Međutim, poteškoće u uzgoju gljiva u velikim razmjerima, zajedno s dugim procesima inkubacije, ekstenzivnom fazom rasta potaknulo je istraživanje i ekstrakciju sirovih i izoliranih enzima (118). Ipak, do danas je glavni ograničavajući čimbenik visoka cijena postupka pročišćavanja enzimima (10). S druge strane, iako korištenje izoliranih enzima skraćuje vrijeme remedijacije, ono može imati manju učinkovitost što je povezano s aktivnostima biosorpcije i drugih enzima (119).

1.2.6. Zelena metrika

Nakon što smo definirali što je zelena kemija moramo moći uspoređivati procese (i proizvode) na temelju njihove zelenosti. Ne postoji apsolutno zelenilo, jedan je proces zeleniji od drugog procesa (30). Farmaceutske kompanije mogu procijeniti koliko je zelen proces implementacijom zelene metrike (120). Najšire prihvaćene mjere za procjenu utjecaja kemijskih procesa na okoliš su vjerojatno ne slučajno i dvije najjednostavnije: E-faktor (engl. *Environmental Factor*), definiran kao omjer mase otpada i željenog proizvoda i atomska ekonomičnost (engl. *Atom Economy*, AE), definiran kao molekularna masa željenog produkta podijeljena zbrojem

molekularnih masa svih proizvedenih tvari u stehiometrijskoj jednadžbi, izraženo kao postotak (29, 30).

E faktor je stvarna količina otpada proizvedena u procesu, definirana kao sve osim željenog proizvoda. Uzima u obzir kemijski prinos i uključuje sve reagense, gubitke otapala, sva pomoćna sredstva u procesu i u načelu čak i potrebnu energiju jer to stvara otpad u obliku ugljikovog dioksida. Voda se općenito isključuje iz računa E faktora jer je procijenjeno da njeno uključivanje dovodi do iznimno visokih E faktora u mnogim slučajevima i čini smislene usporedbe procesa teškima. Na primjer, kada se uzme u obzir tok vodenog otpada, samo se anorganske soli i organski spojevi sadržani u vodi uzimaju u račun dok je voda isključena. Međutim, postoji određeni trend, barem u farmaceutskoj industriji, prema uključivanju vode u E faktor. Viši E faktor znači i više otpada, i posljedično, veći negativni utjecaj na okoliš. Idealni E faktor je nula. Jednostavno rečeno, to su kilogrami sirovina koje ulaze u proces minus kilogrami željenog proizvoda podijeljeno s kilogramima koji su izašli iz procesa. Može se lako izračunati poznavanjem broja kupljenih tona sirovih materijala i broja tona prodanog proizvoda, za određeni proizvod, proizvodno mjesto ili čak cijelu tvrtku. Napominje se da ova metoda u izračunu automatski isključuje vodu korištenu u procesu, ali ne i vodu koja je nastala. E faktor je naširoko prihvaćen u kemijskoj industriji, a osobito u farmaceutskoj industriji kao korisna metrika za procjenu utjecaja procesa proizvodnje na okoliš (30). U idealnom procesu svi atomi završe u proizvodu s iskorištenjem atoma od 100 % i teorijskim E faktorom nula. U praksi naravno, E faktor nije nula jer se koriste pomoćni materijali, prinos proizvoda nije 100 %, a često se koriste prekomjerne količine reagensa (29).

Poznavanje stehiometrijske jednadžbe omogućuje nam da bez ikakvog eksperimenta predvidimo teoretsku količinu otpada koja se može očekivati. Iskustvo s procesom floroglucinola dovelo je do uporabe onoga što smo nazvali korištenje atoma za brzu procjenu prihvatljivosti za

okoliš alternativnih proces. AE je teorijski broj koji se temelji na kemijskom prinosu od 100 % od teorijskog i pretpostavlja da se reaktanti koriste u točno stehiometrijskim količinama. Zanemaruje tvari, poput otapala i kiselina ili baza koje se koriste u obradi, a ne pojavljuju se u stehiometrijskoj jednadžbi (30).

Predložene su i druge metrike za mjerenje prihvatljivosti procesa za okoliš. One se mogu kategorizirati u dvije vrste, metriku koja predstavlja doradu AE koncepta tj. onih koje se temelje na stehiometrijskoj jednadžbi reakcija i metrike koje su varijacije na temu E faktora tj. bave se stvarnom količinom otpada koji je nastao u procesu. Kao primjeri prvog su pojmovi učinkovitosti reakcijske mase (engl. *Reaction Mass Efficiency*, RME) i učinkovitost ugljika (engl. *Carbon Efficiency*, CE). RME se definira kao masa dobivenih proizvoda podijeljena s masom reaktanata u stehiometrijskoj jednadžbi, izražena kao postotak. To je usavršavanje AE koje izuma kemijski prinos proizvoda i stvarne korištene količine reaktanata u obzir. Nedostatak u usporedbi s AE je da se RME ne može koristiti za brze analize različitih procesa prije provođenja bilo kakvog eksperimentalnog rada. CE je sličan RME-u ali uzima u račun samo ugljik, tj. masu ugljika u dobivenom proizvodu, podijeljeno s ukupnom masom ugljika prisutnog u reaktantima. Primjer druge kategorije je intenzitet mase (engl. *Mass Intensity*, MI). Definiran je kao ukupna masa materijala korištenih u procesu podijeljena masom dobivenog proizvoda, izraženo kao postotak, a idealni MI je jedan u usporedbi s nulom za E faktor. Članice farmaceutske industrije odlučile su definirati MI procesa uključujući vodu i sada rutinski koriste ovu metriku za svrhe usporedbe. Ovo i ima smisla jer farmaceutska industrija koristi visoko pročišćenu vodu i postoje utjecaji na životni ciklus povezani s kemikalijama i opremom koja se koristi za pročišćavanje vode. Tu je i problem miješanih vodeno-organskih tokova otpada, za koje su možda potrebni dodatni postupci za odvajanje toka vode prije obrade otpadnih voda, a kada to nije moguće može se završiti

spaljivanjem smjesa sa značajnom količinama vode što ima implikacije na potrošnju energije. Konačno, u mnogim dijelovima svijeta natjecanje za pitku vodu postaje sve veći problem i bit će sve veći problem u budućnosti. Posljedično, metrike za vodu se češće koriste. Autori koji su predložili MI, predložili su i korištenje tzv. produktivnosti mase što je recipročna vrijednost MI. Predložena je i analogna metrika efektivni maseni prinos (engl. *Effective Mass Yield*, EMY), definiran kao masa željenog proizvoda podijeljena s ukupnom masom nebenignih reaktanata korištenih u pripremi. EMY ne uključuje tzv. ekološki benigne spojeve, kao što su NaCl, octena kiselina i dr. Ovo je upitno jer utjecaj takvih tvari na okoliš nije nula i ovisi o volumenu. Definiranje nebenignog je teško i proizvoljno pa se smatra da EMY nije jasno definiran (30).

Sve spomenute metrike u obzir uzimaju samo masu generiranog otpada. Međutim, učinak otpada na okoliš nije određen samo njegovom količinom nego i njegovom prirodom. Jedan kilogram natrijevog klorida očito nije ekvivalentan jednom kilogramu soli kroma. Kako bi se i ovo uzelo u obzir, razvijen je okolišni kvocijent (engl. *Environmental Quotient*, EQ), dobiven na način da se E faktor množi s proizvoljno dodijeljenim nepovoljnijim kvocijentom Q. Na primjer, može se proizvoljno dodijeliti Q vrijednost 1 za NaCl i, recimo, 100 – 1000 za sol teških metala, kao što je recimo krom, ovisno o njegovoj toksičnosti, lakoći recikliranja i sl. Veličina Q je očito diskutabilna i teško ju je kvantificirati, ali, što je još važnije, kvantitativnu procjenu utjecaja kemijskih procesa na okoliš, u načelu je moguće dobiti. Nadalje, Q za određenu tvar može biti pod utjecajem obujma proizvodnje i lokacije proizvodnih pogona. Na primjer, generiranje 100 – 1000 tona natrijevog klorida godišnje malo vjerojatno predstavlja problem, ali 10 000 tona godišnje, nasuprot tome, može predstavljati veći problem odlaganja, stoga opravdava povećanje Q. Ironično, kada nastaju vrlo velike količine natrijevog klorida, Q vrijednost bi se ponovno mogla smanjiti jer recikliranje elektrolizom postaje održiv prijedlog. Tako, općenito govoreći Q vrijednost određenog

otpada će biti određena lakoćom odlaganja ili recikliranja. Organski je otpad, općenito govoreći, lakše zbrinuti nego anorganski otpad, a to je važno kada uzmemo u obzir zelene metrike biokatalitičkih procesa (30).



Slika 3. Primjer kemijske reakcije

U gornjoj reakciji stvarni utjecaj na okoliš ne uključuje samo korištenje materijala A, B, D i obradu i odlaganje bilo kakvog povezanog otpada, nego i utjecaje materijala i energije koja se koristi za proizvodnju A, B i D (Slika 3) (121). Pristup procjeni utjecaja na okoliš i održivosti proizvoda i procesa općenito je procjena životnog ciklusa (engl. *Life Cycle Assessment*, LCA). Ovo uključuje procjenu proizvoda i procesa unutar definiranih domena, npr. od vrata do vrata, na osnovu mjerljivih pokazatelja utjecaja na okoliš, poput utrošene energije, globalnog zagrijavanja, oštećenja ozona, acidifikacije, eutrofikacije, stvaranja smoga i ekotoksičnosti, uz stvoreni otpad. U biti, LCA je integracija količine otpada s mjerljivim učincima uzrokovanim otpadom, kao što je stvaranje smoga, i stoga nalikuje EQ (30).

Uključivanje koncepta održivosti u dizajn procesa zahtijeva značajnu promjenu ponašanja ljudi u industriji i akademske zajednice i uspjeh ove promjene ponašanja se može mjeriti kroz napredak koji je postignut u razvoju zelenijih procesa. Ta želja za mjerenjem napretka dovela je do mnogo različitih prijedloga o tome kako mjeriti koliko je proces zelen iz kemijske i inženjerske perspektive. Kako sve više znanstvenika i inženjera uključuje zelene metrike u analize svojih procesa, također bi trebali razmotriti uključenje zelene metrike pri dizajniranju procesa kao što uključuju ekonomske, tehničke i društvene metrike. Ukratko, mjerenje koliko je proces zelen se

ne odnosi samo na određivanje količine otpada, već zahtijeva holistički pristup, uzimajući u obzir gore navedeni širi fokus (121).

Jedan od glavnih izazova je procjena zelenosti kemijskih procesa i postavljanje toga u širi kontekst analize životnog ciklusa, za koje postoji niz alata za procjenu. Razne metrike, različitih vrsta, koriste se za kvantificiranje ekoloških, ekonomskih, zdravstvenih i sigurnosnih posljedica kemikalija u procesima (122). Ne postoji jedna jedina ili jednostavna metrika koja mjeri ukupnu učinkovitost procesa tako da je potreban multivarijatan pristup kako bi se utvrdilo koji su čimbenici najvažniji za bilo koji proces (121).

Izbor metrike najviše ovisi o osobnim preferencijama ili kontekstu primjene, što znači da je univerzalni skup metrika prikladan za primjerice farmaceutske tvrtke, trenutno ne postoji. Međutim, dostupno je nekoliko metoda i skupova alata za specifične potrebe korisnika. Ovi se alati oslanjaju na dobro poznate metrike, kao što su intenzitet mase procesa, okolišni faktor (E faktor), prinos, itd. za procjenu je li kemijski proces učinkovit i jesu li kemikalije sigurne i je li uporaba opasnih kemikalija minimizirana. Nadalje, uvedene su nove metrike, primjerice u analitičkoj kemiji, Eco-Scale, GAPI (engl. *Green Analytical Procedure Index*), AGREE (engl. *Analytical Greenness Calculator*) ili u farmaceutskoj kemiji iGAL (engl. *Innovation Green Aspiration Level*), AMGS (engl. *Analytical Method Greenness Score*), eco-label i dr. (122).

2. Cilj istraživanja

Dobra proizvođačka praksa (engl. *Good Manufacturing Practice*, GMP) u farmaciji zahtijeva praćenje API-ja unutar laboratorija za kontrolu kvalitete kroz više koraka proizvodnje. Ovi koraci uključuju provjeru API-ja kao sirovine, kao međuprodukta tijekom kontrole unutar procesa, nakon pakiranja i za ispitivanje stabilnosti tijekom vremena trajanja proizvoda. Ova činjenica, među ostalim, dovodi do ponovljenog testiranja farmaceutskih supstanci za različite farmaceutske proizvode. Ovaj pristup je skup i dugotrajan, a često nije ni ekološki prihvatljiv. Nažalost, uporaba zelenih analitičkih metoda još uvijek je ograničena u farmaceutskom području, posebice u aktivnostima kontrole kvalitete. Ozelenjavanje analitičkih metoda postalo je od velikog interesa u području farmaceutske analize kako bi se zaštitilo zdravlje analitičara i okoliš. Metode po kojima se ispituju djelatne tvari, dio gotovih lijekova i dr. propisane su farmakopejama, stoga je cilj ovog istraživanja na modelu izabranih djelatnih tvari ispitati koliko su zelene metode za određivanje sadržaja i onečišćenja tih tvari u Europskoj farmakopeji.

3. Materijal i metode

3.1. Procjena ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda

Kako bi se ispitala ekološka prihvatljivost analitičkih metoda koje se koriste u određivanju sadržaja i onečišćenja lijekova prema Europskoj farmakopeji odabrana je skupina lijekova koja se koristi u terapiji upalne bolesti crijeva. Razmatrane su monografije šest lijekova iz skupine imunosupresiva i 5-aminosalicilata: azatioprin, merkaptopurin, mesalazin, sulfasalazin, budesonid i osalazin, a pretraživana je Europska farmakopeja 10.3. Vršena je procjena zelenosti metoda opisanih za određivanje sadržaja i onečišćenja navedenih djelatnih tvari. **Monografije nerijetko imaju opisano više metode za različita onečišćenja istog API-ja pa je u ovakvim slučajevima procjena napravljena za svaku metodu posebno.** Zelenost opisanih metoda određena je koristeći dva slobodno dostupna alata AGREE i AMGS (80, 123). Programi su dostupni na poveznicama <https://mostwiedzy.pl/en/wojciech-wojnowski,174235-1/AGREE> odnosno <https://www.acsgcipr.org/amgs/>.

Za procjenu ekološke prihvatljivosti metoda sukladno AGREE alatu korišteni su specifični ulazni podaci prikazani u Tablici 2. Primjerice za metodu određivanja sadržaja azatioprina procijenjeno je da je potrebna minimalna količina uzorka od 0,25 g, da se metoda odvija u 3 ili manje koraka i da nastaje barem 35 ml otpada. Ulazni podaci korišteni za procjenu ekološke prihvatljivosti metoda preko AMGS alata su navedeni u dodatku rada pojedinačno s obzirom na API i metodu (9.1.3., 9.2.2., 9.2.4., 9.3.3., 9.4.3., 9.4.5., 9.5.7., 9.5.3., 9.6.3., 9.6.5.).

Tablica 2. Ulazni podaci za procjenu ekološke prihvatljivosti ispitivanih metoda

| Aktivna farmaceutska supatancija | Metoda | Količina uzorka (g ili ml) | Broj koraka u postupku | Količina otpada (g ili ml) | Broj analita koji se određuju | Broj uzoraka analiziranih po satu | Energetski najintenzivnija tehnika | Količina otrovnog reagensa (g ili ml) | Priroda otapala |
|----------------------------------|-------------------|----------------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------|
| azatioprin | sadržaj | 0,25 | 3 ili manje | 35 | 1 | 6 | potencijometrija | 35 | zapaljivo i nadražujuće |
| | onečišćenje | 0,01 | 8 ili više | 1407 | 7 | 0,74 | tekućinska kromatografija | 137,55 | zapaljivo i nadražujuće |
| budesonid | sadržaj | 0,025 | 6 | 1101,5 | 1 | 0,49 | tekućinska kromatografija | 451,5 | zapaljivo |
| | onečišćenje | 0,025 | 7 | 1164 | 12 | 0,25 | tekućinska kromatografija | 462,7 | zapaljivo |
| merkaptopurin | sadržaj | 0,1 | 3 ili manje | 57 | 1 | 6 | potencijometrija | 57 | zapaljivo i nadražujuće |
| | onečišćenje | 0,012 | 8 ili više | 1898 | 4 | 0,48 | tekućinska kromatografija | 1898 | zapaljivo i nadražujuće |
| mesalazin | sadržaj | 0,05 | 3 ili manje | 104 | 1 | 6 | potencijometrija | 4 | nadražujuće |
| | onečišćenje (I) | 0,05 | 8 ili više | 2000 | 2 | 0,48 | tekućinska kromatografija | 2000 | zapaljivo i nadražujuće |
| | onečišćenje (II) | 0,04 | 8 ili više | 1000 | 1 | 0,95 | tekućinska kromatografija | 150 | zapaljivo |
| | onečišćenje (III) | 0,01 | 8 ili više | 1976 | 10 | 0,25 | tekućinska kromatografija | 676 | zapaljivo i nadražujuće |
| osalazin | sadržaj | 0,1 | 3 ili manje | 122,4 | 1 | 3 | potencijometrija | 92 | zapaljivo i nadražujuće |
| | onečišćenje | 0,02 | 7 | 3075 | 9 | 0,31 | tekućinska kromatografija | 950 | zapaljivo i nadražujuće |
| sulfasalazin | sadržaj | 0,15 | 8 ili više | 2190 | 1 | 3 | UV/Vis | 240 | zapaljivo i nadražujuće |
| | onečišćenje (I) | 0,025 | 4 | 1624 | 8 | 0,31 | tekućinska kromatografija | 324 | zapaljivo i nadražujuće |
| | onečišćenje (II) | 0,025 | 6 | 1633 | 2 | 2 | tekućinska kromatografija | 333 | zapaljivo i nadražujuće |

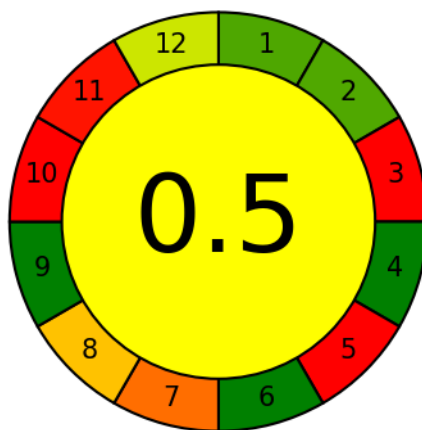
3.2. Statistička obrada podataka

Dobiveni rezultati **alata za izračun** zelenosti metoda su pojedinačno opisani, a za usporedbu dvaju **izračuna** korišten je test Spearmanove korelacije. Statistička značajnost je postavljena na $p < 0,05$. Statistička analiza je napravljena koristeći softver MedCalc verzija 19.1.2 (MedCalc Software, Ostend, Belgija).

4. Rezultati

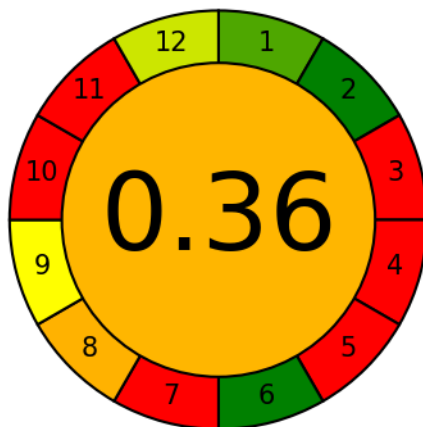
4.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja azatioprina

AGREE zbir za metodu određivanja sadržaja azatioprina iznosio je 0,5 (Slika 4). Prema indikatoru boja, najveći doprinos niskom zbiru nosila su načela 3, 5, 10 i 11, odnosno pozicioniranje instrumenta, manualna izvedba i ne korištenje minijaturizirane pripreme uzorka, kao i priroda korištenih reagensa. Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.1.1.). Za ovu metodu nije bilo moguće izračunati AMGS zbir.



Slika 4. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje sadržaja azatioprina

Za metodu određivanja onečišćenja azatioprina, pripadajući izračunati AGREE zbir je bio niži u odnosu na metodu za određivanje njegova sadržaja te je iznosio 0,36 (Slika 5). Sukladno piktogramu, osim pozicioniranja uređaja, cjelokupnog postupka pripreme uzorka i bio-reagensa, problematičan je i veliki broj analitičkih koraka, količina otpada koja nastaje i priroda, tj. toksičnost korištenih reagensa. Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.2.1.).

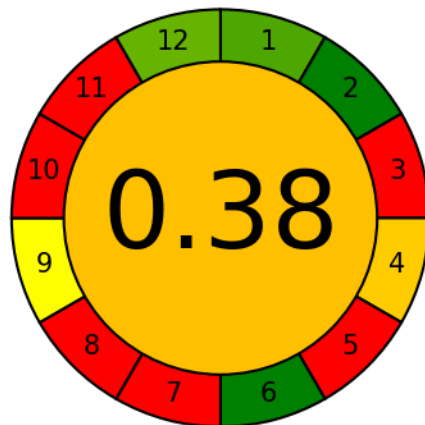


Slika 5. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje onečišćenja azatioprina

Prema AMGS izračunu za farmakopejsku metodu kojom se određuju onečišćenja azatioprina zbir iznosio je 58,63. Izračunati zbir energije instrumenta bio je 24,53, zbir energije otapala 6,88 i okolišni, zdravstveni i sigurnosni zbir otapala 27,21. Prema pretpostavkama **alata** ovakva razdioba doprinosa donekle zadovoljava, čime zbir energije otapala u ukupnom zbiru pridonosi sa svega 11,74 %, zbir energije instrumenta 41,84 %, a okolišni, zdravstveni i sigurnosni zbir otapala s 46,41 %. Detaljan AMGS izračun za farmakopejsku metodu kojom se određuju onečišćenja azatioprina je prikazan u dodatku rada (9.1.3.).

4.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja budesonida

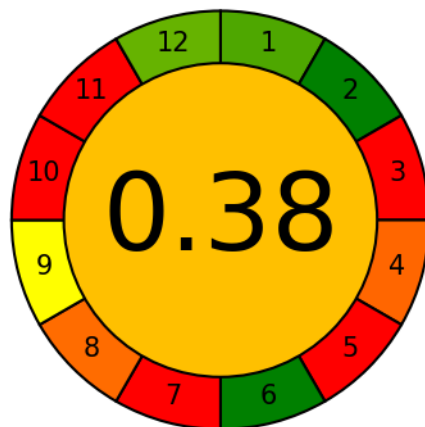
AGREE zbir za farmakopejsku metodu za određivanje sadržaja budesonida iznosio je 0,38 (Slika 6). Prema indikatoru boja, niskom zbiru najviše doprinosi čak 6 načela odnosno 3, 5, 7, 8, 10 i 11, dok prema načelima 1, 2, 6 i 12 metoda zadovoljavala kriterije. Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.2.1.).



Slika 6. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje sadržaja budesonida

Pripadajući AMGS zbir je izračunat kao 837,93. Prema tumačenju **alata** i razdiobi doprinosa pojedinih komponenti donekle zadovoljava. Najveći doprinos bio je energije otapala s 49,14 %, dok su energija instrumenta i okolišni, zdravstveni i sigurnosni zbir otapala doprinosili s nešto više od 25 %. Detaljan AMGS izračun za farmakopejsku metodu kojom se određuje sadržaj budesonida je prikazan u dodatku rada (9.2.2.).

Za farmakopejsku metodu kojom se određuju onečišćenja budesonida izračunat je AGREE zbir iste vrijednosti kao i za određivanje sadržaja odnosno 0,38 (Slika 7). Kako je vidljivo prema piktogramu, isto kao kod metode za određivanje njegova sadržaja samo po načelima 1, 2, 6 i 12, odnosno *in-field* uzorkovanje s direktnom analizom, malom količinom uzorka, izbjegavanjem derivatizacije i netoksičnim reagensima je metoda zadovoljila kriterije za zelenu analitičku metodu. Izračun prema svakoj domeni za metodu određivanja onečišćenja budesonida je dan u dodatku rada (9.2.3.).

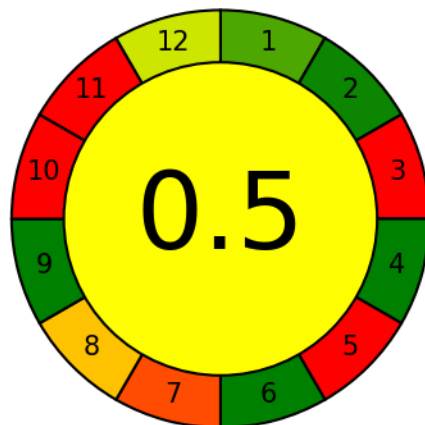


Slika 7. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje onečišćenja budesonida

Pripadajući AMGS zbir iznosio je 126,22, a prema **izračunu** zadovoljio je s doprinosom energije instrumenta (27,21 %) i okolišnim, zdravstvenim i sigurnosnim zbirom otapala (24,70 %) dok energija otapala doprinosi s 48,08 %. Detaljan AMGS izračun za farmakopejsku metodu određivanja onečišćenja budesonida je prikazan u dodatku rada (9.2.4.).

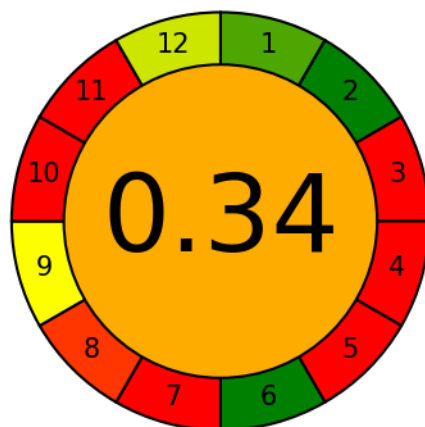
4.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja merkaptopurina

Za farmakopejsku metodu određivanja sadržaja merkaptopurina, pripadajući izračunati AGREE zbir iznosio je 0,5 (Slika 8). Kako je vidljivo iz piktograma, metoda ne zadovoljava prema načelima 3, 5, 7, 10 i 11 zelene analitičke kemije. Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.3.1.). Za ovu metodu nije bilo moguće izračunati AMGS zbir.



Slika 8. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje sadržaja merkaptopurina

Za farmakopejsku metodu za određivanje onečišćenja merkaptopurina, pripadajući AGREE zbir bio je niži, odnosno svega 0,34 (Slika 9). Iz piktograma je vidljivo da sukladno načelima zelene analitičke kemije metoda zadovoljavala samo po prvom, drugom i šestom načelu. Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.3.2.).



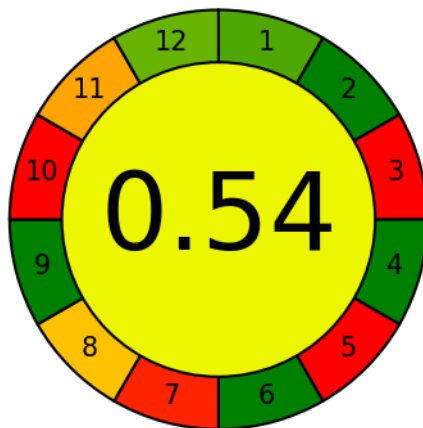
Slika 9. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje onečišćenja merkaptopurina

Sukladno AMGS-u, farmakopejska metoda za određivanje onečišćenja merkaptopurina je zadovoljila u pogledu energije instrumenta i energije otapala, dok nije zadovoljila u pogledu doprinosa okolišnog, zdravstvenog i sigurnosnog zbira otapala. Ukupni izračunati AMGS za

metodu je iznosio 188,87. Detaljan AMGS izračun za metodu kojom se određuju onečišćenja merkaptopurina je prikazan u dodatku rada (9.3.3.).

4.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja mesalazina

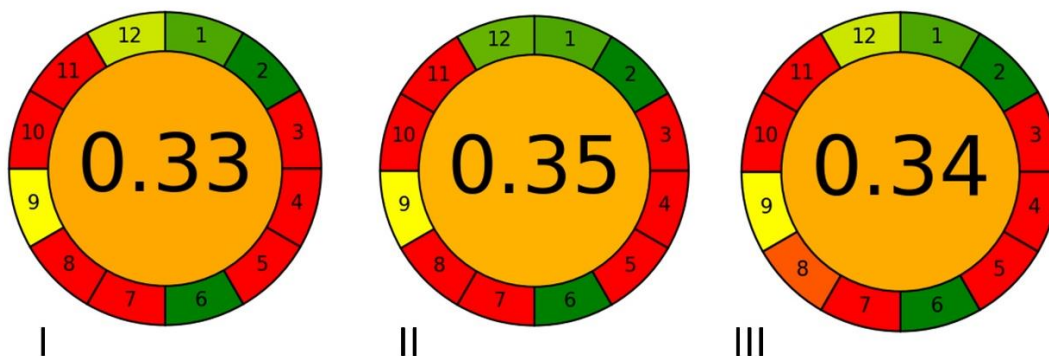
Sukladno farmakopejskoj metodi za određivanje sadržaja mesalazina, izračunat je pripadajući AGREE zbir od 0,54 (Slika 10), najviši u odnosu na ostale odabrane farmakopejske metode za određivanje sadržaja. Opisana metoda nije zadovoljavala prema načelima 3, 5, 7 i 10 (crveno), kao ni 8 i 10 (narančasto). Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.4.1.). Za ovu metodu nije bilo moguće izračunati AMGS zbir.



Slika 10. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje sadržaja mesalazina

Za određivanje onečišćenja mesalazina, ovisno o onečišćenju koje se određuje, farmakopejske metode uključuju tri različita analitička postupka. Pripadajući AGREE zbir za opisane metode je u rasponu od 0,33 do 0,35 (Slika 11). Niti jedna od opisanih metoda nije zadovoljavala prema načelima 3, 4, 5, 7, 8, 10 ni 11, odnosno zadovoljavaju u pogledu

uzorkovanja, male količine uzorka, izbjegavanja derivatizacije i relativno netoksičnih reagensa. Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.4.2., 9.4.4., 9.4.6.).

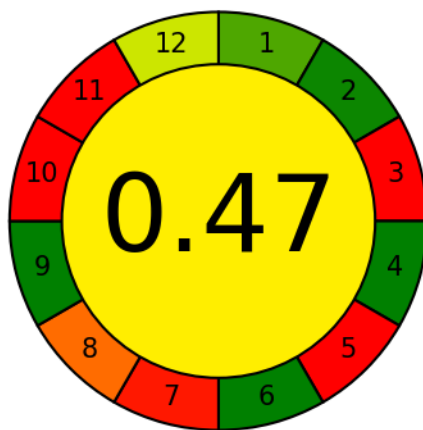


Slika 11. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje onečišćenja mesalazina (I – onečišćenja A i C; II – onečišćenje K; III – onečišćenja E, F, G, H, J, L, M, O, P, R)

Za prvu opisanu metodu za određivanje onečišćenja mesalazina, pripadajući AMGS zbir iznosio je 312,07. U pogledu doprinosa različitih komponenti, zadovoljila je samo energijom otapala. Za drugu opisanu metodu određivanja onečišćenja izračunat je AMGS zbir od 266,71. I ova metoda. Sukladno **izračunu**, zadovoljila je samo u pogledu energije otapala. Treća navedena metoda za određivanje onečišćenja mesalazina je prema AMGS zbiru najzelenija, 82,48. Ova metoda, prema **izračunu** zadovoljava doprinosom i energije i okolišnog, zdravstvenog i sigurnosnog zbira otapala s manje od 30 %. Detaljan AMGS izračun za metode kojima se određuju onečišćenja mesalazina je prikazan u dodatku rada (9.5.3., 9.4.5., 9.4.7.).

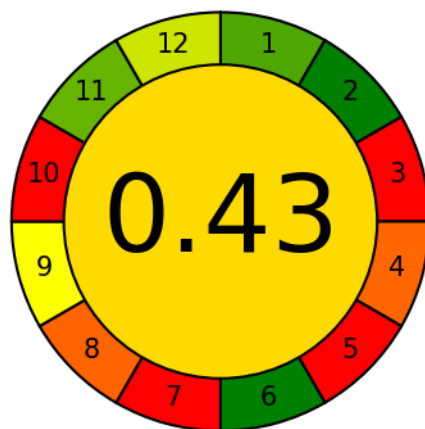
4.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja osalazina

Sukladno opisanoj farmakopejskoj metodi za određivanje sadržaja osalazina, izračunat je pripadajući AGREE zbir od 0,47. Ova metoda je zadovoljila prema načelima 1, 2, 4, 6, 9 i 12 kako je vidljivo iz prikazanog piktograma (Slika 12). Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.5.1.). Za ovu metodu nije bilo moguće izračunati AMGS zbir.



Slika 12. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje sadržaja osalazina

AGREE izračun za zelenost farmakopejske metode za određivanje onečišćenja osalazina iznosio je 0,43. Metoda nije zadovoljila sukladno načelima 3, 4, 5, 7, 8, 10 i 11, odnosno prema pozicioniranju instrumenta, broju koraka, stupnju automatizacije i minijaturizacije, količine otpada koja nastaje, trajanju metode i vrsti reagensa koji se koriste kako je vidljivo iz piktograma (Slika 13). Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.5.2.).

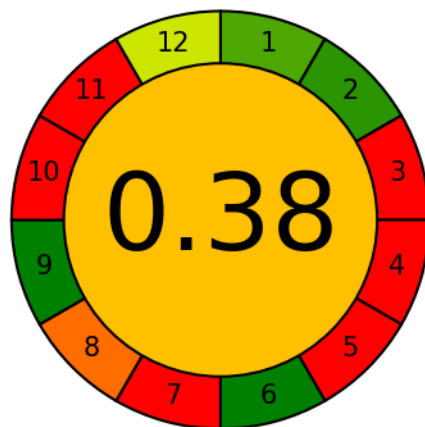


Slika 13. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje onečišćenja osalazina

Prema AMGS izračunu za farmakopejsku metodu kojim se određuju onečišćenja osalazina zbir iznosio je 73,67. Izračunati zbir energije instrumenta bio je 37,21, zbir energije otapala 24,95 i okolišni, zdravstveni i sigurnosni zbir otapala 11,51. Prema pretpostavkama **alata** ovakva razdioba ne zadovoljava samo u pogledu energije instrumenta koja u ukupnom zbiru doprinosi s više od 50 %. Detaljan AMGS izračun za metodu kojom se određuju onečišćenja osalazina je prikazan u dodatku rada (9.5.3.).

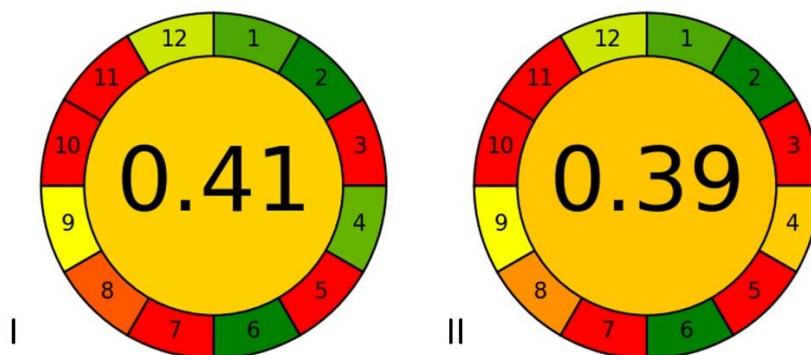
4.6. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja sulfasalazina

Izračunati AGREE zbir za farmakopejsku metodu određivanja sadržaja sulfasalazina bio je 0,38. Opisana metoda je zadovoljila prema kriterijima 1, 2, 6, 9 i 12 zelene analitičke kemije (Slika 14). Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.6.1.). Za ovu metodu nije bilo moguće izračunati AMGS zbir.



Slika 14. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje sadržaja sulfasalazina

Za određivanje onečišćenja sulfasalazina farmakopeja navodi dvije kromatografske metode ovisno o ciljanim onečišćenjima. Sukladno AGREE-u, opisane metode postižu zbir od 0,41, odnosno 0,39. Obje navedene metode zadovoljile su kriterij zelenosti u pogledu načela 1, 2, 6 i 12 zelene analitičke kemije (Slika 15). Izračun prema svakoj domeni je dan u dodatku rada (9.6.2., 9.6.4.).



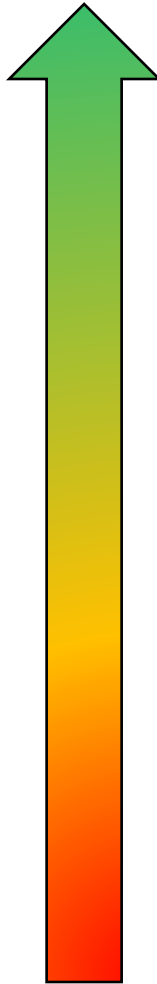
Slika 15. AGREE zbir farmakopejske metode za određivanje onečišćenja sulfasalazina (I – onečišćenja A, B, C, D, E, F, G, I; II – onečišćenja H i J)

Prema AMGS izračunu za prvu opisanu metodu za određivanje onečišćenja sulfasalazina zbir je iznosio 75,37. Izračunati zbir energije instrumenta bio je 41,86, zbir energije otapala 19,70 i okolišni, zdravstveni i sigurnosni zbir otapala 13,81. Prema pretpostavkama **alata** ovakva razdioba nije zadovoljila samo u pogledu energije instrumenta koja u ukupnom zbiru doprinosi s više od 50 %. Nadalje, za drugu opisanu metodu pripadajući AMGS zbir je iznosio 67,39. Sukladno **izračunu**, metoda je zadovoljila samo po pitanju energije otapala koja doprinosi s nešto manje od 8 %. U pogledu okolišnog, zdravstvenog i sigurnosnog zbira otapala metoda je doprinosila s više od 50 %. Detaljan AMGS izračun za obje farmakopejske metode određivanja onečišćenja sulfasalazina je prikazan u dodatku rada (9.6.3., 9.6.5.).

4.7. Usporedba AGREE i AMGS zbira

Prema provedenoj statističkoj obradi AGREE i AMGS rezultata za istraživane metode za koje je bilo moguće odrediti oba zbira, nije pronađena značajna korelacija među rezultatima **dvaju alata** ($r = -0,421$; $P = 0,226$). Poredak metoda prema izračunatom AGREE zbiru prikazan je u Tablici 2. Vidljivo je da niži AGREE zbir postižu najčešće metode za određivanje sadržaja, odnosno ove su metode u većem udjelu zelene.

Tablica 2. Poredak istraživanih farmakopejskih metoda prema zelenosti sukladno AGREE zbiru

| Tvar | Metoda | AGREE | Zelenost metode prema AGREE | AMGS |
|---------------|-------------------|-------|---|--------|
| mesalazin | sadržaj | 0,54 |  | - |
| merkaptopurin | sadržaj | 0,50 | | - |
| azatioprin | sadržaj | 0,50 | | - |
| osalazin | sadržaj | 0,47 | | - |
| osalazin | onečišćenje | 0,43 | | 73,67 |
| sulfasalazin | onečišćenje (I) | 0,41 | | 75,37 |
| budesonid | onečišćenje | 0,39 | | 126,22 |
| sulfasalazin | onečišćenje (II) | 0,39 | | 67,39 |
| sulfasalazin | sadržaj | 0,38 | | - |
| budesonid | sadržaj | 0,38 | | 837,93 |
| azatioprin | onečišćenje | 0,36 | | 58,63 |
| mesalazin | onečišćenje (II) | 0,35 | | 266,71 |
| mesalazin | onečišćenje (III) | 0,34 | | 82,48 |
| merkaptopurin | onečišćenje | 0,34 | | 188,87 |
| mesalazin | onečišćenje (I) | 0,33 | | 312,07 |

Poredak metoda prema izračunatom AMGS zbiru prikazan je u Tablici 3. Iz podataka je vidljivo da za cijeli niz ispitivanih metoda nije bilo moguće izračunati AMGS zbir. Nadalje, metoda za određivanje sadržaja budesonida je postigla jako visok AMGS zbir, odnosno sukladno parametrima kojima se ovaj alat vodi, smatra se najmanje zelenom od svih ispitivanih metoda.

Tablica 3. Poredak istraživanih farmakopejskih metoda prema zelenosti sukladno AMGS zbiru

| Tvar | Metoda | AGREE | AMGS | Zelenost prema AMGS |
|---------------|-------------------|--------------|-------------|----------------------------|
| azatioprin | onečišćenje | 0,36 | 58,63 | |
| sulfasalazin | onečišćenje (II) | 0,39 | 67,39 | |
| osalazin | onečišćenje | 0,43 | 73,67 | |
| sulfasalazin | onečišćenje (I) | 0,41 | 75,37 | |
| mesalazin | onečišćenje (III) | 0,34 | 82,48 | |
| budesonid | onečišćenje | 0,39 | 126,22 | |
| merkaptopurin | onečišćenje | 0,34 | 188,87 | |
| mesalazin | onečišćenje (II) | 0,35 | 266,71 | |
| mesalazin | onečišćenje (I) | 0,33 | 312,07 | |
| budesonid | sadržaj | 0,38 | 837,93 | |

5. Rasprava

S ciljem sveobuhvatne procjene ekološke prihvatljivosti analitičkih farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja i onečišćenja lijekova koji se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva, AGREE alat svaki od 12 načela zelene analitičke kemije prikazuje kao pripadajući zbir. Svaka od 12 ulaznih varijabli transformira se u zajedničku ljestvicu u rasponu od 0 do 1. Konačni rezultat iskazuje se kao umnožak ocjenjivanja za svako načelo. Rezultati procjene prikazuju se u obliku grafikona nalik satu, s ukupnim rezultatom prikazanim u njegovom središnjem dijelu. Izvedba postupka u svakom principu izražava se intuitivnom crveno-žuto-zelenom skalom boja, dok je težina svakog principa iskazana širinom njegovog odgovarajućeg segmenta.

Prvi princip zelene analitičke kemije nalaže da se koristiti direktna analiza, odnosno da se izbjegava obrada uzorka i korak pripreme uzorka što može drastično smanjiti okolišne, zdravstvene i sigurnosne probleme povezane s određenom metodologijom. Sukladno tome AGREE razlikuje različite razine zelenila kao što je prikazano u tablici 4. Prilikom unosa parametara farmakopejskih metoda za izabrane djelatne tvari u AGREE softver razmatrano je da je svaka analiza direktna s *in-field* uzorkovanjem. Za sve ispitane metode dobivena vrijednost za ovaj princip zelene analitičke kemije iznosila je 0,85 te je prikazana zelenom bojom.

Tablica 4. Stupanj obrade uzorka i pripadajući zbir prema AGREE

| Način obrade uzorka | Zbir |
|---|------|
| Daljinsko očitavanje bez oštećenja uzorka | 1,00 |
| Daljinsko očitavanje s malim fizičkim oštećenjem | 0,95 |
| Neinvazivna analiza | 0,90 |
| <i>In-field</i> uzorkovanje i direktna analiza | 0,85 |
| <i>In-field</i> uzorkovanje i <i>on-line</i> analiza | 0,78 |
| <i>On-line</i> analiza | 0,70 |
| <i>At-line</i> analiza | 0,60 |
| <i>Off-line</i> analiza | 0,48 |
| Prethodna obrada i obrada vanjskog uzorka i analiza serije (smanjeni broj koraka) | 0,30 |
| Prethodna obrada i obrada vanjskog uzorka i analiza serije (veliki broj koraka) | 0,00 |

Prema drugom načelu zelene analitičke kemije, minimalna veličina uzorka i minimalan broj uzoraka su ciljevi. Kako se drugo načelo pretvara u metriku je prikazano u tablici 5. Za ispitane farmakopejske metode dobivene vrijednosti ovog principa kretale su se u rasponu od 0,85 (farmakopejska metoda za određivanje sadržaja azatioprina) do 1,00 te su prikazane različitim nijansama zelene boje.

Tablica 5. AGREE zbir temeljem veličine uzorka

| Vrsta analize | Veličina uzorka (mg ili μL) | Zbir |
|-------------------|---|---|
| Ultramikroanaliza | < 1 | 1,00 |
| Mikroanaliza | 1 – 10 | |
| Semimikroanaliza | 10 – 100 | |
| Makroanaliza | > 100 | Prema jednadžbi $-0,142 \times \ln(\text{količina uzorka u g ili mL}) + 0,65$ |

Treće načelo zelene analitičke kemije ima za cilj određivanje ciljanih analita što je moguće izravnije. Važno je locirati uređaj blizu mjesta mjerenja, jer je u tom slučaju vrijeme između dvije

analize kratko, a vremensko kašnjenje između uzimanja uzorka i dobivanja relevantnih analitičkih informacija također je kratko. Konkretno, četiri mogućnosti, naime, *off-line*, *at-line*, *on-line* i *in-line* smatrani su ulaznim podacima za procjenu zbira sukladno tablici 6. S obzirom na prirodu farmakopejskih metoda gdje je priprema uzorka odvojena od njegove analize vrijednosti za ovaj princip za sve ispitane farmakopejske metode iznosile su 0,00 te su istaknute izrazito crvenom bojom.

Tablica 6. Transformacija položaja analitičkog uređaja prema ispitivanom objektu u numerički zbir prema AGREE

| Način povezanosti postupka pripreme te analize uzorka | Zbir |
|--|-------------|
| <i>in-line</i> | 1,00 |
| <i>on-line</i> | 0,66 |
| <i>at-line</i> | 0,33 |
| <i>off-line</i> | 0,00 |

Kako bi se procijenila prihvatljivost analitičke metode prema četvrtom načelu zelene analitičke kemije, program postavlja zbir 1,0 za postupke koji uključuju tri ili manje koraka, dok je za četiri, pet, šest, sedam i osam ili više koraka, zbir je postavljen na 0,8, 0,6, 0,4, 0,2, odnosno 0. Za ispitane farmakopejske metode vrijednost ovog načela kretala se u rasponu od visokih 1,00 do iznimno niskih 0,00. Štoviše, čak 4 metode su imale vrijednost 1,00 te im je ovaj princip bio obojen izrazito crvenom bojom. Ovo se odnosilo na titrimetrijske metode određivanja sadržaja.

Transformacija razina minijaturizacije i automatizacije u odgovarajući zbir prikazana je u tablici 7. Prilikom unosa parametara farmakopejskih metoda za izabrane djelatne tvari u AGREE program razmatrano je da je svaka analiza manualna i bez provedene minijaturizacije. Uzme li se u obzir da je napredne i automatizirane tehnike pripreme uzoraka nisu uključena u ispitanim

farmakopejskim metodama nije iznenađujuće da se za sve metode dobivene niske vrijednosti od 0,00 te je ovaj peti princip kod svih metoda istaknut izrazito crvenom bojom.

Tablica 7. Transformacija razina minijaturizacije i automatizacije u zbir prema AGREE

| Razina automatizacije i minijaturizacije | Zbir |
|---|-------------|
| Automatsko, minijaturizirano | 1,0 |
| Poluautomatsko, minijaturizirano | 0,75 |
| Manualno, minijaturizirano | 0,5 |
| Automatsko, nije minijaturizirano | 0,5 |
| Poluautomatsko, nije minijaturizirano | 0,25 |
| Manualno, nije minijaturizirano | 0,0 |

Primjena derivatizacijskih sredstava je problematična sa stajališta zelene analitičke kemije, jer podrazumijeva dodatne korake i daljnju upotrebu kemikalija s naknadnim stvaranjem otpada. Ukoliko je moguće poželjno je izbjegavanje kemijske derivatizacije. Kako bi se razlikovala sredstva za derivatizaciju s obzirom na njihovu ekološku prihvatljivost, primjenjuje se prethodno razvijen vodič za odabir sredstva za derivatizaciju. Svaki od derivatizacijskih agenasa unutar svake skupine dobio je ocjenu između 0 i 1 (s 1 dodijeljenom najzelenijim agensima). Kriteriji ocjenjivanja odnose se na sigurnost primjene, sudbinu u okolišu, postojanost u okolišu i biološke učinke. Ako se ne primjenjuje derivatizacija, zbir je 1,0; inače se izračunava prema formuli:

$$\text{Zbir} = DA_1 \times DA_2 \times \dots \times DA_n - 0,2$$

Prema formuli DA je rezultat koji odgovara određenom derivatizacijskom agensu. Oduzeta vrijednost 0,2 služi za jasno razlikovanje situacije u kojoj se ne primjenjuje sredstvo za derivatizaciju i kada se primjenjuje ekološki najprihvatljivije sredstvo za derivatizaciju. U suprotnom, najzeleniji agens za derivatizaciju dao bi isti rezultat kao nijedan agens. Ako se u analitičkom postupku koristi više od jednog sredstva za derivatizaciju, ekološki najneprihvatljiviji

(s najnižim rezultatom) imat će najveći utjecaj na ukupni rezultat. Obično se koristi jedno sredstvo za derivatizaciju, tako da su situacije u kojima se primjenjuje više od jednog sredstva rijetke. U svim ispitanim farmakopejskim postupcima nisu korištena sredstva za derivatizaciju te je stoga vrijednost ovog principa u svim slučajevima bila 1,00 te je obilježen intenzivnom zelenom bojom.

Nadalje, sprječavanje stvaranja analitičkog otpada bilo bi idealno s ekološkog i ekonomskog gledišta i u skladu sa sedmim principom. Nažalost, u velikoj većini slučajeva nastaje analitički otpad. Jednadžba prema kojoj se izračuna količina nastalog otpada je sljedeća:

$$\text{Zbir} = -0.134 \times \ln(\text{količina otpada u g ili mL}) + 0,6949$$

Primjena ove jednadžbe rezultira zbirom 1,0 za količinu otpada jednaku ili manju od 0,1 g (mL), za 10 g (mL) zbir je 0,4, a za količinu otpada jednaku 25 i 100 g (mL) zbir je 0,25 odnosno 0,1.

Ispitane farmakopejske metode za određivanje sadržaja i onečišćenja lijekova koji se koriste u terapiji upalnih bolesti crijeva nerijetko koriste HPLC tehniku koja na žalost generira veću količinu otpada. Nadalje, metode za ispitivanje onečišćenja uključuju veće količine otapala za pripremu uzoraka. U metodama tekućinske kromatografije, pri procjeni vremena potrebnog za analizu, u obzir je uzeto injektiranje jednog dodatnog volumena kao slijepe probe i ukupno trajanje sukladno ovoj pridruženoj analizi, a priroda i utrošak kemikalija se razmatrao kao prosjek utroška za pripremu uzorka. Kada nije naveden volumen pokretne faze koji se treba pripremiti, odnosno volumen otpada koji nastaje od pokretne faze, smatrano je da on iznosi jednu litru. Stoga nije iznenađujuće da su sve ispitane metode za određivanje onečišćenja aktivnih tvari imale niske vrijednosti 0,00 te mi je ovaj princip označen intenzivno crvenom bojom. U titracijskim metodama je za utrošak otopine kojom se titrira razmatran minimalni očekivani, tj. potrebni utrošak. Dio metoda za određivanje sadržaja su imale blago pozitivne vrijednosti (0,05 - 0,15), ali i dalje

0 i 1 smanjenjem potrošnje energije po uzorku s 1,5 na 0,1 kWh. Utrošak energije se nije procjenjivao izračunom već su metode izabrane iz padajućeg izbornika programa. Za sve ispitane farmakopejske metode kojima se određuju onečišćenja dodijeljene su vrijednosti 0,5, a onima za sadržaj 0,5 odnosno 1,0 te su označene žutom ili zelenom bojom.

Korištenje kemikalija dobivenih iz obnovljivih izvora vrlo je obećavajući i poželjan pristup ne samo u analitičkoj kemiji nego u svim granama kemije. Deseto se načelo tretira na jednostavan način. Ako nisu primijenjeni reagensi ili su svi iz bioloških izvora, zbir je 1. Ako neki od njih potječu iz bioloških izvora, dok drugi nisu, zbir je 0,5. U slučaju da niti jedan reagens ne potječe iz bioloških izvora, zbir je jednak 0 što je slučaj za sve ispitane farmakopejske metode.

Jedanaesto načelo zelene kemije ima za cilj uklanjanje ili zamjenu toksičnih reagensa ekološki prihvatljivijim alternativama kad god je to moguće. Osim vrste korištenih kemikalija, količina toksičnih reagensa ili otapala također je kritično pitanje. Prvi korak za procjenu dane analitičke metodologije prema ovom načelu je naznačiti uključuje li procijenjeni analitički postupak primjenu bilo kakvih toksičnih reagensa. Ako se ne koriste toksični reagensi, zbir je jednak 1. U suprotnom, masa ili volumen reagensa pretvara se u zbir u skladu s jednadžbom:

$$\text{Zbir} = -0,156 \times \ln(\text{količina reagensa ili otapala u g ili mL}) + 0,5898$$

Predlaže se da se svaki materijal smatra otrovnim ako je definiran kao otrovan udisanjem, gutanjem, dermalnim kontaktom ili je toksičan za vodeni svijet. Sami analit, odnosno djelatna tvar koja se ispituje i pripadajući standardi nisu smatrani toksičnim supstancijama bez obzira na farmakološko i potencijalno toksično djelovanje iz razloga što je cilj usporedba metoda neovisno o analitu pa se ovo moglo izbjeći s obzirom na to da je vezano isključivo uz prirodu djelatne tvari.

Nažalost ispitane metode su nisko vrednovane za ovo načelo budući da u vrijednosti bile manje od 0,32.

Prema posljednjem principu, sigurnost analitičara je najvažnija. Kako bi se uključila sigurnost analitičara i opasnosti za okoliš, razmatra se broj prijetnji koje nisu izbjegnute. Prijetnje su povezane s primjenom reagensa, u kojem slučaju sigurnosno-tehnički listovi daju jasnu indikaciju, ili s procesima u kojima se stručno znanje može koristiti za procjenu potencijala opasnog izlaganja. Prijetnje koje nije bilo moguće izbjeći trebaju se izabrati s liste ponuđenih (otrovno za vodene organizme, bioakumulativno, perzistentno, visoko zapaljivo, visoko oksidirajuće, eksplozivno i nagrizajuće). Ako se nijedna prijetnja ne izabere, zbir je 1. Ako se izabere jedna, dvije, tri ili četiri koje su prisutne, pripadajući zbir je 0,8, 0,6, 0,4, odnosno 0,2. Ako se izabere pet ili više prijetnji, zbir je 0. Podaci o toksičnosti reagensa su uzeti iz sigurnosno-tehničkih listova tvari. Za ispitane farmakopejske metode dodijeljene su vrijednosti 0,6 odnosno 0,8 istaknute različitim nijansama zelene boje.

Sukladno izračunima prema AGREE **alatu** može se zaključiti da su metode za određivanje sadržaja zelenije od onih za određivanje onečišćenja. Ovom nalazu doprinosi činjenica da su to nerijetko jednostavnije, titrimetrijske metode koje zahtijevaju manji utrošak energije, generiraju manje otpada i izvode se u manje koraka od složenijih kromatografskih metoda. Stoga slijedi i da bi se preferencijom jednostavnijih metoda možda postiglo barem djelomično ozelenjivanje farmakopejskih metoda.

AMGS alat je razvijen kao **nova metoda** ocjene zelenila analitičke metode kako bi potaknuo korištenje najzelenijih metoda odvajanja i zamišljen je kao opća metrička smjernica za usporedbu metoda tijekom razvoja. Što je niža AMGS vrijednost, to je metoda ekološki prihvatljivija. AMGS metrički faktori uključuju sigurnost korištenih kemikalija te njihov utjecaj

na okoliš, potrošnju energije instrumenta i količinu nastalog otpada. Rezultati su prikazani i kao zbir energije instrumenta, zbir energije otapala i okolišni, zdravstveni i sigurnosni zbir otapala. Rezultati su označeni bojom te predstavljaju smjernicu koja pokazuje da li određeni energetski rezultat (od tri navedene kategorije) utječe na ravnotežu ukupnog % AMGS-a iznad $\sim 1/3$ doprinosa. Žuta i crvena boja označile su područja gdje se ispitana farmakopejska metoda može poboljšati, primjerice, energija instrumenta mogla bi se smanjiti skraćivanjem vremena izvođenja metode. **Alat** se može koristiti samo za procjenu tekućinske kromatografije i superkritične fluidne kromatografije te je bio primjenjiv samo za dio naših istraživanja, odnosno ispitivanjem nisu obuhvaćene titrimetrijske metode. Parametri koji su uzeti procjenu ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda su broj analita od interesa, broj injektiranja, brzina protoka, vrijeme analize, vrsta protoka pokretne faze, volumen i sastav pokretne faze te volumen i sastav otapala korištenih u pripremi standardnih i ispitivanih otopina. Za izračun broja injektiranja kod kromatografskih metoda te broja uzoraka je pribrojen jedan dodatni uzorak koji predstavlja slijepa proba. Izračunati AMGS zbir farmakopejskih metoda koje se koriste za određivanje sadržaja i onečišćenja lijekova koji se koriste u terapiji upalne bolesti crijeva bio je u rasponu od 58,63 do 837,93.

Konačno, ukoliko se razmotre svi rezultati provedenog istraživanja primjenom i AGREE i AMGS **alata** moguće je uočiti da su većinom zelenijima bile ocijenjene metode za određivanje sadržaja djelatne tvari, od metoda za određivanje onečišćenja što ne iznenađuje s obzirom na to da su to nerijetko titrimetrijske metode koje su i jednostavnije i zahtijevaju, kako manji utrošak kako energije, tako i reagensa. Međutim, sukladno izračunato AGREE zbiru, niti jedna od istraživanih metoda ne može se smatrati zelenom, s obzirom na to da se prema AGREE zbiru metoda može smatrati zelenom ako isti iznosi više od 0,7 (124).

Za sve metode je pretpostavke bila da je pozicioniranje instrumenta *off-line*, da nisu automatizirane i da priprema uzorka nije minijaturizirana, kao i da ne koriste reagense na biološkoj bazi pa je u tom smislu prema AGREE izračunu svaka metoda izgubila “zelene bodove” sukladno načelima 3, 5 i 10 zelene analitičke kemije. Nadalje, među metodama za određivanje onečišćenja, koje su najčešće metode tekućinske kromatografije niti jedna od istraživanih nije zadovoljila u pogledu količine otpada koja nastaje ni toksičnosti korištenih otapala, odnosno prema načelima 7 i 11. Iz navedenog slijedi kako bi se zelenost postojećih metoda mogla postići eventualno zamjenom korištenih otapala i minijaturizacijom. Štoviše, razvijen je i opisan cijeli niz metoda za određivanje različitih farmaceutskih supstancija u gotovim formulacijama i biološkim uzorcima korištenjem alternativnih otapala, primjerice etanola (88).

Svakako je dobivene vrijednosti potrebno usporediti s dostupnim literaturnim podacima. Za usporedbu, u literaturi je opisana HPLC metoda za određivanje lignokain hidroklorida, ketoprofena i hidrokortizona u gotovoj proizvodu čiji je izračunati AGREE zbir iznosio 0,76 (124). Nadalje, opisane metode za određivanje moksifloksacina i flukonazola postižu AGREE zbir od 0,66 do 0,71 a spektrofotometrijska metoda za određivanje kombiniranog pripravka s paracetamolom AGREE zbir od 0,86 (125, 126). Također, ozelenjavanjem postojeće metode za određivanje kolhicina AGREE zbir je porastao s 0,46 na 0,75 (127), a zamjenom postojeće HPLC metode za određivanje acetilsalicilatne kiseline i omeprazola u gotovim lijekovima TLC-denzitometrijskom metodom AGREE zbir je porastao s 0,72, na 0,81 (128). Ove spomenute studije svakako ohrabruju daljnja istraživanja na području ozelenjivanja analitičkih metoda koje se koriste u kontroli kvalitete farmaceutika.

Sukladno provedenoj statističkoj analizi rezultata dvaju korištenih **alata**, uočeno je da im rezultati ne koreliraju što govori u prilog činjenici da svaki od njih ima svoje specifičnosti. Tijekom

odabira **alata** za pojedini analitički postupak potrebno je izabrati onaj koji će najpouzdanije vrednovati ga. Nadalje, potrebno je istaknuti da je potrebno razvijati i nove **alate** koji će biti specifičniji i dozvoliti prostor za uzimanje u obzir svih otapala koja se koriste sukladno propisanim farmakopejskim metodama. S druge strane, vrijednost je korištenja različitih alata što na drugačiji način sugeriraju u kojem bi se pogledu ili na koji način metoda mogla učiniti ekološki prihvatljivijom.

Gore navedeno podupire činjenica da svjetska populacija stari što će dovesti do porasta u konzumaciji lijekova. Različite bi se mjere trebale implementirati kako bi se smanjio utjecaj proizvodnje i konzumacije lijekova na okoliš i smanjio ugljični otisak farmaceutskog sektora. Maleni doprinos velikog broja pojedinaca može imati sinergistički i pozitivan učinak na okoliš (4).

Od listopada 2005. Europska agencija za lijekove (EMA) zahtijeva od nositelja odobrenja i njihovih laboratorija da naprave procjenu okolišnog utjecaja lijekova za humane lijekove (tzv. ERA, engl. *Environmental risk assessment*). Međutim, ovo izvješće se ne uzima u obzir prilikom procjene omjera rizika i koristi čak i kada se ispostavi da određeni lijek predstavlja rizik za okoliš. Naglasimo ovdje da procjene utjecaja na okoliš ne postoje za lijekove odobrene prije listopada 2005. godine (6, 129, 130). Nadalje, ne uzimaju se u obzir emisije koje nastaju tijekom proizvodnje (131). Također, u obzir se uzima izloženost nakon predviđene primjene iako lijekovi često mogu biti korišteni izvan odobrenih indikacija, tzv. *off-label* (7). Nema obveze dopunjavanja ni revizije ovog izvješća (132). Nadalje, iako je EMA već započela s provedbom strategija upravljanja rizikom za veterinarske lijekove koji mogu predstavljati prijetnju okolišu, za humane lijekove nema razvijene takve strategije (9). Međutim, ohrabruje podatak da su neke farmaceutske kompanije u Europi počele s implementacijom planova upravljanja okolišnim rizicima (21, 133).

Primjer za ublažavanje okolišnih rizika je uputa o pravilnom odlaganju transdermalnog flastera etinilestradiola (133).

Nametanje obveze za nadzor razina farmaceutskih supstancija u okolišu je svojevrsni dvosjekli mač. Čak i ako se obveza nalaže samo za dio supstancija od interesa, s jedne strane imamo kontrolu razina ovih tvari, a s druge strane imamo povećanu potrošnju kemikalija za provođenje ovih analiza. To nas dovodi do zaključka da je razvoj zelenih metoda neophodan jer je onečišćenje u modernom svijetu gotovo nemoguće izbjeći. Neki autori smatraju da bi neusmjereno praćenje i promatranje zagađenja kao općenitog, umjesto usmjeravanja na pojedine supstancije predstavljalo značajno rasipanje resursa. Općenito bi se lijekovi velike potrošnje trebali smatrati prioritetnima (132).

Primjerice sustav generičke supstitucije koji se primjenjuje u mnogim zemljama usredotočuje se gotovo isključivo na smanjenje troškova i pruža malo ili nimalo poticaja za tvrtke da ulažu u zelene tehnologije. Za jačanje ekonomske motivacije, švedska je vlada predložila revidirani sustav u kojemu se kontrola onečišćenja prilikom proizvodnje uzima u obzir. Također je zatraženo praćenje emisija prilikom proizvodnje i nabave lijekova. Slične propise bi trebalo implementirati prilikom davanja odobrenja za proizvodnju i stavljanja u promet lijekova. Mediji mogu stvoriti veliki val svijesti u tom smislu (131). Nadalje, pritiske mogu izvršiti i osiguravajuće kuće koje mogu uzeti utjecaj na okoliš u obzir kod lijekova iz iste skupine.

Procjene su da se 85 % čvrstih dozirnih oblika u Europi prodaje u farmaceutskim blisterima. Ova otpadna pakiranja obično sadrže slojeve aluminijske i plastične folije što ih čini težim za recikliranje. Štoviše, u Europi se iz ovog razloga reciklira 50 % ambalaže koja sadrži aluminij (7). Dodatna mjera koja bi se mogla provesti za smanjenje utjecaja farmaceutske proizvodnje na okoliš je proizvodnja odgovarajuće veličine pakiranja što bi rezultiralo smanjenjem količine

neiskorištenih lijekova koji mogu završiti u kanalizaciji ili čak stolnoj vodi ako se s takvim otpadom ne postupa pravilno (4).

Ovo istraživanje ograničeno je činjenicom da nisu ispitane sve monografije sadržane u Europskoj farmakopeji i ne može se sa sigurnošću tvrditi da se analiza na 6 djelatnih tvari može poopćiti na cijelu farmakopeju, ali vjerujemo da smo dobili općenitu ideju da farmakopejske metode analize zaostaju za suvremenim trendom ozelenjivanja analitičkih metoda. U istraživanju smo se ograničili na dva alata, svaki od kojih ima svoje specifičnosti i ograničenja. Primjerice, AMGS dozvoljava izbor između ponuđenih metoda i otapala zbog čega nije uvijek bilo moguće izračunati ovaj parametar za određivanje sadržaja djelatne tvari jer, recimo, ne dozvoljava izračun zelenosti potencijometrijske titracije. Nadalje, nerijetko smo izabirali vodu kao otapalo jer određena otapala koja su navedena u farmakopejskim monografijama ovaj alat ne nudi kao opciju. Premda postoji nekoliko pristupa procjeni ekološke prihvatljivosti analitičke metode, ne uzimaju sve u obzir iste čimbenike, pa je izrazito zahtjevno osigurati zelenu markicu za analitičku metodu što je potvrđeno i rezultatima ovog istraživanja u kojima su pronađena odstupanja u zelenosti iste metode izračunato različitim alatima. Idealno bi bilo da postoji specifičan alat za provjeru zelenosti farmakopejske metode koji bi uzeo u obzir sve metode i otapala, slično kako kod podnošenja zahtjeva za stavljanje lijeka u promet postoji obveza procjene utjecaja lijeka na okoliš. Nadalje, u budućnosti očekujemo da će se razviti mehanizmi kojima se nositelji odobrenja i istraživače potiče da razvijaju zelenije alternative za farmakopejske metode i da te metode budu usvojene od Vijeća Europe. Već postojeći alati i metrike se mogu koristiti u fazi razvoja metoda kako bi se metode već pri inicijalnom razvoju učinile što je moguće zelenijima.

6. Zaključak

Nažalost, uporaba zelenih analitičkih metoda još uvijek je ograničena u farmaceutskom području, posebice u aktivnostima kontrole kvalitete. Analitičke metode opisane u monografijama farmakopeja naširoko su korištene u farmaceutskoj industriji. Rezultati ovog istraživanja upućuju na zaključak da se postojeće farmakopejske metode za određivanje sadržaja i onečišćenja u djelatnim tvarima ne mogu smatrati zelenima sukladno dostupnim alatima za procjenu ekološke prihvatljivosti analitičkih metoda. Uzimajući u obzir porast potrošnje farmaceutika, problem otpada i negativnog ekološkog utjecaja farmaceutske industrije na okoliš neće nestati, već može samo rasti. Slijedom navedenog i s obzirom na to da ne postoji idealan alat za vršiti procjenu ekološke prihvatljivosti analitičke metode, idealno bi bilo napore usmjeriti ka razvoju specifičnog alata za procjenu ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda. Nadalje, potrebno je razviti poticaje za kemičare da ozelenjuju postojeće i razvijaju nove metode, kao i uzimati u obzir cjeloživotni utjecaj lijeka na okoliš prilikom njegovog propisivanja i potrošnje.

7. Literatura

1. Carvalho IT, Santos L. Antibiotics in the aquatic environments: A review of the European scenario. *Environ Int* 2016;94:736-757.
2. Wang J, Li S, Zhu Y, Guo J, Liu J, He B. Targeted eco-pharmacovigilance as an optimized management strategy for adverse effects of pharmaceuticals in the environment. *Environ Toxicol Pharmacol* 2021;82:103565.
3. Grenni P, Ancona V, Caracciolo AB. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review. *Microchemical Journal* 2018;136:25-39.
4. Sammut Bartolo N, Azzopardi LM, Serracino-Inglott A. Pharmaceuticals and the environment. *Early Hum Dev* 2021;155:105218.
5. Belkhir L, Elmeligi A. Carbon footprint of the global pharmaceutical industry and relative impact of its major players. *Journal of Cleaner Production* 2019;214:185-194.
6. Argaluz J, Domingo-Echaburu S, Orive G, Medrano J, Hernandez R, Lertxundi U. Environmental pollution with psychiatric drugs. *World J Psychiatry* 2021;11:791-804.
7. Domingo-Echaburu S, Davalos LM, Orive G, Lertxundi U. Drug pollution & Sustainable Development Goals. *Sci Total Environ* 2021;800:149412.
8. Wang J, Zhang M, Li S, He B. Adapting and applying common methods used in pharmacovigilance to the environment: A possible starting point for the implementation of eco-pharmacovigilance. *Environ Toxicol Pharmacol* 2018;61:67-70.
9. Jose J, Sandra Pinto J, Kotian B, Mathew Thomas A, Narayana Charyulu R. Comparison of the regulatory outline of ecopharmacovigilance of pharmaceuticals in Europe, USA, Japan and Australia. *Sci Total Environ* 2020;709:134815.

10. Ortuzar M, Esterhuizen M, Olicon-Hernandez DR, Gonzalez-Lopez J, Aranda E. Pharmaceutical Pollution in Aquatic Environments: A Concise Review of Environmental Impacts and Bioremediation Systems. *Front Microbiol* 2022;13:869332.
11. Boxall AB, Rudd MA, Brooks BW, Caldwell DJ, Choi K, Hickmann S, Innes E, Ostapyk K, Staveley JP, Verslycke T, Ankley GT, Beazley KF, Belanger SE, Berninger JP, Carriquiriborde P, Coors A, Deleo PC, Dyer SD, Ericson JF, Gagne F, Giesy JP, Gouin T, Hallstrom L, Karlsson MV, Larsson DG, Lazorchak JM, Mastrocco F, McLaughlin A, McMaster ME, Meyerhoff RD, Moore R, Parrott JL, Snape JR, Murray-Smith R, Servos MR, Sibley PK, Straub JO, Szabo ND, Topp E, Tetreault GR, Trudeau VL, Van Der Kraak G. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: what are the big questions? *Environ Health Perspect* 2012;120:1221-1229.
12. Mezzelani M, Gorbi S, Regoli F. Pharmaceuticals in the aquatic environments: Evidence of emerged threat and future challenges for marine organisms. *Mar Environ Res* 2018;140:41-60.
13. Gunnarsson L, Snape JR, Verbruggen B, Owen SF, Kristiansson E, Margiotta-Casaluci L, Osterlund T, Hutchinson K, Leverett D, Marks B, Tyler CR. Pharmacology beyond the patient - The environmental risks of human drugs. *Environ Int* 2019;129:320-332.
14. Ojemaye CY, Petrik L. Pharmaceuticals in the marine environment: a review. *Environmental Reviews* 2019;27:151-165.
15. Richmond EK, Rosi EJ, Walters DM, Fick J, Hamilton SK, Brodin T, Sundelin A, Grace MR. A diverse suite of pharmaceuticals contaminates stream and riparian food webs. *Nat Commun* 2018;9:4491.

16. Cerveny D, Grabic R, Grabicova K, Randak T, Larsson DGJ, Johnson AC, Jurgens MD, Tysklind M, Lindberg RH, Fick J. Neuroactive drugs and other pharmaceuticals found in blood plasma of wild European fish. *Environ Int* 2021;146:106188.
17. Daughton CG, Ruhoy IS. Green pharmacy and pharmEcovigilance: prescribing and the planet. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2011;4:211-232.
18. Agerstrand M, Berg C, Bjorlenius B, Breitholtz M, Brunstrom B, Fick J, Gunnarsson L, Larsson DG, Sumpter JP, Tysklind M, Ruden C. Improving environmental risk assessment of human pharmaceuticals. *Environ Sci Technol* 2015;49:5336-5345.
19. Oaks JL, Gilbert M, Virani MZ, Watson RT, Meteyer CU, Rideout BA, Shivaprasad HL, Ahmed S, Chaudhry MJ, Arshad M, Mahmood S, Ali A, Khan AA. Diclofenac residues as the cause of vulture population decline in Pakistan. *Nature* 2004;427:630-633.
20. Ruhoy IS, Daughton CG. Beyond the medicine cabinet: an analysis of where and why medications accumulate. *Environ Int* 2008;34:1157-1169.
21. Wang J, Hu X. Ecopharmacovigilance: Current state, challenges, and opportunities in China. *Indian J Pharmacol* 2014;46:13-17.
22. Orive G, Domingo-Echaburu S, Lertxundi U. Redefining the "rational use of medicines". *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 2021;20:100381.
23. Lertxundi U, Domingo-Echaburu S, Orive G. Rational use of drugs as a source control measure to fight drug pollution. *J Hazard Mater* 2021;410:124664.
24. Daughton CG. Eco-directed sustainable prescribing: feasibility for reducing water contamination by drugs. *Sci Total Environ* 2014;493:392-404.
25. Daughton CG, Ruhoy IS. Lower-dose prescribing: minimizing "side effects" of pharmaceuticals on society and the environment. *Sci Total Environ* 2013;443:324-337.

26. Castensson S, Eriksson V, Lindborg K, Wettermark B. A method to include the environmental hazard in drug prescribing. *Pharm World Sci* 2009;31:24-31.
27. Agerstrand M, Ruden C. Evaluation of the accuracy and consistency of the Swedish environmental classification and information system for pharmaceuticals. *Sci Total Environ* 2010;408:2327-2339.
28. Benet LZ. Predicting drug disposition via application of a Biopharmaceutics Drug Disposition Classification System. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2010;106:162-167.
29. Sheldon RA. Engineering a more sustainable world through catalysis and green chemistry. *J R Soc Interface* 2016;13:20160087.
30. Sheldon RA. Fundamentals of green chemistry: efficiency in reaction design. *Chem Soc Rev* 2012;41:1437-1451.
31. O'Flynn D, Lawler J, Yusuf A, Parle-McDermott A, Harold D, Mc Cloughlin T, Holland L, Regan F, White B. A review of pharmaceutical occurrence and pathways in the aquatic environment in the context of a changing climate and the COVID-19 pandemic. *Anal Methods* 2021;13:575-594.
32. Dunn PJ. The importance of green chemistry in process research and development. *Chem Soc Rev* 2012;41:1452-1461.
33. Sanderson K. Chemistry: It's not easy being green. *Nature* 2011;469:18-20.
34. Tundo P, Anastas P, Black DS, Breen J, Collins T, Memoli S, Miyamoto J, Polyakoff M, Tumas W. Synthetic pathways and processes in green chemistry. Introductory overview. *Pure and Applied Chemistry* 2000;72:1207-1228.
35. Linthorst JA. An overview: origins and development of green chemistry. *Foundations of Chemistry* 2009;12:55-68.

36. Anastas PT, Zimmerman JB. Design through the 12 principles of green engineering. *Environ Sci Technol* 2003;37:94a-101a.
37. Gernaey KV, Cervera-Padrell AE, Woodley JM. A perspective on PSE in pharmaceutical process development and innovation. *Computers & Chemical Engineering* 2012;42:15-29.
38. Tucker JL. Green chemistry, a pharmaceutical perspective. *Organic Process Research & Development* 2006;10:315-319.
39. Santi M, Sancineto L, Nascimento V, Braun Azeredo J, Orozco EVM, Andrade LH, Groger H, Santi C. Flow Biocatalysis: A Challenging Alternative for the Synthesis of APIs and Natural Compounds. *Int J Mol Sci* 2021;22:990.
40. Sheldon RA. Biocatalysis and biomass conversion: enabling a circular economy. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2020;378:20190274.
41. Berton P, Lana NB, Rios JM, Garcia-Reyes JF, Altamirano JC. State of the art of environmentally friendly sample preparation approaches for determination of PBDEs and metabolites in environmental and biological samples: A critical review. *Anal Chim Acta* 2016;905:24-41.
42. Spietelun A, Marcinkowski L, de la Guardia M, Namiesnik J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta* 2014;119:34-45.
43. Spietelun A, Marcinkowski L, de la Guardia M, Namiesnik J. Recent developments and future trends in solid phase microextraction techniques towards green analytical chemistry. *J Chromatogr A* 2013;1321:1-13.
44. Billiard KM, Dershem AR, Gionfriddo E. Implementing Green Analytical Methodologies Using Solid-Phase Microextraction: A Review. *Molecules* 2020;25:5297.

45. Plotka J, Tobiszewski M, Sulej AM, Kupska M, Gorecki T, Namiesnik J. Green chromatography. *J Chromatogr A* 2013;1307:1-20.
46. Vasconcelos Soares Maciel E, de Toffoli AL, Sobieski E, Domingues Nazario CE, Lancas FM. Miniaturized liquid chromatography focusing on analytical columns and mass spectrometry: A review. *Anal Chim Acta* 2020;1103:11-31.
47. Ponce-Rodriguez HD, Verdu-Andres J, Herraes-Hernandez R, Campins-Falco P. Innovations in Extractive Phases for In-Tube Solid-Phase Microextraction Coupled to Miniaturized Liquid Chromatography: A Critical Review. *Molecules* 2020;25:2460.
48. Yabre M, Ferey L, Some TI, Sivadier G, Gaudin K. Development of a green HPLC method for the analysis of artesunate and amodiaquine impurities using Quality by Design. *J Pharm Biomed Anal* 2020;190:113507.
49. Soares da Silva Burato J, Vargas Medina DA, de Toffoli AL, Vasconcelos Soares Maciel E, Mauro Lancas F. Recent advances and trends in miniaturized sample preparation techniques. *J Sep Sci* 2020;43:202-225.
50. Aly AA, Gorecki T. Green Approaches to Sample Preparation Based on Extraction Techniques. *Molecules* 2020;25:1719.
51. Tabani H, Nojavan S, Alexovic M, Sabo J. Recent developments in green membrane-based extraction techniques for pharmaceutical and biomedical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2018;160:244-267.
52. Filippou O, Bitas D, Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2017;1043:44-62.
53. Toma A, Crisan O. Green pharmacy - a narrative review. *Clujul Med* 2018;91:391-398.

54. Rastogi T, Leder C, Kummerer K. Designing green derivatives of beta-blocker Metoprolol: a tiered approach for green and sustainable pharmacy and chemistry. *Chemosphere* 2014;111:493-499.
55. Leder C, Rastogi T, Kummerer K. Putting benign by design into practice-novel concepts for green and sustainable pharmacy: Designing green drug derivatives by non-targeted synthesis and screening for biodegradability. *Sustainable Chemistry and Pharmacy* 2015;2:31-36.
56. Medhi B, Sewal RK. Ecopharmacovigilance: an issue urgently to be addressed. *Indian J Pharmacol* 2012;44:547-549.
57. Sheldon RA. E factors, green chemistry and catalysis: an odyssey. *Chem Commun (Camb)* 2008:3352-3365.
58. Ishikawa A, Takasaki H, Sakurai A, Katayama T, Wada K, Furuishi T, Fukuzawa K, Obata Y, Yonemochi E. Manufacturability and Properties of Granules and Tablets Using the Eco-Friendly Granulation Method Green Fluidized Bed Granulation Compared to Direct Compression. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 2021;69:447-455.
59. Ismail R, Baaity Z, Csoka I. Regulatory status quo and prospects for biosurfactants in pharmaceutical applications. *Drug Discov Today* 2021;26:1929-1935.
60. Jain AS, Pawar PS, Sarkar A, Junnuthula V, Dyawanapelly S. Bionanofactories for Green Synthesis of Silver Nanoparticles: Toward Antimicrobial Applications. *Int J Mol Sci* 2021;22:11993.
61. Donga S, Bhadu GR, Chanda S. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of gold nanoparticles green synthesized using *Mangifera indica* seed aqueous extract. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2020;48:1315-1325.

62. Donga S, Chanda S. Facile green synthesis of silver nanoparticles using *Mangifera indica* seed aqueous extract and its antimicrobial, antioxidant and cytotoxic potential (3-in-1 system). *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2021;49:292-302.
63. Chopra H, Bibi S, Singh I, Hasan MM, Khan MS, Yousafi Q, Baig AA, Rahman MM, Islam F, Emran TB, Cavalu S. Green Metallic Nanoparticles: Biosynthesis to Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2022;10:874742.
64. Singh H, Du J, Singh P, Yi TH. Ecofriendly synthesis of silver and gold nanoparticles by *Euphrasia officinalis* leaf extract and its biomedical applications. *Artif Cells Nanomed Biotechnol* 2018;46:1163-1170.
65. Flores-Lopez NS, Cervantes-Chavez JA, de Jesus DGT, Cortez-Valadez M, Estevez-Gonzalez M, Esparza R. Bactericidal and fungicidal capacity of Ag₂O/Ag nanoparticles synthesized with *Aloe vera* extract. *Journal of Environmental Science and Health Part a-Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering* 2021;56:762-768.
66. Mousavi SM, Hashemi SA, Ghasemi Y, Atapour A, Amani AM, Dashtaki AS, Babapoor A, Arjmand O. Green synthesis of silver nanoparticles toward bio and medical applications: review study. *Artificial Cells Nanomedicine and Biotechnology* 2018;46:S855-S872.
67. Huq MAA, M.; Rahman, M.M.; Balusamy, S.R.; Akter, S. Green Synthesis and Potential Antibacterial Applications of Bioactive Silver Nanoparticles: A Review. *Polymers (Basel)* 2022;14:742.
68. Zhang D, Ma XL, Gu Y, Huang H, Zhang GW. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles and Their Potential Applications to Treat Cancer. *Front Chem* 2020;8:799.

69. Annamalai J, Ummalyama SB, Pandey A, Bhaskar T. Recent trends in microbial nanoparticle synthesis and potential application in environmental technology: a comprehensive review. *Environ Sci Pollut Res Int* 2021;28:49362-49382.
70. Hamida RS, Ali MA, Redhwan A, Bin-Meferij MM. Cyanobacteria - A Promising Platform in Green Nanotechnology: A Review on Nanoparticles Fabrication and Their Prospective Applications. *Int J Nanomedicine* 2020;15:6033-6066.
71. Kumar S, Lather V, Pandita D. Green synthesis of therapeutic nanoparticles: an expanding horizon. *Nanomedicine (Lond)* 2015;10:2451-2471.
72. Paiva-Santos AC, Herdade AM, Guerra C, Peixoto D, Pereira-Silva M, Zeinali M, Mascarenhas-Melo F, Paranhos A, Veiga F. Plant-mediated green synthesis of metal-based nanoparticles for dermopharmaceutical and cosmetic applications. *Int J Pharm* 2021;597:120311.
73. Abd-Elsalam WH, Saber MM, Abouelatta SM. Trehalosomes: Colon targeting trehalose-based green nanocarriers for the maintenance of remission in inflammatory bowel diseases. *Eur J Pharm Biopharm* 2021;166:182-193.
74. Teaima MH, Elasal MK, Omar SA, El-Nabarawi MA, Shoueir KR. Eco-friendly synthesis of functionalized chitosan-based nanoantibiotic system for potential delivery of linezolid as antimicrobial agents. *Saudi Pharm J* 2020;28:859-868.
75. Nageeb El-Helaly S, Abd-Elrasheed E, Salim SA, Fahmy RH, Salah S, El-Ashmoony MM. Green Nanotechnology in the Formulation of a Novel Solid Dispersed Multilayered Core-Sheath Raloxifene-Loaded Nanofibrous Buccal Film; In Vitro and In Vivo Characterization. *Pharmaceutics* 2021;13:474.

76. Mehariya S, Goswami RK, Karthikeysan OP, Verma P. Microalgae for high-value products: A way towards green nutraceutical and pharmaceutical compounds. *Chemosphere* 2021;280:130553.
77. Constable DJC, Jimenez-Gonzalez C, Henderson RK. Perspective on solvent use in the pharmaceutical industry. *Organic Process Research & Development* 2007;11:133-137.
78. Krewer U, Liauw MA, Ramakrishna M, Babu MH, Raghavan KV. Pollution prevention through solvent selection and waste minimization. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2002;41:4534-4542.
79. Concepción Jiménez-González ADC, David J. C. Constable, Virginia L. Cunningham Expanding GSK's Solvent Selection Guide—application of life cycle assessment to enhance solvent selections. *Clean Technologies and Environmental Policy* 2004;7:42-50.
80. Roundtable AGCIP: ACS GCI Pharmaceutical Roundtable. 2019. *Available at: <https://www.acsgcipr.org/>*.
81. Alfonsi K, Colberg J, Dunn PJ, Fevig T, Jennings S, Johnson TA, Kleine HP, Knight C, Nagy MA, Perry DA, Stefaniak M. Green chemistry tools to influence a medicinal chemistry and research chemistry based organisation. *Green Chemistry* 2008;10:31-36.
82. Sheldon RA. Green solvents for sustainable organic synthesis: state of the art. *Green Chemistry* 2005;7:267-278.
83. Leitner W, Seddon KR, Wasserscheid P. Green solvents for catalysis - Forword. *Green Chemistry* 2003;5:G28-G28.
84. Hintermair U, Gong Z, Serbanovic A, Muldoon MJ, Santini CC, Cole-Hamilton DJ. Continuous flow hydroformylation using supported ionic liquid phase catalysts with carbon dioxide as a carrier. *Dalton Trans* 2010;39:8501-8510.

85. Sheldon R. Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem Commun (Camb)* 2001:2399-2407.
86. Jimenez-Skrzypek G, Ortega-Zamora C, Gonzalez-Salamo J, Hernandez-Borges J. Miniaturized green sample preparation approaches for pharmaceutical analysis. *J Pharm Biomed Anal* 2022;207:114405.
87. Shaaban H. New insights into liquid chromatography for more eco-friendly analysis of pharmaceuticals. *Anal Bioanal Chem* 2016;408:6929-6944.
88. Yabre M, Ferey L, Some IT, Gaudin K. Greening Reversed-Phase Liquid Chromatography Methods Using Alternative Solvents for Pharmaceutical Analysis. *Molecules* 2018;23:1065.
89. Mikhail IE, Elmansi H, Belal F, Ehab Ibrahim A. Green micellar solvent-free HPLC and spectrofluorimetric determination of favipiravir as one of COVID-19 antiviral regimens. *Microchem J* 2021;165:106189.
90. Chanduluru HK, Sugumaran A. Eco-friendly estimation of isosorbide dinitrate and hydralazine hydrochloride using Green Analytical Quality by Design-based UPLC Method. *RSC Adv* 2021;11:27820-27831.
91. Shaaban H, Gorecki T. Current trends in green liquid chromatography for the analysis of pharmaceutically active compounds in the environmental water compartments. *Talanta* 2015;132:739-752.
92. Abdel-Kader MS, Alam P, Soliman GA, Al-Shdefat R, Afzal O. Eco-friendly stability-indicating RP-HPTLC method for sildenafil analysis, characterization and biological evaluation of its oxidized stress degradation product. *Sci Rep* 2021;11:15358.
93. Essam HM, Saad MN, Elzanfaly ES, Amer SM. Stepwise optimization and sensitivity improvement of green micellar electrokinetic chromatography method to simultaneously

determine some fluoroquinolones and glucocorticoids present in various binary ophthalmic formulations. *Biomed Chromatogr* 2020;34:e4941.

94. Attimarad M, Venugopala KN, Al-Dhubiab BE, Elgorashe REE, Shafi S. Development of Ecofriendly Derivative Spectrophotometric Methods for the Simultaneous Quantitative Analysis of Remogliflozin and Vildagliptin from Formulation. *Molecules* 2021;26:6160.

95. Elmansi H, Ibrahim AE, Mikhail IE, Belal F. Green and sensitive spectrofluorimetric determination of Remdesivir, an FDA approved SARS-CoV-2 candidate antiviral; application in pharmaceutical dosage forms and spiked human plasma. *Anal Methods* 2021;13:2596-2602.

96. Abdalah NA, Fathy ME, Tolba MM, El-Brashy AM, Ibrahim FA. Green spectrofluorimetric assay of dantrolene sodium via reduction method: application to content uniformity testing. *R Soc Open Sci* 2021;8:210562.

97. Ghonim R, El-Awady MI, Tolba MM, Ibrahim F. Green quantitative spectrofluorometric analysis of rupatadine and montelukast at nanogram scale using direct and synchronous techniques. *R Soc Open Sci* 2021;8:211196.

98. Moneim MMA, Hamdy MMA. Green spectrofluorimetric methods for tramadol assay with ibuprofen or chlorzoxazone: comparison of greenness profiles. *Luminescence* 2021;36:497-505.

99. Sheldon RA, Woodley JM. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev* 2018;118:801-838.

100. Erythropel HC, Zimmerman JB, de Winter TM, Petitjean L, Melnikov F, Lam CH, Lounsbury AW, Mellor KE, Jankovic NZ, Tu QS, Pincus LN, Falinski MM, Shi WB, Coish P, Plata DL, Anastas PT. The Green ChemisTREE: 20 years after taking root with the 12 principles. *Green Chemistry* 2018;20:1929-1961.

101. Poechlauer P, Manley J, Broxterman R, Gregertsen B, Ridemark M. Continuous Processing in the Manufacture of Active Pharmaceutical Ingredients and Finished Dosage Forms: An Industry Perspective. *Organic Process Research & Development* 2012;16:1586-1590.
102. Ruan Y, Lin H, Zhang X, Wu R, Zhang K, Leung KMY, Lam JCW, Lam PKS. Enantiomer-specific bioaccumulation and distribution of chiral pharmaceuticals in a subtropical marine food web. *J Hazard Mater* 2020;394:122589.
103. Comber S, Gardner M, Sorme P, Leverett D, Ellor B. Active pharmaceutical ingredients entering the aquatic environment from wastewater treatment works: A cause for concern? *Sci Total Environ* 2018;613-614:538-547.
104. Fekadu S, Alemayehu E, Dewil R, Van der Bruggen B. Pharmaceuticals in freshwater aquatic environments: A comparison of the African and European challenge. *Sci Total Environ* 2019;654:324-337.
105. Reyes NJDG, Geronimo FKF, Yano KAV, Guerra HB, Kim LH. Pharmaceutical and Personal Care Products in Different Matrices: Occurrence, Pathways, and Treatment Processes. *Water* 2021;13:1159.
106. Domaradzka D, Guzik U, Wojcieszynska D. Biodegradation and biotransformation of polycyclic non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Reviews in Environmental Science and Bio-Technology* 2015;14:229-239.
107. Ekpeghere KI, Sim WJ, Lee HJ, Oh JE. Occurrence and distribution of carbamazepine, nicotine, estrogenic compounds, and their transformation products in wastewater from various treatment plants and the aquatic environment. *Sci Total Environ* 2018;640-641:1015-1023.

108. Jelic A, Cruz-Morato C, Marco-Urrea E, Sarra M, Perez S, Vicent T, Petrovic M, Barcelo D. Degradation of carbamazepine by *Trametes versicolor* in an air pulsed fluidized bed bioreactor and identification of intermediates. *Water Res* 2012;46:955-964.
109. Gros M, Cruz-Morato C, Marco-Urrea E, Longree P, Singer H, Sarra M, Hollender J, Vicent T, Rodriguez-Mozaz S, Barcelo D. Biodegradation of the X-ray contrast agent iopromide and the fluoroquinolone antibiotic ofloxacin by the white rot fungus *Trametes versicolor* in hospital wastewaters and identification of degradation products. *Water Res* 2014;60:228-241.
110. Esterhuizen M, Behnam Sani S, Wang L, Kim YJ, Pflugmacher S. Mycoremediation of acetaminophen: Culture parameter optimization to improve efficacy. *Chemosphere* 2021;263:128117.
111. Olicon-Hernandez DR, Camacho-Morales RL, Pozo C, Gonzalez-Lopez J, Aranda E. Evaluation of diclofenac biodegradation by the ascomycete fungus *Penicillium oxalicum* at flask and bench bioreactor scales. *Sci Total Environ* 2019;662:607-614.
112. Olicon-Hernandez DR, Ortuzar M, Pozo C, Gonzalez-Lopez J, Aranda E. Metabolic Capability of *Penicillium oxalicum* to Transform High Concentrations of Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. *Applied Sciences-Basel* 2020;10:2479.
113. Dabrowska M, Muszynska B, Starek M, Zmudzki P, Opoka W. Degradation pathway of cephalosporin antibiotics by in vitro cultures of *Lentinula edodes* and *Imleria badia*. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2018;127:104-112.
114. Copete-Pertuz LS, Placido J, Serna-Galvis EA, Torres-Palma RA, Mora A. Elimination of Isoxazolyl-Penicillins antibiotics in waters by the ligninolytic native Colombian strain *Leptosphaerulina* sp. considerations on biodegradation process and antimicrobial activity removal. *Sci Total Environ* 2018;630:1195-1204.

115. Cvancarova M, Moeder M, Filipova A, Cajthaml T. Biotransformation of fluoroquinolone antibiotics by ligninolytic fungi--Metabolites, enzymes and residual antibacterial activity. *Chemosphere* 2015;136:311-320.
116. Cvancarova M, Moeder M, Filipova A, Reemtsma T, Cajthaml T. Biotransformation of the antibiotic agent flumequine by ligninolytic fungi and residual antibacterial activity of the transformation mixtures. *Environ Sci Technol* 2013;47:14128-14136.
117. Menk JJ, do Nascimento AIS, Leite FG, de Oliveira RA, Jozala AF, de Oliveira Junior JM, Chaud MV, Grotto D. Biosorption of pharmaceutical products by mushroom stem waste. *Chemosphere* 2019;237:124515.
118. Stadlmair LF, Letzel T, Drewes JE, Grassmann J. Enzymes in removal of pharmaceuticals from wastewater: A critical review of challenges, applications and screening methods for their selection. *Chemosphere* 2018;205:649-661.
119. Nguyen LN, Hai FI, Yang SF, Kang JG, Leusch FDL, Roddick F, Price WE, Nghiem LD. Removal of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters, industrial chemicals and pesticides by *Trametes versicolor*: Role of biosorption and biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation* 2014;88:169-175.
120. Emara Y, Siegert, MW, Lehmann, A., Finkbeiner, M. U: Benetto E, Gericke K, Guiton M. ur. Life Cycle Management in the Pharmaceutical Industry Using an Applicable and Robust LCA-Based Environmental Sustainability Assessment Approach. Springer, Cham; 2018, str 79-88.
121. Jimenez-Gonzalez C, Constable DJ, Ponder CS. Evaluating the "greenness" of chemical processes and products in the pharmaceutical industry--a green metrics primer. *Chem Soc Rev* 2012;41:1485-1498.

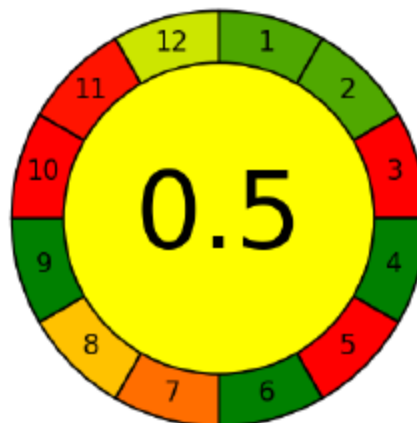
122. Derbenev IN, Dowden J, Twycross J, Hirst JD. Software tools for green and sustainable chemistry. *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry* 2022;35:100623.
123. Pena-Pereira F, Wojnowski W, Tobiszewski M. AGREE-Analytical GREENness Metric Approach and Software. *Anal Chem* 2020;92:10076-10082.
124. Mehmood T, Hanif S, Azhar F, Ali I, Alafnan A, Hussain T, Moin A, Alamri MA, Syed MA. HPLC Method Validation for the Estimation of Lignocaine HCl, Ketoprofen and Hydrocortisone: Greenness Analysis Using AGREE Score. *Int J Mol Sci* 2022;24:440.
125. Yosrey E, Elmansi H, Sheribah ZA, Metwally ME. Implementation of HILIC-UV technique for the determination of moxifloxacin and fluconazole in raw materials and pharmaceutical eye gel. *Sci Rep* 2022;12:13388.
126. Soliman RM, Mostafa NM, Fayez YM, Monir HH, Rostom Y. Novel Spectrophotometric Approaches for the Simultaneous Quantification of Ternary Common Cold Mixture Containing Paracetamol with a Challenging Formulation Ratio: Greenness Profile Evaluation. *J AOAC Int* 2022;105:1268-1279.
127. Alqarni MH, Shakeel F, Aljarba TM, Abdel-Kader MS, Zaatout HH, Alshehri S, Alam P. Determination of Colchicine in Pharmaceutical Formulations, Traditional Extracts, and Ultrasonication-Based Extracts of *Colchicum autumnale* Pleniflorum (L.) Using Regular and Greener HPTLC Approaches: A Comparative Evaluation of Validation Parameters. *Plants (Basel)* 2022;11:1767.
128. Abdelazim AH, Ramzy S. Application of different quantitative analytical techniques for estimation of aspirin and omeprazole in pharmaceutical preparation. *BMC Chem* 2022;16:60.
129. Kuster A, Adler N. Pharmaceuticals in the environment: scientific evidence of risks and its regulation. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 2014;369: 20130587.

130. European Medicines Agency, CHMP. Environmental risk assessment of medicinal products for human use - Scientific guideline. 2018. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/environmental-risk-assessment-medicinal-products-human-use-scientific-guideline>.
131. Jena M, Mishra A, Maiti R. Environmental pharmacology: source, impact and solution. *Rev Environ Health* 2019;34:69-79.
132. Wang J, He B, Yan D, Hu X. Implementing ecopharmacovigilance (EPV) from a pharmacy perspective: A focus on non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Sci Total Environ* 2017;603-604:772-784.
133. Holm G, Snape JR, Murray-Smith R, Talbot J, Taylor D, Some P. Implementing ecopharmacovigilance in practice: challenges and potential opportunities. *Drug Saf* 2013;36:533-546.

9. Dodatak

9.1.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja azatioprina AGREE analiza

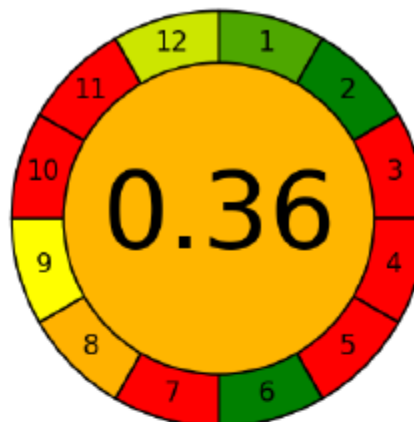
Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 0.85 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 1.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0.22 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.38 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 1.0 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.04 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.1.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja azatioprina AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.35 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.1.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja azatioprina AMGS analiza

Calculate Print Clear Example Calculation About Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|---|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="24.53"/> | <input style="border: 2px solid orange;" type="text" value="41.84%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="6.88"/> | <input style="border: 2px solid green;" type="text" value="11.74%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="27.21"/> | <input style="border: 2px solid orange;" type="text" value="46.41%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

| | |
|--|---|
| Flow Rate (mL/min): <input type="text" value="1"/> | Run time (min/injection): <input type="text" value="20"/> |
|--|---|

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="5"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="15"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |
| <input type="text" value="20"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |

9.1.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja azatioprina AMGS analiza, nastavak

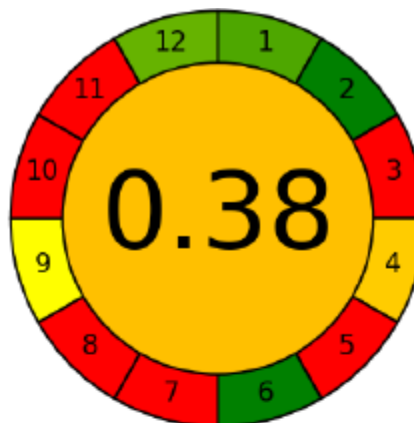
| Mobile Phases | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Methanol | Water | - |
| 5 | 95 | Percent |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | Methanol | - |
| 40 | 60 | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 507.5 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.2.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja budesonida AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.4 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.0 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.8 | 2 |

9.2.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja budesonida AMGS analiza

Calculate
Print
Clear
Example Calculation
About
Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="212.95"/> | <input type="text" value="25.41%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="411.78"/> | <input type="text" value="49.14%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="213.20"/> | <input type="text" value="25.44%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

| | |
|--|---|
| Flow Rate (mL/min): <input type="text" value="1"/> | Run time (min/injection): <input type="text" value="31"/> |
|--|---|

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="21"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="22"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |
| <input type="text" value="31"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |

9.2.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja budesonida AMGS analiza, nastavak

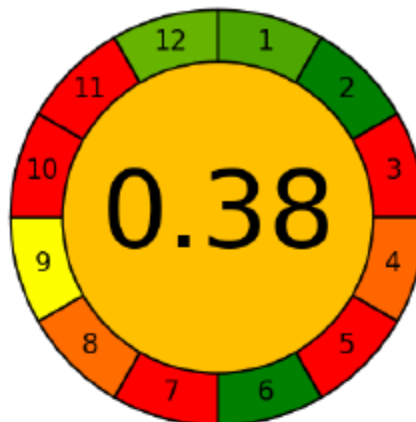
| Mobile Phases | | |
|-----------------------|--------------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Ethanol | Acetonitrile | Water |
| 2 | 32 | 68 |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Acetonitrile | Water | - |
| 50 | 50 | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 140 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Acetonitrile | Water | - |
| 30 | 70 | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.2.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja budesonida AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.2 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.22 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.8 | 2 |

9.2.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja budesonida AMGS analiza

Calculate
Print
Clear
Example Calculation
About
Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="34.35"/> | <input type="text" value="27.21%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="60.69"/> | <input type="text" value="48.08%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="31.18"/> | <input type="text" value="24.70%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

Flow Rate (mL/min): Run time (min/injection):

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="38"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="50"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |
| <input type="text" value="60"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |

9.2.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja budesonida AMGS analiza, nastavak

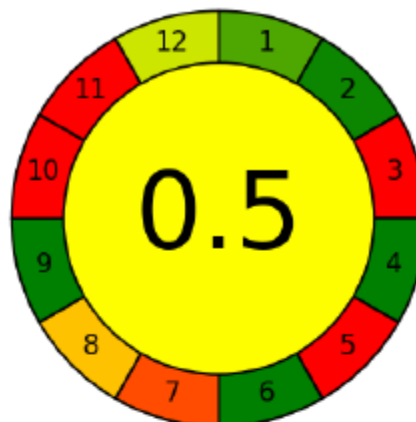
| Mobile Phases | | |
|-----------------------|--------------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Ethanol | Acetonitrile | Water |
| 2 | 32 | 68 |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Acetonitrile | Water | - |
| 50 | 50 | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 217.33 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Acetonitrile | Water | - |
| 31.33 | 68.67 | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.3.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja merkaptopurina AGREE analiza

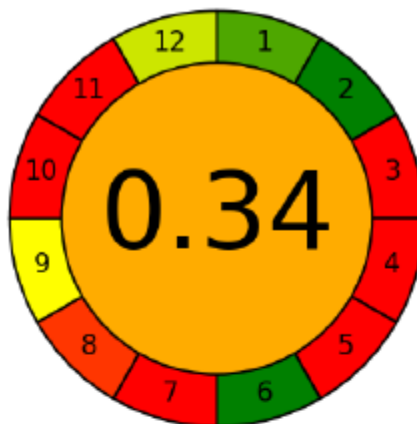
Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 0.98 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 1.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0.15 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.38 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 1.0 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.3.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja merkaptopurina AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.11 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.3.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja merkaptopurina AMGS analiza

Calculate
Print
Clear
Example Calculation
About
Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="53.67"/> | <input type="text" value="28.41%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="33.20"/> | <input type="text" value="17.58%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="102.00"/> | <input type="text" value="54.00%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

| | |
|--|---|
| Flow Rate (mL/min): <input type="text" value="1"/> | Run time (min/injection): <input type="text" value="25"/> |
|--|---|

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="8"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="20"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |
| <input type="text" value="25"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |

9.3.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja merkaptopurina AMGS analiza, nastavak

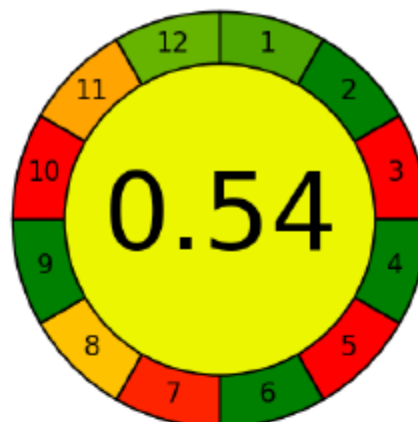
| Mobile Phases | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Methanol | Water | - |
| 2 | 98 | Percent |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Methanol | Water | - |
| 50 | 50 | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 1121.25 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| DMSO | Methanol | Water |
| 1.1 | 1.8 | 97.1 |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.4.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja mesalazina AGREE analiza

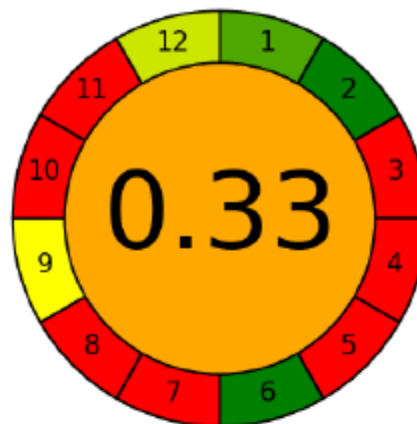
Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 1.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0.07 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.38 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 1.0 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.32 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.8 | 2 |

9.4.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AGREE analiza (I)

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.0 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.4.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (I)

CalculatePrintClearExample CalculationAboutMaximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="107.33"/> | <input type="text" value="34.39%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="59.31"/> | <input type="text" value="19.01%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="145.42"/> | <input type="text" value="46.60%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

Flow Rate (mL/min): Run time (min/injection):

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="8"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="25"/> | <input type="text" value="40"/> | <input type="text" value="60"/> |

9.4.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (I), nastavak

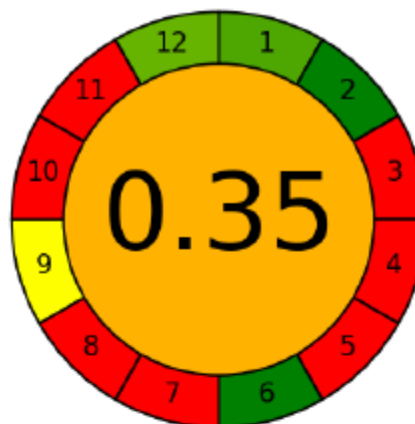
| Mobile Phases | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Acetonitrile | - | - |
| 100 | Percent | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 671.25 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.4.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AGREE analiza (II)

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.0 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.8 | 2 |

9.4.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (II)

Calculate Print Clear Example Calculation About Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="108.19"/> | <input type="text" value="40.56%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="66.72"/> | <input type="text" value="25.01%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="91.80"/> | <input type="text" value="34.42%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

Flow Rate (mL/min): Run time (min/injection):

Gradient

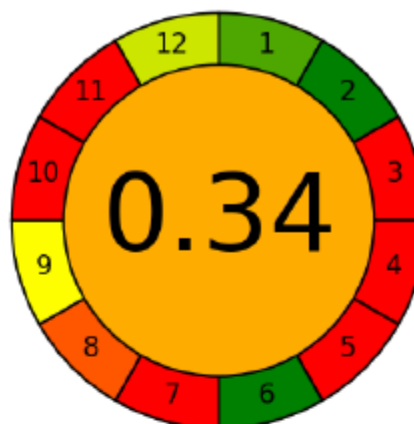
| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="21"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |

9.4.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (II), nastavak

| Mobile Phases | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Methanol | Water | - |
| 15 | 85 | Percent |
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| - | - | - |
| Percent | Percent | Percent |
| Sample | | |
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 239.4 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Methanol | Water | - |
| 15 | 85 | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.4.6. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AGREE analiza (III)

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.17 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.4.7. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (III)

Calculate
Print
Clear
Example Calculation
About
Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="41.22"/> | <input type="text" value="49.97%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="20.30"/> | <input type="text" value="24.62%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="20.96"/> | <input type="text" value="25.41%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

| | |
|--|---|
| Flow Rate (mL/min): <input type="text" value="1"/> | Run time (min/injection): <input type="text" value="60"/> |
|--|---|

Gradient

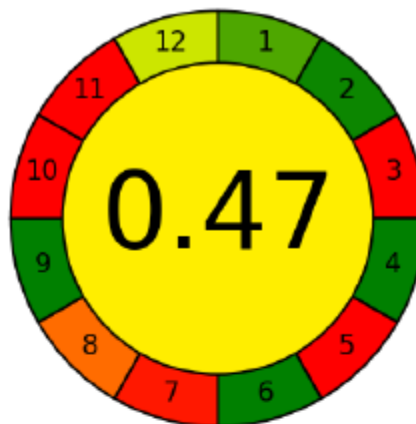
| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="8"/> | <input type="text" value="100"/> | <input type="text" value="0"/> |
| <input type="text" value="20"/> | <input type="text" value="85"/> | <input type="text" value="15"/> |
| <input type="text" value="40"/> | <input type="text" value="25"/> | <input type="text" value="75"/> |
| <input type="text" value="60"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |

9.4.7. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja mesalazina AMGS analiza (III), nastavak

| Mobile Phases | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Acetonitrile | Water | - |
| 40 | 60 | Percent |
| Sample | | |
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 218.7 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.5.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja osalazina AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 0.98 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 1.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0.05 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.22 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 1.0 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.5.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja osalazina AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.2 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.2 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.8 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.5.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja osalazina AMGS analiza

Calculate
Print
Clear
Example Calculation
About
Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|--|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="37.21"/> | <input style="border: 2px solid red;" type="text" value="50.51%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="24.95"/> | <input style="border: 2px solid green;" type="text" value="33.87%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="11.51"/> | <input style="border: 2px solid green;" type="text" value="15.62%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

Flow Rate (mL/min): Run time (min/injection):

Gradient

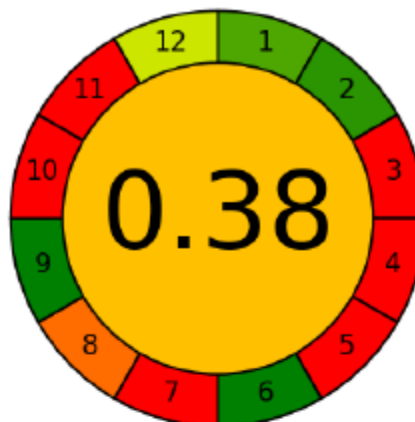
| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="55"/> | <input type="text" value="45"/> |
| <input type="text" value="15"/> | <input type="text" value="55"/> | <input type="text" value="45"/> |
| <input type="text" value="45"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |
| <input type="text" value="50"/> | <input type="text" value="55"/> | <input type="text" value="45"/> |
| <input type="text" value="65"/> | <input type="text" value="55"/> | <input type="text" value="45"/> |

9.5.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja osalazina AMGS analiza, nastavak

| Mobile Phases | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | Methanol | - |
| 70 | 30 | Percent |
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | Methanol | - |
| 35 | 65 | Percent |
| Sample | | |
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 179.25 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | Methanol | - |
| 70 | 30 | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.6.1. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje sadržaja sulfasalazina AGREE analiza

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 0.92 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.0 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.22 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 1.0 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.6.2. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AGREE analiza (I)

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.8 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.17 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.6.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AMGS analiza (I)

Calculate
Print
Clear
Example Calculation
About
Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|--|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="41.86"/> | <input style="border: 2px solid red;" type="text" value="55.54%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="19.70"/> | <input style="border: 2px solid green;" type="text" value="26.14%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="13.81"/> | <input style="border: 2px solid green;" type="text" value="18.32%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

Flow Rate (mL/min): Run time (min/injection):

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="60"/> | <input type="text" value="40"/> |
| <input type="text" value="15"/> | <input type="text" value="45"/> | <input type="text" value="55"/> |
| <input type="text" value="25"/> | <input type="text" value="45"/> | <input type="text" value="55"/> |
| <input type="text" value="60"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |
| <input type="text" value="65"/> | <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="100"/> |

9.6.3. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AMGS analiza (I), nastavak

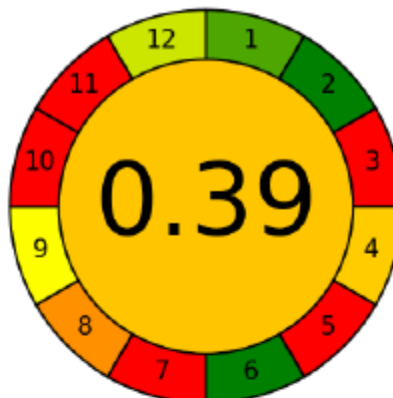
| Mobile Phases | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | Methanol | - |
| 20 | 80 | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 186 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |

9.6.4. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AGREE analiza (II)

Analytical Greenness report sheet



| Criteria | Score | Weight |
|--|-------|--------|
| 1. Direct analytical techniques should be applied to avoid sample treatment. | 0.85 | 2 |
| 2. Minimal sample size and minimal number of samples are goals. | 1.0 | 2 |
| 3. If possible, measurements should be performed in situ. | 0.0 | 2 |
| 4. Integration of analytical processes and operations saves energy and reduces the use of reagents. | 0.4 | 2 |
| 5. Automated and miniaturized methods should be selected. | 0.0 | 2 |
| 6. Derivatization should be avoided. | 1.0 | 2 |
| 7. Generation of a large volume of analytical waste should be avoided, and proper management of analytical waste should be provided. | 0 | 2 |
| 8. Multi-analyte or multi-parameter methods are preferred versus methods using one analyte at a time. | 0.29 | 2 |
| 9. The use of energy should be minimized. | 0.5 | 2 |
| 10. Reagents obtained from renewable sources should be preferred. | 0.0 | 2 |
| 11. Toxic reagents should be eliminated or replaced. | 0.0 | 2 |
| 12. Operator's safety should be increased. | 0.6 | 2 |

9.6.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AMGS analiza (II)

Calculate Print Clear Example Calculation About Maximize

Method

Method Number:

Greenness Score:

| | | |
|--------------------------|------------------------------------|-------------------------------------|
| Instrument Energy Score: | <input type="text" value="25.76"/> | <input type="text" value="38.23%"/> |
| Solvent Energy Score: | <input type="text" value="5.39"/> | <input type="text" value="7.99%"/> |
| Solvent EHS Score: | <input type="text" value="36.24"/> | <input type="text" value="53.78%"/> |

Technique:

Number of analytes of interest:

Number of injections/runs for one full analysis:

Instrument Conditions

| | |
|--|---|
| Flow Rate (mL/min): <input type="text" value="1"/> | Run time (min/injection): <input type="text" value="10"/> |
|--|---|

Gradient

| Time (min) | %A | %B |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| <input type="text" value="0"/> | <input type="text" value="30"/> | <input type="text" value="70"/> |
| <input type="text" value="10"/> | <input type="text" value="30"/> | <input type="text" value="70"/> |

9.6.5. Procjena ekološke prihvatljivosti farmakopejskih metoda za određivanje onečišćenja sulfasalazina AMGS analiza (II), nastavak

| Mobile Phases | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase A | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | Methanol | - |
| 20 | 80 | Percent |

| | | |
|-----------------------|-----------|-----------|
| Mobile Phase B | | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |

| Sample | | |
|--------------------------|-------------------------|---------------|
| Sample Diluent | | |
| Sample prep volume (mL): | Number of sample preps: | |
| 199.5 | 1 | |
| SOLVENT 1 | SOLVENT 2 | SOLVENT 3 |
| Water | - | - |
| 100 | Percent | Percent |
| Copy Solvents | Copy Solvents | Copy Solvents |