



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Vladimir Stankov

**RAZGRADNJA OKSITETRACIKLINA
U VODI PRIMJENOM NAPREDNIH
OKSIDACIJSKIH PROCESA UZ UV
ZRAČENJE**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Vladimir Stankov

**DEGRADATION OF
OXYTETRACYCLINE IN WATER BY
PHOTO-BASED ADVANCED
OXIDATION PROCESSES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2026.



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Vladimir Stankov

**RAZGRADNJA OKSITETRACIKLINA
U VODI PRIMJENOM NAPREDNIH
OKSIDACIJSKIH PROCESA UZ UV
ZRAČENJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor: prof. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, 2026.



University of Zagreb

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Vladimir Stankov

**DEGRADATION OF
OXYTETRACYCLINE IN WATER BY
PHOTO-BASED ADVANCED
OXIDATION PROCESSES**

DOCTORAL THESIS

Supervisor: prof. dr. sc. Šime Ukić

Zagreb, 2026.

SAŽETAK

Ljudska aktivnost dovodi do kontinuiranog unosa organskih kontaminanata, osobito farmaceutika, u vodne sustave, gdje oni zbog postojanosti, bioakumulacije i utjecaja na antimikrobnu rezistenciju predstavljaju značajan ekotoksikološki i zdravstveni rizik. Među njima se oksitetraciklin (OTC), tetraciklinski antibiotik, ističe visokom potrošnjom, često se pojavljuje u okolišu i uvršten je na europske liste tvari koje je potrebno pratiti u vodenom okolišu. Standardni postupci obrade komunalnih i industrijskih otpadnih voda ne pokazuju učinkovitost u uklanjanju OTC-a, što dovodi do potrebe za primjenom naprednih oksidacijskih procesa (AOP) i razvoja pouzdanih analitičkih metoda za praćenje razgradnje kao i za procjenu rizika.

Cilj ovog doktorskog rada bio je razviti i validirati retencijske modele za sustav s dvokomponentnim eluensom metanol/acetonitril/voda koji omogućuje prijenos informacija dobivenih iz izokratnih elucija u gradijentne uvjete (*iso-to-grad* pristup) te primijeniti tako razvijene modele na proučavanje razgradnje oksitetraciklina UV-C fotolizom, UV/H₂O₂ i UV/S₂O₈²⁻ procesima, uključujući kinetiku, putove razgradnje, mineralizaciju, biorazgradivost i promjene u toksičnosti.

U prvom dijelu rada razvijeni su polinomni modeli $\log k$ za osam prioritetnih onečišćivala (alaklor, atrazin, diuron, izoproturon, 17-estradiol, 17-etinilestradiol, karbamazepin, deksametazon) u sustavu metanol/acetonitril/voda, pri čemu su ispitani linearni model (M1), modeli s kvadratnim članovima (M2), interakcijski model (M3) i potpuni kvadratni model (M4). Parametri su određeni višestrukom linearnom regresijom na skupu od 28 izokratnih elucija, dok je sposobnost predikcije modela provjerena neovisnim validacijskim skupom te kroz 16 gradijentnih elucija. Najjednostavniji model M1 pokazao je najveću pogrešku predviđanja (RMSE oko 0,90 min.), dok je model M4 dao najniži RMSE (0,609 min.) i najviši koeficijent determinacije ($R^2 = 0,9954$). Dobiveni rezultati pokazuju da je za točan opis retencije i simulaciju razdvajanja u tekućinskoj kromatografiji s dvokomponentnim eluensom potrebno uzeti u obzir i nelinearne te učinke metanola i acetonitrila na retencije.

U drugom dijelu rada ispitana je razgradnja OTC-a pri izravnoj UV-C fotolizi, UV/H₂O₂ i UV/S₂O₈²⁻ procesima u šaržnom fotoreaktoru, uz praćenje koncentracije OTC-a i nehlapljivih međuprodukata LC-MS/MS metodom, ukupnog organskog ugljika (TOC), biorazgradivosti (BPK₅/KPK) i toksičnosti pomoću *Vibrio fischeri* bioluminiscentnog testa. U sva tri procesa postignuta je brza konverzija OTC-a (nestanak signala na LC-MS/MS-u unutar prvih 30 minuta), no mineralizacija je značajno zaostajala, pri čemu su nakon 90 min. zabilježeni stupnjevi uklanjanja TOC-a od približno 12 % za UV-C, 40 % za UV/H₂O₂ i 62 % za UV/S₂O₈²⁻ proces. Razlike u učinkovitosti pripisane su većoj kvantnoj učinkovitosti i molarnoj apsorpciji persulfatnog procesa pri 254 nm te povoljnijoj kinetici reakcija sulfatnih radikala sa stabilnim međuproduktima, osobito malim alifatskim kiselinama.

Kinetička analiza pokazala je da razgradnja OTC-a u svim ispitivanim procesima dobro slijedi kinetiku pseudo-prvog reda, uz najveće konstante brzine kod UV/S₂O₈²⁻ procesa. Identifikacijom međuprodukata razgradnje predloženi su mehanizmi demetilacije, hidroksilacije i kinonizacije tetraciklinske strukture te su predloženi putevi razgradnje za UV/H₂O₂ i UV/S₂O₈²⁻ procese. Iako izravna UV-C fotoliza brzo uklanja OTC, mineralizacija ostaje niska a u otopini se nakupljaju međuprodukti s vrlo slabom apsorpcijom na 254 nm, dok radikalski vođeni AOP-i omogućuju snažniju oksidaciju, poboljšanu biorazgradivost i smanjenje štetnih učinaka na vodeni ekosustav, pri čemu se UV/S₂O₈²⁻ proces pokazao najučinkovitijim, uz dobar odnos između kinetike razgradnje, postignute mineralizacije i potrošnje energije.

Kombinacijom retencijskog modeliranja i naprednih oksidacijskih procesa, ovaj rad pokazuje kako se *iso-to-grad* pristup s LC-MS/MS-om može iskoristiti za razvoj LC metoda za kompleksne smjese produkata razgradnje te kvantitativno opisati sudbina oksitetraciklina u vodenom okolišu pri različitim fotokemijskim procesima. Dobiveni rezultati pridonose boljem razumijevanju mehanizama razgradnje i optimizaciji AOP-a za uklanjanje antibiotika iz voda u području okolišne i zelene analitičke kemije.

Ključne riječi: oksitetraciklin; napredni oksidacijski procesi; UV-C fotoliza; UV/H₂O₂; UV/S₂O₈²⁻; LC-MS/MS; retencijsko modeliranje; *iso-to-grad*; mineralizacija; *Vibrio fischeri*.

SUMMARY

Human activities lead to the continuous input of organic contaminants, particularly pharmaceuticals, into aquatic systems, where their persistence, bioaccumulation and impact on antimicrobial resistance pose a significant ecotoxicological and human health risk. Among these compounds, oxytetracycline (OTC), a tetracycline antibiotic, stands out due to its high consumption, frequent occurrence in the environment, and inclusion on European watch lists of substances to be monitored in aquatic systems. Conventional municipal and industrial wastewater treatment processes are not efficient in removing OTC, which highlights the need to apply advanced oxidation processes (AOPs) and to develop reliable analytical methods for monitoring its degradation and assessing the associated risks.

The aim of this doctoral thesis was to develop and validate retention models for a dual-component eluent system methanol/acetonitrile/water that enable the transfer of information obtained in isocratic elutions to gradient conditions (*iso-to-grad* approach), and to apply the developed models to the study of oxytetracycline degradation by UV-C photolysis, UV/H₂O₂ and UV/S₂O₈²⁻ processes, including kinetics, degradation pathways, mineralization, biodegradability and changes in toxicity.

In the first part of the work, polynomial $\log k$ models were developed for eight priority pollutants (alachlor, atrazine, diuron, isoproturon, 17-estradiol, 17-ethinylestradiol, carbamazepine, dexamethasone) in the methanol/acetonitrile/water system, testing a linear model (M1), models with quadratic terms (M2), an interaction model (M3) and a full quadratic model (M4). Model parameters were obtained by multiple linear regression using a set of 28 isocratic elutions, while the predictive ability of the models was evaluated on an independent validation set and through 16 gradient elutions. The simplest model M1 showed the highest prediction error (RMSE of about 0.90 min), whereas model M4 yielded the lowest RMSE (0.609 min) and the highest coefficient of determination ($R^2 = 0.9954$). The results show that an accurate description of retention and simulation of liquid chromatographic separations with a dual-component eluent requires inclusion of both nonlinear terms and the effects of methanol and acetonitrile on retention.

In the second part of the work, OTC degradation by direct UV-C photolysis, UV/H₂O₂ and UV/S₂O₈²⁻ processes was investigated in a batch photoreactor, with monitoring of OTC and non-volatile transformation products by LC-MS/MS, total organic carbon (TOC), biodegradability (BOD₅/COD) and toxicity using the *Vibrio fischeri* bioluminescence assay. In all three processes, rapid OTC conversion was achieved (disappearance of the OTC signal in

LC-MS/MS within the first 30 minutes), but mineralization lagged significantly behind, with TOC removal after 90 minutes of approximately 12% for UVC, 40% for UV/H₂O₂ and 62% for the UV/S₂O₈²⁻ process. The differences in performance were attributed to the higher quantum yield and molar absorptivity of the persulfate process at 254 nm, as well as to more favourable kinetics of sulfate radical reactions with persistent intermediates, especially small aliphatic acids.

Kinetic analysis showed that OTC degradation in all investigated processes follows pseudo-first-order kinetics, with the highest rate constants obtained for the UV/S₂O₈²⁻ process. Based on the identification of transformation products, degradation pathways involving demethylation, hydroxylation and quinonization of the tetracycline structure were proposed, along with degradation schemes for the UV/H₂O₂ and UV/S₂O₈²⁻ processes. Although direct UV-C photolysis rapidly removes OTC, mineralization remains low and intermediates with very weak absorbance at 254 nm accumulate in solution, whereas radical-driven AOPs enable deeper oxidation, improved biodegradability and a reduction of adverse effects on the aquatic ecosystem, with the UV/S₂O₈²⁻ process proving to be the most efficient, providing a favourable balance between degradation kinetics, achieved mineralization and energy consumption.

By combining retention modelling and advanced oxidation processes, this work demonstrates how the *iso-to-grad* approach coupled with LC-MS/MS can be used for the development of LC methods for complex mixtures of degradation products and for a quantitative description of the fate of oxytetracycline in aquatic environments under different photochemical conditions. The results contribute to a better understanding of degradation mechanisms and to the optimization of AOPs for the removal of antibiotics from water in the context of environmental and green analytical chemistry.

Key words: oxytetracycline; advanced oxidation processes; UV-C photolysis; UV/H₂O₂; UV/S₂O₈²⁻; LC-MS/MS; retention modelling; *iso-to-grad*; mineralization; *Vibrio fischeri*.