

# Primjena polimera s otiskom molekule farmaceutika u pripremi uzorka vode za kromatografsku analizu

---

Mlinarević, Josipa

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:027823>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-15**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

**Josipa Mlinarević**

**ZAVRŠNI RAD**

**Zagreb, rujan 2023.**

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
POVJERENSTVO ZA ZAVRŠNE ISPITE

Kandidatkinja \_\_\_\_\_ **Josipa Mlinarević** \_\_\_\_\_

Predala je izrađen završni rad dana: \_\_\_\_\_ 19. rujna 2023. \_\_\_\_\_

Povjerenstvo u sastavu:

prof. dr. sc. Sandra Babić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

prof. dr. sc. Irena Škorić, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

dr. sc. Kristina Tolić Čop, asistentica, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

doc. dr. sc. Dragana Vuk, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo završni rad i odobrilo obranu završnog rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Završni ispit održat će se dana: \_\_\_\_\_ 22. rujna 2023. \_\_\_\_\_

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU**  
**FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE**  
**SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ**

Josipa Mlinarević

**PRIMJENA POLIMERA S OTISKOM MOLEKULE  
FARMACEUTIKA U PRIPREMI UZORKA VODE ZA  
KROMATOGRAFSKU ANALIZU**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Sandra Babić

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Sandra Babić

Prof. dr. sc. Irena Škorić

Dr. sc. Kristina Tolić Čop

Zagreb, rujan 2023.

*Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Sandri Babić na pomoći i strpljenju te izvrsnom mentorstvu tijekom pisanja ovog završnog rada kao i na prenesenom znanju i trudu tijekom pisanja rada. Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj podršci, prijateljima i svom*  
*Lovri.*

## **SAŽETAK:**

Najčešće korišten postupak uklanjanja interferencija i izolacije analita je ekstrakcija čvrstom fazom. U odnosu na konvencionalne sorbense koji se koriste za pripremu uzorka, najvažnja značajka polimera s otiskom molekule je visoka selektivnost prema ciljanim analitima. Osim za ekstrakciju farmaceutika, polimeri s otiskom molekule primjenjuju se za ekstrakciju teških metala, industrijskih boja, patogenih organizama, raznih pesticida itd. Priprema uzorka primjenom polimera s otiskom molekule ima posebnu važnost prilikom analize mikroonečišćivala u uzorcima iz okoliša. Kao vodeće prednosti nad ostalim sorbensima, uz visoku selektivnost, mogu se izdvojiti visoka stabilnost te jednostavna i jeftina priprema. Ekstrakcija primjenom polimera s otiskom molekule može se provoditi u *on-line* ili *off-line* načinu rada. Za njenu učinkovitu provedbu, nužno je kontrolirati čimbenike koji mogu smanjiti učinkovitost ekstrakcije polimerom s otiskom molekule poput: utjecaja pH-vrijednosti, količine sorbensa, volumen uzorka, izbor otapala za eluiranje, brzine protoka uzorka te ionske jakosti.

**Ključne riječi: polimer s otiskom molekule, ekstrakcija čvrstom fazom, priprema uzorka**

## **SUMMARY:**

Solid phase extraction is the most commonly used procedure for the removal of interferences and isolation of analytes. Compared to conventional sorbents used for sample preparation, the most important feature of molecularly imprinted polymers is their high selectivity towards target analytes. In addition to the extraction of pharmaceuticals, molecularly imprinted polymers are used for the extraction of heavy metals, industrial dyes, pathogenic organisms, various pesticides, etc. Sample preparation using molecularly imprinted polymers is of particular importance when analyzing micropollutants in environmental samples. The leading advantages, in addition to high selectivity, are high stability and simple and inexpensive preparation. Extraction using molecularly imprinted polymers can be performed in on-line or off-line mode. For its effective implementation, it is necessary to control factors that can reduce the efficiency of the extraction by molecularly imprinted polymer, such as: the influence of the pH value, the amount of sorbent, sample volume, choice of washing solvent and elution solvent, sample flow rate and ionic strength.

**Key words: molecularly imprinted polymer, solid phase extraction, sample preparation**

## Sadržaj

<b>1. UVOD.....</b>	<b>1</b>
<b>2. OPĆI DIO.....</b>	<b>3</b>
<b>3. EKSTRAKCIJA ČVRSTOM FAZOM.....</b>	<b>5</b>
<b>3.1. Polimeri s otiskom molekule (MIP) u analizi uzorka vode.....</b>	<b>9</b>
<b>3.2. Off-line i on-line način rada ekstrakcije.....</b>	<b>12</b>
<b>3.3. Primjena polimera s otiskom molekule u analizi uzorka vode .....</b>	<b>13</b>
<b>4. Čimbenici koji utječu na ekstrakciju pomoću MIP-ova .....</b>	<b>17</b>
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>19</b>
<b>6. POPIS KRATICA I OZNAKA .....</b>	<b>20</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>21</b>
<b>8. ŽIVOTOPIS: .....</b>	<b>23</b>



## 1. UVOD

Priprema uzorka, koji je nužan korak prilikom obrade uzorka, ima značajnu funkciju u većini analitičkih metoda (primjerice prilikom obrade uzoraka iz okoliša ili analize hrane). Unatoč razvoju mnogih modernih metoda i instrumenata za analizu, priprema uzorka čini preko 60 % kompletne metode. Cilj je pripremiti prikladan uzorak, određene koncentracije, za kromatografsku analizu a takva dugotrajna složena priprema u više koraka je neizbježna i za analizu mikrozagađivala u uzorcima iz okoliša. Iz navedenog je jasno da je postupan proces često podložan pogreškama (do čak 30 %) i naposljetku gubitku komponenti no, unatoč tome, gotovo uvijek se izvodi [1, 2].

Kako bi se obavila priprema uzorka koja neće rezultirati gubitkom analita bez mogućih dodatnih pogrešaka tijekom rukovanja instrumentom, razvijeni su različiti postupci kojima se takvi uvjeti mogu osigurati. Takva preliminarna obrada uključuje tehnike kao što su: filtracija, centrifugiranje, uparavanje, razrjeđivanje, pročišćavanje, izolacija analita itd. a kao glavni postupak je izdvojena ekstrakcija. Njihovom provedbom se osigurava uklanjanje interferencija, koncentriranje analita te ponovljivost rezultata. Pravilna priprema uzorka može značajno utjecati na rezultate analize, stoga je od velike važnosti pravilno provesti prethodno navedene korake.

Tehnike ekstrakcije se mogu podijeliti s obzirom na fizikalno stanje uzorka i sredstva za ekstrakciju:

- ekstrakcija otapalom
  - ekstrakcija tekuće-tekuće u kojoj su i uzorak i sredstvo za ekstrakciju tekućine
  - ekstrakcija čvrsto-tekuće u kojoj se analit ekstrahira otapalom iz čvrstog uzorka
- ekstrakcija čvrstom fazom
  - za tekuće uzorke
  - za čvrste uzorke, poput raspršenja matrice uzorka kroz čvrstu fazu

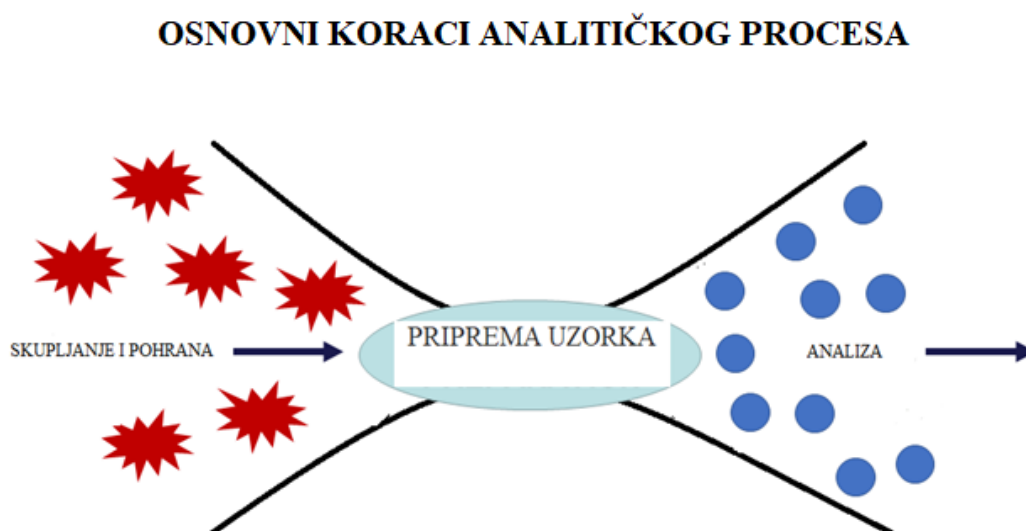
Svrha nadogradnje navedenih postupaka je reduciranje početne količine uzorka, povećanje efikasnosti ekstrakcije, automatizacija procesa u cilju smanjenja moguće sustavne pogreške i

manja potrošnja organskog otapala. Ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Extraction*, SPE) i ekstrakcija tekuće-tekuće (engl. *Liquid Liquid Extraction*, LLE) su dominantne analitičke tehnike pripreme uzorka [3]. Izbor odgovarajućeg sorbensa pri ekstrakciji čvrstom fazom je ključan te ovisi o fizikalno-kemijskim svojstvima sorbensa, sastojcima matrice uzorka i međusobnoj kompatibilnosti analita i sorbensa. Za analizu uzorka vode atraktivni su, posebno dizajnirani, polimerni sorbensi kojima su integrirani trodimenzionalni oblici analita. Polimeri s otiskom molekule (engl. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP) su visoko stabilni polimeri koji funkcioniraju na način da molekula predloška, nakon vezivanja s monomerom, ostavlja prostor za ulazak molekule iz uzorka vode. U odnosu na druge sorbense, korištenjem MIP-ova se smanjuje trajanje a povećava pouzdanost analize uklanjanjem interferencija. Osim navedenog, pružaju isplativiju pripremu uzorka te stabilnost pri visokim temperaturama i promjenama pH-vrijednosti. Često se koriste za pripremu uzoraka koji se kasnije analiziraju različitim analitičkim tehnikama poput kromatografije ili elektrokemijskih metoda a ne zaostaju ni kao sorbensi atraktivni za primjenu u farmaciji, analizi okoliša i hrane, forenzici itd. [4]. Cilj ovog rada je usporediti do sada razvijene polimere s otiskom molekule farmaceutika s obzirom na iskorištenje.

## 2. OPĆI DIO

- **Priprema uzorka**

Kako bi uzorak bio pogodan za kemijsku analizu potrebno ih je prije svega na odgovarajući način prikupiti i pohraniti a slijedno tome i pripremiti (**Slika 1**).



*Slika 1.* Shematski prikaz osnovnih koraka tijekom analitičkog procesa

Korak priprema uzorka je neizbježan u analizi uzoraka s kompleksnim matricama koja ima negativan utjecaj na izvedbu analitičkog sustava što otežava analizu ciljanih analita. Osim navedenog, nužno je pripremiti uzorak zbog moguće preniske koncentracije analita kako bi se postigla prihvatljiva usklađenost s analitičkim instrumentima a realizira se kroz smanjenje veličine uzorka i oslobađanja analita iz matrice, prilagođavanje uzorka analitičkoj metodi, uklanjanje interferencija te koncentriranje (povećanje koncentracije analita u cilju njegovog kvantitativnog određivanja (**Slika 2**).



**Slika 2.** Univerzalni koraci tijekom pripreme uzorka [3]

Postupci pripreme uzorka vode uključuju ekstrakciju analita i čišćenje uzorka koje je zanemareno s obzirom da postupak ekstrakcije pruža određenu selektivnost te je čišćenje uzorka provedeno u istom koraku zajedno s ekstrakcijom. Idealna ekstrakcijska metoda za uzorke vode trebala bi osigurati koncentriranje analita, visoku točnost i preciznost, nisku granicu detekcije, visoku efikasnost, zadovoljavajuće iskorištenje za ispitivane analite te prikladnost za analizu na terenu. Dijele se na postupke imobiliziranja analita na čvrstu fazu i postupke ekstrakcije analita u manji volumen drugog otapala [4].

Kao najbitnije metode pripreme uzorka mogu se izdvojiti: ekstrakcija čvrstom fazom, mikroekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME), magnetska ekstrakcija čvrstom fazom (engl. *Magnetic Solid Phase Extraction*, MSPE) i ekstrakcija miješalicom (engl. *Stir-Bar Sorptive Extraction*, SBSE). Mikroekstrakcija čvrstom fazom uvedena je 1987. godine i prekretnica je u pripremi bioanalitičkih uzoraka s obzirom da se skupljanje i pohrana uzorka, ekstrakcija i koncentriranje analita odvija istovremeno. Dijele se na

mikroekstrakciju na čvrstom nosaču (engl. *Solid Phase Microextraction*, SPME) i mikroekstrakciju tekućom fazom (engl. *Liquid Phase Microextraction*, LPME). Ukoliko je čvrsti nosač smješten na magnetu, mikroekstrakcija je posredovana miješanjem (engl. *Stir-Bar Sorptive Extraction*, SBSE) [5]. MSPE je posljednjih godina postala najkorištenija metoda prilikom odvajanja organskih/anorganskih i bioaktivnih komponenti na razini matrice [6].

### 3. EKSTRAKCIJA ČVRSTOM FAZOM

Pod ekstrakciju otapalom se ubrajaju Soxhletu i Soxtecu ekstrakcija. Soxtec ekstrakcija predstavlja unaprijeđenu verziju Soxhlet koja je značajno brža metoda i kojom je riješen problem velikog volumena ekstrata. Dodatna podjela ekstrakcije otapalom je:

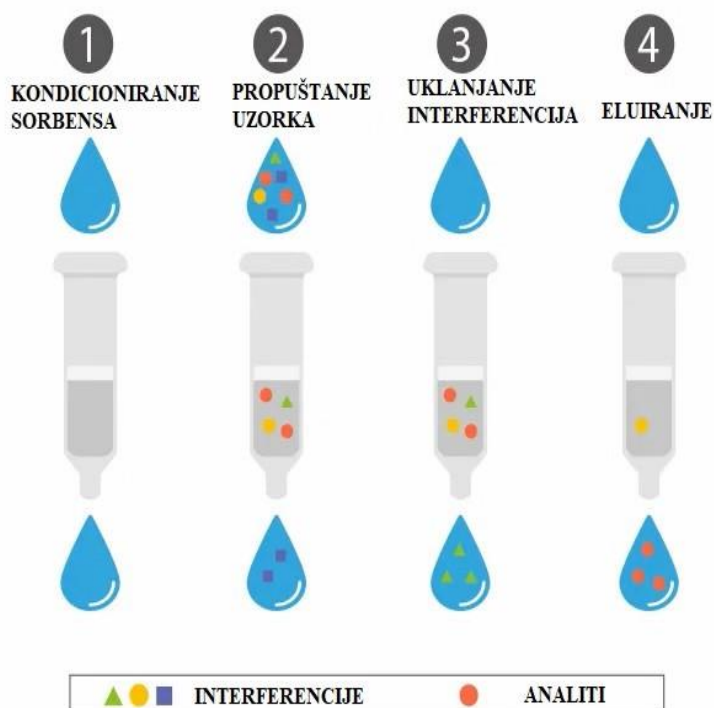
- Ultrazvučna ekstrakcija otapalom
- Ekstrakcija superkričnim fluidom
- Tekuća ekstrakcija pod pritiskom (engl. *Pressurized Liquid Extraction*, PLE)
- Ekstrakcija pregrijanom vodom (engl. *Superheated Water Extraction*, SHWE)
- Ekstrakcija pomoću mikrovalova (engl. *Microwave-Assisted Extraction*, MAE)
- Matrična disperzija čvrste faze (engl. *Matrix Solid-Phase Dispersion*, MSPD) [7]

Za pročišćavanje uzorka i koncentriranje koristi se jedna od najpopularnijih tehnika odvajanja: ekstrakcija čvrstom fazom. SPE pronalazi učinkovitu primjenu od 1940. godine kada je prvi put otkrivena. Osnovno načelo ekstrakcije čvrstom fazom je disperzija analita između tekuće i čvrste faze pri čemu analit mora imati veći afinitet prema čvrstoj fazi. Uzorak predstavlja tekuću fazu dok je sorbens definiran kao čvrsta faza. Neželjeni spojevi matrice, koji mogu ometati analizu, separiraju se od analita na temelju razlike u afinitetu i sorpciji te iz tog razloga pripadaju skupini metoda zadržavanja analita. Čvrsti sorbens zadržava analit dok ostatak uzorka vode, zajedno s interferencijama, prolazi nevezan. U konačnici, analit se ispiru pogodnim otapalom s čvrstog sorbensa. Neki od glavnih razloga zašto je ova metoda široko zastupljena je što je postupak brz, ponovljiv, isplativ, efikasan i jednostavan za rukovanje pa se koristi za podjelu uzoraka na frakcije

(primjerice: odvajanje spojeva iz uzorka na temelju polarosti), pročišćavanje (analit se pročišćava adsorpcijom iz otopine) i koncentriranje.

Osnovni koraci pri ekstrakciji čvrstom fazom su: kondicioniranje sorbensa, propuštanje uzorka, uklanjanje interferencija i eluiranje (**Slika 4**). Ta četiri koraka su detaljnije opisana kako slijedi:

- 1) s obzirom da je čvrsta faza smještena u kolonama ili diskovima različitih veličina, prvi korak nalaže pripremu sorbensa za prihvat željenog analita i sam odabir prikladne čvrste faze koji se temelji na fizikalno-kemijskim karakteristikama analita
- 2) uzorak se propušta kroz kolonu čime se analit, ali i interferencije zadržavaju na sorbentu
- 3) ispiranje interferencija pogodnim otapalom
- 4) zadnjim korakom analit se eluiraju sa sorbensa korištenjem odgovarajućeg otapala [8]



**Slika 4.** Osnovni koraci pri ekstrakciji čvrstom fazom [8]

Prednost ekstrakcije čvrstom fazom je u činjenici da se pročišćavanje i koncentriranje odvija u jednom koraku. U odnosu na ekstrakciju tekuće – tekuće, ekstrakcija čvrstom fazom je češće korištena zbog mogućnosti automatiziranja procesa, smanjenja potrošnje organskog otapala i povećanja učinkovitosti procesa [7]. Dodatna prednost, s ekološke strane, ekstrakcije čvrstom fazom je manji utjecaj na okoliš odnosno pruža smanjeno onečišćenje okoliša u odnosu na LLE.

- **Klasični materijali u ekstrakciji čvrstom fazom [9]**

Konvencionalni sorbensi koji se koriste u ekstrakciji čvrstom fazom dijele se na materijale za ekstrakciju na bazi:

- Silicijeva dioksida

Iako je silicijev dioksid uobičajeno predstavljen jednostavnom molekulskom formulom ( $\text{SiO}_2$ ), u stvarnosti, to je anorganski polimerni materijal. U molekuli silicijeva dioksida, atomi silicija i kisika tvore tetraedarske strukture s atomom silicija u središtu i četiri atoma kisika na četiri ugla svakog tetraedra. U amorfnom silicijevom dioksidu (najčešće korišten u kromatografskim kolonama i za pripremi uzorka), svaki od ovih tetraedra može biti kemijski vezan na do četiri susjedna tetraedra kroz veze silicij-kisik (siloksan). Noderivatizirani silicijev dioksid koriste se u kromatografiji normalnom fazom te za pročišćavanje uzoraka. Funkcionalizirani materijali od silicijevog dioksida učestalo se koriste u tehnikama pripreme uzoraka uključujući ekstrakciju čvrstom fazom te se upotrebljavaju kao nepokretne faze u tekućinskoj kromatografiji visoke djelotvornosti (engl. *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), kromatografiji superkritičnim fluidom (engl. *Supercritical Fluid Chromatography*, SFC), kapilarnoj elektrokromatografiji (engl. *Capillary electrochromatography*, CEC) i plinskoj kromatografiji (engl. *Gas Chromatography*, GC). Prednosti materijala na bazi silicijevog dioksida je visoka mehanička otpornost dok su nedostaci: nestabilnost pri visokim pH-vrijednostima, nedovoljno zadržavanje polarnih analita tijekom ekstrakcije što ograničava koncentriranje polarnih spojeva.

- Ugljika

Podjela: aktivni ugljen, grafitna čađa, porozni grafitni ugljik, ugljična molekularna sita.

Prednost: prikupljanje i koncentriranje hlapivih organskih spojeva iz zraka i vode, visok kapacitet adsorpcije, velika površina, primjena u širokom rasponu pH-vrijednosti, široka dostupnost.

Nedostatak: snažne interakcije s adsorbiranim analitima ograničavaju primjenu polarnih i nisko hlapljivih spojeva što rezultira otežanim ekstrahiranjem takvih analita iz materijala s aktivnim ugljenom, ovisnost adsorpcijskog kapaciteta o složenoj strukturi mikropora gdje ogromne površine materijala za ekstrakciju na bazi aktivnog ugljena mogu dovesti do određenih katalitičkih reakcija i time onemogućiti ekstrakciju primjerenog analita, loša mehanička stabilnost.

- **Polimerni materijali u ekstrakciji čvrstom fazom**

Među najpopularnijim materijalima našli su se porozni materijali na bazi polimera zbog svoje velike specifične površine a samim time i većeg kapaciteta, veće robusnosti u širem pH-području, fleksibilnijeg modificiranja svojstava prilikom promjene strukture i pravilnog oblika što rezultira smanjenjem otpora (protutlaka). Razvojem poroznih polimernih sorbenata dovelo je do uklanjanja svih navedenih nedostataka u ekstrakciji čvrstom fazom. Dije se na:

- polistiren-divinilbenzen kopolimere
- polimere s otiskom molekule (engl. *Molecularly Imprinted Polymers*, MIP)
- materijale s ograničenim pristupom (engl. *Restricted-Access Materials*, RAM)

Primjena materijala na bazi polimera je široko rasprostranjena u analizi hrane, analizi bioloških uzoraka, analizi uzoraka iz okoliša i slično. Neki od primjera korištenih materijala, načina rada, spojeva, uzorka i tehnika kojim su ekstrahirani su prikazani u **Tablici 1** [9,10].



**Tablica 1.** Primjeri primjene materijala na bazi polimera u SPE [10]

<b>MATERIJAL</b>	<b>NAČIN RADA</b>	<b>ANALITI</b>	<b>UZORAK</b>	<b>INSTRUMENTALNA ANALIZA</b>
Strata - X	off-line	farmaceutici	otpadne vode	LC-MS/MS
Bond Elut Plexa	disperzija	antibiotici	mlijeko	LC-MS/MS
NVIm-DVB	on-line	pesticidi	rijeka	LC-UV
MIP/inzulin	off-line	inzulin	plazma	LC-DAD
MIP/PAHs	off-line	PAHs	morska voda	GC-MS
Strata-X-WC	off-line	toksini	urin	LC-TOF
Oasis MCX	off-line	zloupornabe droge	otpadne vode	LC-MS/MS
Oasis HLB	off-line	sladila	otpadne vode	LC-MS/MS

### **3.1. Polimeri s otiskom molekule (MIP) u analizi uzorka vode**

Polimer s otiskom molekule je polimer koji funkcionira na principu 'ključ-brava' gdje su vezna mjesta polimera veličinski komplementarna s molekulom predloška koji se vezuje. Osim po veličini, šupljina na polimeru je usklađena s ciljnom molekulom po obliku i poziciji funkcionalne skupine. Molekula predloška i funkcionalni monomer se polimeriziraju uz prisustvo sredstva za umrežavanje nakon čega dolazi do uklanjanja molekule predloška formirajući spomenute šupljine [11].

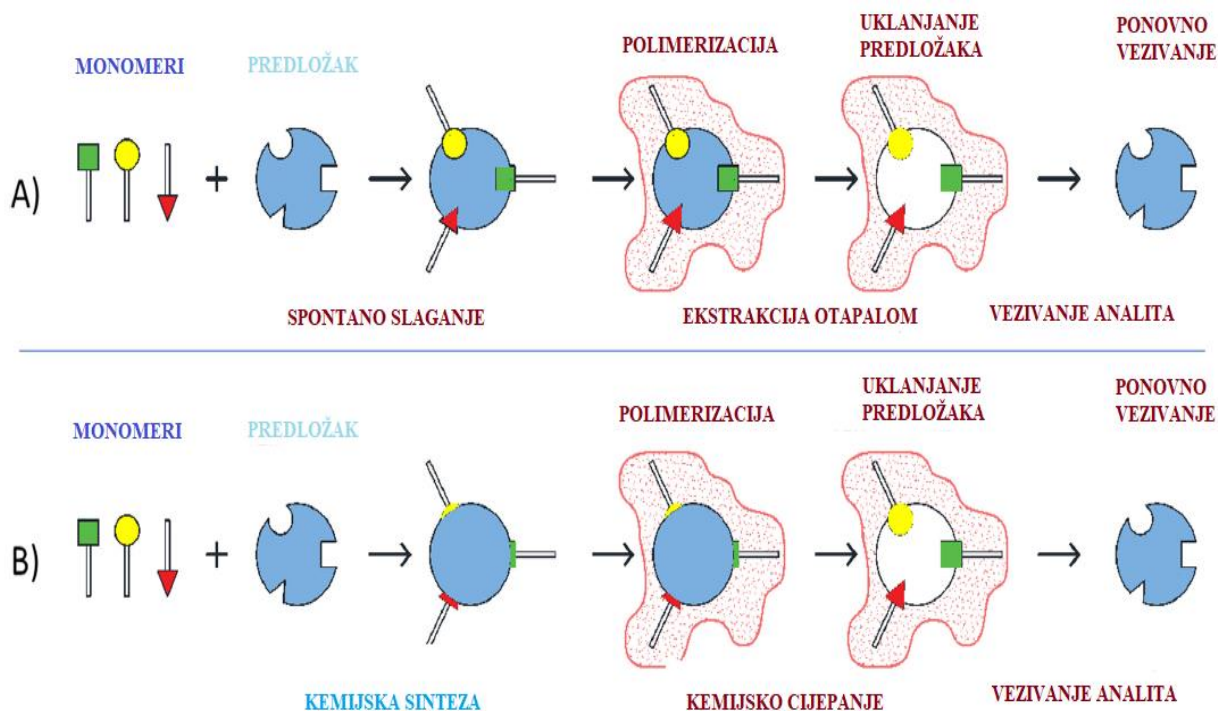
Kemijske veze između monomera i molekule predloška mogu biti kovalentne i nekovalentne. Ukoliko je veza kovalentna, nakon formiranja stabilnog kompleksa i polimerizacije, dolazi do

njenog kidanja i uklanjanja molekule predloška te se na taj način definiraju komplementarna mjesta. Jakost kovalentne veze mora biti istovremeno snažna i slaba uz brz proces ekstrakcije. Snažna zbog odvijanja polimerizacije a slaba zbog pucanja kovalentne veze pomoću kemijske interakcije kako ne bi došlo do značajnijih oštećenja veznih mjesta. Primjeri kovalentnih međudjelovanja kod polimera s otiskom molekule su Shiffove baze (dvostruka veza koja povezuje atome dušika i ugljika), esterske veze borne kiseline i acetalne veze. Iako prednost kovalentnog otiskivanja čini bolja selektivnost, broj organskih spojeva koji je sposoban za učinkovitu sintezu je limitiran [12].

Nekovalentna kemijska veza između molekule predloška i molekule otiska može biti ionska veza, vodikova veza ili dipolna djelovanja. Najpopularniji u primjeni je funkcionalni monomer metakrilna kiselina ( $C_4H_6O_2$ ) a slijede ju akrilna ( $C_3H_4O_2$ ), itakonska ( $C_5H_6O_4$ ), benzojeva kiselina itd. [11,13]. Usporedba kovalentnih i nekovalentnih tehnika utiskivanja je prikazana u **Tablici 2** dok je princip rada metoda detaljno prikazan na **Slici 5** [12].

**Tablica 2.** Usporedba kovalentnih i nekovalentnih veza između monomera i molekule predloška

TIP VEZIVANJA	INTERAKCIJA	PREDNOST	NEDOSTATAK
<b><u>KOVALENTNA</u></b>	Shiffove baze, esteri, ketali, acetali	snažnije i izdržljivije veze, stabilnost predloška monomera tijekom polimerizacije, polimer s homogenijom veznom šupljinom	otežano uklanjanje predloška zbog snažnih veza, sporo vezivanje
<b><u>NEKOVALENTNA</u></b>	ionske veze, vodikove veze i Van Der Waalsove interakcije	fleksibilno i brzo vezivanje, olakšano uklanjanje molekule predloška, visoka selektivnost MIP-a	visoka osjetljivost na interferencije



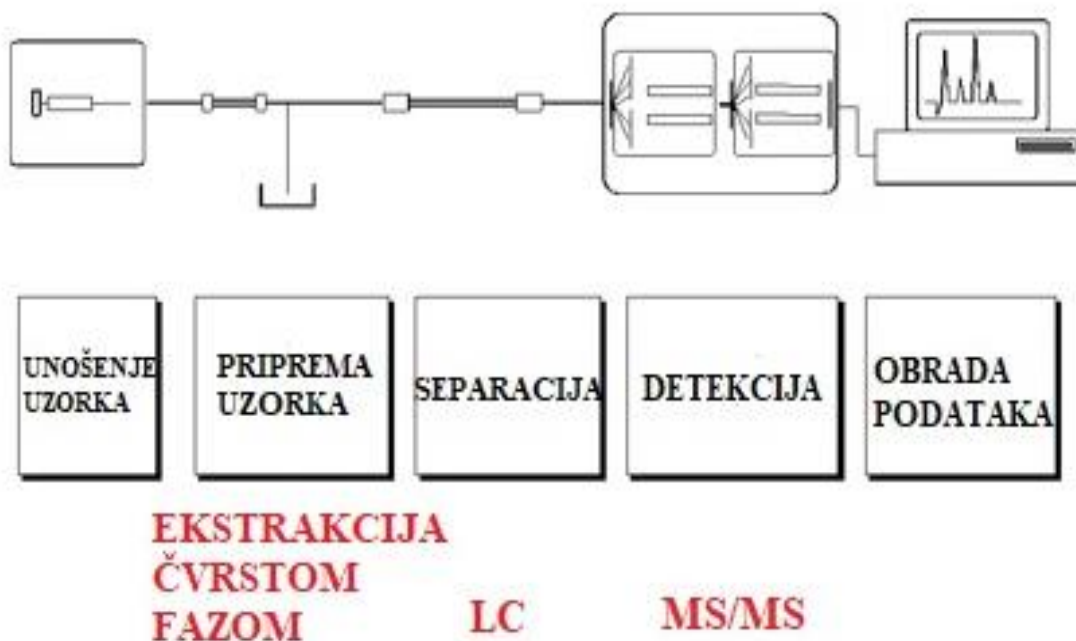
**Slika 5.** Ilustrirani prikaz koraka u polimerizaciji prilikom A) nekovalentnog vezivanja i B) kovalentnog vezivanja [13]

### 3.2. Off-line i on-line način rada ekstrakcije

Postupak ekstrakcije primjenom polimera s otiskom molekule moguće je izravno povezati s instrumentalnom tehnikom detekcije i kvantitativne analize dobivenog ekstrakta, npr. Kromatografskom analizom (*on-line* način rada) ili u odvojenim koracima pripremiti uzorak nakon čega se ekstrakt, u sljedećem koraku, analizira primjenom odgovarajuće analitičke tehnike, primjerice tekućinskom kromatografijom (*off-line* način rada). *Off-line* način rada je klasičan primjer ekstrakcije čvrstom fazom pomoću polimera s otiskom molekule a uključuje kondicioniranje sorbensa, propuštanje uzorka, ispiranje interferencija i eluiranje analita (Slika 4).

Ovaj pristup rada je jednostavan za provođenje ali spor pa se povećava vjerojatnost onečišćenja ekstrakta čime se smanjuje iskorištenje. Za analizu se koriste instrumenti poput tekućinske kromatografije vezane s različitim detektorima, vrlo često spektrometrijom masa (engl. *mass spectrometry*, MS). Pesticid za suzbijanje korova (atrazin) je analiziran pomoću ovakvog načina rada [14].

Osnovna prednost *on-line* načina rada je povezanost s kromatografskim instrumentom što rezultira kraćim vremenom analize i boljim iskorištenjem zbog smanjenog gubitka analita. Na **slici 6** su prikazani koraci pripreme uzorka i kromatografska separacije tijekom *on-line* načina rada pri čemu se uzorak unosi u analitički sustav, analiti se akstrahiraju ekstrakcijom čvrstom fazom i separiraju tekućinskom kromatografijom, detektiraju na prikladnom detektoru i na kraju se dobiveni podaci obrađuju.



*Slika 6. On-line načina rada [15]*

#### 4. Primjena polimera s otiskom molekule u analizi uzoraka vode

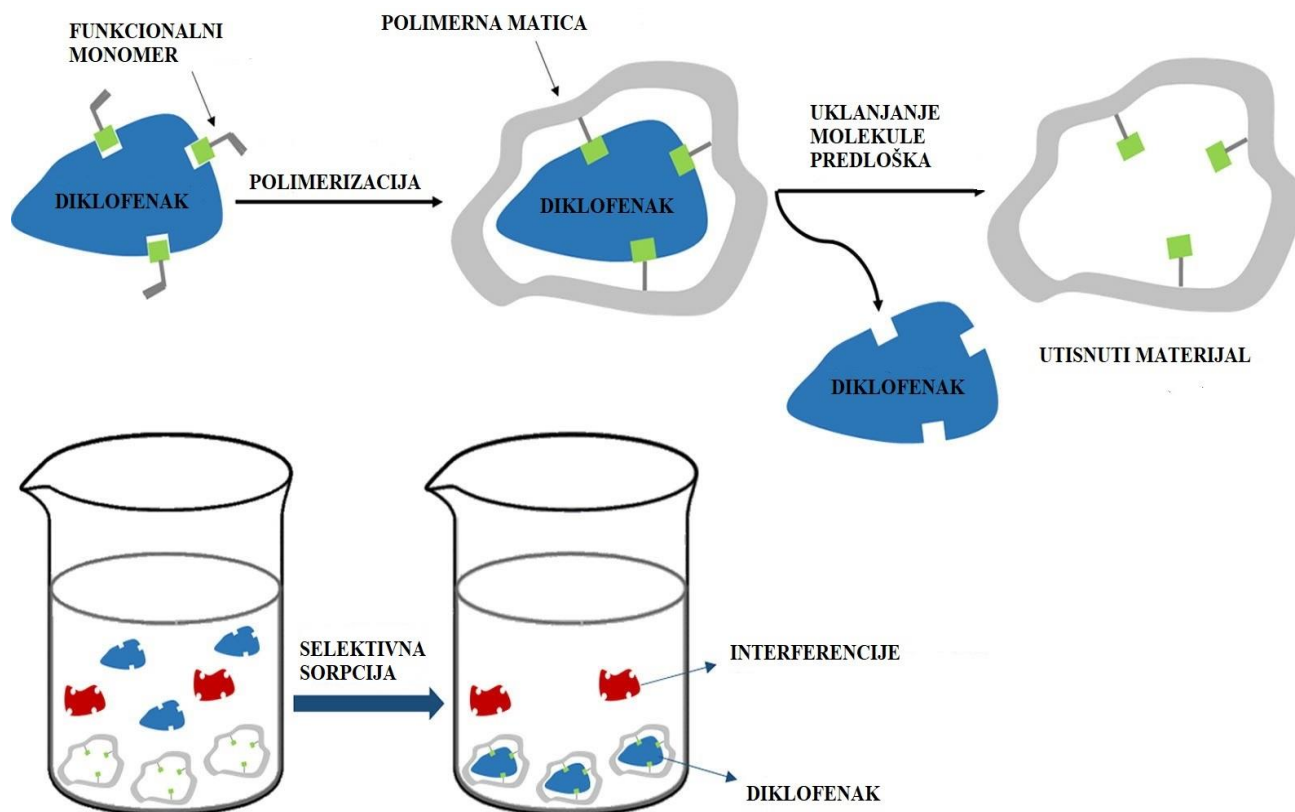
Za uspješnu ekstrakciju uz pomoć MIP-ova, izbor odgovarajućeg predloška igra veliku ulogu a osnova je usklađenost s funkcionalnim monomerom. Korištenje MIP-ova nudi obećavajuće rješenje kada je riječ o pripremi uzoraka iz okoliša za analizu različitih onečišćivala poput teških metala, pesticida, patogenih organizama, industrijskih boja itd. Teški metali uzrokuju onečišćenje vode te se na taj način akumuliraju i u biološke sustave. Upotreba MIP-ova se pokazala uspješnom za ekstrakciju teških metala, posebice za živu, u analizi uzorka vode zbog svoje dostupnosti, selektivnosti i pristupačne cijene. Provedena je ekstrakcija Hg(II) iz uzorka vode koristeći posebno dizajnirani polimer s otiskom iona (engl. *Ion Imprinted Polymer*, IIP) sa sposobnošću selektivnog vezivanja navedenog živinog (II) iona. Nakon konstrukcije Hg (II) elektrokemijskog senzora, uz pomoć elektrode od staklastog ugljika, korištena je metakrilna kiselina (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>) s ulogom funkcionalnog monomera, etilen glikol dimetakrilat (engl. *ethylene glycol dimethacrylate*, EGDMA) kao umreživač, amonij persulfat ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) koji pruža potrebnu aktivacijsku energiju

za pokretanje procesa. Nakon što je promatrano nakupljanje živinog (II) oksida na površini elektrode od staklastog ugljika u rasponu od 0,07 do 80 µg/L, utvrđena je granica detekcije koja iznosi 0,02 µg/L što je ispod preporuke Svjetske zdravstvene organizacije (engl. *World Health Organization*, WHO) [16].

Za analizu uzorka vode onečišćenog raznim sintetičkim bojama, primjena MIP-ova se također pokazala kao zadovoljavajuće rješenje zbog mogućnosti ponovnog korištenja pripremljenih polimera [16].

Ispiranje s poljoprivrednih površina, otpuštanje uslijed erozije iz tla, nepravilno zbrinjavanje i skladištenje samo su neki od razloga onečišćenja vode pesticidima. Stoga su mnogi spojevi iz kategorije insekticida, fungicida i herbicida učestalo detektirani u uzorcima voda iz okoliša u vrlo niskim koncentracijama. Kako bi se omogućila detekcija i kvantitativno određivanje niskih koncentracija pesticida, prije kromatografske analize neophodna je odgovarajuća priprema uzorka čime se uklanjaju interferencije i koncentriraju analiti. Stoga se primjena MIP-ova pokazala kao alternativno rješenje za pripremu uzoraka, što obuhvaća ekstrakciju i koncentriranje analita [16].

Osim prethodno navedenih primjera, farmaceutici također imaju utjecaj na kvalitetu vode. MIP je korišten kao sorbens kako bi se uklonile interferencije a ciljani analit izdvojio. Jedno istraživanje je provedeno koristeći MIP s funkcionalnim monomerom metakrilne kiseline i tilozin kao molekula predloška. Analizirano je deset skupina lijekova koji se koriste za liječenje bakterijskih infekcija (spiramicin, klaritromicin, eritromicin, tulatromicin, midekamicin, roksitromicin, josamicin, kitasamicin, tilmikozin i azitromicin). Primjenom ekstrakcije čvrstom fazom, MIP se pokazao kao uspješan sorbens za ekstrakciju lijekova [12]. Drugo istraživanje koje uključuje MIP, provedeno je s ciljem utvrđivanja učinkovitosti uklanjanja diklofenaka iz otpadne vode sorpcijom na MIP. Diklofenak je nesteroidni protuupalni lijek koji se često koristi za ublažavanje edema nakon raznih ozljeda. Posebno pripremljen selektivni MIP pokazao se uspješnim za uklanjanje diklofenaka iz uzorka otpadnih voda. Na **Slici 7** shematski je prikazana priprema selektivnog MIP-a jednostavnim postupkom polimerizacije koji veže diklofenak iz uzorka vode. Tijekom pet minuta uspješno je uklonjeno odnosno sorbirano oko 90 % diklofenaka iz uzorka vodene što je rezultiralo boljim iskorištenjem ekstrakcije u odnosu na konvencionalne sorbense [17].



**Slika 7.** Priprema selektivnog MIP-a i njegova primjena za sorpciju diklofenaka iz otpadne vode [17]

U radu L. M. Madikizela i sur. [18] je prikazana sinteza polimera s otiskom molekule koji je selektivan za ketoprofen, aktivnu tvar za liječenje blage do umjerene boli, i primijenjen je za sorpciju te tvari iz vode. MIP je sintetiziran metodom polimerizacije u masi na povišenoj temperaturi između 60 °C i 80 °C, pri čemu je ketoprofen korišten kao predložak, 2-vinilpiridin kao funkcionalni monomer, etilen glikol kao umreživalo, dimetakrilat kao porozna struktura, toluen kao otapalo i 1,1'-azobis(cikloheksankarbonitril) kao inicijator. Paralelno je sintetiziran i polimer bez otiska molekule. On je sintetiziran na isti način ali je u sintezi izostavljen ketoprofen. U radu je simulirana molekulska dinamika te je utvrđeno da se interakcije između predloška i

funkcionalnog polimera ostvaruju na osnovi vodikovih veza. To je potvrđeno i eksperimentalno kada je postignuta visoka učinkovitost ekstrakcije od > 90% pri pH 5 zbog protoniranja ketoprofena. U vremenu od 45 minuta došlo je do maksimalne sorpcije ketoprofena iz vode kojoj je bilo dodano 8 mg sorbensa, tj. funkcionalnog polimera. MIP je pokazao veću selektivnost od polimera bez otiska molekule postigavši relativni koeficijent selektivnosti od 7,7 prema ketoprofenu u prisutnosti strukturno srodnih farmaceutika. Redoslijed sorpcije na MIP iz vode bio je ketoprofen > fenoprofen > gemfibrozil. Modeli koji najbolje opisuju djelovanje ovog MIP-a su Langmuirova apsorpcijska izoterma i kinetički model pseudo-drugog reda, s maksimalnim kapacitetom sorpcije od  $8,24 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$  i konstantom brzine sorpcije od  $0,25 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  što ukazuje na kemisorpciju ketoprofena na mjesta vezanja na MIP-u. Ovaj rad je pokazao veliki potencijal MIP-a u selektivnom odvajanju ketoprofena iz otpadnih voda u odnosu na blisko srodne spojeve [18].

Selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*, SSRI) su klasa antidepresiva koji se često pronalaze u okolišu. To ukazuje da postojeće tehnike pročišćavanja otpadnih voda ne uklanjaju SSRI dovoljno uspješno. U ovom istraživanju ispitivan je potencijal polimera s otiskom molekule kao sorbensa za uklanjanje SSRI iz otpadnih voda. Sertralin je odabran kao predložak. Optimiziran je sastav MIP-a kako bi dobili materijale s najvećim kapacitetom za sorpciju, afinitetom i selektivnošću za sertralin. Uočeno je da je maksimalni kapacitet MIP-a za sertralin u vodi od  $72,6 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ . MIP je bio unakrsno reaktivan prema drugim SSRI i metabolitu sertralina, norsertralinu. MIP je pokazao stabilnost u rasponu pH između 6 i 8 u otpadnoj vodi te se mogao ponovno koristiti nakon kratkog ispiranja. Unatoč manjoj površini između  $27,4$  i  $193,8 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , u usporedbi s površinom aktivnog ugljena od  $1400 \text{ m}^2 \cdot \text{g}^{-1}$ , njihove sorpcijske sposobnosti u otpadnim vodama općenito su bile superiornije. MIP-ovi s većom površinom i volumenom pora koji su stvarali više nespecifičnih interakcija s molekulama od interesa znatno su pridonijeli ukupnoj učinkovitosti njihovog uklanjanja, što ih je učinilo prikladnijima za upotrebu u pročišćavanju otpadnih voda [19].



#### 4. Čimbenici koji utječu na ekstrakciju primjenom MIP-ova [14]

Kako bi se uspješno provela ekstrakcija uz pomoć polimera s otiskom molekule, potrebno je pratiti niz čimbenika koji mogu destabilizirati i smanjiti učinak djelovanja MIP-ova. Među najznačajnijima su: utjecaj pH-vrijednosti, utjecaj količine sorbensa, utjecaj volumena uzorka, izbor otapala eluiranje, utjecaj brzine protoka uzorka, utjecaj dodatka soli i utjecaj ionske jakosti.

- **Uticaj pH-vrijednosti**

Važna uloga u postupku ekstrakcije čvrste faze pomoću polimera s otiskom molekule pripisuje se pH-vrijednosti uzorka iz kojega se ekstrahira analit. Točno određena pH-vrijednost ima značajan utjecaj na specifične međumolekularne interakcije (ionske interakcije, vodikove veze i hidrofobne interakcije između analita i polimera s otiskom molekule) koje su prisutne u ekstrakcijskom procesu. Učinkovita adsorpcija analita na sorbens, o čemu ujedno ovisi i učinkovitost ekstrakcije, određena je poželjnim interakcijama određenim pH-vrijednosti.

- **Uticaj mase sorbensa**

Unaprijed optimizirana masa sorbenta treba biti unutar raspona masa koji omogućavaju potpunu ekstrakciju ciljanog analita. Za sprječavanje reakcije neželjenih tvari s polimerom s otiskom molekule potrebno je procijeniti i odrediti masu koja neće ometati vezanje analita na MIP. Maranata i suradnici [14] su ispitivali utjecaj mase sorbensa na učinkovitost ekstrakcije pomoću polimera s otiskom molekule za farmaceutski spoj koji se koristi za kontrolu aritmije - sotalol. Primjenom različite količine sorbensa (100 – 500 mg), došli su do zaključka da se najveće iskorištenje postiže ukoliko je analit u potpunosti vezan na sorbens (optimalna količina za postizanje visokog stupnja iskorištenja).

- **Uticaj volumena uzorka**

Potrebno je pažljivo odabrati volumen uzorka što je pokazalo istraživanja koje su proveli Sanagi i sur. [14]. U ovom istraživanju uočeno je kako iskorištenje analita raste s povećanjem volumena uzorka od 5 mL do 10 mL, nakon čega je došlo do značajnog smanjenja iskorištenja. Razlog slabijem iskorištenju ekstrakcije analita pri upotrebi uzorka volumena od 5 mL može se pripisati nedostatku interakcije između analita i aktivnih mjesta uzorka za ekstrakciju. Najbolje iskorištenje za čvrste sorbense pokazao je uzorak volumena 10 mL, što ukazuje na potpuno vezivanje analita

za aktivna mjesta. Povećanje volumena uzorka preko 10 mL rezultiralo je prezasićenjem aktivnih mjesta sorbensa čime se onemogućilo vezivanje analita za aktivna mjesta. Iako povećanjem volumena uzorka dolazi do povećanja učinkovitost, nužno je regulirati volumen uzorka kako bi se ekstrakcija analita odvijala nesmetano a time osigurala ponovljivost metode.

- **Utjecaj otapala za eluiranje**

Svrha otapala za eluiranje je regulacija specifičnih interakcija između analita i polimera s otiskom molekule i mogućih interakcije koje ometaju vezanje analita na MIP. Ključan faktor, koji određuje u kojoj mjeri će analit biti uspješno eluiran, je polarnost otapala za eluiranje. Ukoliko je analit polaran, otapalo za eluiranje mora biti također polarno i obratno. Koncentraciju, fizikalno-kemijska svojstva i količinu otapala za eluiranje potrebno je prilagoditi kemijskim svojstvima analita.

- **Utjecaj brzine protoka uzorka**

Ukoliko je vrijeme kontakta uzorka i sorbensa prekratko, postoji mogućnost da se sav analit ne veže za MIP. S druge strane, ukoliko je vrijeme kontakta predugo, paralelno sa sorpcijom dolazi do desorpcije analita sa sorbens. Ispitivanja utjecaja brzine protoka uzorka na učinkovitost sorpcije florfenikola pokazao je smanjenu učinkovitost sorpcije florfenikola kada su brzine protoka bile veće od 2 mL/min. Razlog tome su ograničene interakcije između florfenikola i polimera s otiskom molekule. Niske brzine protoka uzorkuju smanjenje učinkovitosti sorpcije odnosno desorpcije sorniranih spojeva iz sorbensa a povećanjem protoka dolazi do rasta tlaka u sustavu [14]. Općenito, brzina protoka uzorka tijekom eluiranja se održava ispod 1 mL/min.

- **Utjecaj dodatka soli i ionske jakosti**

Kao i prilikom izbora vrste otapala za eluiranje, polarnost analita određuje količinu soli koju je potrebno dodati. Prema istraživanju Djozana i sur. [14], rezultati su pokazali da porastom koncentracije soli u otopini dolazi do smanjenja učinkovitosti ekstrakcije za 10 %. Dodatak soli u vodenu otopinu može rezultirati smanjenjem potrebne količine otapala koja je dostupna otopljenim molekulama analita zbog formiranja hidratacijske sfere oko iona koji proizlaze iz molekula soli i može poboljšati učinkovitost ekstrakcije za ciljne analite.

## 5. ZAKLJUČAK

Priprema uzorka je ključni korak u postupku kemijske analize jer utječe na pouzdanost rezultata. Postupci pripreme uzorka vode uključuju ekstrakciju analita, uklanjanje interferencija te koncentriranje. Za analizu farmaceutika u uzorcima voda iz okoliša najčešće se kao metoda pripreme uzorka primjenjuje ekstrakcija čvrstom fazom (SPE). Odabir između različitih komercijalno dostupnih sorbensa ovisi o ciljanim analitima i sastavu ispitivanog uzorka. Korištenjem polimera s otiskom molekule kao sorbensa omogućava postizanje visoke selektivnosti. Nekoliko je čimbenika koji mogu utjecati na učinkovitost SPE uz primjenu MIP-a, poput pH, mase sorbensa, volumena i brzine protoka uzorka, izbora otapala za eluiranje te ionske jakosti. Odabir optimalnih eksperimentalnih uvjeta izuzetno je važan jer utječe na formiranje odgovarajućih interakcija između ciljane molekule i sorbensa te time na učinkovitost ekstrakcije.

## 6. POPIS KRATICA I OZNAKA

SLE (engl. *solid liquid extraction*) – ekstrakcija čvrstom fazom

LLE (engl. *liquid liquid extraction*) – ekstrakcija tekuće - tekuće

SPME (engl. *solid phase microextraction*) - mikroekstrakciju čvrstom fazom

LPME (engl. *liquid phase microextraction*) - mikroekstrakcija tekućom fazom

SBSE (engl. *stir-bar sorptive extraction*) – mikroekstrakcija miješalom

MSPE (engl. *magnetic solid phase extraction*) - magnetska ekstrakcija čvrstom fazom

PLE – (engl. *pressurized liquid extraction*) – ekstrakcija otapalom pod pritiskom

SHWE – (engl. *superheated water extraction*) - ekstrakcija pregrijanom vodom

MAE – (engl. *microwave-assisted extraction*) - ekstrakcija mikrovalovima

MSPD – (engl. *matrix solid-phase dispersion*) - raspršenja matrice uzorka kroz čvrstu fazu

MIP (engl. *molecularly imprinted polymers*) - polimer s otiskom molekule

RAM (engl. *restricted-access materials*) - materijali s ograničenim pristupom

MS/MS – (engl. *tandem mass spectrometry*) - tandemaska spektrometrija masa

LC-MS (engl. *liquid chromatography - mass spectrometry*) - tekućinska kromatografija spregnuta sa spektrometrijom masa

HPLC (engl. *high-performance liquid chromatography*) - tekućinska kromatografija visoke djelotvornosti

WHO (engl. *World Health Organization*) - Svjetska zdravstvena organizacija

SSRI (engl. *selective serotonin reuptake inhibitors*) - selektivni inhibitori ponovne pohrane serotonina

## 7. LITERATURA

- [1] H. Kataoka, Column-Switching Sample Preparation, u: J. Pawliszyn (ur.), Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Analytical Techniques for Scientists, volumen 2, Elsevier, Amsterdam, 2012., str. 649-676.
- [2] Y. Meng, J. L. Anderson, Use of Unconventional Solvents for Sample Preparation in Environmental Analysis, u: J. Pawliszyn (ur.), Comprehensive Sampling and Sample Preparation, Analytical Techniques for Scientists, volumen 3, Elsevier, Amsterdam, 2012., str. 943-970.
- [3] <https://encyclopedia.pub/entry/713> (Pristup 12.06.2023.)
- [4] M. Kaštalan-Macan, D. Mutavdžić, S. Babić, Novi postupci priprave uzorka za određivanje organskih tvari u vodi, Hrvatske vode, 12 (2004) 47, 115-124.
- [5] A. Mornar, I. Marinac-Andić, D. Amidžić Klarić, J. Kovačić, Mikroekstrakcija čvrstom fazom-inovativni pristup u bioanalitičkim istraživanjima, Kem. Ind., 71 (2022) 639-652.
- [6] E. Yilmaz, M. Soylak, Type of new generation separation and preconcentration methods u: M. Soylak, E. Yilmaz (ur.), New Generation Green Solvents for Separation and Preconcentration of Organic and Inorganic Species, Elsevier, Amsterdam, 2020., str. 75-148.
- [7] S. Babić, D. Mutavdžić Pavlović, Analysis of PhACs in Solid Environmental Samples (Soil, Sediment, and Sludge), u: M. Petrović, S. Perez, D. Barcelo (ur.), Analysis, Removal, Effects and Risk of Pharmaceuticals in the Water Cycle, volumen 62, 2. izdanje, Elsevier, Amsterdam, 2013., str. 129-167.
- [8] [https://www.rocker.com.tw/en/application/solid\\_phase\\_extraction/](https://www.rocker.com.tw/en/application/solid_phase_extraction/) (Pristup 3.7.2023.)
- [9] A. Malik, New polymeric extraction materials, u: J. Pawliszyn (ur.), Sampling and Sample Preparation for Field and Laboratory, volumen 37, Elsevier, Amsterdam, 2002., str. 1023-1080.
- [10] N. Fontanals, R. M. Marce, F. Borrull, Materials for Solid-Phase Extraction of Organic Compounds, Separations, 6 (2019) 56.

- [11] O. Kotrotsiou, C. Kiparissides, Water treatment by molecularly imprinted materials u: S. Tomas, D. Pasquini, S.-Y. Leu, D. A. Gopakumar (ur.), Nanoscale Materials In Water Purification, Elsevier, Amsterdam, 2019., str. 179-230.
- [12] A. N. Hasanah, N. Safitri, A. Zulfa, N. Neli, D. Rahayu, Factors Affecting Preparation of Molecularly Imprinted Polymer and Methods on Finding Template-Monomer Interaction as the Key of Selective Properties of the Materials, *Molecules*, 26 (2021) 5612.
- [13] M. Parlapiano, Ç. Akyol, A. Foglia, M. Pisani, P. Astolfi, A. L. Eusebi, F. Fatone, Selective removal of contaminants of emerging concern (CECs) from urban water cycle via Molecularly Imprinted Polymers (MIPs): Potential of upscaling and enabling reclaimed water reuse, *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 9 (2021) 105051.
- [14] G. J. Maranata, N. O. Surya, A. N. Hasanah, Optimising factors affecting solid phase extraction performances of molecular imprinted polymer as recent sample preparation technique *Heliyon*, 7 (2021) 1-12.
- [15] <https://www.chromedia.org/chromedia?waxtrapp=sptlvLsHiemBpdmBIIEcCI&subNav=zzwxzLsHiemBpdmBIIEcCIfC> (Pristup 1.8.2023.)
- [16] M. G. Metwally, A. H. Benhawy, R. M. Khalifa, R. M. El. Nashar, M. Trojanowicz, Application of Molecularly Imprinted Polymers in the Analysis of Waters and Wastewaters, *Molecules*, 26 (2021) 6515.
- [17] M. Cantarella, S. C. Carroccio, S. Dattilo, R. Avolio, R. Castaldo, C. Puglisi, V. Privitera, Molecularly imprinted polymer for selective adsorption of diclofenac from contaminated water, *Chemical Engineering Journal*, 367 (2019) 180-188.
- [18] L. M. Madikizela, S. S. Zunngu, N. Y. Mlunguza, N. T. Tavengwa, P. S. Mdluli, L. Chimuka, Application of molecularly imprinted polymer designed for the selective extraction of ketoprofen from wastewater, *Water SA*, 44 (2018) 406-418.
- [19] T. Gornik, S. Shinde, L. Lamovsek, M. Koblar, E. Heath, B. Sellergren, T. Kosjek, Molecularly Imprinted Polymers for the Removal of Antide-Pressants from Contaminated Wastewater, *Polymers*, 13 (2020) 1-19.

## 8. ŽIVOTOPIS:

Josipa Mlinarević [REDACTED] Tijekom pohađanja osnovne škole Ivane Brlić Mažuranić, Ljubuški nagrađena je za projekt „Juriš na okoliš“ u organizaciji Goethe - Instituta Bosne i Hercegovine kao najbolja učenica njemačkog jezika. Osnovnu školu i osnovnu glazbenu školu za klavir završila je 2013. godine a potom je upisala opću gimnaziju Sestara Milosrdnica u Ljubuškom, koju je završila 2017. godine. Godine 2019. upisuje prvu godinu na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, preddiplomski studij Kemijsko inženjerstvo. Stručnu praksu odradila je u firmi Plastform d.o.o. u Zagrebu. Radila je kao stručni suradnik u rješavanju problemskih zadataka na područjima opće kemije, analitičke kemije, fizikalne kemije te organske kemije za tvrtku Quizlet. Tijekom školovanja položila je certifikat C1.1 iz engleskog jezika te B2 iz njemačkog jezika.